



# DIPLOMARBEIT

„Stabilitätsstudien und Testung des  
antiinflammatorischen Potentials einzelner Fraktionen  
von *Caesalpinia sappan*“

verfasst von

Sofie Deix

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt: A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt: Diplomstudium Pharmazie

Betreut von: o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein



## **Danksagung**

Ein recht herzliches Dankeschön gilt o. Univ.-Prof. Mag. Dr. Helmut Viernstein, der mir eine Diplomandenstelle am Department für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie zur Verfügung gestellt hat.

Ein besonderer Dank gilt auch meiner Betreuerin Frau MMag. DI Dr. Monika Müller für die Auswahl des interessanten Themas sowie die fachliche und persönliche Betreuung während der Verfassung meiner Diplomarbeit. Danke, dass ich dich immer mit all meinen Fragen ‚löchern‘ durfte!

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken, die mich sehr gut aufgenommen haben und mir mit Rat und Tat zur Seite gestanden haben.

Ein spezieller Dank gilt Mag. Roswitha Schuster, die auch immer ein offenes Ohr für meine Fragen hatte.

Der größte Dank geht an meine Familie und Freunde, die mich in jeglicher Form unterstützt, meine Launen die ganze Zeit über mit viel Geduld ertragen und immer an mich geglaubt haben.



## Abstract (Deutsch)

Die Behandlung von Entzündungen hat einen sehr hohen Stellenwert in der heutigen Pharmakotherapie. Es scheint daher sinnvoll, nach therapeutisch wirksamen Leitstrukturen im Pflanzenreich zu suchen. Extrakte aus *Caesalpinia sappan* sind vor allem in Asien eine sehr beliebte pflanzliche Alternative zur Behandlung von Entzündungen.

Im Rahmen der vorliegenden Diplomarbeit wurden fünf Fraktionen von *Caesalpinia sappan* auf die Zytokinfreisetzung (Interleukin-6, Tumornekrosefaktor alpha und Interleukin-10) aus Makrophagen und Chondrozyten untersucht. Wie schon durch vorherige Studien bestätigt, zeigt vor allem Brazilin eine sehr starke antiinflammatorische Wirkung, betreffend die Interleukin-6- und Tumornekrosefaktor alpha - Sekretion aus Chondrozyten. Aber auch die Fraktionen 2 und 4 reduzierten sowohl die Interleukin-6-Freisetzung als auch die Tumornekrosefaktor alpha-Sekretion aus Chondrozyten bzw. Makrophagen in ausreichendem Maße, sodass von einer entzündungshemmenden Wirkung ausgegangen werden kann. Einen interessanten Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen könnten die als Fraktion 7 zusammengefassten apolaren Verbindungen darstellen, welche die Interleukin-6-Sekretion aus Makrophagen signifikant verringern konnte.

Des Weiteren wurden verschiedene Lagerungsstudien durchgeführt, um das Verhalten der Fraktionen bei längerer Lagerung in Lösung zu beschreiben. Sowohl bei den Lagerungsstudien des Gesamtextraktes von *Caesalpinia sappan* als auch bei denen von Brazilin zeigte sich, dass Abbau- und Umlagerungsreaktionen stattfanden, welche auch durch die Zugabe von  $\beta$ -Cyclodextrin nicht unterbunden werden konnten. Die Fraktionen 1 und 5 wiesen im sauren Milieu keine sehr hohe Stabilität auf, vielmehr erfolgte eine kontinuierliche Umlagerung in Brazilin. Auch hier förderte  $\beta$ -Cyclodextrin nicht die Stabilität. Die Auftrennung konnte jedoch durch Weglassen der Säure im Laufmittel soweit optimiert werden, dass jeweils eine reine und stabile Fraktion 1 und 5 gewonnen werden konnte.



## Abstract (Englisch)

The treatment of inflammation is a very important aspect in today's pharmaceutical care. Therefore, it appears necessary to search for active agents in plants. Especially in Asia, extracts of *Caesalpinia sappan* are common alternatives when it comes to the treatment of inflammation.

Within the context of this diploma thesis, certain fractions of *Caesalpinia sappan* were tested for the release of cytokines (interleukin-6, tumor necrosis factor alpha and interleukin-10) from macrophages and chondrocytes. The very strong anti-inflammatory effect of brazilin, regarding the secretion of interleukin-6 and tumor necrosis factor alpha from chondrocytes, was already proven by previous studies. Also, fractions 2 and 4 reduced the interleukin-6 release as well as the tumor necrosis factor alpha secretion from chondrocytes and makrophages respectively to a sufficient degree, hence an anti-inflammatory effect can be assumed. For further research the apolar compounds could be an interesting starting point. They were summed up as fraction 7, which reduced the secretion of interleukin-6 of macrophages.

Furthermore, various storage studies were undertaken to describe the behavior of the fractions under long-term storage. Both storage studies, the one concerning the total extract of *Caesalpinia sappan* as well as the one concerning brazilin, showed reduction as well as redistribution reactions, which also could not be significantly prevented by adding  $\beta$ -cyclodextrin. Furthermore, fractions 1 and 5 did not show high stability in acidic milieu, resulting in a continuous redistribution to brazilin. Again  $\beta$ -cyclodextrin did not boost stability. In a further step, the separation was optimized by using running buffers without acid, so that pure and stable fraction 1 and 5 could be obtained.



# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1	Entzündung .....	1
1.2	Entzündungsmediatoren .....	2
1.3	Zytokine .....	3
1.4	Makrophagen .....	4
1.5	<i>Caesalpinia sappan</i> .....	5
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>8</b>
2.1	Extrakterstellung aus <i>Caesalpinia sappan</i> .....	8
2.2	Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC) .....	8
2.2.1	Analytische HPLC von <i>Caesalpinia sappan</i> - Extrakt .....	8
2.2.2	Präparative HPLC von <i>Caesalpinia sappan</i> - Extrakt .....	11
2.2.2.1	Präparative HPLC mit säurehaltigem Laufmittel .....	11
2.2.2.2	Präparative HPLC mit säurefreiem Laufmittel .....	13
2.2.3	Stabilitätsmessung des <i>Caesalpinia sappan</i> -Extrakts (CSE) .....	13
2.2.3.1	Herstellung der Ansätze .....	13
2.2.3.2	HPLC-Methode .....	13
2.2.4	Stabilitätsmessung des Brazilins .....	14
2.2.4.1	Herstellung der Ansätze .....	14
2.2.5	Stabilitätsmessung von Fraktion 1 und Fraktion 5 mit und ohne Zusatz von $\beta$ -Cyclodextrin .....	14
2.2.6	Verhalten der Fraktionen 1 und 5 auf Säurezusatz .....	15
2.3	Aufarbeitung der Fraktionen .....	15
2.4	Zellkultur .....	15
2.4.1	Zelllinien .....	16
2.4.2	Kultivierung der Zellen .....	16
2.4.3	Passagieren der Zellen .....	17

2.4.4	Test auf antiinflammatorische Wirkung.....	17
2.4.5	Der Zytotoxizitätstest.....	19
2.4.6	Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA) .....	20
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion.....</b>	<b>21</b>
<b>3.1</b>	<b>Analytische HPLC von <i>Caesalpinia sappan</i>- Extrakt .....</b>	<b>21</b>
<b>3.2</b>	<b>Stabilitätsmessung des Gesamtextrakts von <i>Caesalpinia sappan</i> (CSE) .....</b>	<b>22</b>
3.2.1	Stabilität von CSE in wässriger Lösung .....	23
3.2.2	Stabilität von CSE in wässriger Lösung mit $\beta$ -Cyclodextrin .....	24
<b>3.3</b>	<b>Stabilitätsmessung von Brazilin .....</b>	<b>25</b>
3.3.1	Brazilin in wässriger Lösung .....	25
3.3.2	Brazilin in wässriger Lösung unter Zusatz von $\beta$ -Cyclodextrin .....	26
3.3.3	Vergleich der Stabilität von Brazilin in Wasser mit oder ohne $\beta$ -Cyclodextrin .....	27
<b>3.4</b>	<b>Stabilitätsmessung von Fraktion 1 nach der Trennung mit 0,1 % TFA im Laufmittel .....</b>	<b>28</b>
3.4.1	Stabilität von Fraktion 1 ohne Zusatz von $\beta$ -Cyclodextrin.....	29
3.4.2	Stabilität von Fraktion 1 in wässriger Lösung unter Zusatz von $\beta$ -Cyclodextrin.....	30
<b>3.5</b>	<b>Stabilitätsmessung von Fraktion 5 nach der Trennung mit 0,1 % TFA im Laufmittel .....</b>	<b>31</b>
3.5.1	Stabilität von Fraktion 5 in wässriger Lösung.....	32
3.5.2	Stabilität von Fraktion 5 in wässriger Lösung unter Zusatz von $\beta$ -Cyclodextrin.....	33
<b>3.6</b>	<b>Lagerungsstudie von Fraktion 1 und 5 in säurehaltigem Medium.....</b>	<b>34</b>
3.6.1	Lagerung von F1 in Laufmittel A .....	36
3.6.2	Lagerung von F1 in künstlichem Magensaft .....	37
3.6.3	Lagerung von F5 in Laufmittel A .....	38
3.6.4	Lagerung von F5 in künstlichem Magensaft .....	39
<b>3.7</b>	<b>Antiinflammatorische Wirkung einzelner Fraktionen von <i>Caesalpinia sappan</i>- Extrakt .....</b>	<b>40</b>
3.7.1	Interleukin-6-Ausschüttung aus Makrophagen.....	40
3.7.2	TNF- $\alpha$ -Ausschüttung aus Makrophagen .....	42
3.7.3	Interleukin-10-Ausschüttung aus Makrophagen .....	42

3.7.4	Interleukin-6-Ausschüttung aus Chondrozyten .....	43
3.7.5	TNF- $\alpha$ -Ausschüttung aus Chondrozyten .....	44
3.7.6	Interleukin-10-Ausschüttung aus Chondrozyten .....	45
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>46</b>
<b>5</b>	<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>48</b>
6	Tabellenverzeichnis.....	50
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>52</b>
<b>8</b>	<b>Curriculum Vitae .....</b>	<b>57</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Entzündung

Eine Entzündung lässt sich als Gegenreaktion des Organismus auf eine schädigende Noxe auffassen. Das primäre Ziel einer Entzündungsreaktion ist, diese Noxe zu beseitigen.

Die eine Entzündung auslösenden Noxen kann man in zwei Gruppen einteilen:

- unbelebte: mechanische (z.B. Druck, Stich), physikalische (z.B. Hitze, Kälte, Strom), chemische (z.B. Säuren, Laugen) und Allergene
- belebte: Bakterien, Viren, Protozoen, Parasiten, Pilze (Thomas, 2006)

Diese Noxen bewirken eine Gewebeschädigung (Aleration), welche zur Freisetzung von Entzündungsmediatoren führt. Sie dienen als Startschuss für kaskadenartig ablaufende vaskuläre und zelluläre Reaktionen, welche den Entzündungsprozess darstellen.

Das Ziel der Entzündung ist es, das schädigende Agens zu beseitigen und die normale Gewebeintegrität wiederherzustellen (Böcker et al., 2008).

Klinische Zeichen einer akuten Entzündung sind:

- Rötung (Rubor)
- Schwellung (Tumor)
- Wärme (Calor)
- Schmerz (Dolor)
- Funktionseinschränkung (Functio laesa) (Steffers et al., 2011)

## 1.2 Entzündungsmediatoren

Nach einer Gewebeschädigung wird eine Vielzahl von chemischen Botenstoffen freigesetzt, welche die Intensität und den Ablauf der Entzündungsreaktion steuern (Thomas, 2006).

Diese Mediatoren lassen sich in 3 Hauptgruppen einteilen:

### ❖ Zytogene Mediatoren

- biogene Amine: Serotonin und Histamin
- lipogene Mediatoren: Eikosanoide (Prostaglandine, Leukotriene, Prostacyclin, Thromboxan, Lipoxine), Plättchen-aktivierender Faktor

### ❖ Serogene Mediatoren

- Kallikrein-Kininsystem
- Komplementsystem

### ❖ Zytokine

- Interleukine
- Tumornekrosefaktoren
- Chemokine
- Interferone
- Wachstumsfaktoren

Zytogene Mediatoren, die vorwiegend lokal wirken, werden am Ort der Entzündung entweder selbst gebildet oder freigesetzt.

Serogene Mediatoren liegen in inaktiver Form außerhalb des Entzündungsherd vor. Sie gelangen mit dem entzündlichen Exsudat zum Ort der Entzündung und werden dann dort aktiviert (Egger, 2005).

### **1.3 Zytokine**

Zytokine sind eine sehr heterogene Gruppe. Sie können Proteine und Polypeptide sein und eine Vielzahl von Zellfunktionen steuern (Curfs et al., 1997). Sie spielen eine wichtige Rolle bei Entzündungen oder anderen Immunprozessen. Sie regulieren dabei z.B. die Proteinsynthese oder die Zellteilung (Madigan et al., 2001). Zytokine sind Mediatoren, die parakrin oder autokrin, einige aber auch endokrin wirken können (Stadnyk, 1994). Im Rahmen der angeborenen Immunantwort werden die Zytokine meist durch Makrophagen freigesetzt und regulieren die Infektion in der Anfangsphase (Roitt et al., 1995). T-Lymphozyten, welche wichtige Zellen der erworbenen Immunantwort darstellen, können ebenfalls Zytokine freisetzen (Vollmar et al., 2012).

#### **Tumornekrosefaktor alpha (TNF- $\alpha$ )**

TNF- $\alpha$  zählt zu den bedeutendsten proinflammatorischen Zytokinen und spielt eine wichtige Rolle bei der Immunantwort und bei der Entstehung von Entzündungen. Er übernimmt auch eine Kontrollfunktion bei dem Zellwachstum, der Zelldifferenzierung und Apoptose. TNF- $\alpha$  wird von aktivierten Makrophagen, T-Lymphozyten, Keratinozyten, Fibroblasten und einigen Tumorzellen produziert (Baud et al., 2001) und kann z. B. über die Freisetzung anderer Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) wichtige lokale und systemische Entzündungsreaktionen steuern (Vollmar et al., 2012). Die Hauptwirkungen von TNF- $\alpha$  sind die Aktivierung von Granulozyten, Makrophagen und zytotoxischen T-Zellen. Weitere Wirkungen sind Kachexie, Stimulation der Akut-Phase-Reaktion, Fieber sowie Angiogenese (Roitt et al., 1995).

#### **Interleukin-6 (IL-6)**

IL-6 wird wie TNF- $\alpha$  zu den proinflammatorischen Zytokinen gezählt, ist diesem aber untergeordnet (Vollmar et al., 2012). IL-6 wird von Makrophagen, Fibroblasten, T-Zellen, Astrozyten und Endothelzellen exprimiert (Horn et al., 2000). Während einer akuten Entzündung fördert es die Vermehrung und Aktivierung von T-Zellen, initiiert

die Differenzierung von B-Zellen und steuert die Produktion von Akut-Phase-Reaktoren wie z. B. C-reaktives Protein in der Leber (Lee et al., 2012). Es ist auch für die B-Zell-Aktivierung verantwortlich und fördert die Reifung von Makrophagen und Blutplättchen (Martin et al., 2009).

### **Interleukin-10 (IL-10)**

IL-10 wird von TH-2-Zellen sezerniert und inhibiert die Synthese von Zytokinen in TH-1-Zellen. Deshalb wurde es „Cytokin-inhibierender Faktor“ genannt (Fiorentino et al., 1989). Erst später wurde es in Interleukin 10 umbenannt.

IL-10 hat wie die meisten Zytokine pleiotrope Effekte auf das Immunsystem und Entzündungen (Acuner-Ozbabacan et al., 2014). Es wird vor allem von T-Helferzellen, aber auch von z. B. Makrophagen, Monozyten, B-Zellen und natürlichen Killerzellen sezerniert (Iyer et al., 2012). Es wirkt als antiinflammatorisches Zytokin (Kaur et al., 2008) mit der Hauptaufgabe, eine inflammatorische Reaktion zu begrenzen und schlussendlich auch zu beenden (Moore et al., 2001). IL-10 ist ein wirksamer Inhibitor von proinflammatorischen Zytokinen (Moore et al., 2001) und vermindert auf diese Weise die Immunreaktion. Es vermag z. B. die Produktion von TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 und IL-12 zu hemmen (Mellati et al., 2007). Des Weiteren ist IL-10 in der Lage, die Aktivität von antigenpräsentierenden Zellen wie z.B. Makrophagen zu vermindern (Opal et al., 1998).

## **1.4 Makrophagen**

Sie lösen eine Entzündung durch Phagozytose von bakteriellen, viralen oder fungiziden Pathogenen aus. Dadurch wird eine wirksame Immunabwehr eingeleitet. Makrophagen schütten Chemokine aus und locken so andere Immunzellen wie z. B. neutrophile Granulozyten zum Entzündungsherd.

Zu den wichtigsten proinflammatorischen Funktionen von Makrophagen zählen vor allem die Antigenpräsentation gegenüber T-Zellen, aber auch die Bildung von

Zytokinen, wie z. B. IL-12, TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Butcher et al., 2001; Oberholzer et al., 2001).

## 1.5 *Caesalpinia sappan*



Abbildung 1 Illustration von *Caesalpinia sappan* L. (<http://www.botanicus.org/page/280088>; aufgerufen am 27.11.2014)

*Caesalpinia sappan* L., (*Caesalpiniceae*), dargestellt in Abbildung 1, kommt in Thailand, Vietnam, Indonesien, Indien, Burma, Süd- und Südwestchina vor (Flora of China). Der größte medizinische Nutzen wird dem Sappanholz (Abbildung 2), wie das getrocknete Kernholz genannt wird, zugeschrieben. Das orange-rote Holz ist sehr beliebt in der Traditional Chinese Medicine (TCM) und wird bei Menorrhagie, cerebro- und kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt (Chinese Pharmacopoeia Commission, 2010).

Auch in der Ayurveda kommt es zum Einsatz, z. B. bei Hauterkrankungen, Durchfall, Lepra, Dysterie, Verbrennungen, Wunden, Ulzera, Epilepsie, Diabetes und

Leukorrhoe (Badami et al., 2003).

In zahlreichen Studien konnten weitere Wirkungen festgestellt werden:

- antiinflammatorische Wirkung (Jeong et al., 2008)
- hypoglykämische Aktivität (Kim et al., 1998)
- hepatoprotektive Wirkung (Srilakshmi et al., 2010)
- antioxidative Wirkung (Badami et al., 2003)
- vasorelaxierende Wirkung (Xie et al., 2000)
- antikonvulsive Wirkung (Baek et al., 2000)
- antibakterielle Wirkung (Xu et al., 2004)



Abbildung 2 Sappanholz ( Wu , 2011)

Die Hauptkomponente des Sappanholzes ist der rote Farbstoff Brazilin [7,11b-dihydrobenz[b]indeno[1,2-d]pyran-3,6a,9,10(6H)-tetro] (Abbildung 3), ein tetrazyklisches Homoisoflavonoid (Hikino et al., 1977). In zahlreichen Studien konnte festgestellt werden, dass Brazilin zahlreiche biologische Effekte ausübt. Es wirkt z. B. thrombozytenaggregationshemmend (Hwang et al., 1998), vasorelaxierend (Hu et al., 2003), hemmt die Freisetzung von Insulinrezeptorkinase und Proteinkinase C (Kim et al., 1998) und besitzt eine entzündungshemmende Aktivität (Sasaki et al., 2007).

