



universität  
wien

## **DIPLOMARBEIT**

### **GLUCURONIDIERUNG UND SULFATIERUNG VON METHYLHONOKIOL IN DER ISOLIERT PERFUNDIERTEN RATTENLEBER**

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

|                  |                              |
|------------------|------------------------------|
| Verfasserin:     | Romana Bruckmüller           |
| Matrikel-Nummer: | 0007413                      |
| Studienrichtung: | Pharmazie (A-449)            |
| Betreuer:        | Ao. Univ. Prof. Walter Jäger |

Wien, August 2008

Diese Arbeit entstand in der Zeit von Oktober 2007 bis März 2008 am Department für Klinische Pharmazie und Diagnostik unter der Anleitung von Herrn Univ. Prof. Dr. Walter Jäger, der mich mit der Thematik dieser Diplomarbeit vertraut machte und hierbei jederzeit tatkräftig unterstützte.

Für anfällige Fragen konnte ich mich an Mag. Michaela Miksits wenden, die mich in dieser Zeit betreut hat und eine große Hilfe war.

Meiner Mutter Johanna Bruckmüller gebührt ein ganz besonderer Dank, weil sie mich zum Pharmazie Studium animiert hat und jederzeit mit Liebe und Ratschlägen begleitet hat.

Ebenso möchte ich mich bei meinem Onkel Ferdinand Binder bedanken, der mir während meiner gesamten Studienzeit eine segensreiche Unterstützung war.

Meiner Liebe Stefan danke ich für sein Verständnis und seine immerwährende Bereitschaft mir mit Rat und Tat zur Seite zu stehen.

# Inhalt

|          |                                                                               |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1</b> | <b>PROBLEMSTELLUNG .....</b>                                                  | <b>10</b> |
| <b>2</b> | <b>EINLEITUNG .....</b>                                                       | <b>11</b> |
| 2.1      | DIE VOLKSMEDIZINISCHE BEDEUTUNG DER PFLANZE.....                              | 11        |
| 2.1.1    | Verwendung der Magnolie in der Volksmedizin der Ureinwohner Nordamerikas..... | 11        |
| 2.1.2    | Bedeutung und Anwendungsform von Magnolia in der TCM.....                     | 12        |
| 2.2      | MAGNOLIA SP.....                                                              | 13        |
| 2.2.1    | Zur Pflanze .....                                                             | 13        |
| 2.2.2    | Inhaltsstoffe von Magnolia sp.....                                            | 14        |
| 2.3      | PHARMAKOLOGISCHE WIRKUNG VON HONOKIOL IM TIERVERSUCH.....                     | 16        |
| 2.3.1    | Neuroprotektive und antioxidative Effekte von Honokiol .....                  | 16        |
| 2.3.2    | Antibakterielle Wirkung am Beispiel von Akneerregern.....                     | 17        |
| 2.3.3    | Antikancerogene Eigenschaften von Honokiol .....                              | 18        |
| 2.3.4    | Die anxiolytische Wirkung von Honokiol .....                                  | 18        |
| 2.3.4.1  | Affinität bei Benzodiazepinen .....                                           | 20        |
| 2.3.4.2  | Wirkung von Honokiol auf den GABA <sub>A</sub> - Rezeptor .....               | 20        |
| 2.3.4.3  | Honokiol/Dihydrohonokiol .....                                                | 21        |
| 2.3.4.4  | Wirkungsweise von DHH-B auf GABA- Rezeptoren.....                             | 23        |
| 2.4      | METABOLISMUS .....                                                            | 24        |
| 2.4.1    | Metabolismus von Magnolol.....                                                | 24        |
| 2.4.2    | Metabolismus von Magnolia officinalis.....                                    | 26        |
| 2.5      | BIOTRANSFORMATION .....                                                       | 27        |
| 2.5.1    | Phase-I-Reaktionen .....                                                      | 27        |
| 2.5.2    | Phase-II-Reaktionen .....                                                     | 28        |
| <b>3</b> | <b>EXPERIMENTELLER TEIL .....</b>                                             | <b>30</b> |
| 3.1      | MATERIALIEN .....                                                             | 30        |
| 3.2      | GERÄTE .....                                                                  | 30        |
| 3.3      | METHODEN .....                                                                | 31        |
| 3.3.1    | Die isoliert perfundierte Rattenleber .....                                   | 31        |
| 3.3.2    | HPLC-System.....                                                              | 34        |
| 3.3.3    | Strukturaufklärung der Metaboliten von Methylhonokiol .....                   | 35        |
| 3.3.4    | Leberextraktion.....                                                          | 37        |

---

|          |                                                                                                                         |           |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.3.5    | <i>Auswertung und Statistische Methoden</i> .....                                                                       | 37        |
| <b>4</b> | <b>ERGEBNISSE</b> .....                                                                                                 | <b>40</b> |
| 4.1      | TRENNUNG UND QUANTIFIZIERUNG VON METHYLHONOKIOL UND DESSEN<br>BIOTRANSFORMATIONSPRODUKTE MITTELS HPLC .....             | 40        |
| 4.2      | STRUKTURAUFKLÄRUNG DER BIOTRANSFORMATIONSPRODUKTE VON METHYLHONOKIOL .....                                              | 44        |
| 4.2.1    | <i>Enzymatische Hydrolyse</i> .....                                                                                     | 44        |
| 4.2.2    | <i>Massenspektrometrie (LC/MS)</i> .....                                                                                | 44        |
| 4.3      | METABOLISMUS VON METHYLHONOKIOL IN DER ISOLIERTEN PERFUNDIERTEN LEBER UND IM<br>PERFUSAT VON SPRAGUE DAWLEY RATTEN..... | 47        |
| 4.3.1    | <i>Einfluss von Methylhonokiol auf den Gallefluss in Sprague Dawley Ratten</i> .....                                    | 47        |
| 4.3.2    | <i>Sekretionsgeschwindigkeit der Metabolite in die Galle</i> .....                                                      | 48        |
| 4.3.3    | <i>Sekretionsgeschwindigkeit der Metabolite ins Perfusat</i> .....                                                      | 56        |
| 4.3.4    | <i>Kumulative biliäre Sekretion von Methylhonokiol und seinen Metaboliten in der Galle</i> .....                        | 64        |
| 4.3.5    | <i>Kumulative biliäre Sekretion von Methylhonokiol und deren Metabolite im Perfusat</i> .....                           | 66        |
| 4.4      | PROZENTUELLE VERTEILUNG DER METABOLITE IN GALLE UND PERFUSAT VON SPRAGUE DAWLEY<br>RATTEN .....                         | 67        |
| <b>5</b> | <b>DISKUSSION</b> .....                                                                                                 | <b>71</b> |
| <b>6</b> | <b>ZUSAMMENFASSUNG</b> .....                                                                                            | <b>75</b> |
| <b>7</b> | <b>LITERATURVERZEICHNIS</b> .....                                                                                       | <b>76</b> |
| <b>8</b> | <b>LEBENS LAUF</b> .....                                                                                                | <b>81</b> |

