

3230 - 624 3

# DISSERTATIONES BOTANICÆ

BAND 214

---

Apigenin, Apigenin-7-glucosid und  
Acylderivate aus *Matricaria recutita* L.:  
Analytik,  $^{14}\text{C}$ -Markierung und Beiträge zur  
Pharmakokinetik

von

KATHARINA VOGELSANG-TSCHIERSCH

Mit 46 Abbildungen und 29 Tabellen



J. CRAMER

in der Gebrüder Borntraeger Verlagsbuchhandlung

BERLIN · STUTTGART 1994

## Inhaltsverzeichnis

	Seite
I. <b>Einleitung</b> .....	1
I.1.     Systematik.....	1
I.2.     Inhaltsstoffe und ihre Wirkungen .....	3
I.3.     Kamillenzüchtung.....	8
I.4.     Themenentwicklung dieser Arbeit.....	9
II. <b>Analytisch- präparativer Teil</b> .....	11
II.1.     Nachweis und Analytik von Apigenin, Apigenin-7-glucosid und dessen Acylderivaten.....	11
II.1.1.    Isolierung und Strukturaufklärung eines neuen acetylierten Apigenin-7-glucosid-Derivats aus <i>Matricaria recutita</i> L. ....	11
II.1.1.1.   Isolierung.....	11
II.1.1.2.   Identifizierung mittels <sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie und Massenspektroskopie.....	13
II.1.2.     Analytische Arbeitsweisen.....	18
II.1.2.1.    Dünnssichtchromatographie.....	18
II.1.2.2.    Hochleistungsflüssigchromatographie.....	23
II.1.2.2.1.   Ermittlung der Lage acylierter Apigenin-7-glucosid-Derivate im HPLC-Chromatogramm.....	23
II.1.2.2.2.   Validierung der HPLC-Methode für Apigenin-7-glucosid.....	26
II.1.2.2.3.   Validierung der HPLC-Methode für Apigenin.....	29
II.2.      Einfluß des Extraktionsverfahrens auf die Flavonoid- Zusammensetzung.....	31
II.2.1.     Einfluß des Extraktionsmittels.....	32
II.2.2.     Einfluß der Extraktionsmethode.....	33
II.3.      Einfluß der Luftfeuchtigkeit während der Lagerung unter- schiedlich getrockneter Zungenblüten.....	36
II.4.      Korrelation zwischen Blühreihenfolge und Blühhöhe einzelner Pflanzen und dem Gehalt an Apigenin, Apigenin-7-glucosid und dessen Derivaten.....	38
II.5.      Einfluß exogener Faktoren auf den Gehalt an Apigenin-Flavonen.....	45
II.6.      Wertung der Ergebnisse.....	49

III.	<b><math>^{14}\text{C}</math>-Markierung von Flavonoiden mit Apigenin-Grundstruktur.....</b>	52
III.1.	Einleitung.....	52
III.2.	Applikation von $[^{14}\text{C}]\text{O}_2$ als Precursor in einer Biosynthesekammer.....	53
III.2.1.	Versuchsbedingungen der $^{14}\text{C}$ -Markierungen in der Biosynthesekammer.....	55
III.2.2.	Ermittlung des $[^{14}\text{C}]\text{O}_2$ -Gehalts in der Atmosphäre der Biosynthesekammer während der Versuchszeiträume.....	57
III.2.3.	Vergleich der spezifischen Radioaktivitäten des $[^{14}\text{C}]$ Apigenins aus dem Zungenblütenextrakt, aus $[^{14}\text{C}]$ Apigenin-7-glucosid und seinen $[^{14}\text{C}]$ -markierten Acylderivaten im Biosynthesekammer Versuch I 1989.....	58
III.2.3.1.	Gewinnung des $[^{14}\text{C}]$ Apigenins aus dem Extrakt sowie aus $[^{14}\text{C}]$ Apigenin-7-glucosid und den $^{14}\text{C}$ -markierten Acylderivaten...	58
III.2.3.2.	Ergebnisse und Diskussion.....	60
III.2.4.	Vergleichende $[^{14}\text{C}]\text{O}_2$ -Markierungsversuche unterschiedlicher Kultivare von <i>Matricaria recutita</i> L. ....	61
III.2.4.1.	Von den Blütenköpfchen aufgenommene, extrahierbare Gesamtradioaktivität, geerntete Trockenmassen, Einbauraten in die Blütenköpfchen sowie spezifische Aktivitäten der Zungenblüten und Blütenköpfchen.....	61
III.2.4.2.	Spezifische Radioaktivitäten von $[^{14}\text{C}]$ Apigenin, $[^{14}\text{C}]$ Apigenin-7-glucosid und $[^{14}\text{C}]$ Apigenin-7- $\beta$ -D-(6 $''$ O-acetyl)glucosid.....	63
III.2.4.3.	Wertung der Ergebnisse.....	65
III.3.	Isolierung von $[^{14}\text{C}]$ Apigenin und $[^{14}\text{C}]$ Apigenin-7-glucosid für pharmakokinetische in-vitro-Versuche.....	66
III.3.1.	$^{14}\text{C}$ -Markierung über einen Docht unter künstlicher Belichtung...	66
III.3.1.1.	Von den Blütenköpfchen aufgenommene, extrahierbare Gesamtradioaktivität, Einbauraten in die Blütenköpfchen sowie spezifische Radioaktivitäten der Zungenblüten und Blütenköpfchen.....	67
III.3.1.2.	Spezifische Radioaktivität des $[^{14}\text{C}]$ Apigenin-7-glucosids nach Inkorporation von $[2-^{14}\text{C}]$ Acetat.....	68
III.3.2.	Ernterträge.....	68
III.3.3.	Ergebnis der Isolierung der Flavone und Diskussion.....	69