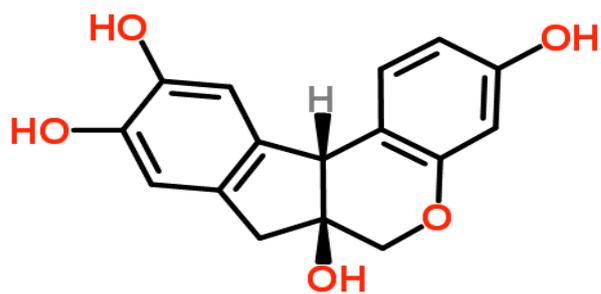


Abbildung 3 Strukturformel von Brazilin

(<http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=66104&mode=2d> ; aufgerufen am 19.10. 2014)

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Extrakterstellung aus *Caesalpinia sappan***

30 mg des zerkleinerten Sappanholzes wurden mit 300 ml 96 %igem Ethanol (EtOH) versetzt und für 24 Stunden bei Raumtemperatur extrahiert. Nach Beendigung der Extraktionszeit wurde der Extrakt filtriert und anschließend am Rotavapor zur Trockene eingedampft.

Für die HPLC-Analysen wurde der Extrakt in 20%igem Ethanol gelöst.

### **2.2 Hochleistungs-Flüssigchromatographie (HPLC)**

Die HPLC ist ein Verfahren der Säulen-Flüssigkeits-Chromatographie, bei der Substanzgemische getrennt werden können. Sie dient auch zu deren quantitativer und qualitativer Analyse oder zur präparativen Auftrennung (Rücker et al., 2008).

Das Trennprinzip beruht auf der Verteilung zwischen zwei nicht mischbaren Phasen. Bei dem Verfahren wird die Probenflüssigkeit mittels einer flüssigen Phase (Elutionsmittel, Laufmittel) unter Anwendung von hohem Druck über die stationäre Phase (Trennsäule) transportiert und so getrennt (Otto, 2011).

#### **2.2.1 Analytische HPLC von *Caesalpinia sappan*- Extrakt**

Für die Charakterisierung des Extraktes von *Caesalpinia sappan* wurde folgendes System verwendet:

<b>System</b>	UltiMate 3000 RS (Thermo Fisher Scientific)
<b>Pumpe</b>	UltiMate 3000 Pump
<b>Ofen</b>	UltiMate 3000 RS Column Compartment
<b>Sampler</b>	UltiMate 3000 Autosampler
<b>Detektor</b>	UltiMate 3000 Diode Array Detector
<b>Stationäre Phase</b>	Kinetex™ C18, 5µm Partikelgröße, 100 Å, 150x4,6mm (Phenomenex)
<b>Mobile Phase</b>	<p><b>Eluent A:</b> Wasser (HPLC Reinheit), 5 % Acetonitril (HPLC Optigrade) 0,1 % Trifluoressigsäure (TFA, Sigma Aldrich)</p> <p><b>Eluent B:</b> Acetonitril 0,1 % TFA</p>
<b>Detektionswellenlängen</b>	254 nm, 280 nm
<b>Flussrate</b>	0,5 ml/min
<b>Injektionsvolumen</b>	20 µl
<b>Temperatur</b>	40 °C

Tabelle 1 Methode für die analytische HPLC

Gradientenprogramm:

Tabelle 2 zeigt den prozentuellen Anteil von Laufmittel B im Laufe des Gradienten, der Rest ist Laufmittel A

Zeit	Laufmittel B in %
0 min	0
30 min	17,5
33 min	50
34 min	100
35 min	100
36 min	0
38 min	0

Tabelle 2 Gradientenprogramm für die analytische HPLC

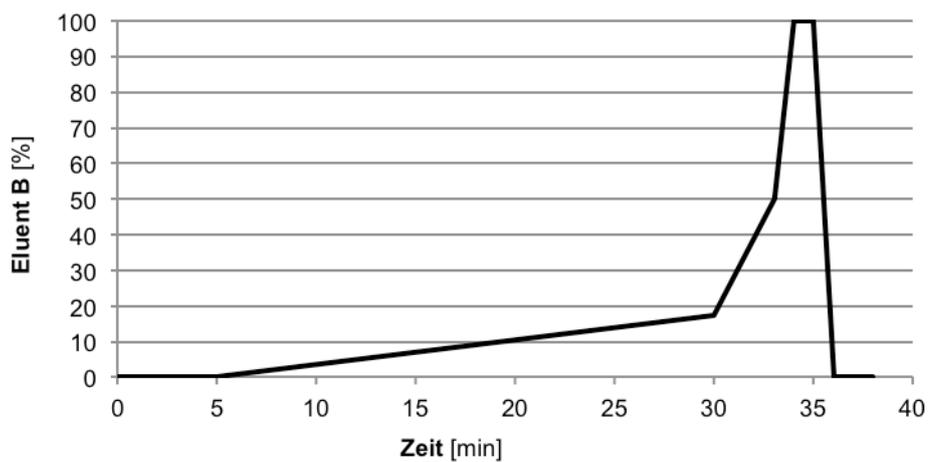


Abbildung 4 Gradient für die analytische HPLC

## 2.2.2 Präparative HPLC von *Caesalpinia sappan*- Extrakt

Die Auftrennung des *Caesalpinia sappan*-Extrakts in seine einzelnen Fraktionen wurde mit Hilfe der präparativen HPLC erreicht. Zur Verwendung kamen folgende Systeme:

### 2.2.2.1 Präparative HPLC mit säurehaltigem Laufmittel

System	UltiMate 3000 RS
Pumpe	UltiMate 3000 Pump
Ofen	UltiMate 3000 RS Column Compartment
Sampler	UltiMate 3000 Autosampler
Detektor	UltiMate 3000 Diode Array Detector
Stationäre Phase	Hypersil GOLD™, 5 µm Partikelgröße, 250x 21,2 mm (Thermo Scientific)
Mobile Phase	Eluent A: Wasser, 5% Acetonitril, 0,1 % TFA Eluent B: Acetonitril, 0,1% TFA
Detektionswellenlängen	254 nm, 280 nm
Flussrate	20 ml/min
Injektionsvolumina	250 µl, 500 µl, 750 µl und 1000 µl
Temperatur	Raumtemperatur

Tabelle 3 Methode für die präparative HPLC mit säurehaltigem Laufmittel

Gradientenprogramm:

Zeit	Laufmittel B in %
0 min	0,5
30 min	17,5
33 min	50
34 min	100
40 min	100
41 min	0,5
55 min	0,5

Tabelle 4 Gradientenprogramm für die präparative HPLC

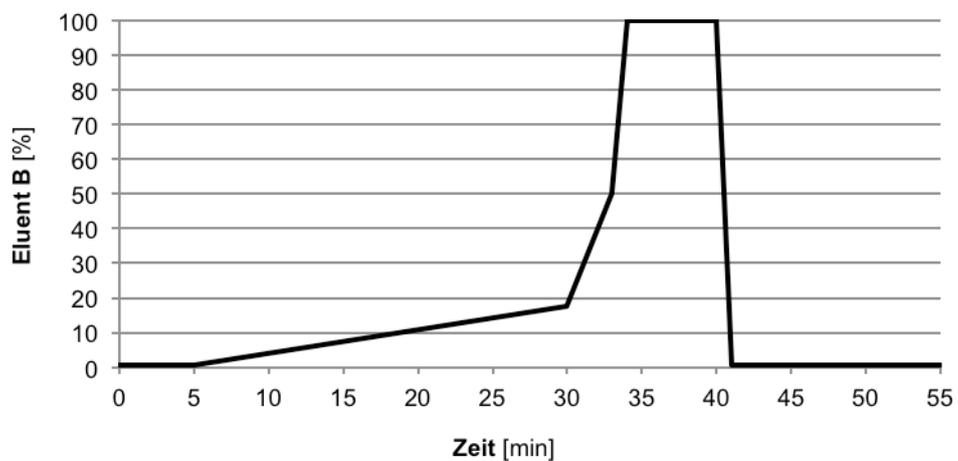


Abbildung 5 Gradient für die präparative HPLC

### **2.2.2.2 Präparative HPLC mit säurefreiem Laufmittel**

Hier wurde mit demselben System und Gradientenprogramm gearbeitet wie in Kapitel 2.2.2.1, nur eine säurefreie mobile Phase wurde dabei verwendet.

Mobile Phase: Eluent E: Wasser. 5 % Acetonitril

Eluent F: Acetonitril

### **2.2.3 Stabilitätsmessung des *Caesalpinia sappan*-Extrakts (CSE)**

#### **2.2.3.1 Herstellung der Ansätze**

Probe 1-3: CSE in H<sub>2</sub>O

Probe 4-6: CSE in H<sub>2</sub>O und  $\beta$ -Cyclodextrin (Kleptose, Roquette, Ref. 504159)

CSE-Stammlösung: 40 mg Brazilin wurden in 4 ml H<sub>2</sub>O gelöst.

$\beta$ -Cyclodextrin-Lösung: 40 mg  $\beta$ -Cyclodextrin wurden in 2 ml H<sub>2</sub>O gelöst.

Eine Lösung von *Caesalpinia sappan*- Extrakt in Wasser mit einer Endkonzentration 2,5 mg/ml und eine Lösung von *Caesalpinia sappan*- Extrakt (2,5 mg/ml) mit  $\beta$ -Cyclodextrin mit einer Endkonzentration von 5 mg/ml wurden hergestellt.

Die Proben wurden in HPLC-Ampullen gelagert und 20  $\mu$ l davon wöchentlich vermessen.

#### **2.2.3.2 HPLC-Methode**

Es wurde mit der gleichen Methode wie in Kapitel 2.2.1 gearbeitet.

## 2.2.4 Stabilitätsmessung des Brazilins

### 2.2.4.1 Herstellung der Ansätze

Proben 1-3: Brazilin in H<sub>2</sub>O

Proben 4-6: Brazilin in H<sub>2</sub>O +  $\beta$ -Cyclodextrin

Zuerst wurden die Stammlösungen zubereitet:

Brazilin-Stammlösung: 8 mg Brazilin wurden in 4 ml H<sub>2</sub>O gelöst.

$\beta$ -Cyclodextrin-Lösung: 40 mg von  $\beta$ -Cyclodextrin wurden in 2 ml H<sub>2</sub>O gelöst.

Eine Lösung von Brazilin in Wasser mit einer Endkonzentration von 0,5 mg/ml und eine Lösung von Brazilin (0,5 mg/ml) mit  $\beta$ -Cyclodextrin mit einer Endkonzentration von 5 mg/ml wurden hergestellt.

Die Proben wurden in HPLC-Ampullen gelagert und 20  $\mu$ l davon wöchentlich vermessen (HPLC-Methode siehe Kapitel 2.2.1)

## 2.2.5 Stabilitätsmessung von Fraktion 1 und Fraktion 5 mit und ohne Zusatz von $\beta$ -Cyclodextrin

Im Zuge der Auftrennung des Extrakts von *Caesalpinia sappan* in seine einzelnen Fraktionen mit Hilfe der präparativen HPLC wurden bei einigen Trennläufen die Fraktionen 1 und 5 in vorgelegtem  $\beta$ -CD gesammelt.

Aufarbeitung der Fraktionen siehe Kapitel 2.3.

Die aufgearbeiteten Fraktionen 1 und 5 wurden in 20 %igem Ethanol gelöst und in HPLC-Ampullen gelagert. Die Messungen erfolgten wöchentlich, wobei dieselbe HPLC-Methode wie in Kapitel 2.2.1 verwendet wurde.

### **2.2.6 Verhalten der Fraktionen 1 und 5 auf Säurezusatz**

Da eine Instabilität der Fraktionen 1 und 5 unter Säurezusatz vermutet wurde, wurden diese mittels präparativer HPLC säurefrei gewonnen (siehe Kapitel 2.2.2.2) und anschließend in säurehaltigem Laufmittel A (Herstellung siehe Kapitel 2.2.1) bzw. künstlichem Magensaft gelagert. Die Messungen erfolgten wöchentlich.

**Herstellung des künstlichen Magensaftes:** Es wurden 20 mg NaCl, und 32 mg Pepsin eingewogen. Danach wurde 0,07 ml HCl hinzugefügt und mit Wasser auf 10 ml aufgefüllt.

Die Stabilität wurde mittels analytischer HPLC (siehe Kapitel 2.2.1) bestimmt.

## **2.3 Aufarbeitung der Fraktionen**

Die mittels präparativer HPLC gewonnenen Fraktionen 1-7 wurden anschließend für 10 Minuten mit Stickstoff begast, um das darin befindliche TFA und Acetonitril weitgehend zu entfernen. Auch die Fraktionen 1-5, welche ohne TFA im Laufmittel gewonnen wurden, wurden 10 Minuten lang begast um das darin befindliche Acetonitril zu entfernen. Darauf wurden sie bei -20°C tiefgefroren und am darauffolgenden Tag lyophilisiert.

## **2.4 Zellkultur**

Die antiinflammatorische Wirkung der einzelnen Fraktionen von *Caesalpinia sappan*-Extrakt wurde an Zellen untersucht.

## 2.4.1 Zelllinien

### RAW 264,7 (ATCC® TIB-71™)

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um adhärenente Makrophagen. Die ursprünglich aus einer adulten, männlichen Maus stammenden Zellen wurden mit dem Abelson Maus-Leukämie-Virus infiziert.

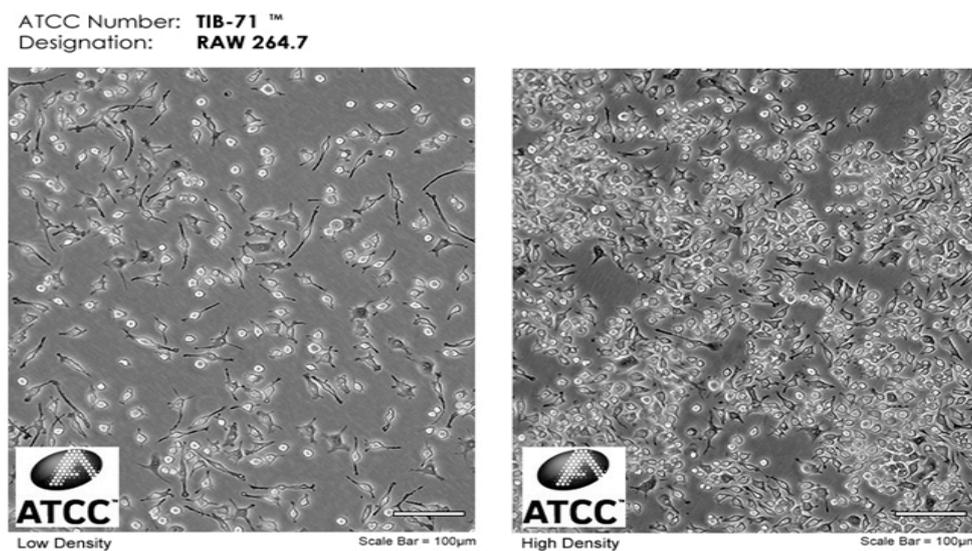


Abbildung 6 RAW 264,7 Zellen in unterschiedlicher Zelldichte (American Type Culture Collection, 2014)

### SW 1353

Hierbei handelt es sich um primäre humane Chondrosarkomzellen. Die gereinigten Fraktionen (1-5) wurden an der medizinischen Universität Wien auf entzündungshemmende Aktivität in Chondrozyten getestet. In den erhaltenen Überständen wurden die IL-6-, TNF-alpha- und IL-10-Konzentrationen quantifiziert.

## 2.4.2 Kultivierung der Zellen

RAW 264.7 Makrophagen wurden im Brutschrank bei 37 °C unter Begasung mit 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in

Zellkulturflaschen in folgendem Medium:

- Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM, Gibco, USA)
- 10 % fötales Kälberserum (FCS, Gibco, USA)
- 100 U/ml Penicillin (Gibco, USA)
- 100 U/ml Streptomycin (Gibco, USA)
- 4 mM L-Glutamin (Gibco, USA)

### **2.4.3 Passagieren der Zellen**

Sobald der Zellrasen eine Konfluenz von ca. 80 % erreicht hatte, wurden die Zellen passagiert. Die Subkultivierung ist erforderlich, da sich bei Überschreitung der maximalen Ausbreitungsdichte eine Stagnation der Teilungsaktivität der Zellen einstellt und somit eine maximale Ausbeute nicht erreicht werden kann. Das Passagieren ermöglicht also ein weiteres Zellwachstum.

Im ersten Schritt des Passagiervorgangs wurde das alte Kulturmedium mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette abgenommen und verworfen. Anschließend wurden die Zellen einmal mit 10 ml einer phosphatgepufferten Salzlösung (PBS, pH 7,2, Gibco) gewaschen und mit 1 ml Trypsin-EDTA (Gibco) benetzt. Zum effektiveren Ablösen der Zellen wurden sie für einige Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und durch vorsichtiges Abklopfen vom Boden gelöst. Anschließend wurden 9 ml frisches Medium hinzugefügt, und die Zellen wurden durch mehrmaliges Auf- und Abziehen mit einer 10 ml-Pipette vereinzelt.

Um eine Verdünnung von 1:100 zu erreichen, wurden einige Tropfen dieser Zellsuspension in eine neue Kulturflasche übergeführt, in die 10 ml frisches Medium vorgelegt wurden.

### **2.4.4 Test auf antiinflammatorische Wirkung**

Zuerst wurde durch Zellzählung mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer (Abbildung 7) die Zelldichte bestimmt, damit auf eine Zielkonzentration von  $2 \cdot 10^6$  pro ml verdünnt werden konnte. Um die Zellzahl zu bestimmen, wurden von der Zellsuspension 10  $\mu$ l

mit einer Pipette aufgenommen. Die Pipettenspitze wurde an den Rand des Deckgläschens angesetzt und langsam entleert. Durch die Kapillarkräfte wurde die Suspension zwischen Deckglas und Kammer gesaugt und unter dem Lichtmikroskop wurden die Zellen von vier Quadranten ausgezählt.