## Abbildungsverzeichnis

|               |                                                                                                                         |    |
|---------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 1:  | Hou po.....                                                                                                             | 12 |
| Abbildung 2:  | Magnolia officinalis .....                                                                                              | 14 |
| Abbildung 3:  | Strukturformeln von Honokiol, Methylhonokiol und Magnolol .....                                                         | 15 |
| Abbildung 4:  | Strukturformeln von Dihydrohonokiol-B (DHH-B) .....                                                                     | 22 |
| Abbildung 5:  | Strukturformeln der Umwandlungsprodukte von Magnolol.....                                                               | 24 |
| Abbildung 6:  | Strukturformeln von Magnolol, Randainsäure, Dihydroxydihydro-<br>magnolol .....                                         | 26 |
| Abbildung 7:  | HPLC- Gradient für die Trennung von Methylhonokiol .....                                                                | 35 |
| Abbildung 8:  | HPLC Chromatogramm von Methylhonokiol .....                                                                             | 40 |
| Abbildung 9:  | Eichgerade für Methylhonokiol .....                                                                                     | 41 |
| Abbildung 10: | Chromatogramm einer Gallenprobe einer Sprague Dawley<br>Versuchsreihe, nach 60 Minuten Perfusion .....                  | 42 |
| Abbildung 11: | Chromatogramm einer Kontrollgalle der Sprague Dawley<br>Versuchsreihe, 60 Minuten, versetzt mit Methylhonokiol.....     | 42 |
| Abbildung 12: | Chromatogramm einer Perfusatprobe aus der Sprague Dawley<br>Versuchsreihe, nach 60 Minuten Perfusion .....              | 43 |
| Abbildung 13: | Chromatogramm eines Kontrollperfusats der Sprague Dawley<br>Versuchsreihe, 60 Minuten, versetzt mit Methylhonokiol..... | 43 |
| Abbildung 14: | Massenspektrum des nativen Methylhonokiol.....                                                                          | 45 |
| Abbildung 15: | Massenspektrum des Metaboliten M1 .....                                                                                 | 45 |
| Abbildung 16: | Massenspektrum des Metaboliten M2 .....                                                                                 | 46 |
| Abbildung 17: | Massenspektrum des Metaboliten M3 .....                                                                                 | 47 |
| Abbildung 18: | Einfluss von Methylhonokiol auf den Gallefluss auf Sprague<br>Dawley Ratten.....                                        | 48 |

---

|                                                                                                                                                                                          |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 19: Durchschnittliche Sekretionsgeschwindigkeit von Methylhonokiol<br>in die Galle von Sprague Dawley Ratten .....                                                             | 49 |
| Abbildung 20: Durchschnittliche Sekretionsgeschwindigkeit des Metaboliten M1<br>in die Galle von Sprague Dawley Ratten .....                                                             | 51 |
| Abbildung 21: Durchschnittliche Sekretionsgeschwindigkeit des Metaboliten M2<br>in die Galle von Sprague Dawley Ratten in einem Zeitintervall<br>von 80 Minuten .....                    | 53 |
| Abbildung 22: Durchschnittliche Sekretionsgeschwindigkeit des Metaboliten M3<br>in die Galle von Sprague Dawley Ratten .....                                                             | 55 |
| Abbildung 23: Durchschnittlicher Efflux von Methylhonokiol in das Perfusat von<br>Sprague Dawley Ratten innerhalb von 80 Minuten .....                                                   | 57 |
| Abbildung 24: Durchschnittlicher Efflux des Metaboliten M1 in das Perfusat von<br>Sprague Dawley Ratten innerhalb von 80 Minuten .....                                                   | 59 |
| Abbildung 25: Durchschnittlicher Efflux des Metaboliten M2 in das Perfusat von<br>Sprague Dawley Ratten innerhalb von 80 Minuten .....                                                   | 61 |
| Abbildung 26: Durchschnittlicher Efflux des Metaboliten M3 in das Perfusat von<br>Sprague Dawley Ratten innerhalb von 80 Minuten .....                                                   | 63 |
| Abbildung 27: Kumulative biliäre Sekretion der Metabolite M1, M2, M3 und<br>Methylhonokiol in der Galle von Sprague Dawley Ratten in einem<br>Zeitintervall von 80 Minuten .....         | 65 |
| Abbildung 28: Gesamte kumulative biliäre Sekretion der Metabolite M1, M2, M3<br>und Methylhonokiol in der Galle von Sprague Dawley Ratten in einem<br>Zeitintervall von 80 Minuten ..... | 65 |
| Abbildung 29: Kumulative biliäre Sekretion der Metabolite M1, M2, M3 und<br>Methylhonokiol im Perfusat von Sprague Dawley Ratten in einem<br>Zeitintervall von 80 Minuten .....          | 66 |

---

|                                                                                                                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Abbildung 30: Gesamte kumulative biliäre Sekretion der Metabolite M1, M2, M3<br>und Methylhonokiol im Perfusat von Sprague Dawley Ratten.....                                 | 67 |
| Abbildung 31: Prozentuelle Anteile der einzelnen Metabolite und von<br>Methylhonokiol an der Sekretion in Galle und Perfusat bei der<br>1. Sprague Dawley Versuchsratte ..... | 68 |
| Abbildung 32: Prozentuelle Anteile der einzelnen Metabolite und von<br>Methylhonokiol an der Sekretion in Galle und Perfusat bei der<br>2. Sprague Dawley Versuchsratte ..... | 69 |
| Abbildung 33: Prozentuelle Anteile der einzelnen Metabolite und von<br>Methylhonokiol an der Sekretion in Galle und Perfusat bei der<br>3. Sprague Dawley Versuchsratte ..... | 70 |
| Abbildung 34: Prozentuelle Anteile der Metabolite sowie von Methylhonokiol<br>an der Gesamtsekretion in Galle und Perfusat.....                                               | 70 |
| Abbildung 35: Metabolisierungsweg von Methylhonokiol .....                                                                                                                    | 72 |

## Tabellenverzeichnis

|             |                                                                                                                                                                        |    |
|-------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 1:  | Körper- und Lebergewicht der Versuchstiere in g.....                                                                                                                   | 32 |
| Tabelle 2:  | Zusammensetzung des Perfusionsmediums (Krebs-Henseleit-Puffer).....                                                                                                    | 33 |
| Tabelle 3:  | Probenaufbereitung der Galle- und Perfusatproben.....                                                                                                                  | 34 |
| Tabelle 4:  | Parameter des HPLC Systems für Methylhonokiol.....                                                                                                                     | 34 |
| Tabelle 5:  | Parameter für die Leberextraktion.....                                                                                                                                 | 37 |
| Tabelle 6:  | Durchschnittliche Retentionszeiten der Metabolite von<br>Methylhonokiol .....                                                                                          | 41 |
| Tabelle 7:  | Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der Sekretions-<br>geschwindigkeit von Methylhokiol (MH) in die Galle von<br>Sprague Dawley Ratten (n=3).....                  | 50 |
| Tabelle 8:  | Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der Sekretions-<br>geschwindigkeit des Metaboliten M1 in die Galle von<br>Sprague Dawley Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min..... | 52 |
| Tabelle 9:  | Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der Sekretions-<br>geschwindigkeit des Metaboliten M2 in die Galle von<br>Sprague Dawley Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min..... | 54 |
| Tabelle 10: | Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der Sekretions-<br>geschwindigkeit des Metaboliten M3 in die Galle von<br>Sprague Dawley Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min..... | 56 |
| Tabelle 11: | Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der Sekretions-<br>geschwindigkeit von Methylhonokiol ins Perfusat von<br>Sprague Dawley Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min..... | 58 |
| Tabelle 12: | Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der Sekretions-<br>geschwindigkeit des Metaboliten M1 ins Perfusat von<br>Sprague Dawley Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min..... | 60 |
| Tabelle 13: | Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der Sekretions-<br>geschwindigkeit des Metaboliten M2 ins Perfusat von<br>Sprague Dawley Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min..... | 62 |

