

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Kenntnisstand</b>	<b>5</b>
2.1	Die Heilpflanze Kava Kava ( <i>Piper methysticum</i> G. Forst.)	5
2.1.1	Botanische Klassifizierung	5
2.1.1.1	Morphologische Beschreibung	5
2.1.1.2	Herkunft, Verbreitung und taxonomische Einordnung	6
2.1.1.3	Varietäten	7
2.1.1.4	Anbau, Kultivierung und Vermarktung	7
2.1.2	Kulturelle Bedeutung	8
2.1.2.1	Religiöser Hintergrund	9
2.1.2.2	Kava Zeremonie – Herstellung des Kavagetränks	9
2.1.2.3	Verwendung in der traditionellen Medizin	10
2.1.3	Inhaltsstoffe der Wurzel	11
2.1.3.1	Kavalactone	12
2.1.3.1.1	Biosynthese	14
2.1.3.1.2	Chemotypen	16
2.1.3.1.3	Bioverfügbarkeit und Metabolismus	17
2.1.3.1.4	Physiologische Wirkungen	19
2.1.3.1.4.1	Sedierende Wirkung	19
2.1.3.1.4.2	Muskelrelaxierende und antikonvulsive Eigenschaften	19
2.1.3.1.4.3	Lokal anästhetische und analgetische Eigenschaften	20
2.1.3.1.4.4	Antifungale Wirkung	20
2.1.3.1.4.5	Struktur-Wirkungsbeziehungen	21
2.1.3.1.4.6	Pharmakologische Wirkungen	21
2.1.3.1.4.7	Entzündungshemmende Eigenschaften	22
2.1.3.1.4.8	Humanpharmakologische/klinische Studien	22
2.1.3.1.4.9	Nebenwirkungen (akute und chronische Toxizität)	23
2.1.3.2	Flavokavine	24
2.1.3.3	Flavanone	26
2.1.3.4	Alkaloide	27
2.1.3.5	Weitere Inhaltsstoffe	29
2.1.4	Toxikologie	30
2.1.4.1	Extrakte	30

2.1.4.2	Mögliche Ursachen für Toxizitätsfälle	31
2.1.4.3	Durchgeführte toxikologische Prüfungen	32
2.1.4.4	Hepatotoxizität	33
2.1.4.4.1	Indikatoren für Leberschädigung	36
2.1.4.4.2	Inhibierung von Cytochrom P450	37
2.1.4.4.3	Inhibierung von Cyclooxygenase	38
2.1.4.4.4	Rolle des Glutathions in der Leber	38
2.1.4.4.5	Pipermethystin in Arznei- und Nahrungsergänzungsmitteln	39
2.1.4.4.6	Toxische Metabolite	40
2.1.4.4.7	Einfluss der Zubereitungsform auf die Hepatotoxizität	41
2.1.4.5	Zytotoxizität	42
2.2	Bestimmung von Zytotoxizität <i>in-vitro</i>	44
2.2.1	Direkte Bestimmung der überlebenden Zellen	44
2.2.2	Indirekte Bestimmung der überlebenden Zellen	45
2.2.2.1	Der LDH-Test	45
2.2.2.2	Der MTT-Test	46
2.2.2.3	Der Resazurin-Test/Alamar Blue™-Test	46
2.3	Bestimmungsmethoden für die Kavainhaltsstoffe	48
2.3.1	Anreicherung und Isolierung der Inhaltsstoffe	48
2.3.1.1	Gelchromatographie an Sephadex LH-20	48
2.3.1.2	High-Speed Countercurrent Chromatography	49
2.3.2	Analysierung der Inhaltsstoffe	52
2.3.2.1	Gaschromatographie	52
2.3.2.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie	52
2.3.3	Charakterisierung der Inhaltsstoffe	53
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>54</b>
3.1	„Bioassay-orientierte Fraktionierung“ von Inhaltsstoffen der Kavawurzel mit Hilfe des Brine-Shrimp-Assays	54
3.1.1	Extraktgewinnung	54
3.1.1.1	Charakterisierung der Extrakte	55
3.1.1.2	Brine-Shrimp-Assay	57
3.1.2	Vorfraktionierung an Sephadex LH-20	59
3.1.2.1	Charakterisierung der Sephadex-Fractionen	59
3.1.2.2	Brine-Shrimp-Assay	61

3.1.3	Fraktionierung mittels High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)	62
3.1.3.1	Sephadex-Fraktion 1.2	62
3.1.3.1.1	Charakterisierung der HSCCC-Fraktionen	63
3.1.3.1.2	Brine-Shrimp-Assay	64
3.1.3.1.2.1	Fraktion 1.2.3	65
3.1.3.1.2.2	Fraktion 1.2.6	66
3.1.3.1.2.3	Fraktion 1.2.Coil	67
3.1.3.1.2.4	Extrakt Aceton RT (Taveuni)	68
3.1.3.2	Sephadex-Fraktion 1.3	72
3.1.3.2.1	Charakterisierung der HSCCC-Fraktionen	72
3.1.3.2.2	Brine-Shrimp-Assay	74
3.1.3.2.2.1	Fraktion 1.3.6	75
3.1.3.2.2.2	Fraktion 1.3.Coil	76
3.1.3.2.2.3	Sephadex-Fraktion 2.3	77
3.1.3.3	Sephadex-Fraktion 1.4	78
3.1.3.3.1	Charakterisierung der HSCCC-Fraktionen	79
3.1.3.3.2	Brine-Shrimp-Assay	81
3.1.4	Isolierung von Reinsubstanzen	82
3.1.4.1	Hauptkavalactone	82
3.1.4.2	Minorkavalactone	85
3.1.4.3	Weitere Inhaltsstoffe	88
3.1.4.3.1	Flavokavine und Flavanone	88
3.1.4.3.2	Zimtsäurederivate	98
3.1.4.4	Quantifizierungen	100
3.1.4.5	HSCCC-Fraktionen 1.2.6b und 1.3.6b	103
3.2	„Bioassay-orientierte Fraktionierung“ von Inhaltsstoffen der Kavawurzel mit Hilfe des Alamar Blue™-Tests	105
3.2.1	Rohextrakte	105
3.2.1.1	Alamar Blue™-Test	105
3.2.1.2	LDH-Test	107
3.2.2	Sephadex-Fraktionen	108
3.2.1	Reinverbindungen	109
3.3	Vergleich der Testsysteme	110
3.3.1	Rohextrakte	110
3.3.2	Sephadex-Fraktionen	111
3.3.3	Reinsubstanzen	111