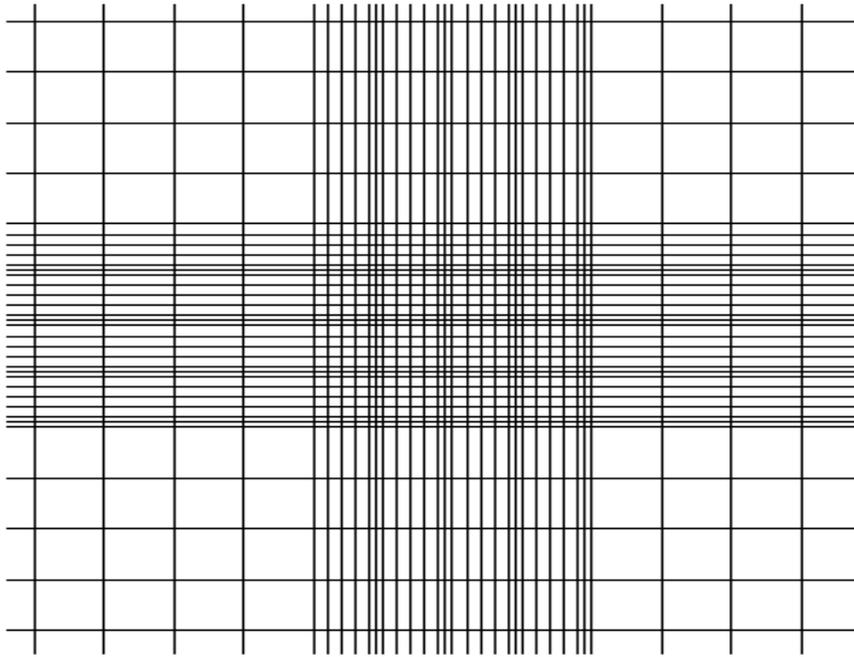


Abbildung 7 Neubauer Zählkammer (Gstraunthaler et al., 2013)

Die geforderte Verdünnung wurde für ein Volumen von 2 ml pro well berechnet. Zuerst wurde mit DMEM entsprechend verdünnt und 1,5 ml der Zellsuspension pro well zugesetzt. Die Zugabe der restlichen 0,5 ml erfolgte am nächsten Tag mit LPS. Die 12-well-Platte wurde anschließend für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden dann je well 2 µl der gelösten Testsubstanzen hinzugefügt. In ein well wurden als Kontrolle 2 µl DMSO zugesetzt. Anschließend wurde für 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Darauf wurde Lipopolysaccharid (LPS, von Escherichia coli 0111: B4, Sigma Aldrich) in der geforderten Konzentration von 1 µg/ml in Wasser zugesetzt. Dazu wurden 2 µl LPS in 0,5 ml DMEM pro well gemischt und zu den 1,5 ml pro well hinzupipettiert. Die Platte wurde für 24 Stunden bei 37 °C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag wurde aus jedem well 1 ml des Zellüberstandes abgenommen und für 10 Minuten bei 12100 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

Der Überstand wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß übergeführt und bis zur Durchführung des ELISA Tests bei -20 °C gelagert.

### 2.4.5 Der Zytotoxizitätstest

Zur Untersuchung der Lebensfähigkeit der Zellen unter dem Einfluss der zugesetzten Testsubstanzen dient der Zytotoxizitätstest, auch MTT-Test genannt. MTT ist die Abkürzung für das gelbe, wasserlösliche Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid. Der Test korreliert mit der Umsetzung von Methyltetrazolium durch NADPH oder NADH, welches von mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen gebildet wird, zu einem wasserunlöslichen violetten Formazanfarbstoff. Diese Reaktion ist in Abbildung 8 dargestellt.

Pro well wurden 100 µl einer 5 mg/ml Stammlösung von MTT (Sigma Aldrich), welche mit 1x PBS verdünnt wurde, hinzugefügt, für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert und anschließend der Zellüberstand abgesaugt. 1 ml der Lyselösung (10 % Natrium Dodecylsulfat [SDS, Merck, Deutschland], 0,01 N HCl) wurden zum Ablösen der Zellen hinzugefügt. Die Absorption wurde bei der Wellenlänge 570 nm und als Referenz bei 690 nm mit dem Mikrotiterplatten-Lesegerät (Infinite M200, Tecan, Schweiz) vermessen.

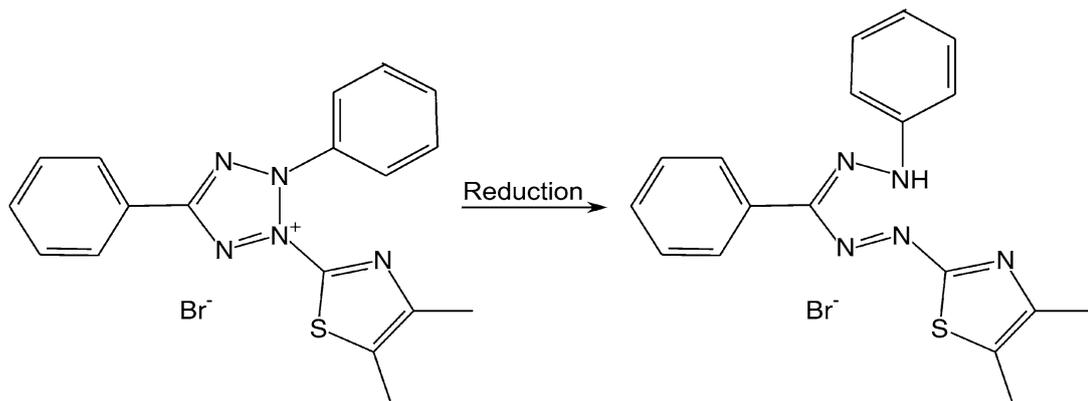


Abbildung 8 Struktur von MTT und dem färbigen Produkt Formazan (Kupcsik, 2011)

### **2.4.6 Enzyme-Linked-Immuno-Sorbent-Assay (ELISA)**

Der ELISA-Test ist eine immunologische Methode, die auf dem Prinzip der Antigen-Antikörper-Bindung beruht.

Die ELISA-Tests auf die Zytokine TNF- $\alpha$ , IL-6 und IL-10 wurden mit den ELISA-Kits „Ready-SET-Go!“ (eBioscience, Affymetrix Company, USA) durchgeführt. Dabei fungieren die zu bestimmenden Zytokine als Antigene, welche durch spezifische Antikörper und einer damit verbundenen enzymatischen Farbreaktion detektiert werden können.

Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers: Im ersten Schritt wurde eine 96-well Mikrotiterplatte (Greiner Bio-One, Deutschland) mit 100  $\mu$ l des jeweiligen Beschichtungsantikörpers (capture antibody) befüllt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde dreimal mit 200  $\mu$ l Waschpuffer (0,05% Tween 20 [Merck, Deutschland] in PBS) pro well gewaschen und anschließend mit 200  $\mu$ l 1x Assay Diluent befüllt und eine Stunde bei Raumtemperatur zum Absättigen inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die wells der Platte mit je 100  $\mu$ l der verdünnten Proben für 2 Stunden beladen. Nach dem Waschvorgang wurden 100  $\mu$ l der mit Biotin gekoppelten Detektionsantikörper, welche vorher dem Protokoll entsprechend mit 1x Assay Diluent verdünnt wurden, in jedes well pipettiert und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden 100  $\mu$ l/well Avidin Horse Rabbish Peroxidase (Avidin-HRP), welche zuvor mit 1x Assay Diluent entsprechend der Vorschrift verdünnt wurde, aufgetragen und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach viermaligem Waschen wurde die Enzymreaktion der Peroxidase gestartet. Dazu wurden 100  $\mu$ l der Substratlösung, Tetramethylenzidin (TMB) in jedes well pipettiert. Die enzymatische Farbreaktion wird durch die Zugabe des zunächst farblosen Substrates TMB katalysiert, welches in Anwesenheit von Peroxidasen eine blaue Färbung zeigt. Nach circa 15 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von 50  $\mu$ l der Stop Solution (1 M Phosphorsäure) gestoppt. Dabei schlägt aufgrund der Veränderung des pH-Wertes die Farbe des TMBs von blau nach gelb um. Die Färbung wurde umgehend nach Abstoppen bei einer Wellenlänge von 450 nm (Referenzwellenlänge: 570 nm) in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät vermessen.

### 3 Ergebnisse und Diskussion

#### 3.1 Analytische HPLC von *Caesalpinia sappan*- Extrakt

Der mit Ethanol hergestellte und zur Trockene eingedampfte Extrakt von *Caesalpinia sappan* (siehe Kapitel 2.1.) wurde in 20 %igem Ethanol gelöst und mittels analytischer HPLC charakterisiert.

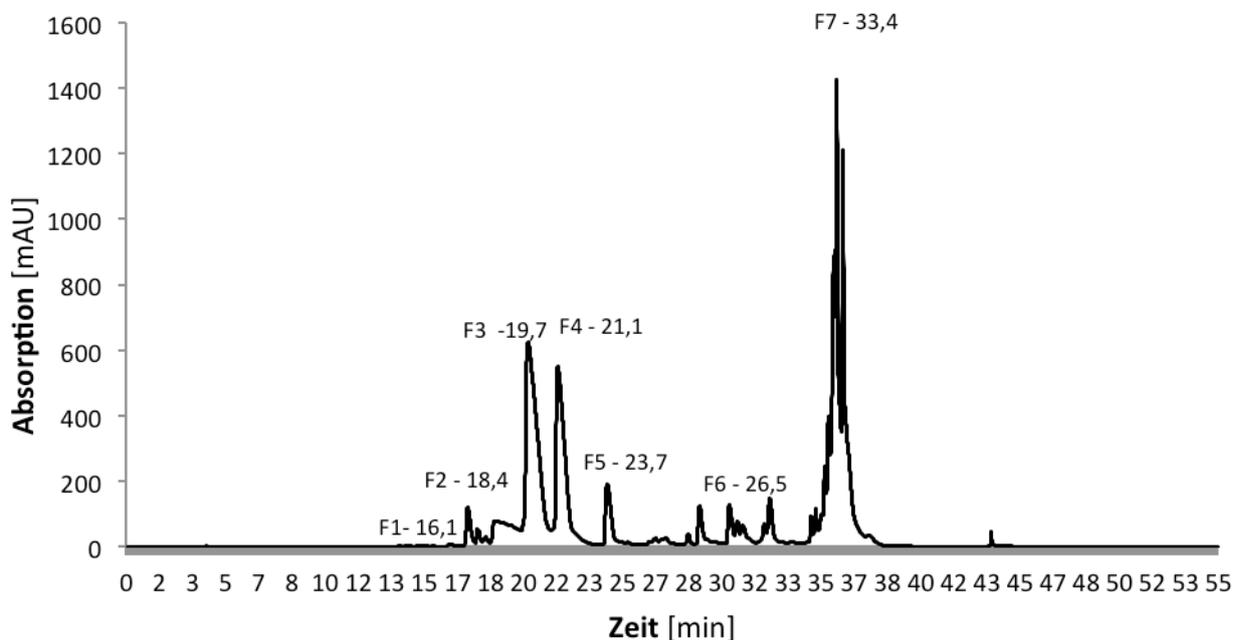


Abbildung 9 Chromatogramm (analytische HPLC) von *Caesalpinia sappan*, detektiert bei 280 nm

Der Extrakt von *Caesalpinia sappan* besteht vor allem aus den polaren Verbindungen Episappanol, Protosappanin C, Brazilin, Protosappanin B + Isoprotosappanin B und Sappanol (Mueller et al., 2015), die einfachheitshalber als Fraktionen 1, 2, 3, 4 und 5 bezeichnet werden (Abbildung 9). Darüber hinaus wurden auch apolare Verbindungen von *Caesalpinia sappan*, zusammengefasst als Fraktion 6 (Retentionszeit ab ca. 26,5 Minuten) und Fraktion 7 (Retentionszeit ab ca. 33,4 Minuten), gesammelt und später auf eine mögliche antiinflammatorische Wirkung getestet.

Fraktion	Verbindung
F1	Episappanol
F2	Protosappanin C
F3	Brazilin
F4	Protosappanin B + Isoprotosappanin B
F5	Sappanol

Tabelle 5 Identifizierte Fraktionen des CSE (Mueller et al., 2015)

### 3.2 Stabilitätsmessung des Gesamtexttrakts von *Caesalpinia sappan* (CSE)

Ziel dieser Studie war es, das Verhalten der einzelnen Fraktionen bei gemeinsamer Lagerung in flüssigem Medium zu analysieren. Den Proben 4-6 (siehe Kapitel 2.2.3.1) wurden  $\beta$ -Cyclodextrin hinzugefügt, um eine eventuelle stabilisierende Wirkung nachzuweisen.

Die Ergebnisse der Lagerungsstudie des Gesamtexttrakts von *Caesalpinia sappan* wurden anhand der Anteile der Flächen im Chromatogramm quantifiziert. Die am Tag 0 ermittelten Werte entsprachen dabei 100 Prozent.

Versuchsdurchführung siehe 2.2.3

### 3.2.1 Stabilität von CSE in wässriger Lösung

Die Stabilitätsstudie erfolgte im Dreifachansatz. Die Ansätze zeigten keine relevanten Unterschiede, daher wurde der Mittelwert zur Ergebnisfindung herangezogen.

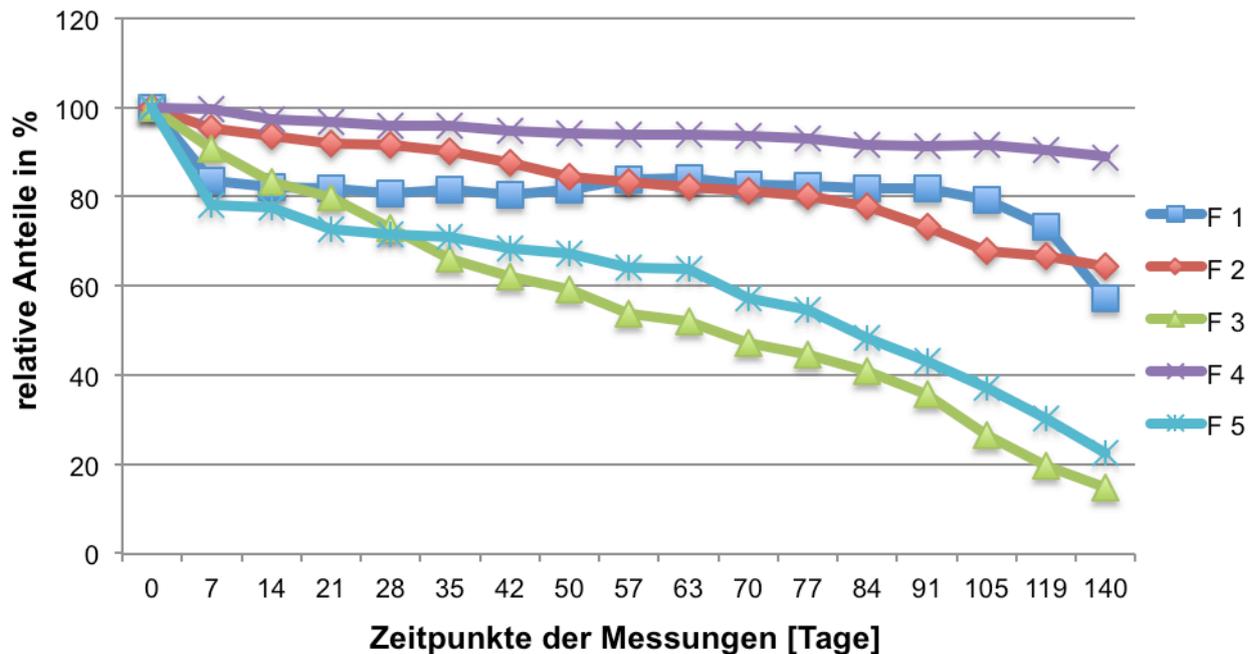


Abbildung 10 Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung des Gesamtextrakts von *Caesalpinia sappan*

Aus Abbildung 10 ist ersichtlich, dass Fraktion 1 innerhalb einer Woche um ca. 16 % von seinem Ausgangswert abnahm. Ab Tag 7 bis Tag 105 blieben die Werte von Fraktion 1 relativ stabil, erst ab Tag 119 begann der Wert von Fraktion 1 wieder abzunehmen. Mit Beendigung der Studie machte Fraktion 1 nur mehr 57 % seines Ausgangswertes aus. Auch bei Fraktion 2 war eine kontinuierliche Abnahme des Gehaltes zu verzeichnen. Nach einem Monat (Tag 28) sank der Wert auf 92 %, nach 2 Monaten (Tag 63) auf 82 % und machte nach 140 Tagen nur mehr 64 % seines Startwertes aus. Bei Fraktion 3 waren die größten Abbaureaktionen zu beobachten. Nach einem Monat (Tag 28) waren noch ca. 73 % von Fraktion 3 vorhanden, wohingegen einen weiteren Monat später (Tag 63) nur noch 52 % vorhanden waren. Nach Beendigung der Lagerungsstudie (Tag 140) machte Fraktion 3 nur mehr 15 % seines Anfangswertes aus. Fraktion 4 blieb über die Dauer von 140 Tagen relativ stabil. Anders verhielt es sich bei Fraktion 5, hier waren, ähnlich wie bei Fraktion 3,

große Abbaureaktionen zu beobachten. Nach einem Monat (Tag 28) war Fraktion 5 noch zu etwa 72 % vorhanden, nach zwei Monaten (Tag 63) nur noch zu ca. 57 % und nach 140 Tagen nur mehr zu 23 %.

### 3.2.2 Stabilität von CSE in wässriger Lösung mit $\beta$ -Cyclodextrin

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde der Mittelwert des Dreifachansatzes herangezogen.

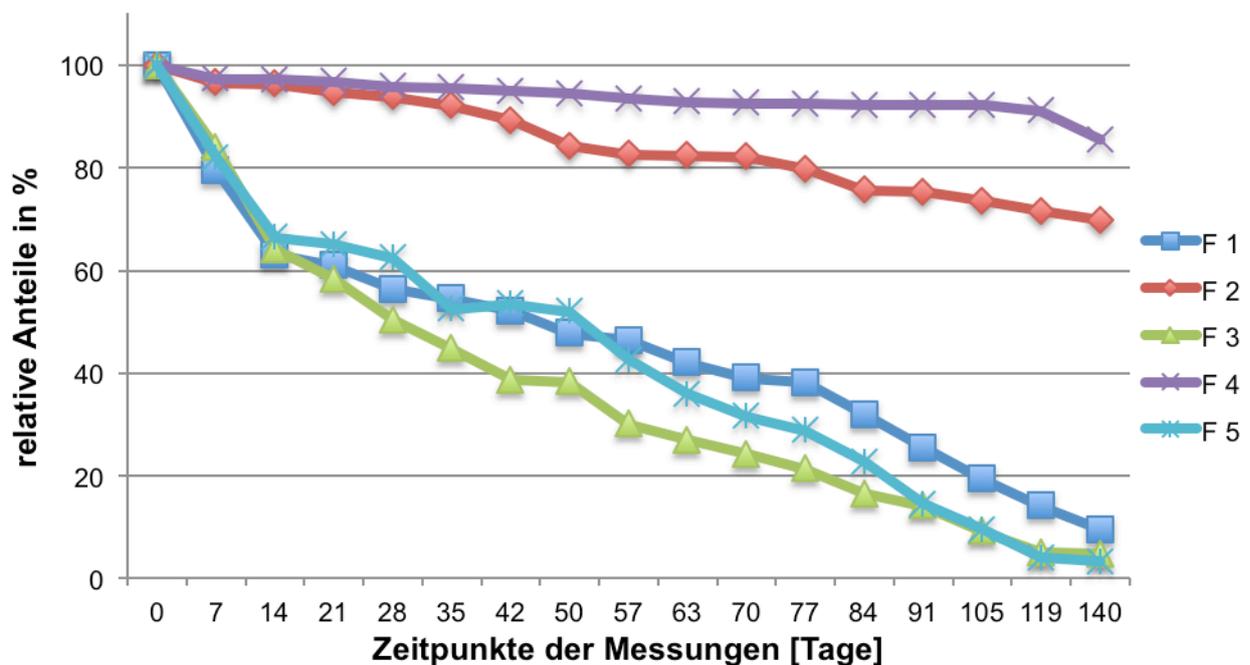


Abbildung 11 Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung des Gesamtextrakts von *Caesalpinia sappan* plus  $\beta$ -Cyclodextrin

Diese Studie ergab, dass die Fraktionen 1, 3 und 5 nahezu gänzlich abgebaut wurden (Abbildung 11). Fraktion 1 machte nach einem Monat (Tag 28) nach Beginn der Studie nur noch 56 % des Anfangsgehaltes aus, nach zwei Monaten (Tag 63) 42 % und nach 140 Tagen war der Gehalt von Fraktion 1 auf 9 % abgesunken. Ähnlich verhält es sich mit Fraktion 5, welche nach einem Monat (Tag 28) auf 62 % abnahm. Nach einem weiteren Monat (Tag 63) machte Fraktion 5 nur mehr 36 % seines Ursprungwertes aus und nach Beendigung der Lagerungsstudie (Tag 140)

war der Gehalt auf 3 % abgesunken. Auch bei Fraktion 3 war ein sehr rapider Abbau zu erkennen, sein Gehalt betrug nach einem Monat (Tag 28) Lagerung nur noch 50 % seines Ausgangwertes, nach zwei Monaten (Tag 63) 27 % und nach 140 Tagen nur mehr 5 %. Bei Fraktion 2 war auch eine kontinuierliche Abnahme des Gehalts zu verzeichnen, wenn auch nicht so drastisch wie bei den Fraktionen 1, 3, und 5. Nach einem Monat Lagerung (Tag 28), machte Fraktion 2 noch 96 % seines Ausgangwertes aus, nach 2 Monaten (Tag 63) 82 % und nach Beendigung der Studie (Tag 140) noch 70 %. Am stabilsten über 140 Tage Lagerung blieb Fraktion 4. Nach einem Monat (Tag 28) Lagerung machte Fraktion 4 noch 96 % seines Ursprungwertes aus. Ein weiteres Monat später noch 93 % und nach Beendigung der Lagerung (Tag 140) 85 %. Die Zugabe von  $\beta$ -Cyclodextrin hatte keinen Einfluß auf die Stabilität des Gesamtextrakts von *Caesalpinia sappan*.