---

|                                                                                                                                                                                    |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabelle 14: Mittelwerte und Standardabweichung (SD) der Sekretions-<br>geschwindigkeit des Metaboliten M3 ins Perfusat von<br>Sprague Dawley Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min..... | 64 |
| Tabelle 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der kumulativen biliären<br>Sekretion in der Galle von Sprague Dawley Ratten (n=3) in<br>nmol/g Leber/80 Minuten .....            | 66 |
| Tabelle 16: Mittelwerte und Standardabweichungen der kumulativen biliären<br>Sekretion im Perfusat von Sprague Dawley Ratten (n=3) in<br>nmol/g Leber/80 Minuten .....             | 67 |

# 1 Problemstellung

Der Behandlung von Krankheiten auf natürlichem Wege wird heutzutage immer mehr Bedeutung zugeschrieben. Dadurch bietet sich die Untersuchung alter Heilmethoden und volksmedizinischen Heilwissens aus allen Kulturkreisen als Forschungsfeld für die Pharmazie an. Besonderes Augenmerk wird den natürlich vorkommenden Substanzen gewidmet, deren Anwendung größtenteils ohne schwerwiegende unerwünschte Nebenwirkungen begleitet wird.

Schon die Indianerstämme Nordamerikas erkannten die heilkräftige Wirkung der Magnolien. Ebenso wird in der TCM (Traditionelle Chinesische Medizin) diese Pflanzenart zur Behandlung diverser Krankheiten, wie gastrointestinale Beschwerden, Erkrankungen des Respirationstraktes, sowie als Schlaf- und Beruhigungsmittel eingesetzt. Die Rinde von *Magnolia officinalis* wird als Bestandteil eines Kräutergemisches, benannt als „Saiboku to“, gegen Bronchialasthma und Magenbeschwerden verwendet. Im Tierversuch wurde außerdem eine anxiolytische Eigenschaft nachgewiesen. Für die Wirkung werden vor allem Honokiol und Magnolol verantwortlich gemacht. Diese Substanzen zählen zur Gruppe der Phenylpropane und werden von *Magnolia officinalis* und anderen Spezies produziert. Honokiol und Magnolol weisen eine antioxidative, antibakterielle sowie antivirale Eigenschaft auf. Zusätzlich zu Honokiol konnte in den Früchten von *Magnolia grandiflora* ein Derivat Methylhonokiol nachgewiesen werden, eine Verbindung die ebenfalls ausgeprägte pharmakologische Eigenschaften enthält.

Über die Metabolisierung von Honokiol und Methylhonokiol sind bis dato keine Daten bekannt. Da nur eine ausreichende Resorption eine erwünschte Wirkung auf den Körper gewährleisten kann, ist die Ergründung der Biotransformation dieser Substanz von großem Interesse.

Zunächst sollte sich der praktische Teil dieser Arbeit eingehender mit der Metabolisierung von Methylhonokiol beschäftigen. Mittels HPLC-Analyse sollten erstmals die Biotransformationsprodukte in der Galle und im Perfusionsmedium qualitativ und quantitativ erfasst werden. Basierend auf diesen Untersuchungen sollte eine Aussage getroffen werden, ob Methylhonokiol in freier Form den Blutkreislauf erreichen kann und in welchem Ausmaß eine Metabolisierung stattfindet.

## 2 Einleitung

### 2.1 *Die volksmedizinische Bedeutung der Pflanze*

Die Familie der Magnoliaceae zählt entwicklungsgeschichtlich zu den ältesten Pflanzen der Erde und ist weltweit verbreitet. Sie besteht aus 12 Gattungen, zu welchen unter anderem Magnolia, Liriodendron, Michelia und Aromadendron zählen. Im nordamerikanischen und asiatischen Raum erhält die Nutzung von Magnolia und Liriodendron volksmedizinisch einen großen Stellenwert.<sup>1</sup>

#### 2.1.1 **Verwendung der Magnolie in der Volksmedizin der Ureinwohner Nordamerikas**

Im Südosten der Vereinigten Staaten gedeihen etliche Arten der Gattung Magnolia. Erwähnenswert aus dieser Artenvielfalt ist die Magnolia virginiana, auch bekannt als „sweetbay Magnolia“ oder „beaver tree“, da die Rinde Bibern als Nahrung dient. Wurzeln, Stamm, Rinde sowie Zweige dieser Magnolienart wurden von Indianerstämmen gesammelt und vielseitig angewandt. Sie bereiteten daraus ein Bittertonikum, welches gegen Herbstfieber und Rheuma Wirkung zeigte. Das Dekokt wurde als Laxans und schweißtreibendes Mittel eingesetzt. Kalt zubereitet, in Form eines Mazerats schätzten die Ureinwohner Amerikas die krampflösende Wirkung bei Wechselfieber.<sup>1</sup>

In der Sprache der Houma-Indianer von Lousiana „wärmt“ die Teezubereitung „das Blut“. Diese Wärme soll die Kälte aus dem Körper vertreiben und somit helfen, die Krankheit auszukurieren. Eine weitere nennenswerte Art stellt Magnolia grandiflora dar, deren Rinde bei den Chocktaw-Indianern Louisianas zur Heilung juckender Brandwunden eingesetzt wurde.<sup>1</sup>

Die Stämme der Irokesen mit ihrer hoch entwickelten Pflanzenheilkunde, nutzten den inneren Teil der Rinde der Magnolia acuminata bei Zahnschmerzen.

Gegen Magenschmerzen und krampfartige Koliken bereiteten die Cherokee-Indianer einen Aufguss von Magnolia acuminata und Magnolia macrophylla zu.<sup>1</sup>

---

<sup>1</sup> Vgl. Schühly et al., 2001, S. 63ff.

### 2.1.2 Bedeutung und Anwendungsform von Magnolia in der TCM

Auch in China wird der Magnolie eine große Bedeutung als Heilmittel beigemessen. Seit über 2000 Jahren wird sie in der Traditionellen Chinesischen Medizin – kurz TCM – als Tonikum und Stimulans verarbeitet und gegen Übelkeit, gastrointestinale Beschwerden und andere Leiden eingesetzt.

Seit alters werden Magnolia Arten in China angepflanzt, welche ursprünglich nur dem Kaiser zustanden. Seit dem 11. Jahrhundert wurden diese prachtvollen Sträucher von ihm als besondere Auszeichnung verschenkt.<sup>2</sup>

Marco Polo, der bedeutendste Reisende des Mittelalters, gelangte schon im 13. Jahrhundert über den Landweg von Venedig in den Fernen Osten. In seinen detaillierten Reiseberichten erwähnte er unter anderem das Vorkommen dieser Pflanze und deren heilkräftige Wirkungen. Erst um 1780 gelangten einige Exemplare durch die Ostindische Kompanie nach Europa, wo sie kultiviert wurde und nun überall gedeiht.<sup>2</sup>

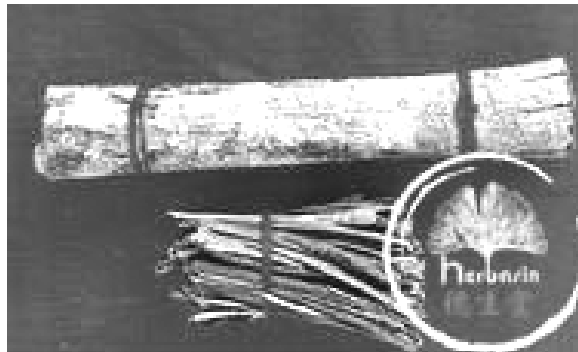


Abbildung 1: Hou po<sup>3</sup>

Seit über 2000 Jahren werden Extrakte aus der Rinde von *Magnolia officinalis* und andere Magnolia-Arten in der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) verwendet. Die Arzneipflanze *Magnolia officinalis* wird hier unter dem Namen „Hou po“ geführt und mit anderen getrockneten Pflanzen in Kräutergemischen verwendet. Dazu zählen Hange-koboku-to, Yoku-kan-san, und Saiboku-to.<sup>4</sup>

Diese wurden schon vor mehreren Hundert Jahren zur Beseitigung von Angststörungen,

---

<sup>2</sup> Vgl. Enzyklopädie, 1991, S. 40.