3.3.4	Fazit	111
3.4	Zusammenfassung	112
<b>4</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>116</b>
4.1	Probenmaterial	116
4.2	Chemikalien	116
4.3	Geräteparameter	116
4.3.1	Dünnschichtchromatographie	116
4.3.2	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)	117
4.3.2.1	Analytische Anlage	117
4.3.2.2	Präparative Anlage	117
4.3.3	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie (LC-MS)	117
4.3.4	Verwendete HPLC Säulen	117
4.3.4.1	Analytische Säulen	117
4.3.4.2	Präparative Säulen	118
4.3.5	HPLC-Gradienten	118
4.3.5.1	Analytisches Fließmittelsystem für die Normalphase	118
4.3.5.2	Analytische Gradienten für die Umkehrphase	118
4.3.5.3	Präparative Fließmittelsysteme für die Normalphase	119
4.3.5.4	Präparative Gradienten für die Umkehrphase	120
4.3.6	Gelchromatographie an Sephadex LH-20	120
4.3.7	High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC)	120
4.3.8	Massenspektrometrie (MS)	120
4.3.9	NMR	121
4.3.10	Circulardichroismus (CD)	121
4.3.11	Photometer	121
4.4	Isolierung von Inhaltsstoffen aus der Kavawurzel	121
4.4.1	Extrakterstellung	121
4.4.1.1	Wurzeln aus Fiji	121
4.4.1.2	Wurzeln von der Insel Taveuni (Fiji)	122
4.4.1.3	Wurzeln aus Samoa	122
4.4.2	Vorfraktionierung an Sephadex LH-20	123
4.4.3	Fraktionierung mittels HSCCC	124
4.4.3.1	Ermittlung des Fließmittelsystems	124
4.4.3.2	Durchführung der Trennung	125

4.4.3.3	Berechnung der Verteilungskoeffizienten	129
4.4.4	Reinstoffisolierung mittels präparativer HPLC	130
4.5	Quantifizierung der Inhaltsstoffe	130
4.5.1	Erstellung der Kalibriergeraden	130
4.5.2	Probenlösungen	131
4.5.2.1	Rohextrakte	131
4.5.2.2	Sephadex-Fractionen	131
4.5.2.3	HSCCC-Fractionen 1.2.6b und 1.3.6b	131
4.5.3	Berechnung	131
4.6	Bestimmung der Varietäten	131
4.7	Brine-Shrimp-Assay auf Zytotoxizität	132
4.7.1	Material	132
4.7.2	Ausbrüten der Eier	132
4.7.3	Probenvorbereitung	132
4.7.4	Auswertung	133
4.7.5	Ergebnisse	133
4.7.5.1	Rohextrakte	134
4.7.5.2	Sephadex-Fractionen	134
4.7.5.3	HSCCC-Fractionen	134
4.7.5.4	Reinverbindungen	135
4.8	Alamar Blue <sup>TM</sup> -Test/LDH-Test	136
4.9	Isolierte Verbindungen	137
4.9.1	(6 <i>R</i> )-Kavain (K)	137
4.9.2	(6 <i>S</i> )-7,8-Dihydrokavain (DHK)	137
4.9.3	(6 <i>R</i> )-Methysticin (M)	138
4.9.4	(6 <i>S</i> )-7,8-Dihydromethysticin (DHM)	138
4.9.5	Yangonin (Y)	139
4.9.6	Demethoxyyangonin (DMY)	139
4.9.7	(6 <i>S</i> )-5,6,7,8-Tetrahydroyangonin (THY)	139
4.9.8	(6 <i>R</i> )-5,6-Dihydroyangonin (DHY)	140
4.9.9	(5 <i>S</i> ,6 <i>S</i> )-5-Hydroxy-7,8-dihydrokavain (5HDHK)	140
4.9.10	(6 <i>S</i> )-5,6,7,8-Tetrahydro-11-methoxyyangonin (TH11MY)	141
4.9.11	11-Methoxy-5,6-dihydroyangonin (11M5,6DHY)	141
4.9.12	11-Methoxyyangonin (11MY)	142
4.9.13	Flavokavin A (FK-A)	142
4.9.14	Flavokavin B (FK-B)	142

4.9.15	Flavokavin C (FK-C)	143
4.9.16	Cardamonin (CAR)	143
4.9.17	(2S)-5-Hydroxy-7,4'-dimethoxyflavanon (5H7,4'DMF)	144
4.9.18	(2S)-5-Hydroxy-7-methoxyflavanon (5H7MF)	144
4.9.19	(2S)-5,4'-Dihydroxy-7-methoxyflavanon (5,4'DH7MF)	145
4.9.20	Zimtsäurebornylester (ZBE)	145
4.9.21	3',4'-Methylenedioxyzimtsäurebornylester (MDZBE)	146
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>147</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b>	<b>160</b>
<b>7</b>	<b>Übersicht der wichtigsten Inhaltsstoffe der Kavawurzel</b>	<b>169</b>