### **3.3 Stabilitätsmessung von Brazilin**

Diese Studie hatte zum Ziel, das Stabilitätsverhalten von Brazilin bei Lagerung in H<sub>2</sub>O bzw. in H<sub>2</sub>O und  $\beta$ -Cyclodextrin innerhalb von 140 Tagen zu analysieren. Der Abbau wurde anhand der Anteile der Flächen im Chromatogramm quantifiziert. Der am Tag 0 ermittelte Wert entsprach dabei 100 Prozent.

Versuchsdurchführung siehe Kapitel 2.2.4

#### **3.3.1 Brazilin in wässriger Lösung**

Zur Berechnung des Abbaus wurde der Mittelwert des Dreifachansatzes herangezogen.

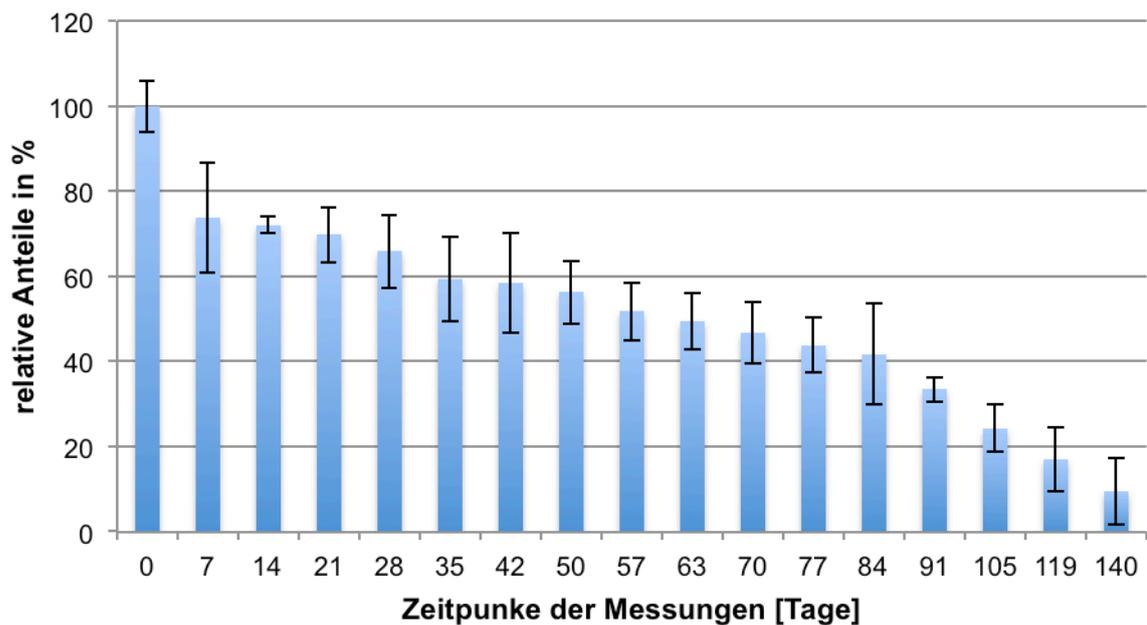


Abbildung 12 Verlauf der relativen Anteile des Brazilins in H<sub>2</sub>O

Abbildung 12 verdeutlicht, dass es zu einem langsamen, aber kontinuierlichen Abbau des Brazilins in wässriger Lösung kommt. Nach ca. einem Monat (entspricht Tag 28) sind noch 66 % des Brazilins vorhanden, wohingegen nach rund 2 Monaten (Tag 63) nur mehr 50 % Brazilin vorhanden waren. Nach 140 Tagen sind nur mehr 10 % des Ausgangswertes vorhanden. Man kann daher davon ausgehen, dass bei längerer Lagerung von Brazilin in flüssigem Medium Abbaureaktionen auftreten.

### 3.3.2 Brazilin in wässriger Lösung unter Zusatz von $\beta$ -Cyclodextrin

Zur Auswertung der Ergebnisse wurde der Mittelwert des Dreifachansatzes herangezogen.

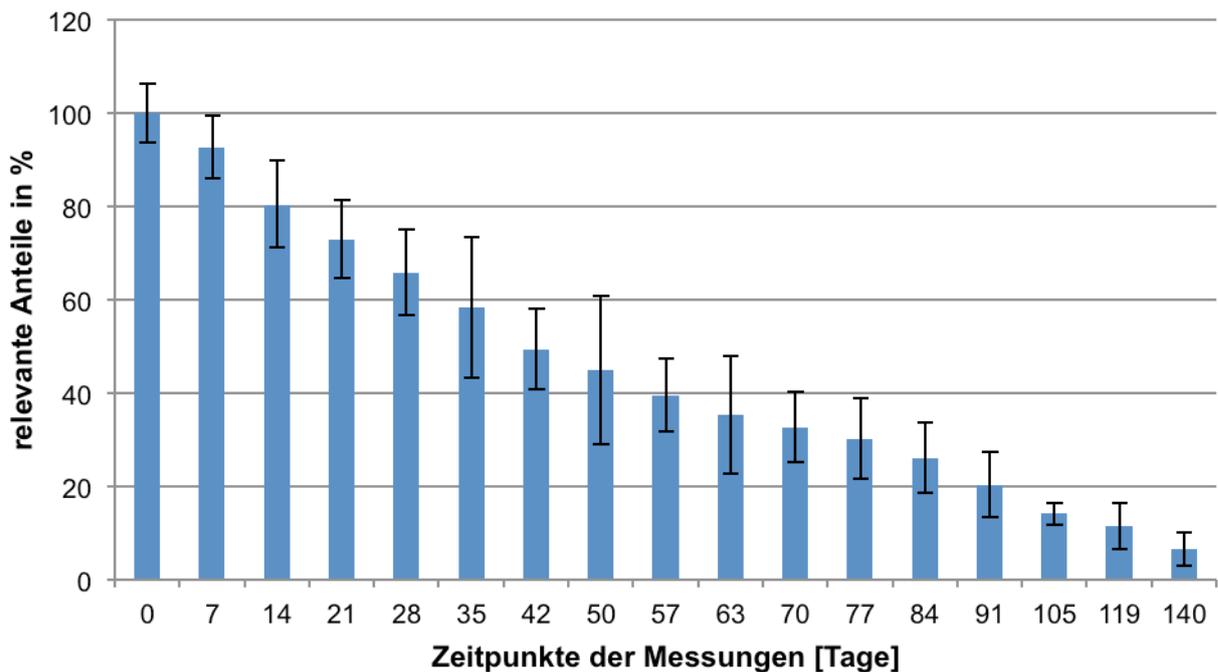


Abbildung 13 Verlauf der relativen Anteile des Brazilins in H<sub>2</sub>O und  $\beta$ -Cyclodextrin

Auch hier verdeutlicht Abbildung 13, dass Brazilin einem kontinuierlichen Abbau unterworfen ist. Entgegen den Erwartungen hatte  $\beta$ -Cyclodextrin keinen positiven Einfluss auf die Stabilität des Brazilins. Nach etwa einem Monat (Tag 28) war Brazilin noch zu 66 % vorhanden, aber bereits ein Monat später (Tag 63) nur noch zu 35 %. Nach Beendigung der Studie (Tag 140) waren nur mehr 7 % des Ausgangswertes vom Brazilin vorhanden.

### 3.3.3 Vergleich der Stabilität von Brazilin in Wasser mit oder ohne $\beta$ -Cyclodextrin

Die Gegenüberstellung der Ergebnisse (Abbildung 14) der beiden Lagerungsstudien macht deutlich, dass  $\beta$ -Cyclodextrin keinen Einfluss auf die Stabilität des Brazilins hat. Anfangs erfolgte der Abbau des Brazilins in  $\beta$ -CD zwar etwas langsamer, aber ab dem 28. Tag blieb Brazilin, welches nur in H<sub>2</sub>O gelagert wurde, stabiler.

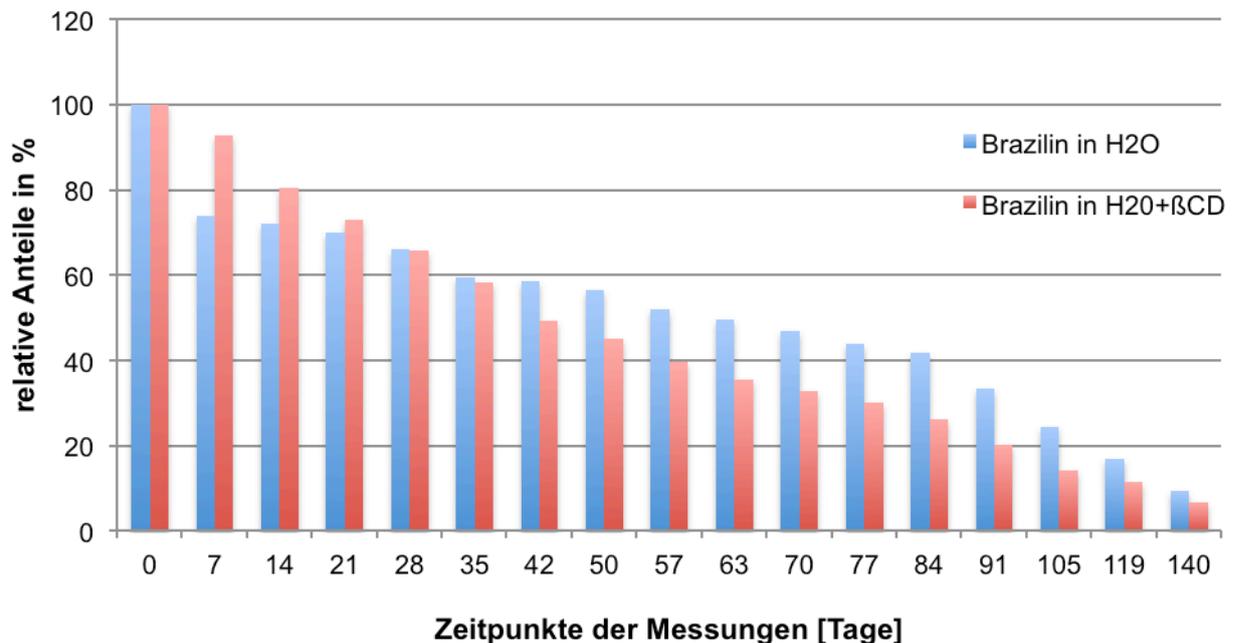


Abbildung 14 Vergleich der relativen Anteile von Brazilin in H<sub>2</sub>O mit und ohne β-Cyclodextrin

### 3.4 Stabilitätsmessung von Fraktion 1 nach der Trennung mit 0,1 % TFA im Laufmittel

Obwohl Fraktion 1 während der präparativen HPLC unter Verwendung des TFA-haltigen Laufmittels rein getrennt wurde, zeigte das Chromatogramm der analytischen HPLC, dass gewisse Anteile der Fraktionen 3 und 5 vorhanden waren (Abbildung 15). Ziel dieser Stabilitätsstudie war es, zu analysieren, wie sich das Verhältnis der 3 Fraktionen zueinander während einer längeren Lagerung in flüssigem Medium verändert. Zusätzlich wurde untersucht, ob zugesetztes β-Cyclodextrin einen stabilisierenden Effekt auf Fraktion 1 hat.

Die Quantifizierung erfolgte anhand der einzelnen Peakflächen in Prozent zur Gesamtfläche.

Versuchsdurchführung siehe Kapitel 2.2.5.

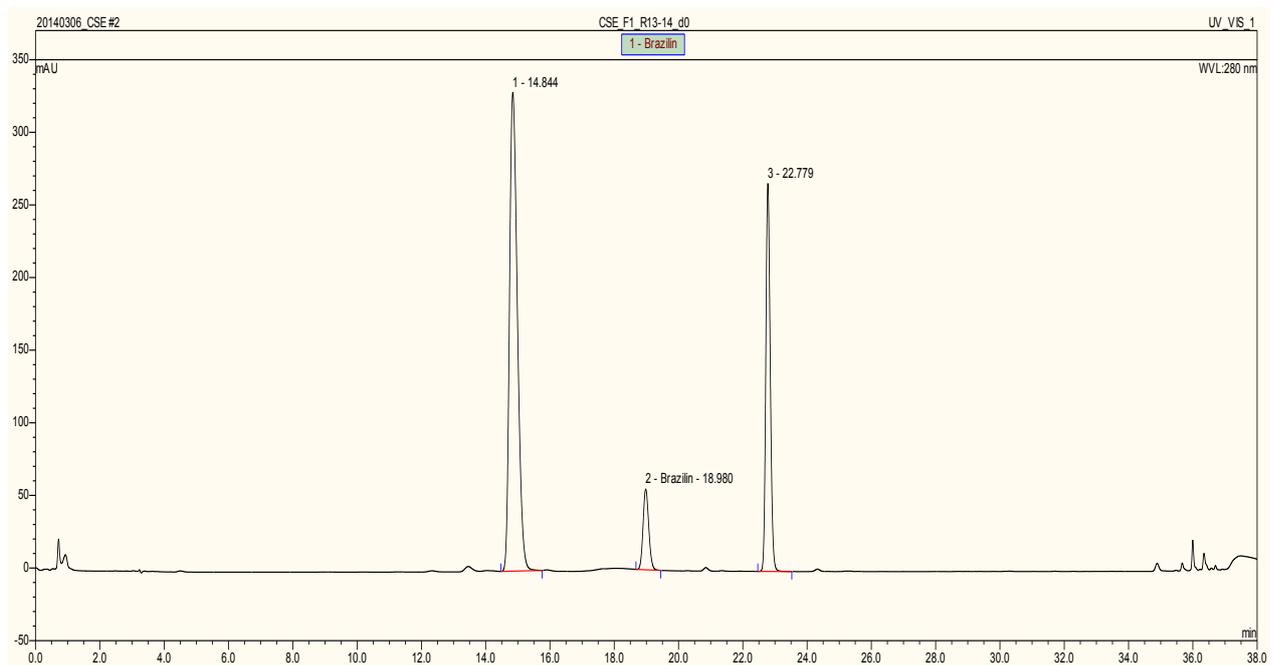


Abbildung 15 Chromatogramm der analytischen HPLC von Fraktion 1 direkt nach der Trennung mit 0,1% TFA im Laufmittel

### 3.4.1 Stabilität von Fraktion 1 ohne Zusatz von $\beta$ -Cyclodextrin

Der Mittelwert des Dreifachansatzes wurde zur Auswertung der Ergebnisse verwendet.

Aus der Abbildung 16 geht hervor, dass schon in der frisch in 20 %igem Ethanol gelösten Probe (Tag 0) Fraktion 1 im Mittel nur etwa 36 % der Gesamtfläche im Chromatogramm ausmachte. Zu Beginn der Lagerung in Lösung waren auch Fraktion 3 zu ca. 14 % und Fraktion 5 zu etwa 29 % vorhanden. Mit Fortdauer der Lagerung wurde zunehmend Fraktion 1 und Fraktion 5 in Fraktion 3 umgelagert. Nach Beendigung der Lagerungsstudie (Tag 35) nahm Fraktion 3 mit ca. 66 % den größten Anteil im Chromatogramm ein. Von den Fraktionen 1 und 5 waren nur mehr 17 % bzw. 20 % vorhanden. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass Fraktion 1 bei längerer Lagerung in flüssigem Medium hauptsächlich in Fraktion 3 umgelagert wird.

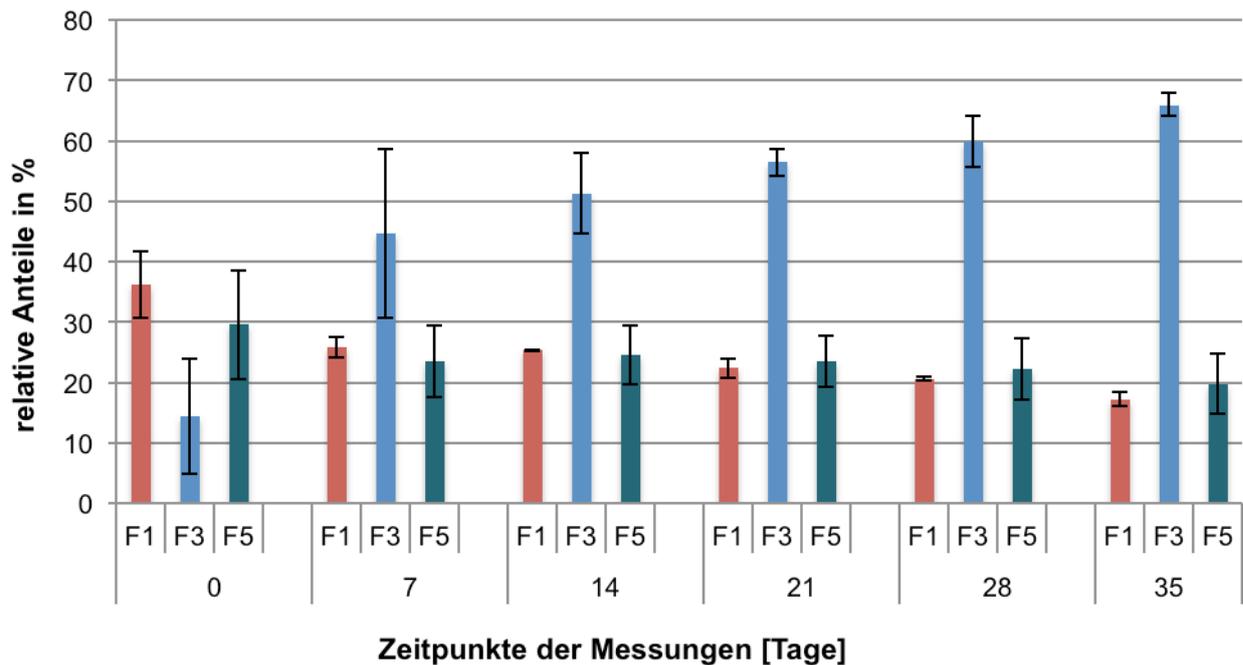


Abbildung 16 Verlauf der relativen Anteile von Fraktion 1, 3 und 5, die aus Fraktion 1 entstehen, nachdem es im Laufmittel mit 0,1 % TFA getrennt wurde

### 3.4.2 Stabilität von Fraktion 1 in wässriger Lösung unter Zusatz von $\beta$ -Cyclodextrin

Auch hier wurde der Mittelwert des Dreifachansatzes zur Berechnung der Ergebnisse herangezogen.