<sup>3</sup> Abbildung entnommen aus: URL: [www.greenlife-herbal.com/database/houpo.htm](http://www.greenlife-herbal.com/database/houpo.htm)

Angstneurosen, Schlaflosigkeit, thrombotischen Verschlüssen und gastrointestinalen Beschwerden eingesetzt.<sup>4</sup>

Cortex Magnoliae officinalis wird in der Traditionellen Chinesischen Medizin als Dekokt eingesetzt, welches bitter und scharf schmeckt. Die Rinde enthält als wirksamkeitsmitbestimmende Bestandteile Magnolol, Tetrahydromagnolol, Isomagnolol, Honokiol, Eudesmol und Magnocurarin.<sup>5</sup>

Als Tagesdosis verwendet man 3- 12g entweder als Einzeldroge oder innerhalb einer Rezeptur zusammen mit anderen Drogen jeweils als Tee.

Die traditionellen Verwendungsmöglichkeiten umfassen den gastrointestinalen Bereich Magen und Dickdarm, sowie Milz und Lunge. Hou po wird bei Völlegefühl, Gastritis, Magengeschwüre, Durchfallerkrankung, Brechreiz und Husten verwendet. In der Heilkunde wird die Wirkung als das qi belebend und die Feuchtigkeit austrocknend (xing qi zao shi), in Gegenrichtung aufsteigendes qi herunterführend und Atemnot lindernd (jiang ni ping chuan) beschrieben.<sup>5</sup>

## 2.2 *Magnolia* sp.

Dem französischen Botaniker Pierre Magnol, geboren 1638, gestorben 1715, verdanken die Magnolien ihren Gattungsnamen. Sie gehören zur Familie der Magnoliaceen, und beinhaltet etwa 125 Arten, welche im Himalaya bis O- und SO- Asien und von O- Nordamerika bis Südamerika beheimatet sind.<sup>6</sup>

### 2.2.1 Zur Pflanze

Die Magnolie bevorzugt bewaldetes halbschattiges Gebiet, sie wächst in Gestrüppen und an Flussufern, wo sie vor starkem Wind geschützt wird. Kultiviert wird sie in feuchtem, wasserdurchlässigen, humusreichen, am besten sauren bis neutralem Boden.<sup>6</sup>

---

<sup>4</sup> Vgl. Maruyama et. al, 2000, S. 35ff.

<sup>5</sup> Vgl. Handbuch der chinesische Heilpflanzen, 1987, S. 243ff.

<sup>6</sup> Vgl. Die große Pflanzenenzyklopädie, 2003, S. 661.

Zahlreiche Fossilfunde belegen das Vorkommen der Magnoliengewächse im Tertiär über die gesamte Nordhalbkugel.<sup>7</sup>

*Magnolia officinalis* ist eine der zahlreichen Arten. (siehe Abbildung) Man findet sie als sommer- oder immergrünen bis zu 22 m hohem Baum mit aromatischer Rinde. Auffallend sind ihre großen Blätter und hübschen, einzelstehenden, duftenden cremeweißen Blüten, die oft vor den Blättern erscheinen.<sup>8</sup>



Abbildung 2: *Magnolia officinalis*

In China werden die in den Monaten Mai bis Juni 20 Jahre alte Bäume gefällt. Für die traditionelle Verwendung der Rinde wird sie in einem Erdloch mit Reisstroh bedeckt, 3 oder 4 Tage so belassen, herausgenommen, auseinandergerollt und getrocknet.<sup>8</sup>

### 2.2.2 Inhaltsstoffe von *Magnolia* sp

Die vielseitigen Anwendungsmöglichkeiten in der Volksmedizin von *Magnolia* species erweckte das Interesse die Inhaltsstoffe der Pflanze näher zu ergründen.

---

<sup>7</sup> Vgl. Urania Pflanzenreich, 1971, S. 303.

<sup>8</sup> Vgl. das große Lexikon der Heilpflanzen, 2001, S. 231.

Fischer und Mitarbeiter berichten von Lignan- und Neolignan-Substanzen, welche in diversen Spezies vorkommen. Die biologische Aktivität dieser Substanzen besitzt ein weites Wirkungsspektrum mit zytotoxischen, antikanzerogenen, antibakteriellen, antiviralen sowie insektiziden Effekten.<sup>9</sup>

Zu den ergründeten Monoterpenlignan-Substanzen von *Magnolia officinalis* zählen Piperitylmagnolol, Piperitylhonokiol, Bornylmagnolol und Dipiperitylmagnolol.

Syringaresinol und ihre 4'-O- $\beta$ -D-glucopyranoside verzeichnen zytotoxische und anti-leukämische Aktivität.<sup>9</sup>

Honokiol und Magnolol zählen zu der Gruppe der Phenylpropane. Sie sind Neolignan-Isomere und die bedeutendsten Inhaltsstoffe von *Magnolia*.

Das natürlich vorkommende Methylhonokiol (4'-Methoxy-5,3'-di-(2-propenyl)-biphenyl-2-ol) der *Magnolia grandiflora* wurde aus deren Früchten isoliert. Mit dieser Arbeit wird vor allem die Wirksamkeit dieser Substanz erforscht, da vermutet wird, dass das Vorhandensein der Methylgruppe ein stärkeres Potential aufweist.<sup>10</sup>

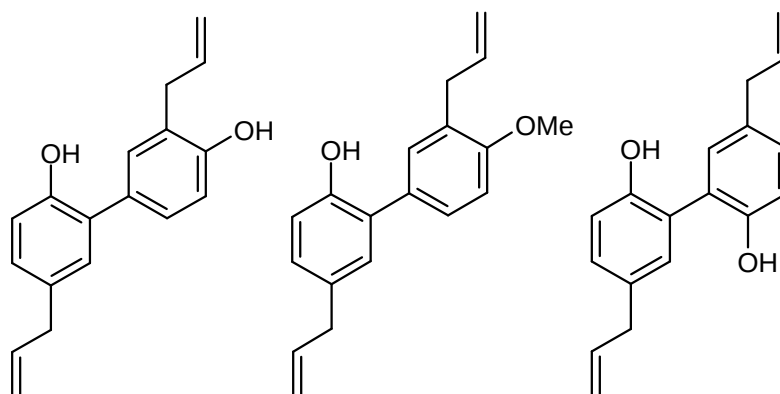


Abbildung 3: Strukturformeln von Honokiol, Methylhonokiol und Magnolol

Honokiol wurde aus einem methanolischen Auszug der Rinde von *Magnolia obovata* Thunb im Jahre 1972 von Fujita und Mitarbeiter isoliert.<sup>10</sup> Diese Bezeichnung stammt von Honoki, dem japanischen Namen von *Magnolia obovata* Thunb.

Honokiol und Magnolol wurden ebenso in *Magnolia officinalis* und anderen Magnolien-Arten wie *Magnolia tripetala* isoliert.