<b>IV.</b>	<b>Benzodiazepinrezeptorstudien mittels Radiorezeptorassay.....</b>	<b>70</b>
IV.1.	Einleitung.....	70
IV.2.	Benzodiazepin-Rezeptorstudien mit Apigenin, Apigenin-7-glucosid und Herniarin.....	76
IV.2.1.	Ergebnisse.....	77
IV.2.2.	Diskussion.....	79
<b>V.</b>	<b>Pharmakokinetik.....</b>	<b>80</b>
V.1.	Einleitung.....	80
V.2.	Metabolisierung der Apigenin-Flavone.....	81
V.2.1.	Metabolisierung der Kamillenflavone durch Enzyme im Darmsystem.....	81
V.2.1.1.	Einfluß enzymhaltiger Arzneimittel.....	82
V.2.1.2.	Einfluß von Lipase, Protease, $\alpha$ -Amylase, Gallensäuren und Zellulase.....	83
V.2.2.	In-vitro-Abbau von [ $^{14}$ C]Apigenin-7-glucosid im Leberhomogenat.....	85
V.3.	Resorption und Elimination von Flavonoiden und Cumarinen nach oraler Gabe eines Kamillengesamtauszugs.....	89
V.3.1.	Optimierung der Blutproben-Aufarbeitung.....	89
V.3.1.1.	Fällung der Proteine durch verschiedene Reagenzien.....	90
V.3.1.2.	Entsalzung der aufgearbeiteten Serumproben durch Amberlite®-Harze.....	92
V.3.1.3.	Validierung der Aufarbeitungsmethode.....	94
V.3.2.	Charakterisierung des oral applizierten Extrakts.....	97
V.3.2.1.	Hochleistungsflüssigchromatographie.....	97
V.3.2.2.	Gaschromatographie.....	101
V.3.3.	Bestimmung des Apigenin-, Apigenin-7-glucosid-, und Herniarin-gehalts im Plasma nach oraler Gabe des Kamillenextrakts.....	103
V.3.3.1.	Erstellung einer Blutspiegelkurve für Herniarin.....	103
V.3.3.2.	Bestimmung der Nachweisgrenzen und Wiederfindungsraten von Apigenin, Apigenin-7-glucosid, Herniarin und Umbelliferon im Blut.....	105
V.3.3.3.	Nachweis von Herniarin und Umbelliferon aus dem 24-Stunden-Sammelurin.....	106
V.4.	Wertung der Ergebnisse.....	109