Aus Abbildung 17 geht hervor, dass Fraktion 1, welche direkt in einer wässrigen Cyclodextrin-Lösung aufgefangen und gelagert wurde, zu Beginn der Lagerungsstudie mit 66 % den größten Anteil der Gesamtfläche im Chromatogramm ausmachte. Aber schon nach einer Woche Lagerung nahm Fraktion 3 mit 60 % den größten Anteil der Gesamtfläche im Chromatogramm ein. Nach Beendigung der Studie hatten sich die Anteile der Fraktionen wie folgt verändert: Fraktion 1 von 66 % auf 10 %, Fraktion 3 von 15 % auf 82 % und Fraktion 5 von 24 % auf 8 %. Es ist daher anzunehmen, dass das zugesetzte  $\beta$ -CD keinen stabilisierenden Effekt auf Fraktion 1 und 5 ausübt, sondern das Verhältnis von Fraktionen 1 und 5 zu Fraktion 3 verschiebt, indem es Fraktion 3, aber nicht Fraktion 1 und 5 stabilisiert.

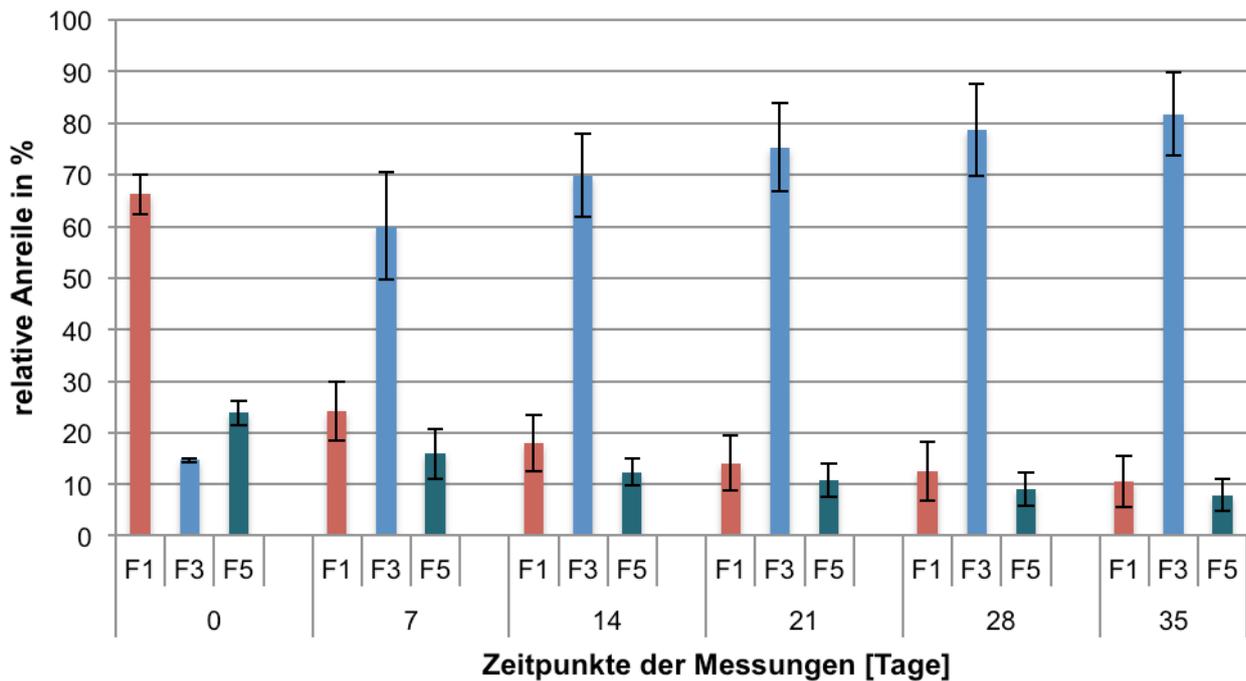


Abbildung 17 Verlauf der relativen Anteile von Fraktion 1, 3 und 5 in wässriger Lösung von Fraktion 1 mit  $\beta$ -CD

### 3.5 Stabilitätsmessung von Fraktion 5 nach der Trennung mit 0,1 % TFA im Laufmittel

Genau wie bei Fraktion 1 zeigt das Chromatogramm der analytischen HPLC von Fraktion 5 nach der Trennung mit TFA im Laufmittel (2.2.2.1) von Anfang an gewisse Anteile der Fraktionen 1 und 3 (Abbildung 18). Auch diese Studie soll darlegen, wie sich die Flächenanteile im Chromatogramm während der Lagerung in flüssigem Medium verändern.

Versuchsdurchführung siehe Kapitel 2.2.5

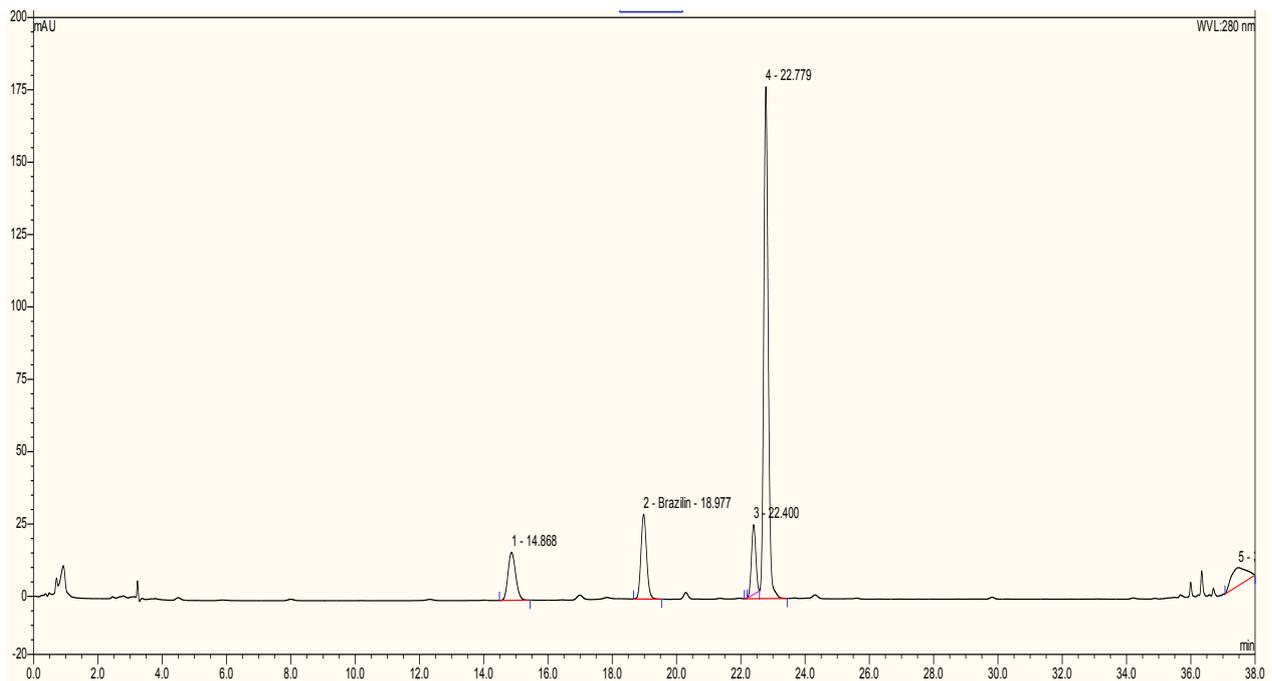


Abbildung 18 Chromatogramm der analytischen HPLC von Fraktion 5 gleich nach der Trennung mit 0,1 % TFA im Laufmittel

### 3.5.1 Stabilität von Fraktion 5 in wässriger Lösung

Zur Darstellung der Ergebnisse wurde der Mittelwert des Zweifachansatzes herangezogen. Die hohe Standardabweichung lässt sich dadurch erklären, dass die Umlagerungsreaktionen von Fraktion 5 in Fraktion 3 der beiden Versuchsansätze anscheinend unterschiedlich schnell katalysiert wurden.

Fraktion 5 macht in der frisch gelösten Probe (Tag 0) mit 55 % den größten Anteil an der Gesamtfläche im Chromatogramm aus, während Fraktion 3 schon zu 27 % vorhanden war (Abbildung 19). Aber bereits nach einer Woche Lagerung sind Fraktion 3 mit 44 % und Fraktion 5 mit 43 % zu fast gleichen Teilen vorhanden. Nach Beendigung der Lagerung (Tag 35) wurden nur mehr 30 % der Fraktion 5 detektiert. Fraktion 3 machte nach Beendigung der Lagerungsstudie 60 % der Gesamtfläche im Chromatogramm aus.

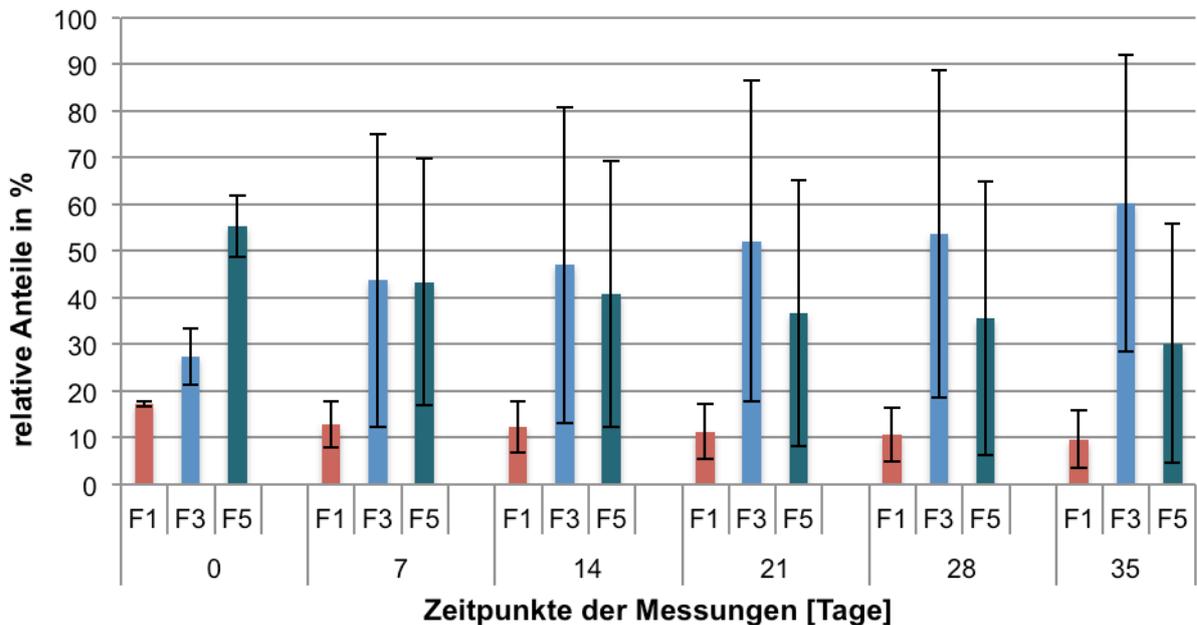


Abbildung 19 Verlauf der relativen Anteile von Fraktion 1,3 und 5 bei der Lagerung von Fraktion 5, das mit TFA im Laufmittel getrennt wurde

### 3.5.2 Stabilität von Fraktion 5 in wässriger Lösung unter Zusatz von $\beta$ -Cyclodextrin

Die Stabilität von Fraktion 5 nach Trennung mit TFA im Laufmittel und Auffangen in einer wässrigen  $\beta$ -CD Lösung wurde analysiert. Zur Ergebnisfindung wurde der Mittelwert des Dreifachansatzes verwendet.

Die frisch in 20 %igem Ethanol gelösten Proben von Fraktion 5 +  $\beta$ -CD zeigen ein ähnliches Verhalten (Abbildung 20) wie die der Fraktion 1 +  $\beta$ -CD (Abbildung 17). Auch hier wurden zu Beginn (entspricht Tag 0 in Abbildung 20) der Studie die Fraktionen 1, 3 und 5 detektiert, wobei Fraktion 5 zu 66 % enthalten war. Schon nach einer Woche Lagerung machte Fraktion 3 mit 73 % den größten Anteil im Chromatogramm aus. Mit Beendigung der Lagerung sind von Fraktion 5 nur noch 10 % vorhanden, während Fraktion 3 mit 86 % den größten Anteil an der Gesamtfläche einnahm. Auch hier ist anzunehmen, dass  $\beta$ -CD keinen Beitrag zur Stabilität beiträgt, sondern vielmehr eine Gleichgewichtsverschiebung von Fraktion 5 zu Fraktion 3 fördert, indem es Fraktion 3 stärker stabilisiert.

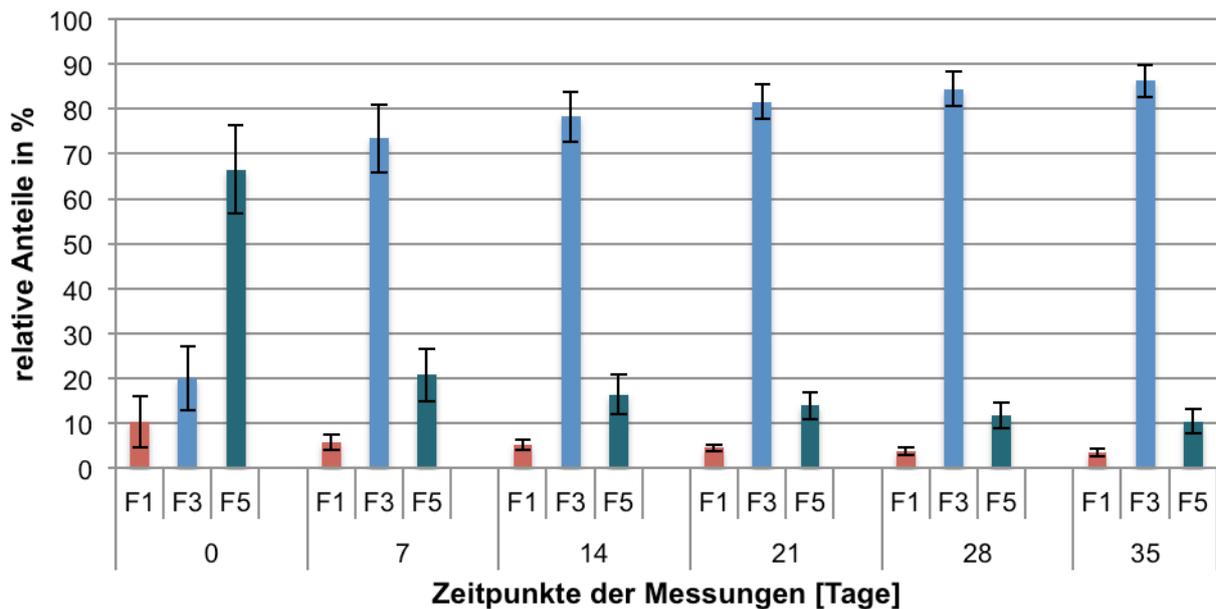


Abbildung 20 Verlauf der relativen Anteile von Fraktion 1, 3 und 5 in wässriger Lösung von Fraktion 5 mit  $\beta$ -CD

### 3.6 Lagerungsstudie von Fraktion 1 und 5 in säurehaltigem Medium

Die Fraktionen 1 bzw. 5 wurden mittels präparativer HPLC gewonnen. Als Elutionsmittel wurden säurefreie Laufmittel verwendet (siehe Kapitel 2.2.2.2). Die analytische HPLC-Untersuchung gab den Aufschluss, dass die säurefrei gewonnen Fraktionen 1 und 5 absolut rein vorlagen (Abbildungen 21 und 22). Eine weitere analytische HPLC-Untersuchung einen Monat später zeigte, dass die beiden in Pulverform gelagerten Fraktionen stabil blieben. Ziel dieser Lagerungsstudie war es, das Verhalten der Fraktion 1 bzw. 5 bei längerer Lagerung in säurehaltigem Laufmittel A bzw. künstlichem Magensaft zu untersuchen.