<sup>9</sup> Vgl. Fischer et.al, 1999, S. 211ff.

<sup>10</sup> Vgl. Maruyama und Kuribara, 2000, S. 35ff.

Honokiol weist in der getrockneten Rinde von *Magnolia officinalis* einen prozentuellen Beitrag von 0,3- 4,6% auf, Magnolol hingegen einen Gehalt von 2-11%.<sup>11</sup>

Nennenswert sind die Samen der immergrünen *Magnolia*, *Magnolia grandiflora*. Honokiol und Magnolol kommen hier nur in kleineren Mengen vor, während Methylhonokiol von etwa 10% Vorkommen als Hauptbestandteil gilt.<sup>12</sup>

Der methanolische Auszug der getrockneten Rinde von *Magnolia obovata* enthält 0,09 - 0,39% von *Magnolia officinalis* 0,34- 1,17 % und von *Magnolia tripetala* 1,83- 4,03 % Honokiol.

Abgekochte Auszüge von *Magnolia obovata* und *Magnolia officinalis* enthalten jeweils 0,23- 1,53 % und 0,25- 2,34 % Honokiol.<sup>13</sup>

Zu den weiteren Inhaltsstoffen der Rinde zählen unter anderem Hydroxybiphenyle, wie 8,9-Dihydroxydihydrohonokiol, 8,9-Dihydroxymagnolol, Eudeshonokiol und Eudesmagnolol. Zudem weist dieser einen Anteil ätherischen Öls mit 94- 98% Cadinol,  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ - Eudesmol und Guaiol, sowie quartärne Alkaloide Magnocurarin, Magnosprengerin, Salicifolin auf.<sup>11</sup>

## **2.3 Pharmakologische Wirkung von Honokiol im Tierversuch**

Im folgenden Kapitel wird auf die erforschte pharmakologische Wirkung von Honokiol im Tierversuch näher eingegangen. Die Substanz zeigt neben neuroprotektiven, auch antioxidative, antibakterielle und antikanzerogene Effekte. Am häufigsten jedoch wurde über die anxiolytischen Eigenschaften berichtet, diese sollen ebenfalls näher beschrieben werden.

### **2.3.1 Neuroprotektive und antioxidative Effekte von Honokiol**

Glukosemangel hat die Eigenschaft oxidativen Stress zu induzieren, was zu extrazellulärer Akkumulation von Glutamat führt. Im Zuge dessen erhöht sich der Einstrom von Kalziumionen in die Zellen. Die daraus resultierenden reaktiven Sauerstoffspezies sorgen hierbei

---

<sup>11</sup> Vgl. Hager's Handbuch, S. 156.

<sup>12</sup> Vgl. Rao und Davis, 1982, S. 249ff.

<sup>13</sup> Vgl. Maruyama und Kuribara, 2000, S. 40ff.

für den neuronalen Zelluntergang.

Ebenso führt die massive Freisetzung von N-Methyl-D-Aspartat,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , und Glutamat zu neuronaler Toxizität und ebenfalls zum Zelluntergang.<sup>14</sup>

Yi- Ruu Lin und seine Mitarbeiter vermuteten einen positiven Einfluss von Magnolol und Honokiol auf die mitochondriale Aktivität. Sie setzten beschädigte Neuronen der Wirkung von Magnolol 1- 10 $\mu\text{M}$  und Honokiol 1- 10 $\mu\text{M}$  aus. Es wurden die neuroprotektiven sowie antioxidativen Eigenschaften – hervorgerufen durch die Reduktion des Glutamat-Induzierten  $\text{Ca}^{2+}$ - Einstroms in den cerebralen Zellen – nachgewiesen. Honokiol hat im Vergleich zu Magnolol eindeutig ein stärkeres antioxidatives und neuroprotektives Potential.<sup>14</sup>

Das lipidlösliche Vitamin E, das zur Gruppe der Antioxidantien zählt und MK-801, ein Glutamat-Rezeptor-Blocker verhindern bekannterweise neuronale Dysfunktion und Neuronenuntergang. Das interessante Ergebnis dieser Studie war der Nachweis eines stärkeren neuroprotektiven Effekts von Honokiol und Magnolol.<sup>14</sup>

Es ist allgemein bekannt, dass Inflammation, oxidativer Stress und ein Ungleichgewicht von exzitatorischen Ionen eine wichtige Rolle bei Ischämie spielen. In einem experimentellen Versuch wurde im Cerebellum von Ratten ein Infarkt ausgelöst. Eine intravenöse Verabreichung von Honokiol bei einer Dosierung von 10<sup>-6</sup> g/kg und 10<sup>-7</sup> g/kg reduzierte signifikant das totale Infarktvolumen. Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, Honokiol sei eine potente neuroprotektive Substanz, einzusetzen gegen Ischämie.<sup>15</sup>

### 2.3.2 Antibakterielle Wirkung am Beispiel von Akneerregern

*Propionibacterium acnes* ist ein anaerobisches Bakterium, welches in der Pathophysiologie von Akne eine wichtige Rolle spielt und für entzündlich auftretende Prozesse im Gesicht verantwortlich ist. Dieser Keim stimuliert die Produktion von proinflammatorischen Cytokinen, eingenommen Interleukin 8 und  $\text{TNF-}\alpha$  (Tumor Nekrose Faktor).<sup>16</sup>

Mehrere In-vitro-Untersuchungen zeigten die antibakterielle Aktivität und antiinflammatorische Eigenschaft von Honokiol und Magnolol gegen *P. acnes* auf. Ein DPPH (Diphenyl-

---

<sup>14</sup> Vgl. Yi- Ruu Lin et al., 2005, S. 64ff.

<sup>15</sup> Vgl. Kuo- Tong Liou, 2002, S. 130ff.

p-picrylhydrazyl) Test und SOD (Superoxide dismutase) activity assay gaben Aufschluss über die Radikalfängerwirkung der Inhaltsstoffe von *Magnolia species*. Auch hier zeigte sich wiederum eine stärkere Wirkung Honokiols gegenüber der Substanz Magnolol.

*P.acnes* fördert den Reaktionsschritt Cyclooxygenase-2 (kurz COX-2) und somit die Bildung von entzündlichen Stoffen. Durch die Hemmung der COX-2 mittels Honokiol und Magnolol konnte die Prostaglandin E<sub>2</sub> (PG E<sub>2</sub>) Produktion gesenkt werden. Ebenso zeigt hier Honokiol eine größere Wirksamkeit.<sup>16</sup>

Auch die von *Propionibakterium acnes* induzierten hauptproinflammatorischen Mediatoren IL-8 und TNF- $\alpha$  können von den beiden Neolignan Isomeren reduziert werden.

Der Nuclear Factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) kann die Transkription von Cytokinen und Wachstumsfaktoren steigern und wird durch dieses Bakterium aktiviert. Im Testversuch konnte diese Aktivierung mit Hilfe von Honokiol und Magnolol reduziert werden.<sup>16</sup>

Diese Ergebnisse zeigen, dass *Magnolia* zur Behandlung von Akne in Erwägung gezogen werden kann.

### 2.3.3 Antikanzerogene Eigenschaften von Honokiol

Mehrere Studien belegen die positive Auswirkung von Honokiol auf kanzerogene Zellen. In Vitro zeigte die Substanz bei einer Konzentration von 10-15  $\mu$ g/ml zunächst eine Hemmung der DNA Synthese von RKO Krebszelllinien und eine daraus resultierende Inhibition der Proliferation.<sup>17</sup>

Durch Applikation der RKO Krebszelllinien in Balb/c nude Mäusen wurde ein künstlich erzeugtes Tumorwachstum erreicht. Die tägliche intraperitoneale Verabreichung von Honokiol 80 mg/kg zeigte eine rasche Absorption sowie eine erfolgreiche Bekämpfung des Tumors.<sup>17</sup> Honokiol ist somit in der Lage Apoptose zu induzieren. Durch die Aktivierung von Caspasen wird eine signifikante Hemmung des Tumorwachstums erzielt.