V.5.	In-vitro-Permeation von [ <sup>14</sup> C]Apigenin und [ <sup>14</sup> C]Apigenin-7-glucosid durch die Epidermis und das Stratum corneum.....	112
V.5.1.	Einleitung.....	112
V.5.2.	Permeationsversuch mit [ <sup>14</sup> C]Apigenin durch die humane Epidermis.....	118
V.5.3.	Permeationsversuche durch das Stratum corneum.....	119
V.5.3.1.	Permeationsversuche mit [ <sup>14</sup> C]Apigenin.....	120
V.5.3.2.	Permeationsversuche mit [ <sup>14</sup> C]Apigenin-7-glucosid.....	123
V.5.4.	Wertung der Ergebnisse.....	125
VI.	<b>Zusammenfassung</b> .....	126
VII.	<b>Material und Methoden</b> .....	133
VII.1.	Pflanzenmaterial.....	133
VII.1.1.	Anzucht und Behandlung des Pflanzenmaterials.....	133
VII.1.2.	Klimatische Wachstumsbedingungen.....	135
VII.2.	Probenziehung, Trocknung und Lagerungsbedingungen.....	135
VII.3.	Lösungsmittel und Chemikalien.....	136
VII.4.	Extraktionsbedingungen.....	136
VII.4.1.	Ermittlung des optimalen Lösungsmittels.....	136
VII.4.2.	Extrakte zur Überprüfung des Einflusses der Extraktionsmethode.....	136
VII.4.2.1.	Ultraschallextraktion.....	136
VII.4.2.2.	Schüttleextraktion.....	137
VII.4.2.3.	Soxhletextraktion.....	137
VII.4.3.	Extrakt für die präparative Isolierung der Acylderivate des Apigenin-7-glucosids.....	137
VII.4.4.	Extrakt zur Überprüfung des Einflusses von Dünndarmenzymen..	137
VII.5.	Chromatographische Methoden.....	138
VII.5.1.	Säulenchromatographie.....	138
VII.5.1.1.	Vorfraktionierung des Extrakts für die präparative Isolierung von Apigenin, Apigenin-7-glucosid und der Acylderivate.....	138
VII.5.1.2.	Aufreinigung der Substanzen über Sephadex® LH-20.....	139
VII.5.2.	Dünnschichtchromatographie.....	139
VII.5.2.1.	DC-Methode 1 zur Auf trennung der Flavonglykoside.....	139
VII.5.2.2.	DC-Methode 2 zur Auf trennung der Flavonaglyka.....	140

VII.5.2.3.	DC-Methode 3 zur Überprüfung der etherisch-Öl Komponenten..	140
VII.5.3.	Hochleistungsflüssigchromatographie.....	140
VII.5.3.1.	HPLC-Methode 1 zur Bestimmung des Apigenin-7-glucosids und dessen Derivate.....	142
VII.5.3.2.	HPLC-Methode 2 zur Bestimmung der Flavonaglyka.....	142
VII.5.4.	Gaschromatographie.....	143
VII.6.	Spektroskopische Methoden.....	143
VII.6.1.	<sup>1</sup> H-NMR-Spektroskopie.....	143
VII.6.2.	Massenspektroskopie.....	144
VII.7.	Radioaktive Arbeitsmethoden.....	144
VII.7.1.	Szintillations-Messung.....	144
VII.7.1.1.	<sup>14</sup> C-Messung.....	144
VII.7.1.2.	<sup>3</sup> H-Messung.....	145
VII.7.2.	[ <sup>14</sup> Cl]O <sub>2</sub> -Markierung in einer Biosynthesekammer.....	145
VII.7.3.	<sup>14</sup> C-Markierung mit [2- <sup>14</sup> C]Acetat als Precursor über einen Docht.....	146
VII.7.4.	Autoradiographie.....	147
VII.7.5.	Berechnung der radiochemische Reinheit über DC.....	147
VII.7.6.	Durchführung der Rezeptorbindungsstudien.....	148
VII.7.7.	In-vitro-Abbau im Leberhomogenat.....	150
VII.7.8.	Permeationsversuche mit Epidermis und Stratum corneum.....	151
VII.7.8.1.	Aufarbeitung der Epidermis und des Stratum corneums zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität.....	153
VII.8.	Bestimmung von Apigenin, Apigenin-7-glucosid und Herniarin im Plasma.....	153
VII.9.	Bestimmung von Apigenin, Apigenin-7-glucosid und Herniarin im 24-Stunden-Sammelurin.....	154
VIII.	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	155
IX.	<b>Anhang.....</b>	169
IX.1.	Tabelle IX.1.....	170
IX.2.	<sup>1</sup> H-NMR-Spektrum von Apigenin-7-β-D-(6"O-acetyl)glucosid.....	171
IX.3.	<sup>1</sup> H-NMR-Spektrum von Apigenin-7-β-D-(4"O-acetyl)glucosid.....	172
IX.4.	Massenspektrum von Apigenin-7-β-D-(6"O-acetyl)glucosid.....	173
IX.5.	Massenspektrum von Apigenin-7-β-D-(4"O-acetyl)glucosid.....	174
IX.6.	Ausmaße der Franz-Zelle für die Versuche mit Stratum corneum..	175