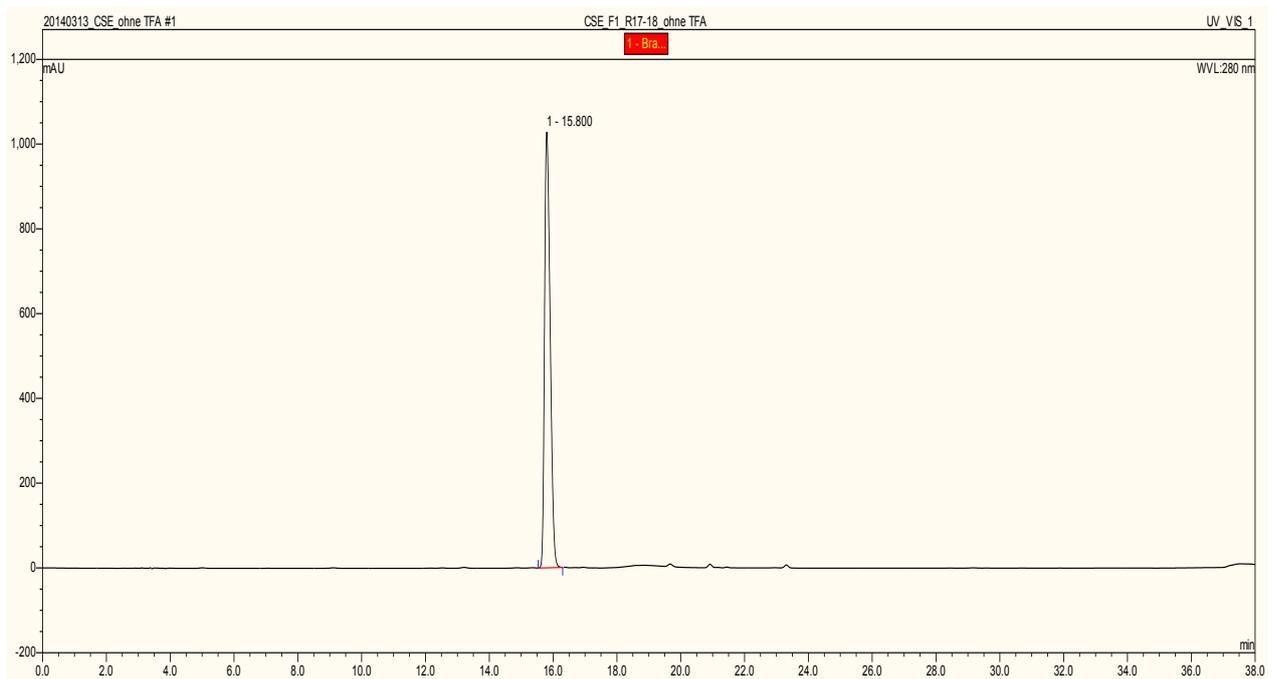


Abbildung 21 Chromatogramm der analytischen HPLC von Fraktion 1 nach der Trennung mit säurefreiem Laufmittel

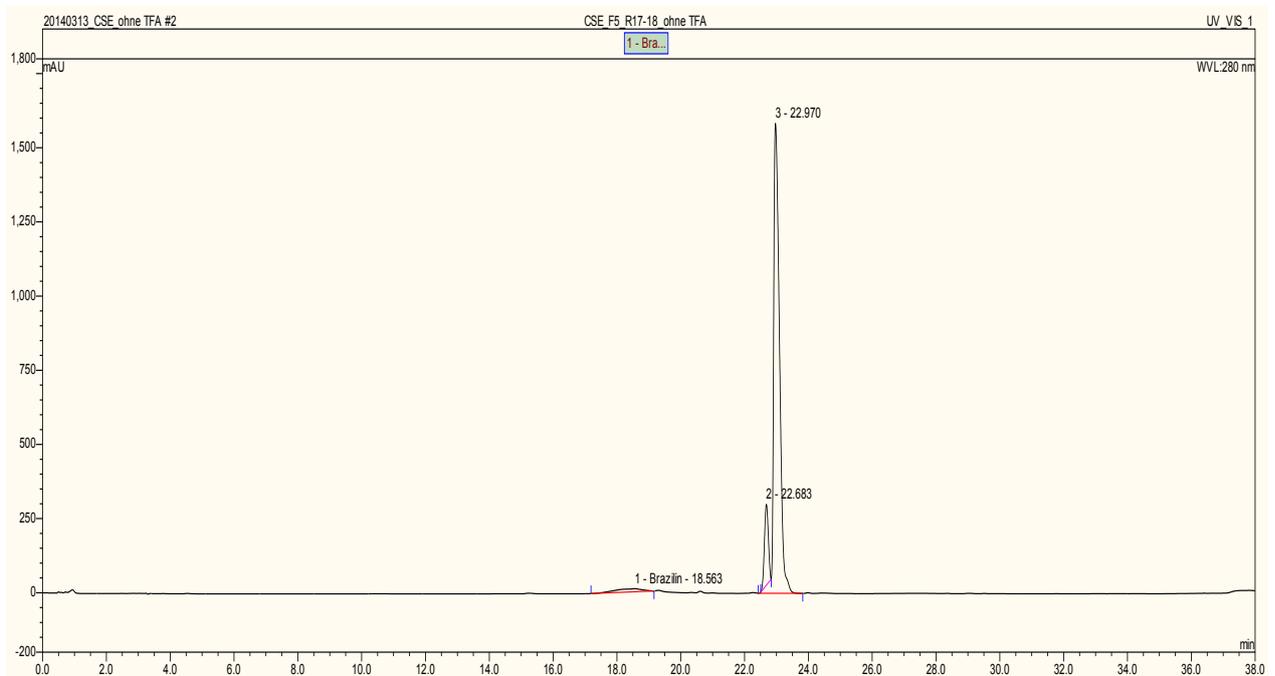


Abbildung 22 Chromatogramm der analytischen HPLC von Fraktion 5 nach der Trennung mit säurefreiem Laufmittel

### 3.6.1 Lagerung von F1 in Laufmittel A

Fraktion 1 wurde in TFA-haltigem Laufmittel A 25 Tage lange gelagert. Die Versuchsdurchführung erfolgte im Zweifachansatz, und zur Ermittlung der Ergebnisse wurde der Mittelwert verwendet.

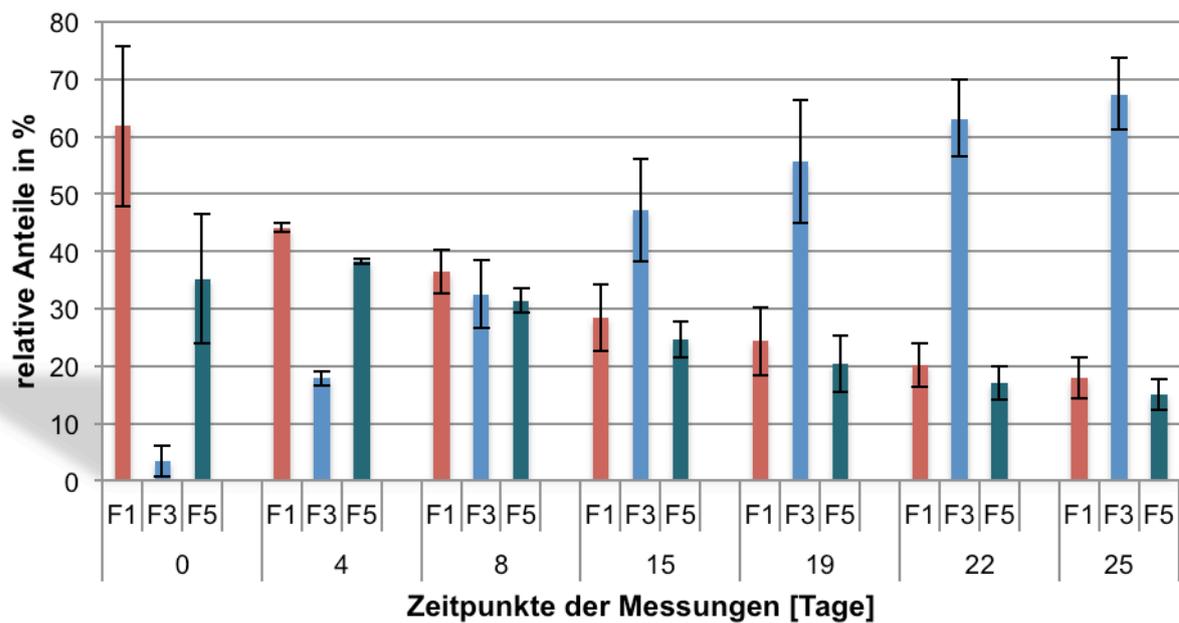


Abbildung 23 Ergebnis der Lagerung von Fraktion 1 in Laufmittel A

Abbildung 23 verdeutlicht, dass der Zusatz des säurehaltigen Laufmittels A relativ schnell zu Umlagerungsreaktionen führt. Schon in den frisch in Laufmittel A gelösten Proben (entspricht Tag 0 in Abbildung 23) sind neben der Hauptfraktion 1 (62 %) auch die Fraktionen 3 (3 %) und vor allem 5 (35 %) vorhanden. Mit zunehmender Lagerungsdauer wird immer mehr der Fraktion 1 bzw. 5 in Fraktion 3 umgelagert. Nach Beendigung der Studie (Tag 25) machte Fraktion 3 mit 67 % den größten Anteil der Gesamtfläche aus. Fraktion 1 hatte nur mehr einen Anteil von 18 % an der Gesamtfläche und Fraktion 5 von 15 %.

### 3.6.2 Lagerung von F1 in künstlichem Magensaft

Fraktion 1 wurde in künstlichem Magensaft 25 Tage lang gelagert. Zur Berechnung der Ergebnisse wurde der Mittelwert des Zweifachansatzes verwendet.

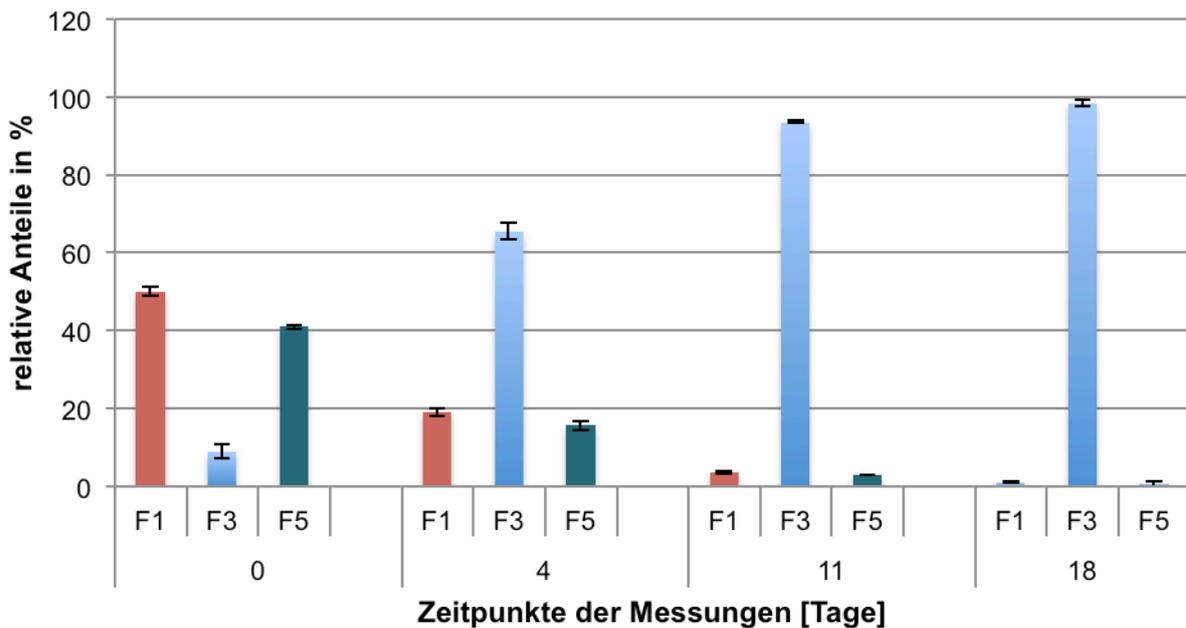


Abbildung 24 Ergebnis der Lagerung von Fraktion 1 in künstlichem Magensaft

Wie Abbildung 24 zeigt, kommt es bei der Lagerung in künstlichem Magensaft zu einer sehr raschen Umlagerung in Fraktion 3. Zu Beginn der Lagerungsstudie nahm Fraktion 1 mit 50 % den größten Anteil an der Gesamtfläche im Chromatogramm ein. Aber auch Fraktion 3 war schon zu 9 % und Fraktion 5 zu 41 % vorhanden. Bereits nach 18 Tagen Lagerung machte Fraktion 3 98 % der Gesamtfläche im Chromatogramm aus. Somit wurden die Fraktionen 1 und 5 fast gänzlich in Fraktion 3 umgelagert.

### 3.6.3 Lagerung von F5 in Laufmittel A

Fraktion 5 wurde in TFA-haltigem Laufmittel A 25 Tage lange gelagert. Zur Ermittlung der Ergebnisse wurde der Mittelwert des Zweifachansatzes herangezogen.

Ähnlich wie bei der Studie mit Fraktion 1 in säurehaltigem Laufmittel A erfolgt bei Fraktion 5 eine allmähliche Umlagerung zu Fraktion 3. Wie Abbildung 25 zeigt, setzt sich die Gesamtfläche des Chromatogramms zu Beginn der Studie aus folgenden Anteilen zusammen: **Fraktion 1** 38 %, **Fraktion 3** 6 % und **Fraktion 5** 56 %. Schon ab Tag 15 der Studie machte Fraktion 3 mit 50 % den größten Anteil an der Gesamtfläche aus, während Fraktion 5 nur mehr 23 % zur Gesamtfläche beitragen konnte. Nach Beendigung der Studie nahm Fraktion 3 mit 73 % den größten Anteil an der Gesamtfläche ein, während Fraktion 5 nur mehr 13 % ausmachte und Fraktion 1 14 %

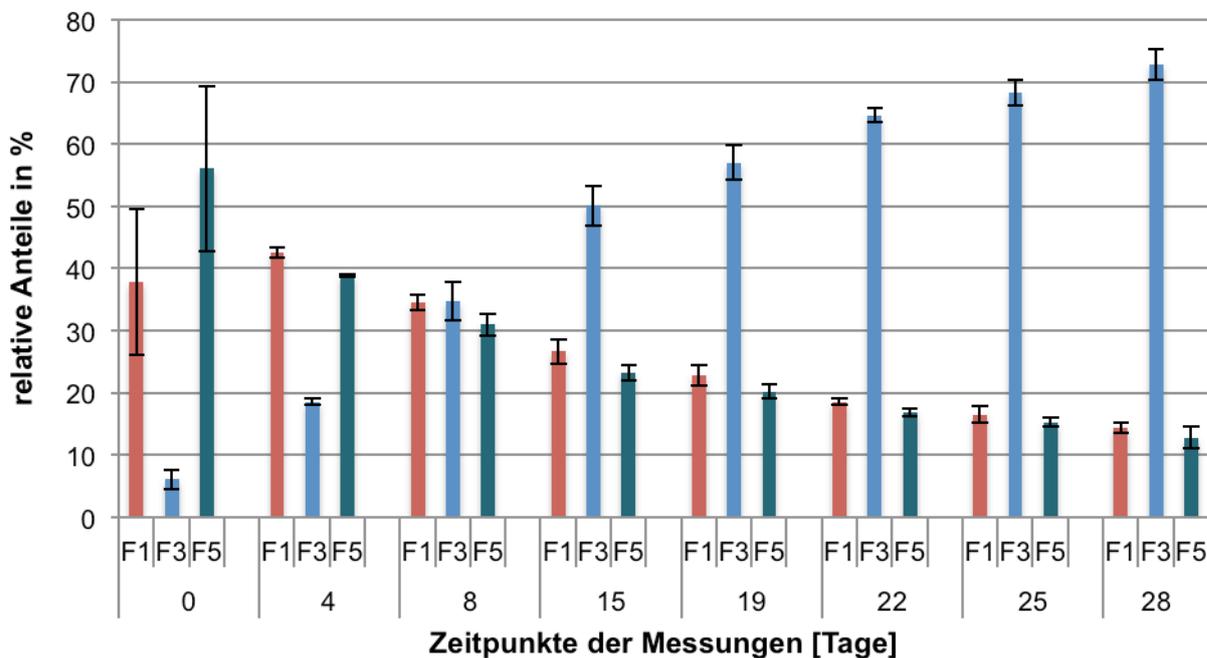


Abbildung 25 Ergebnis der Lagerung von Fraktion 5 in Laufmittel A

### 3.6.4 Lagerung von F5 in künstlichem Magensaft

Die Lagerungsstudie von Fraktion 5 in künstlichem Magensaft erfolgte im Zweifachansatz, wobei der Mittelwert zur Berechnung der Ergebnisse verwendet wurde.

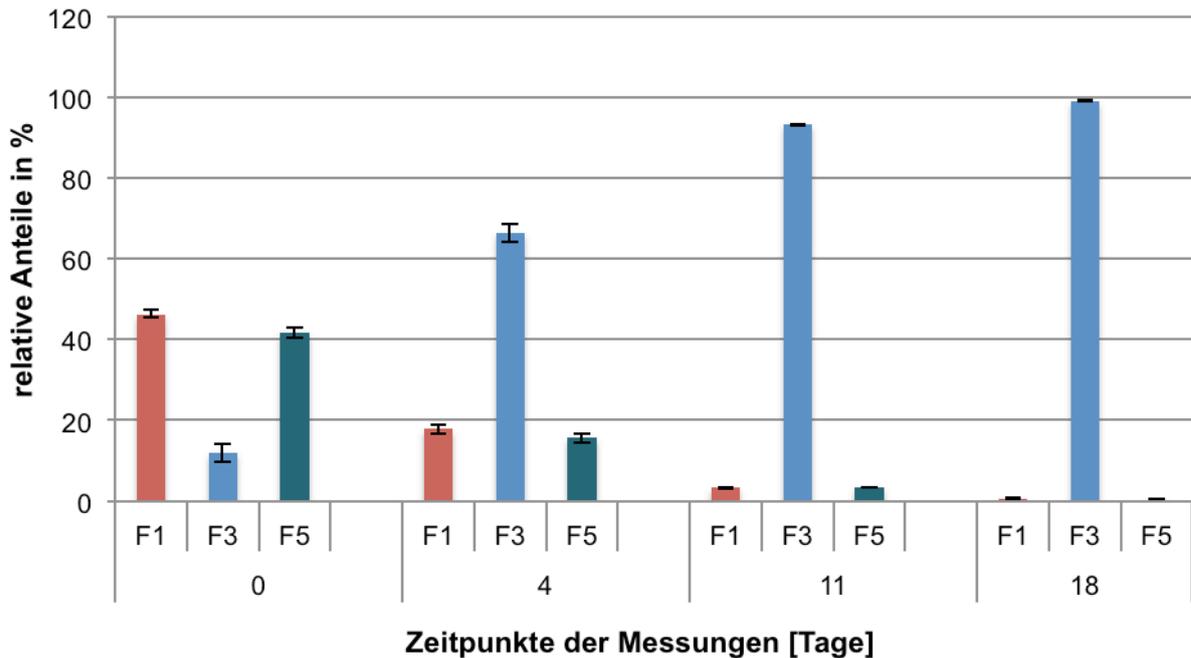


Abbildung 26 Ergebnis der Lagerung von Fraktion 5 in künstlichem Magensaft

Auch bei dieser Versuchsreihe war zu beobachten, dass es zu einer sehr raschen Umlagerung der Fraktion 5 in Fraktion 3 kam (Abbildung 26). Nach 18 Tagen war Fraktion 5 nur mehr zu ca. 0,3 % vorhanden, während Fraktion 3 etwa 99 % der Gesamtfläche ausmachte.

### **3.7 Antiinflammatorische Wirkung einzelner Fraktionen von *Caesalpinia sappan*-Extrakt**

An Makrophagen, welche mit LPS stimuliert wurden, bzw. an Chondrozyten, welche mit Interleukin 1 $\beta$  stimuliert wurden, wurden einzelne Fraktionen von *Caesalpinia sappan*-Extrakt in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Die antiinflammatorische Wirkung wurde anhand der Ausschüttung von IL-6, TNF- $\alpha$  und IL-10 mittels ELISA ermittelt.

Ausgehend von der Positivkontrolle, welche einer 100 % Sekretion des zu testenden Zytokins entsprach, wurden die Ergebnisse der einzelnen Fraktionen als prozentueller Anteil zu der Positivkontrolle angegeben. Zusätzlich wurden bei der Ermittlung der Ergebnisse die Werte des MTT-Tests miteinbezogen, um unterschiedliche Zellzahlen zu berücksichtigen.

Bei den proinflammatorischen Zytokinen IL-6 und TNF- $\alpha$  entspricht eine Reduktion der Zytokinfreisetzung um 25 % oder mehr einer aussagekräftigen antiinflammatorischen Wirkung, wohingegen eine Zunahme der Sekretion von IL-10 um 25 % oder mehr eine entzündungshemmende Wirkung aufzeigt.

#### **3.7.1 Interleukin-6-Ausschüttung aus Makrophagen**

Die Modulation der IL-6-Ausschüttung wurde von den Fraktionen 1, 2, 4, 5, 6 und 7 in unterschiedlichen Konzentrationen getestet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 28 dargestellt. Da die entzündungshemmende Wirkung der Fraktion 3 schon in vorangegangenen Arbeiten analysiert wurde, wurde sie bei dieser Arbeit ausgelassen.

**Fraktion 1** zeigt in der Konzentration 100  $\mu\text{g/ml}$  eine deutliche Reduktion der IL-6-Ausschüttung, wohingegen die Konzentrationen 50  $\mu\text{g/ml}$  und 20  $\mu\text{g/ml}$  keinen reduzierenden Einfluss auf die IL-6-Sekretion aufweisen.

Bei den **Fraktionen 2 und 4** wird bei beiden getesteten Konzentrationen, 100  $\mu\text{g/ml}$  und 50  $\mu\text{g/ml}$ , die Sekretion von IL-6 um die geforderten 25 % reduziert.