### 2.3.4 Die anxiolytische Wirkung von Honokiol

In einer Vielzahl von Studien wurde anhand von Tierversuchen die anxiolytische Wirkung von Honokiol untersucht.

---

<sup>16</sup> Vgl. Lee et al., 2005, S. 338ff.

<sup>17</sup> Vgl. Fei Chen et al., 2004, S. 3459ff.

Kuribara und Mitarbeiter testeten die Eigenschaften dieser Substanz und vollzogen einen Vergleich zu Diazepam in unterschiedlichen Dosierungen an Mäusen. In einem physiologischen Abhängigkeitstest konnten nach Antagonisierung der jeweiligen Komponenten mit Flumazenil im Falle Honokiol keine Entzugserscheinungen festgestellt werden. Sogar bei der höchsten Dosierung von 2 mg/kg, welche zehnmal höher als die notwendige Dosis für einen anxiolytischen Effekt ist, traten keine Abhängigkeitserscheinungen auf. Der Entzug von Diazepam hingegen führt zu Hyperreaktivität, Tremor und Unruhe. Die jeweiligen Versuche wurden drei Stunden nach Verabreichung von Honokiol durchgeführt, da die Substanz erst hier den höchsten Peak erreicht. Diazepam hingegen erreicht diesen schon nach 10 Minuten.<sup>18</sup>

Weiters sollte mit Hilfe eines „hexobarbital-induced sleeping test“ die Modulation von Barbituraten getestet werden. Bei Mäusen, die mit Diazepam vorbehandelt wurden, potenzierte sich die Wirkung von Barbituraten, was zu tiefer zentraler Schwäche, Depression und Schlaf führte. Eine Kombination von Hexobarbital mit Benzodiazepinen kann fatale Folgen mit sich führen und ZNS Störungen auslösen.<sup>18</sup>

Es stellte sich nun die Frage, ob Honokiol ebenfalls eine Interaktion mit Hexobarbital eingeht. Um dies näher zu erörtern, wurde einer Gruppe von Mäusen Honokiol und einer weiteren eine Kombination aus Honokiol und Diazepam verabreicht.

Nach Applikation von Hexobarbital (100 mg/kg) konnte anhand der Schlafstunden festgestellt werden, dass die Vorbehandlung von Honokiol weder die Wirkung von Hexobarbital beeinflusst, noch den potenzierenden Effekt von Diazepam auf Hexobarbital abschwächt.<sup>18</sup>

Die alkalische Verbindung Bicuculline, ein kompetitiver Antagonist von GABA am GABA<sub>A</sub> Rezeptor führt im Tiermodell zu tonischen und klonischen Krämpfen.

Benzodiazepine sind für ihre antikonvulsive Eigenschaft bekannt und können die von Bicuculline hervorgerufenen Krämpfe hemmen. Honokiol führt zu keiner Antagonisierung der Wirkung, auch nicht bei einer Dosierung von 20mg/kg. Somit wurde mittels dieser Studie der Schluss gezogen, Honokiol sei ineffektiv gegen epileptische Anfälle.<sup>18</sup>

Honokiol weist bei einer Dosierung von 0.2 mg/kg im Tierversuch eine anxiolytische Wirkung auf und verursacht im Gegensatz zu Diazepam keine Muskelrelaxation, Müdigkeit oder motorischen Dysfunktion.

Bei hohen Dosen von 125mg/kg wird von Sedation und bei 250mg/kg von Bewegungsstö-

rungen berichtet. Diese sind aber 625 – 1250 mal stärker als die minimale Dosierung für einen signifikanten anxiolytischen Effekt.<sup>18</sup>

Diese Studie zeigt deutlich die anxiolytische Eigenschaft von Benzodiazepinen und Honokiol auf. Beide Substanzen besitzen eine Affinität zu den GABA Rezeptoren und verstärken vermutlich die Wirkung des Neurotransmitters GABA. Zum Zwecke der Anschaulichkeit sollen diese nun in einzelnen Unterkapiteln näher beleuchtet werden.

#### 2.3.4.1 Affinität bei Benzodiazepinen

Benzodiazepine und analoge Verbindung greifen am GABA-System an und hemmen die Funktion GABA-erger Neuronen. Sie reagieren mit einer spezifischen Bindungsstelle am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor, der zu den ligandengesteuerten Ionenkanälen gehört. Diese wiederum befinden sich im gesamten ZNS in hoher Dichte vor allem in der frontalen und okzipitalen Hirnrinde, im Hippocampus und im Kleinhirn.<sup>19</sup>

Wenn die Benzodiazepine mit ihren Bindungsstellen interagieren, wird die Affinität von GABA zu deren Bindungsstelle, die Teil des Chloridkanals darstellt (sog. GABA<sub>A</sub>-Rezeptor- Chloridkanal- Komplex), erhöht.

Die Benzodiazepine steigern durch allosterische Wechselwirkungen die Bindungsfähigkeit von GABA zu deren Rezeptoren und verstärken dadurch die Wirkung. Durch die Erhöhung der Öffnungswahrscheinlichkeit von Chloridkanälen können mehr Chlorid-Ionen in die Zelle einströmen, was zu einer Hyperpolarisation der Zellen führt. Im Zuge dessen kommt es zu einer verminderten Erregbarkeit und einer Unempfindlichkeit der postsynaptischen Nervenzellen gegenüber exzitatorischen Einflüssen.<sup>19</sup>

Die Langzeitbehandlung von Benzodiazepinen erweist sich aber als besonders schwierig, da vor allem die Gefahr der Abhängigkeit und der Toleranz besteht. Bei langem Gebrauch kann es zu kognitiven Leistungseinbußen, Beeinträchtigung der Initiative und neurologische Störungen wie Ataxie, Muskelschwäche und Reflexverlust.

#### 2.3.4.2 Wirkung von Honokiol auf den GABA<sub>A</sub>-Rezeptor

Die Mehrzahl der GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren besteht aus 2 $\alpha$  Untereinheiten, 2 $\beta$  Untereinheiten und einer  $\gamma_2$  Untereinheit. Unterschiedliche Populationen von Nervenzellen sind durch spe-

---

<sup>18</sup> Vgl. Maruyama et.al., 1999, S. 97ff.

<sup>19</sup> Vgl. Mutschler, 2000, S. 19.

zifische GABA<sub>A</sub>-Rezeptor-Subtypen charakterisiert.  $\alpha_2$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren sind für die anxiolytische Wirkung,  $\alpha_1$ -GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren für die sedierende Wirkung der Benzodiazepine verantwortlich.<sup>20</sup>

Um die Interaktion von Honokiol und seinem Neolignan-Isomer Magnolol zu demonstrieren, wurden verschiedene Kombinationen von rekombinanten Rezeptorsubtypen mittels Sf-9/Baculovirus-System exprimiert. Hierbei wird die benötigte DNA mit Hilfe eines reinen rekombinanten Retrovirus in spezifische Insektenzellen eingeschleust.<sup>20</sup>

In Binding Assays konnte die modulierende Eigenschaft von Honokiol auf humanen rekombinanten GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren veranschaulicht werden. Honokiol als auch Magnolol erhöhen die Bindung von [<sup>3</sup>H]Muscimol an die GABA<sub>A</sub>-Rezeptoren. Beide Substanzen potenzieren zudem die Bindung an den cerebralen und Hippocampus-Membranen, konzentrationsabhängig um 400%. Hingegen erwies sich der Effekt auf das Cerebellum als weniger bedeutsam.<sup>20</sup>

Die Selektivität auf den Rezeptoren ist unabhängig davon, ob deren Kombination eine  $\gamma$ -Untereinheit enthält oder nicht. Unterschiede sind vor allem in der  $\alpha$ -Untereinheit festzustellen. Sowohl Honokiol als auch Magnolol verzeichnen eine steigernde Wirkung auf den  $\alpha_2$  Subtypus.