**Fraktion 5** weist bei 100 µg/ml eine leichte, nicht signifikante und 50 µg/ml keine relevante Reduktion der IL-6-Sekretion auf.

Da **Fraktion 6** in der Konzentration 100 µg/ml zytotoxisch war, wurde die IL-6-Sekretion in den Konzentrationen 50, 20 und 10 µg/ml getestet. Fraktion 6 erreicht nur bei einer Konzentration von 50 µg/ml die geforderte Reduktion der IL-6-Ausschüttung, während bei den Konzentrationen 20 µg/ml und 10 µg/ml nicht auf eine antiinflammatorische Wirkung geschlossen werden kann.

Auch **Fraktion 7** reagierte in der Konzentration 100 µg/ml zytotoxisch und wurde daher in den Konzentrationen 50, 20 und 10 µg/ml getestet. Die Fraktion 7 weist bei allen 3 getesteten Konzentrationen, 50 µg/ml, 20 µg/ml und 10 µg/ml, eine ausreichende Reduktion der IL-6-Ausschüttung auf.

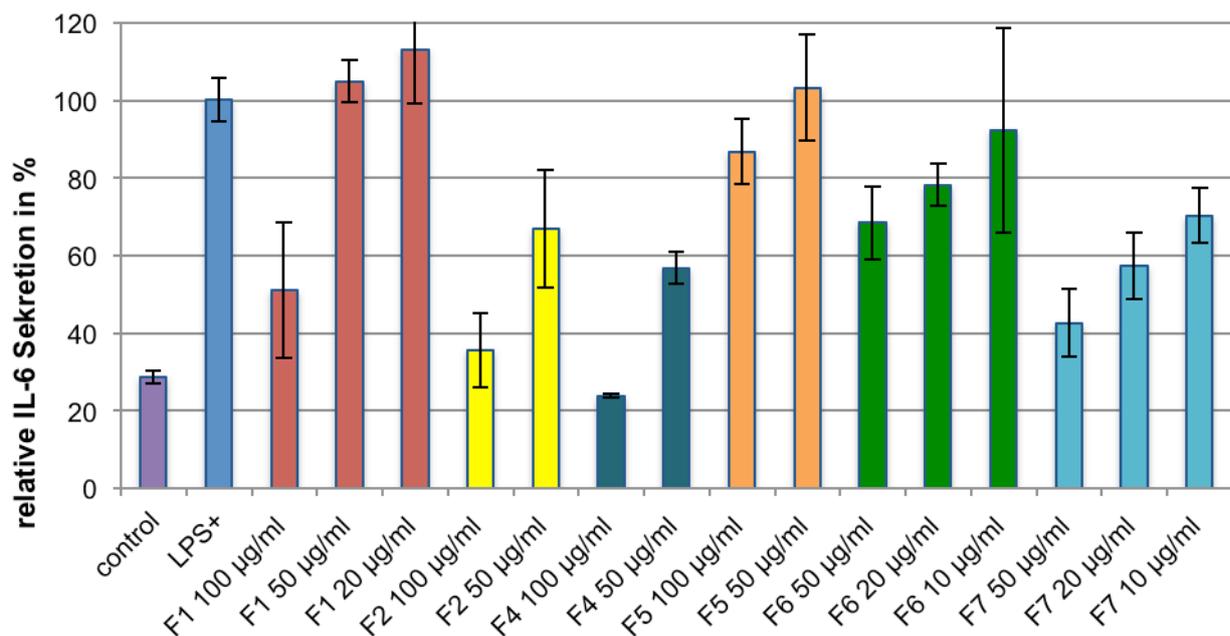


Abbildung 27 Modulation der IL-6-Ausschüttung durch die Fraktionen 1, 2, 4, 5, 6 und 7 von *Caesalpinia sappan* aus Makrophagen

### 3.7.2 TNF- $\alpha$ -Ausschüttung aus Makrophagen

In diesem Versuch wurde die Wirkung der Fraktionen 1 und 5 in unterschiedlichen Konzentrationen auf die TNF- $\alpha$ -Sekretion untersucht (Abbildung 29). Fraktion 1 erreicht in keinen der getesteten Konzentrationen, 100  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml und 20  $\mu$ g/ml, eine Reduktion der TNF- $\alpha$ -Sekretion um die geforderten 25 %. Fraktion 5 reduziert in allen drei getesteten Konzentration, 100  $\mu$ g/ml, 50  $\mu$ g/ml und 20  $\mu$ g/ml, die TNF- $\alpha$ -Sekretion um mindestens 25 %, jedoch ist die Reduktion so gering, dass man Fraktion 5 nicht eindeutig eine antiinflammatorische Wirkung bescheinigen kann.

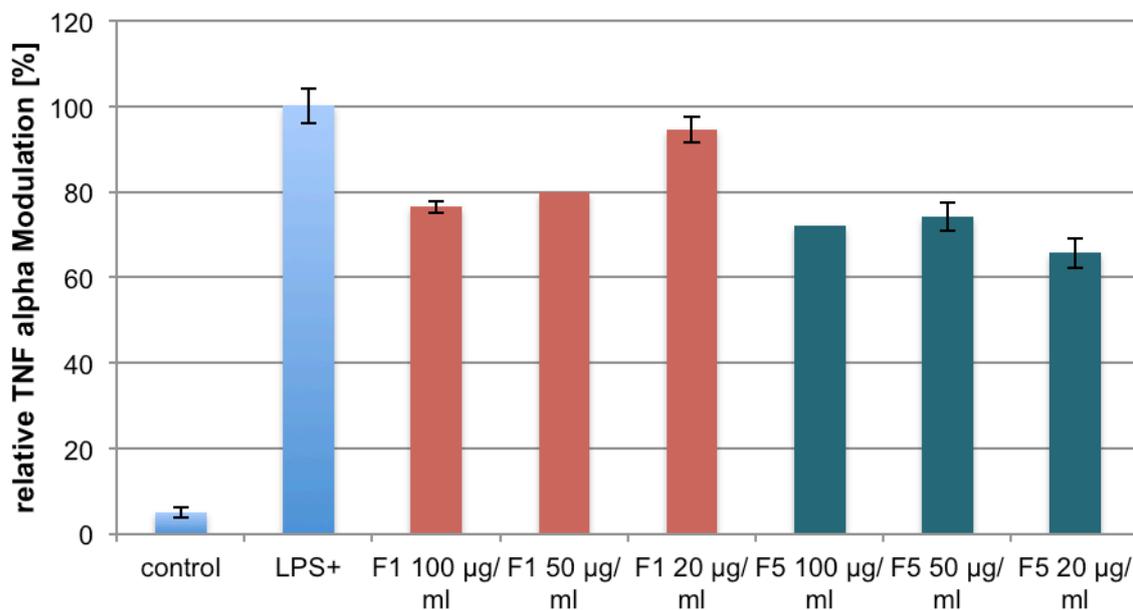


Abbildung 28 Modulation der TNF- $\alpha$ -Ausschüttung durch die Fraktionen 1 und 5 von *Caesalpinia sappan* aus Makrophagen

### 3.7.3 Interleukin-10-Ausschüttung aus Makrophagen

In dieser Studie wurden die Fraktionen 1 und 5 auf ihre Fähigkeit, die Interleukin-10-Ausschüttung aus Makrophagen zu erhöhen, untersucht.

Fraktion 1 wies in keiner der getesteten Konzentrationen eine ausreichende Erhöhung der Interleukin-10-Ausschüttung auf, daher sind die Ergebnisse nicht in

Abbildung 30 dargestellt. Fraktion 5 konnte in der Konzentration 100 µg/ml die Interleukin-10-Sekretion um die geforderten 25 % erhöhen.

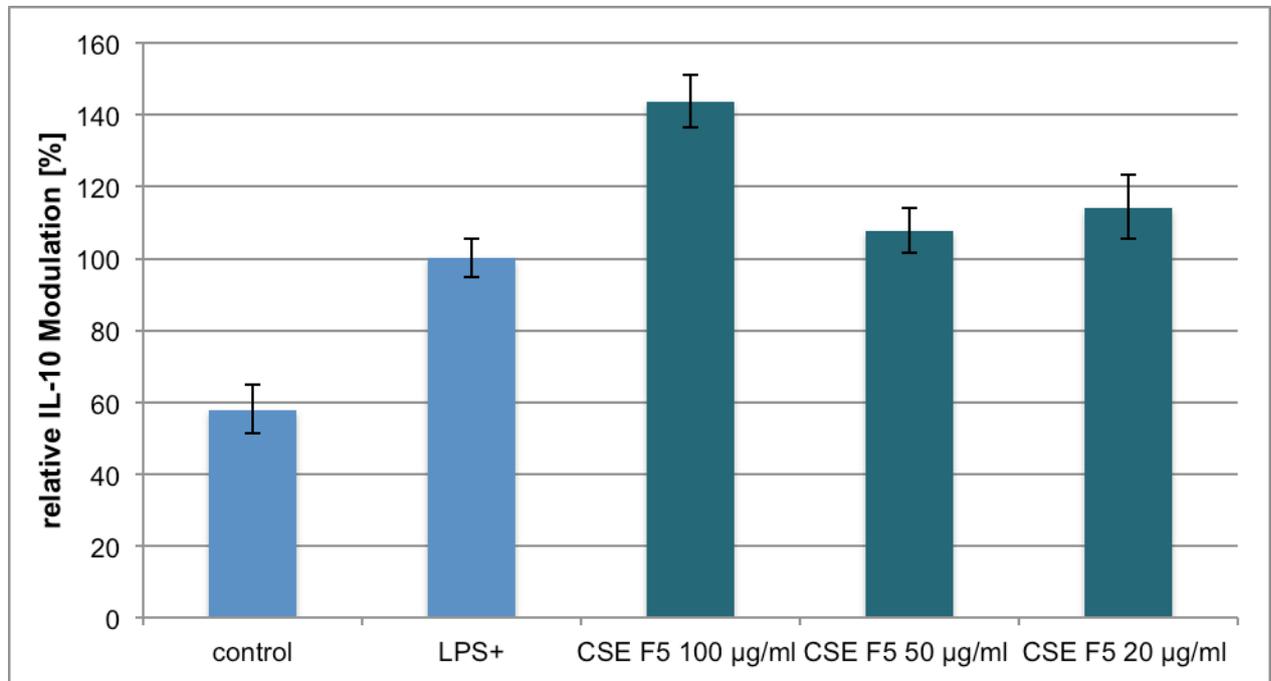


Abbildung 29 Modulation der IL-10 Ausschüttung durch die Fraktion 5 von *Caesalpinia sappan* aus Makrophagen

### 3.7.4 Interleukin-6-Ausschüttung aus Chondrozyten

Aus der Studie ging hervor, dass die Fraktionen 2, 3 und 4 in beiden getesteten Konzentrationen die IL-6-Ausschüttung aus den Chondrozyten um die geforderten 25 % reduzierten (Abbildung 30). Besonders Fraktion 3 reduzierte die IL-6-Sekretion auf ca. 7,3 % (5 µg/ml) bzw. 8,5 % (10 µg/ml). Fraktion 1 und 5 erreichten jeweils in der Konzentration 20 µg/ml die geforderte Reduktion der IL-6-Sekretion.

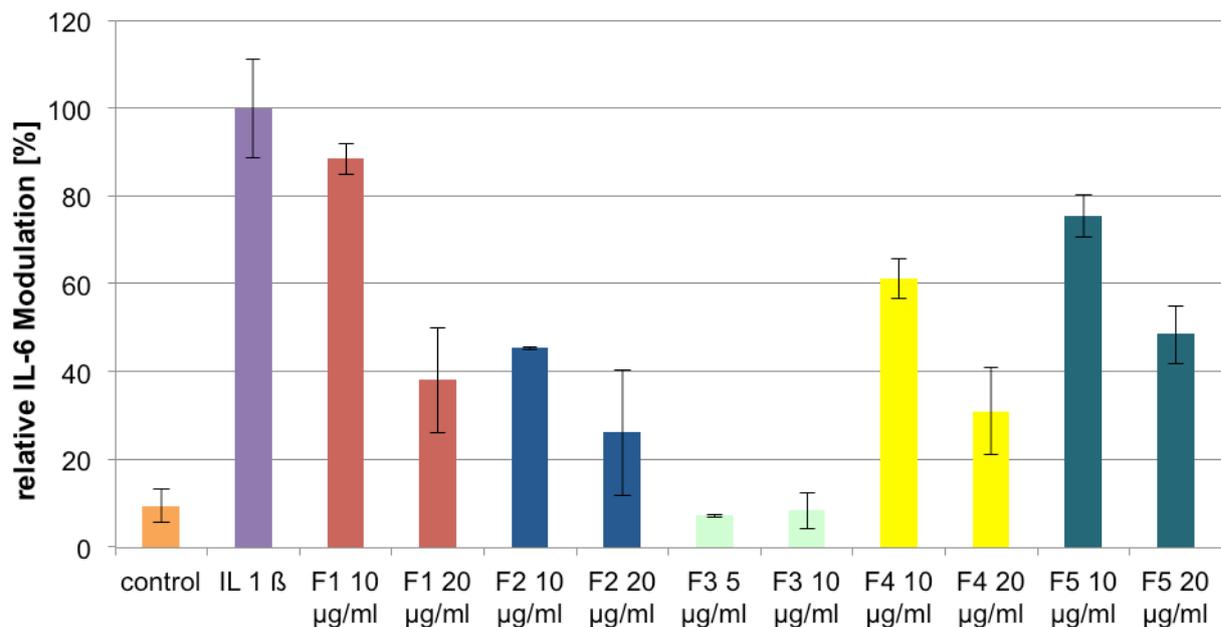


Abbildung 30 Modulation der IL-6-Ausschüttung durch die Fraktionen 1, 2, 3, 4, und 5 von *Caesalpinia sappan* aus Chondrozyten

### 3.7.5 TNF- $\alpha$ -Ausschüttung aus Chondrozyten

Auch bei der TNF- $\alpha$ -Sekretion aus Chondrozyten wies Fraktion 3 die größte Reduktion der TNF- $\alpha$ -Ausschüttung auf (Abbildung 31). Bei der Konzentration von 5  $\mu\text{g/ml}$  verringerte sich die Sekretion auf 12 % und bei 10  $\mu\text{g/ml}$  auf 7 %. Aber auch Fraktion 2 und 4 konnten in beiden getesteten Konzentrationen, 10 bzw. 20  $\mu\text{g/ml}$ , die Modulation um ein beträchtliches Ausmaß reduzieren. Anders als bei der IL-6-Sekretion erreichten Fraktion 1 und 5 in beiden Konzentrationen eine deutliche Senkung der TNF- $\alpha$ -Ausschüttung.

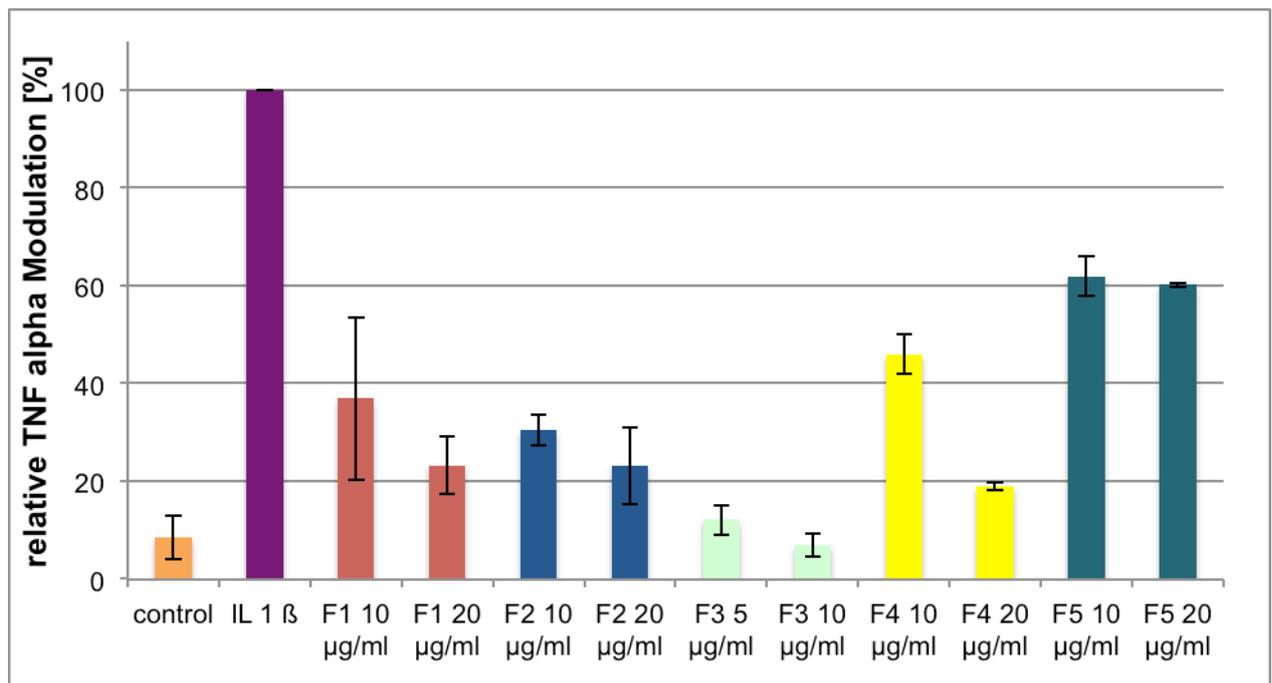


Abbildung 31 Modulation der TNF- $\alpha$ -Ausschüttung durch die Fraktionen 1, 2, 3, 4, und 5 von *Caesalpinia sappan* aus Chondrozyten

### 3.7.6 Interleukin-10-Ausschüttung aus Chondrozyten

Diese Studie brachte leider keine reproduzierbaren Ergebnisse, da die Interleukin-10-Sekretion aus den Chondrozyten zu gering war, um auf eine aussagekräftige antiinflammatorische Wirkung schließen zu können.

## 4 Zusammenfassung

Die Entzündungsreaktion ist ein sehr wichtiger Mechanismus zur Beseitigung von Fremdstoffen bzw. zur Reparatur chemischer oder physikalischer Schäden. Sie ist per se also nicht schädlich, sondern erst einmal nützlich. Eine unbehandelte Entzündung kann allerdings die Integrität des Organismus bedrohen oder aber einen chronischen Verlauf einnehmen. Die Standardtherapie besteht vor allem aus Nicht-steroidalen Antirheumatika (NSAR), Glucocorticoiden und Immunsuppressiva. Aber auch die Phytotherapie als Alternative spielt eine immer wichtigere Rolle.

Das Sappanholz, wie das Kernholz von *Caesalpinia sappan* auch genannt wird, findet vor allem in der Traditionellen Chinesischen Medizin und auch in anderen asiatischen Ländern eine volksmedizinische Anwendung.

Im Zuge dieser Diplomarbeit wurden einzelne Fraktionen von *Caesalpinia sappan* auf antiinflammatorische Wirkung getestet. Als Maß für die antiinflammatorische Wirkung galt die Reduktion der Interleukin-6- und TNF-alpha-Sekretion sowie die Zunahme der Interleukin-10-Sekretion aus mit Lipopolysaccharid stimulierten Makrophagen und mit Interleukin-1 $\beta$  stimulierten Chondrozyten. Wie schon durch andere Studien bestätigt werden konnte, zeigt vor allem Brazilin (Fraktion 3) eine sehr starke antiinflammatorische Wirkung in beiden Zelllinien.