In dieser Studie ist deren Wirkung auf GABA-Rezeptoren ersichtlich. Die Substanzen differenzieren hinsichtlich ihrer stimulierenden Wirkung auf die verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten der  $\alpha_1$ -Untereinheiten. Eine weitere Unterscheidung zeigte sich bei der Bindungsfähigkeit von Magnolol bei [<sup>3</sup>H]Flutrinazepam auf cerebralen Membranen des GABA<sub>A</sub>-Rezeptors. Im Gegensatz dazu wurde eine Inhibition von Honokiol von [<sup>3</sup>H]Flutrinazepam beobachtet.<sup>20</sup>

#### 2.3.4.3 Honokiol/ Dihydrohonokiol

Honokiol und Magnolol sind wie schon erwähnt Neolignan-Isomere. In vivo wird die Propenyl Seitenkette von Magnolol reduziert und die Substanz zu Dihydro- und Tetrahydro-magnolol metabolisiert. Nach mehrtägiger Administration erreichen diese Metabolite erhöhten Plasmalevel. (Metabolisierung von Magnolol siehe Kapitel 2.4.1). In dieser Studie

---

<sup>20</sup> Nielsen et al., 2001, S. 34ff.

wird angenommen, die reduzierte Form von Honokiol, das Dihydrohonokiol erhöhe nach mehrmaliger Verabreichung die anxiolytische Wirkung.<sup>21</sup>

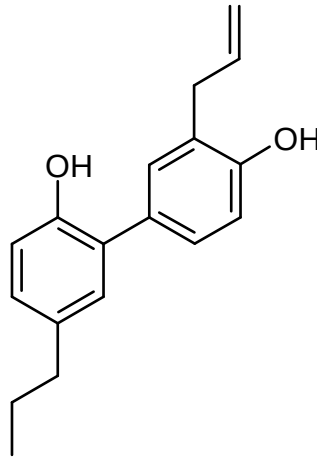


Abbildung 4: Strukturformel von Dihydrohonokiol-B (DHH-B)

Um dies zu veranschaulichen wurden drei Gruppen von Ratten mit Honokiol, DHH-B (Dihydrohonokiol-B) und Diazepam behandelt und einem „elevated plus maze test“ unterworfen. Die Aufenthaltszeiten der unterschiedlich behandelten Gruppen unterschieden sich nicht wesentlich voneinander.<sup>21</sup>

Nach oraler Verabreichung von DHH-B 1mg/kg konnte man nach zwei Stunden eine merklich verstärkte Wirksamkeit feststellen, welche vier Stunden persistierte. Nach drei Stunden wurde erst der höchste Peak erreicht.

Die Studie erwähnt eine anxiolytische Wirkung ohne bedeutende Nebenwirkungen selbst bei einer Verabreichung von lediglich 0,04 mg/kg.

DHH-B führt weiters zu keiner Müdigkeit sowie zu keiner Veränderung der motorischen Aktivität.<sup>21</sup>

Miyamoto und Mitarbeiter testeten den Einfluss von DHH-B auf die Chlorid Aufnahme kortikaler Synaptoneurosomen der Maus. Die Durchführung erfolgte in An- und Abwesenheit von Muscimol, welche strukturelle Ähnlichkeit mit cyclisierter  $\gamma$ -Aminobuttersäure hat und einen selektiven GABA<sub>A</sub>-Agonisten darstellt, doch jeweils in unterschiedlichen Konzentrationen.

Das Resultat ergab einen stimulierenden Effekt von DHH-B auf den Chlorid uptake. Schon

---

<sup>21</sup> Maruyama, Kuribara 2001, S. 597ff.

nach einmaliger Verabreichung wurde die Muscimol stimulierende Chloridaufnahme erhöht. Daraus ist zu schließen, dass ein GABA<sub>A</sub>-Rezeptor gesteuerter Cl<sup>-</sup>-Kanal Komplex in der anxiolytischen Aktivität von DHH-B involviert ist.<sup>22</sup>

Das Ausmaß der durch die Zuführung von Ammoniak verursachten Zunahme der intrazellulären Konzentrationen von Chloridionen wurde in Hippocampus Primärneuronen von kultivierten Ratten überprüft. NH<sub>4</sub>Cl erhöht die Cl<sup>-</sup>-Konzentration in pyramidalen Neuronen von 17 Tage alten Wistar Ratten. DHH-B bei Konzentrationen von 1ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml inhibiert signifikant die von Ammoniak induzierte Zunahme der Cl<sup>-</sup>-Ionen. Der Vergleich zu Magnolol führt zu keiner Veränderung der Cl<sup>-</sup>-Akkumulation, auch nicht bei einer Konzentration von 100 ng/ml.<sup>22</sup>

#### 2.3.4.4 Wirkungsweise von DHH-B auf GABA-Rezeptoren

In dieser Studie konnte die senkende Eigenschaft von DHH-B auf Ammoniak induzierten Cl<sup>-</sup> Konzentration verdeutlicht und veranschaulicht werden.

Um herauszufinden welche Rezeptoraffinität DHH-B nun hat, wurden GABA Agonisten und Antagonisten beleuchtet.<sup>23</sup>

10μM von Muscimol und jeweils 200 μM von CACA, GABA<sub>A</sub> und GABA<sub>C</sub> Rezeptor Agonisten führen zu einer Hemmung der Chlorid Ionen Konzentration. Eine GABA<sub>C</sub> Stimulation reduziert eine von Ammonium Ionen induzierte Akkumulation der Chlorid Ionen.

Jeweils 10 μM von Bicuculline, TPMPA, GABA<sub>A</sub> und GABA<sub>C</sub> Rezeptor Blocker wurden verabreicht. TPMPA antagonisiert den Effekt von DHH-B, hingegen den von Bicuculline nicht.

Das Alkaloid Bicuculline ist ein kompetitiver Antagonist von GABA am GABA<sub>A</sub>-Rezeptor und ruft im Tiermodell Krämpfe hervor.<sup>23</sup>

---

<sup>22</sup> Vgl. Irie, Miyamoto et al., 2001, S. 121ff.

<sup>23</sup> Vgl. Kuribara, 2000, S. 721ff.

## 2.4 Metabolismus

Der Metabolismus von Honokiol und Methylhonokiol sowie deren Biotransformationsprodukte sind bis dato noch nicht geklärt. Das folgende Kapitel beschäftigt sich eingehender mit dem Metabolismus von Magnolol, das wie schon beschrieben ein Isomer zu Honokiol darstellt und somit spezifische Strukturähnlichkeit aufweist. Ebenso gibt es eine erwähnenswerte Studie über Biotransformationsprodukte des Dekokts von *Magnolia officinalis*, welche hier auch näher betrachtet werden sollen und dadurch ein Einblick in die Zirkulation der Substanzen und deren Umwandlungsprodukte verschafft werden kann.