Auch Protosappanin C (Fraktion 2) und (Iso-)Protosappanin B (Fraktion 4) scheinen ein hohes antiinflammatorisches Potential sowohl in Makrophagen als auch in Chondrozyten zu besitzen.

Die Untersuchung der Fraktionen 1 und 5 zeigte eine leichte antiinflammatorische Wirkung, die in Chondrozyten signifikanter war als in Makrophagen.

Darüber hinaus wurden auch apolare Bestandteile von *Caesalpinia sappan*, zusammengefasst als Fraktionen 6 und 7, auf ihr antiinflammatorisches Potential in Makrophagen getestet. Fraktion 7 scheint ein antiinflammatorisches Potential zu besitzen und könnte daher ein interessantes Thema für weitere Untersuchungen sein.

Im Rahmen von Stabilitätsstudien wurde untersucht, wie lange einzelne Fraktionen von *Caesalpinia sappan* in Lösung stabil bleiben.

Die Untersuchung des Gesamtexttrakts von *Caesalpinia sappan* kam zu dem Ergebnis, dass die Fraktionen 1, 3 und 5 mäßig stabil waren. Am stabilsten erwies sich die Mischung aus Protosappanin B und Isoprotosappanin B (Fraktion 4) und Fraktion 2. Der Zusatz von  $\beta$ -Cyclodextrin hatte wider Erwarten keinen stabilisierenden Effekt auf den Gesamtextrakt.

Die Stabilitätsstudie von reinem Brazilin bestätigte die Studienergebnisse bezüglich des Gesamtexttrakts, auch hier war Brazilin in Lösung über einen langen Zeitraum mäßig stabil und der Zusatz von  $\beta$ -Cyclodextrin hatte keinen stabilisierenden Effekt.

Die Fraktionen 1 und 5, welche mittels säurehaltigem Elutionsmittel gewonnen wurden, wiesen jeweils Anteile der anderen Fraktion und Brazilin auf. Diese Lagerungsstudie kam zu dem Ergebnis, dass sowohl Fraktion 1 als auch Fraktion 5 in saurer Lösung in die jeweils andere Fraktion, aber vor allem in Brazilin umgelagert wurde. Auch diesmal hatte das zugesetzte  $\beta$ -Cyclodextrin keinen stabilisierenden Effekt.

Fraktionen 1 und 5, welche während der präparativen HPLC mit säurefreiem Laufmittel gewonnen wurden, lagen absolut rein vor und blieben für zumindest einen Monat in Pulverform stabil. Die Lagerung in säurehaltigem Medium zeigte deutlich, dass sowohl Fraktion 1 als auch Fraktion 5 in Brazilin umgelagert wurden.

## 5 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1</b> Illustration von <i>Caesalpinia sappan</i> L. ( <a href="http://www.botanicus.org">http://www.botanicus.org</a> ) .....	5
<b>Abbildung 2</b> <i>Sappanholz</i> (Wu, S., 2011) .....	6
<b>Abbildung 3</b> Strukturformel von Brazilin ( <a href="http://www.chemspider.com">http://www.chemspider.com</a> ) .....	7
<b>Abbildung 4</b> Gradient für die analytische HPLC .....	10
<b>Abbildung 5</b> Gradient für die präparative HPLC .....	12
<b>Abbildung 6</b> RAW 264,7 Zellen in unterschiedlicher Zelldichte (American Type Culture Collection, 2014) .....	16
<b>Abbildung 7</b> Neubauer Zählkammer (Gstraunthaler et al., 2013) .....	18
<b>Abbildung 8</b> Struktur von MTT und dem färbigen Produkt Formazan (Kupcsik, L., 2011) .....	19
<b>Abbildung 9</b> Chromatogramm (analytische HPLC) von <i>Caesalpinia sappan</i> , detektiert bei 280 nm .....	21
<b>Abbildung 10</b> Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung des Gesamtextrakts von <i>Caesalpinia sappan</i> .....	23
<b>Abbildung 11</b> Ergebnisse der Stabilitätsuntersuchung des Gesamtextrakts von <i>Caesalpinia sappan</i> plus $\beta$ -Cyclodextrin .....	24
<b>Abbildung 12</b> Verlauf der relativen Anteile des Brazilins in H <sub>2</sub> O .....	26
<b>Abbildung 13</b> Verlauf der relativen Anteile des Brazilins in H <sub>2</sub> O und $\beta$ -Cyclodextrin .....	27
<b>Abbildung 14</b> Vergleich der relativen Anteile von Brazilin in H <sub>2</sub> O mit und ohne $\beta$ -Cyclodextrin .....	28
<b>Abbildung 15</b> Chromatogramm der analytischen HPLC von Fraktion 1 direkt nach der Trennung mit 0,1% TFA im Laufmittel .....	29
<b>Abbildung 16</b> Verlauf der relativen Anteile von Fraktion 1, 3 und 5, die aus Fraktion 1 entstehen, nachdem es im Laufmittel mit 0,1 % TFA getrennt wurde .....	30
<b>Abbildung 17</b> Verlauf der relativen Anteile von Fraktion 1, 3 und 5 in wässriger Lösung von Fraktion 1 mit $\beta$ -CD .....	31
<b>Abbildung 18</b> Chromatogramm der analytischen HPLC von Fraktion 5 gleich nach der Trennung mit 0,1 % TFA im Laufmittel .....	32

<b>Abbildung 19</b> Verlauf der relativen Anteile von Fraktion 1,3 und 5 bei der Lagerung von Fraktion 5, das mit TFA im Laufmittel getrennt wurde .....	33
<b>Abbildung 20</b> Verlauf der relativen Anteile von Fraktion 1, 3 und 5 in wässriger Lösung von Fraktion 5 mit $\beta$ -CD .....	34
<b>Abbildung 21</b> Chromatogramm der analytischen HPLC von Fraktion 1 nach der Trennung mit säurefreiem Laufmittel .....	35
<b>Abbildung 22</b> Chromatogramm der analytischen HPLC von Fraktion 5 nach der Trennung mit säurefreiem Laufmittel .....	35
<b>Abbildung 23</b> Ergebnis der Lagerung von Fraktion 1 in Laufmittel A .....	36
<b>Abbildung 24</b> Ergebnis der Lagerung von Fraktion 1 in künstlichem Magensaft .....	37
<b>Abbildung 25</b> Ergebnis der Lagerung von Fraktion 5 in Laufmittel A .....	38
<b>Abbildung 26</b> Ergebnis der Lagerung von Fraktion 5 in künstlichem Magensaft .....	39
<b>Abbildung 27</b> Modulation der IL-6-Ausschüttung durch die Fraktionen 1, 2, 4, 5, 6 und 7 von <i>Caesalpinia sappan</i> aus Makrophagen .....	41
<b>Abbildung 28</b> Modulation der TNF- $\alpha$ -Ausschüttung durch die Fraktionen 1 und 5 von <i>Caesalpinia sappan</i> aus Makrophagen .....	42
<b>Abbildung 29</b> Modulation der IL-10 Ausschüttung durch die Fraktion 5 von <i>Caesalpinia sappan</i> aus Makrophagen .....	43
<b>Abbildung 30</b> Modulation der IL-6-Ausschüttung durch die Fraktionen 1, 2, 3, 4, und 5 von <i>Caesalpinia sappan</i> aus Chondrozyten .....	44
<b>Abbildung 31</b> Modulation der TNF- $\alpha$ -Ausschüttung durch die Fraktionen 1, 2, 3, 4, und 5 von <i>Caesalpinia sappan</i> aus Chondrozyten .....	45

## **6 Tabellenverzeichnis**

<b><i>Tabelle 1</i></b> Methode für die analytische HPLC .....	9
<b><i>Tabelle 2</i></b> Gradientenprogramm für die analytische HPLC .....	10
<b><i>Tabelle 3</i></b> Methode für die präparative HPLC .....	11
<b><i>Tabelle 4</i></b> Gradientenprogramm für die präparative HPLC .....	12
<b><i>Tabelle 5</i></b> Identifizierte Fraktionen des CSE .....	22

## 7 Literaturverzeichnis

- Acuner-Ozbabacan, E. S., Engin, B. H., Guven-Maiorov, E., Kuzu, G., Muratcioglu, S., Baspinar, A., Nussinov, R. (2014). The structural network of Interleukin-10 and its implications in inflammation and cancer. *BMC Genomics*, 15 Suppl 4, S2.
- American Type Culture Collection, 2014. American Type Culture Collection ATCC®. [Online] Available at: <https://www.lgcstandardsatcc.org/~media/Attachments/6/F/C/6/25878.ashx>; aufgerufen am 26.11.2014
- Badami, S., Moorkoth, S., Rai, S. R., Kannan, E., & Bhojraj, S. (2003). Antioxidant activity of Caesalpinia sappan heartwood. *Biol Pharm Bull*, 26(11), 1534-1537.
- Baek, N. I., Ahn, E. M., Hahn, J. T., Bahn, J. H., Jang, J. S., Cho, S. W., Park, J. K. & Choi, S. Y., 2000. Anticonvulsant compounds from the wood of Caesalpinia sappan L.. *Archives of Pharmacal Research*, 4(23), pp. 344-348.
- Baud, V., & Karin, M. (2001). Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. *Trends Cell Biol*, 11(9), 372-377.
- Böcker, W., Denk, H., Heitz, P. U., & Moch, H. (2008). *Lehrbuch Pathologie*. München: Urban & Fischer in Elsevier.
- Botanicus, 2014 [Online] Available at: [http:// www.botanicus.org/page/280088](http://www.botanicus.org/page/280088); aufgerufen am 27.11.2014).
- Butcher, B., Kim, L., Johnson, P., & Denkers, E. (2001). Toxoplasma gondii Tachyzoites Inhibit Proinflammatory Cytokine Induction in Infected Macrophages by Preventing Nuclear Translocation of the Transcription Factor NF- B. *The Journal Of Immunology*, 167(4), 2193-2201.
- Chemspider, 2014 [Online] Available at: [www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=66104&mode=2d](http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=66104&mode=2d) ; aufgerufen am 19.10. 2014).

- Chinese Pharmacopoeia Commission. (2010). Pharmacopoeia of the Peoples Republic of China 2010. Beijing: China Medical Science Press.
- Curfs, J. H., Meis, J. F., & Hoogkamp-Korstanje, J. A. (1997). A primer on cytokines: sources, receptors, effects, and inducers. *Clinical Microbiology Reviews*, 10(4), 742-780.
- Egger, G. (2005). *Die akute Entzündung: Grundlagen, Pathophysiologie und klinische Erscheinungsbilder der unspezifischen Immunität*. Wien: Springer.
- Fiorentino, D. F., Bond, M. W., & Mosmann, T. R. (1989). Two types of mouse T helper cell. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *The Journal of Experimental Medicine*, 170(6) 2081-2095.
- Flora of China, 2010. Caesalpinia. In: *Flora of China*. 10 Hrsg., pp. 41-47
- Gstraunthaler, G., & Lindl, T. (2013). Zell- und Gewebekultur. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum.
- Hikino, H., Taguchi, T., Fujimura, H., & Hiramatsu, Y. (1977). Antiinflammatory principles of Caesalpinia sappan wood and of Haematoxylon campechianum wood . *Planta Med*, 31(03), 214-220.
- Horn, F., Henze, C., & Heidrich, K. (2000). Interleukin-6 Signal Transduction and Lymphocyte Function. *Immunobiology*, 202(2), 151-167.
- Hu, C., Kang, J., Lee, C., Li, C., Liao, J., & Cheng, Y. (2003). Induction of vasorelaxation through activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by brazilin. *European Journal Of Pharmacology*, 468(1), 37-45.
- Hwang, G., Kim, J., Chang, T., Jeon, S., So, D., & Moon, C. (1998). Effects of brazilin on the phospholipase A2 activity and changes of intracellular free calcium concentration in rat platelets. *Archives Of Pharmacal Research*, 21(6), 774-778.
- Iyer, S., & Cheng, G. (2012). Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Critical Reviews In Immunology*, 32(1), 23-63.

- Jeong, I. Y., Jin, C. H., Park, Y. D., Lee, H. J., Choi, D. S., Byun, M. W., & Kim, Y. J. (2008). Anti-inflammatory activity of an ethanol extract of *Caesalpinia sappan* L. in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Journal of Food Science Nutrition*, 13(4), 253-258.
- Kaur, K., Dhingra, S., Slezak, J., Sharma, A., Bajaj, A., & Singal, P. (2008). Biology of TNF $\alpha$  and IL-10, and their imbalance in heart failure. *Heart Failure Reviews*, 14(2), 113-123.
- Flora of China, 2010. *Caesalpinia*. In: *Flora of China*. 10 Hrsg., pp. 41-47.
- Gstraunthaler, G., & Lindl, T. (2013). Zell- und Gewebekultur. *Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum*.
- Hikino, H., Taguchi, T., Fujimura, H., & Hiramatsu, Y. (1977). Antiinflammatory principles of *Caesalpinia sappan* wood and of *Haematoxylon campechianum* wood. *Planta Med*, 31(03), 214-220.
- Horn, F., Henze, C., & Heidrich, K. (2000). Interleukin-6 Signal Transduction and Lymphocyte Function. *Immunobiology*, 202(2), 151-167.
- Hu, C., Kang, J., Lee, C., Li, C., Liao, J., & Cheng, Y. (2003). Induction of vasorelaxation through activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by brazilin. *European Journal Of Pharmacology*, 468(1), 37-45.
- Hwang, G., Kim, J., Chang, T., Jeon, S., So, D., & Moon, C. (1998). Effects of brazilin on the phospholipase A2 activity and changes of intracellular free calcium concentration in rat platelets. *Archives Of Pharmacal Research*, 21(6), 774-778.
- Iyer, S., & Cheng, G. (2012). Role of Interleukin 10 Transcriptional Regulation in Inflammation and Autoimmune Disease. *Critical Reviews In Immunology*, 32(1), 23-63.
- Jeong, I. Y., Jin, C. H., Park, Y. D., Lee, H. J., Choi, D. S., Byun, M. W., & Kim, Y. J. (2008). Anti-inflammatory activity of an ethanol extract of *Caesalpinia sappan* L. in LPS-induced RAW 264.7 cells. *Journal of Food Science Nutrition*, 13(4), 253-258

- Kaur, K., Dhingra, S., Slezak, J., Sharma, A., Bajaj, A., & Singal, P. (2008). Biology of TNF $\alpha$  and IL-10, and their imbalance in heart failure. *Heart Failure Reviews*, 14(2), 113-123.
- Kim, S., Kim, Y., Khil, L., Jeon, S., So, D., Moon, C., & Moon, C. (1998). Brazilin inhibits activities of protein kinase C and insulin receptor serine kinase in rat liver. *Archives Of Pharmacal Research*, 21(2), 140-146.
- Kupcsik, L., (2011) Estimation of cell number based on metabolic activity: The MTT reduction assay. In: Stoddart MJ, editor. *Mammalian Cell Viability: Methods and Protocols*: Springer.
- Lee, J., Bettencourt, R., Brenner, D., Le, T., Barrett-Connor, E., & Loomba, R. (2012). Association between Serum Interleukin-6 Concentrations and Mortality in Older Adults: The Rancho Bernardo Study. *Plos ONE*, 7(4), e34218.
- Madigan, M., Martinko, J., Parker, J., Brock, T., & Goebel, W. (2001). *Mikrobiologie*. Berlin [u.a.]: Spektrum Akad. Verl.
- Martin, M., & Klaus, R. (2009). *Immunologie*. Stuttgart: UTB.
- Mellati, E., Arab, H. R., Tavakkol-Afshari, J., Ebadian, A. R., & Radvar, M. (2007). Analysis of -1082 IL-10 gene polymorphism in Iranian patients with generalized aggressive periodontitis. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 13(11), 510-514.
- Moore, K., de Waal Malefyt, R., Coffman, R., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the Interleukin-10 Receptor. *Annual Review Of Immunology*, 19(1), 683-765.
- Mueller, M., Bieder, D., Toegel, S., Hongwiset, D., Holzer, W., Unger, F. M., Viernstein H. (2015) Compounds from *Caesalpinia sappan* with anti-inflammatory properties in macrophages and chondrocytes. *Phytomedicine*. Under revision.
- Oberholzer, A., Oberholzer, C., & Moldawer, L. (2001). Sepsis syndromes: understanding the role of innate and acquired immunity. *Shock*, 16(2), 83-96.

- Opal, S., Wherry, J., & Grint, P. (1998). Interleukin-10: Potential Benefits and Possible Risks in Clinical Infectious Diseases. *Clinical Infectious Diseases*, 27(6), 1497-1507.
- Otto, M. (2011). *Analytische Chemie*. Weinheim, Wiley-VCH
- Roitt, I. M., Brostoff, J., & Male, D. K. (1995). *Kurzes Lehrbuch der Immunologie*. Stuttgart: Thieme.
- Rücker, G., Neugebauer, M., & Willems, G. G. (2008). *Instrumentelle pharmazeutische Analytik: Lehrbuch zu spektroskopischen, chromatographischen, elektrochemischen und thermischen Analysemethoden; mit 81 Tabellen*. Stuttgart: Wiss. Verl.-Ges.
- Sasaki, Y., Hosokawa, T., Nagai, M., & Nagumo, S. (2007). In Vitro Study for Inhibition of NO Production about Constituents of Sappan Lignum. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30(1), 193-196.
- Srilakshmi, V. S., Vijayan, P., Raj, P. V., Dhanaraj, S. A., & Chandrashekar, H. R. (2010). Hepatoprotective properties of *Caesalpinia sappan* Linn. heartwood on carbon tetrachloride induced toxicity. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48(9), 905-910.
- Stadnyk, A. W. (1994). Cytokine production by epithelial cells. *Faseb Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 8(13), 1041-1047.
- Steffers, G., & Credner, S. (2011). *Allgemeine Krankheitslehre und Innere Medizin für Physiotherapeuten*. Stuttgart [u.a.]: Thieme.
- Thomas, C. (2006). *Histopathologie*. Stuttgart: Schattauer.
- Vollmar, A., Dingermann, T., & Zündorf, I. (2013). *Immunologie: Grundlagen und Wirkstoffe* ; mit 216 Tabellen. Stuttgart: Wiss. Verlagsges.
- Wu, S. (2011). Inflammation and human chondrocytes. *Dissertation, Universität Wien. Fakultät für Lebenswissenschaften*.

- Xie, Y., Ming, D., Xu, H., Dong, H., & But, P. (2000). Vasorelaxing effects of *Caesalpinia sappan*. *Life Sciences*, 67(15), 1913-1918
- Xu, H., & Lee, S. (2004). The antibacterial principle of *Caesalpinia sappan*. *Phytotherapy Research*, 18(8), 647-651

## 8 Curriculum Vitae

### **Sofie Deix**

Geburtsdatum: 2. Mai 1980

Geburtsort: St. Pölten

Staatsbürgerschaft: Österreich

Familienstand: ledig

### **Ausbildung:**

1986 – 1990 Volksschule der Englischen Fräulein St. Pölten

1990 – 1998 Gymnasium der Englischen Fräulein St. Pölten

1999 – 2015 Diplomstudium Pharmazie Universität Wien

2/14 – 7/14 Diplomarbeit am Department für Pharmazeutische  
Technologie und Biopharmazie

### **Berufliche Tätigkeit:**

seit 1999 Herz-Jesu Apotheke, St.Pölten, Teilzeit