### 2.4.1 Metabolismus von Magnolol

Um die Umwandlung- und Ausscheidungsprodukte von Magnolol, isoliert aus *Magnolia cortex*, zu erläutern wurde die Substanz peroral einer Gruppe von Ratten verabreicht. 24 Stunden nach Applikation konnten erste Fäzes- und Urinproben einer Analyse unterworfen werden. Das HPLC Gerät wies 6 Metabolite auf, wobei als Hauptmetabolite Tetrahydromagnolol und das unveränderte Magnolol identifiziert wurden.<sup>24</sup>

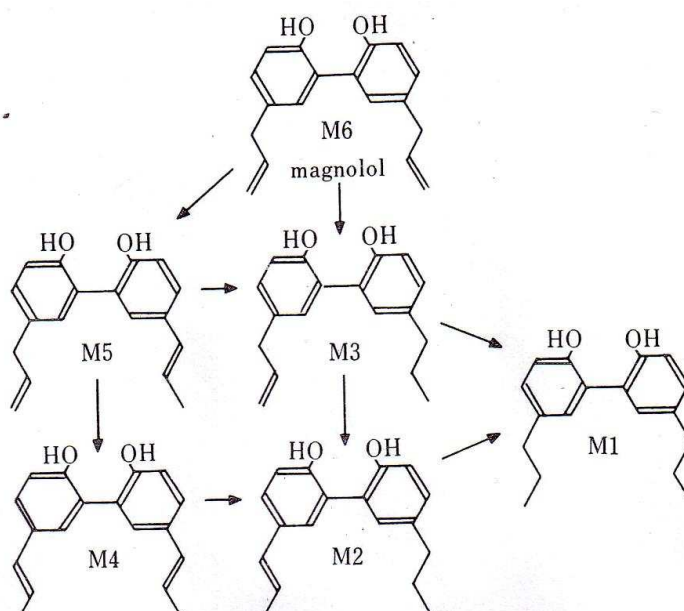


Abbildung 5: Strukturformeln der Umwandlungsprodukte von Magnolol, (Tetrahydromagnolol (M1), 5-(1-propen-1(E)-yl)-5'-propyl-2,2'-dihydroxybiphenyl (M2), 5-allyl-5'-propyl-2,2'-dihydroxybiphenyl (M3), Isomagnolol (M4), 5-allyl-5'-(1-propen-1(E)-yl)-2,2'-dihydroxybiphenyl (M5), Magnolol (M6))

Dieses Schema zeigt mögliche Umwandlungsprozesse von Magnolol zu den entstehenden Metaboliten. Dabei wird die Substanz über einen Zwischenschritt zu Isomagnolol isomerisiert. Schließlich ergeben sich durch Reduktion von 5-allyl-5'-(1-propen-1(E)-yl)-2,2'-dihydroxybiphenyl (M5) und Isomagnolol (M4) die Dihydroderivate (M2 und M3). In weiterer Folge werden diese zu Tetrahydromagnolol (M1) umgewandelt.<sup>24</sup>

Um die Metabolisierung und den Ausscheidungsweg näher zu betrachten wurde radiomarkiertes Magnolol intraperitoneal und peroral einer weiteren Gruppe von Ratten verabreicht. Neben Blutanalysen, wurden auch die Ausscheidungsprodukte über Fäzes und Urin untersucht. 24 Stunden nach oraler Administration wurden 65% des radiomarkierten Magnolols über Fäzes und 11% über Urin ausgeschieden. Ähnlich dazu zeigte die intraperitoneale Verabreichung eine Ausscheidungsrate von 52% über Fäzes und 24% über Urin.<sup>25</sup>

Das Ergebnis der Strukturanalyse ergab jene Metabolite, die in Abbildung 5 ersichtlich sind. Magnolol zeigt ebenfalls in Fäzes nach 24 Stunden den höchsten Peak. Nach wiederholter Verabreichung verkleinert sich der Peak von Magnolol und die Peaks der Metabolite wie die von Tetrahydromagnolol und Dihydromagnololderivate zeigen eine deutliche Erhöhung.<sup>25</sup>

In den Fäzes konnten 53% der freien Form von Magnolol und den Metaboliten nachgewiesen werden. Dies lässt erkennen, dass der Hauptausscheidungsweg über die Galle erfolgt. Weiters sind nur 6% als Glucuronide und Sulfate in den Fäzes aufzufinden.

Es stellt sich nun die Frage, warum der prozentuelle Satz der Konjugate in den Fäzes kleiner ist als der, der von der Leber verstoffwechselt wurde. Hattori und Mitarbeiter sind diesem Phänomen nachgegangen und entdeckten den Zusammenhang der intestinalen Mikroflora des Darms, mit der Überführung der entstandenen Konjugate in die freie Form.<sup>25</sup>

Des Weiteren zeigt eine Blutanalyse der Versuchstiere interessanterweise schon nach 15 Minuten peroraler Verabreichung ein Peak von Magnolol im Chromatogramm. Da 8 Stunden nach Verabreichung im Blut wieder ein Magnololpeak sichtbar war, deutet dieses Ergebnis auf eine enterohepatische Zirkulation hin. Neben 10% unverändertes Magnolol konnten auch 16% Magnolol-2-O-Glucuronid und 74% unidentifizierbare Komponenten aus dieser Blutuntersuchung ermittelt werden.<sup>25</sup>

---

<sup>24</sup> Vgl. Hattori et al., 1984, S. 5010ff.

<sup>25</sup> Vgl. Hattori et al., 1986, S. 158ff.

Im Hinblick auf die Verstoffwechselung von Magnolol im Tierversuch verabreichten Tsai und Mitarbeiter einer Gruppe von Sprague Dawley Ratten peroral 20 mg/kg Magnolol. Mit Hilfe von Herzpunktionen wurden Plasmafraktionen gesammelt und diese einer HPLC-Analyse unterworfen. Nach anschließender Behandlung mit  $\beta$ -Glucuronidase erkannten die Autoren eine Abspaltung von Glucuroniden. Magnolol wird demnach in der Leber durch den Einfluß von  $\beta$ -Glucuronidase verstoffwechselt.<sup>26</sup>

#### 2.4.2 Metabolismus von *Magnolia officinalis*

In der TCM wird *Magnolia officinalis* in Form eines Dekokts verabreicht. Nakazawa und Mitarbeiter analysierten die Metabolite via HPLC, die nach oraler Verabreichung entstehen.

Ein Heißwasserauszug wird hierbei aus 100g der Rinde von *Magnolia officinalis* mit 2l destilliertem Wasser bereitet und das Extrakt (1g/kg) einer Gruppe von Ratten verabreicht. Mittels eines HPLC Geräts wird schließlich deren Urin detektiert, der für 48 Stunden gesammelt worden ist. Das Ergebnis zeigt zwei Metabolite auf, zu welchen Dihydroxydihydromagnolol und Randainsäure ((3-[2,6-dihydroxy-5'(2-propenyl)[1,1'-biphenyl]-3-yl]-(E)-2,propensäure) zählen. Sinapinsäure ist ein weiterer Bestandteil von *Magnolia officinalis*. Die Metabolite von diesem Inhaltsstoff sind Sinapinsäure-4-O-sulfat sowie Sinapinsäure-4-O- $\beta$ -glucuronid. Das unveränderte Magnolol konnte im Harn nur in Spuren nachgewiesen werden.<sup>27</sup>

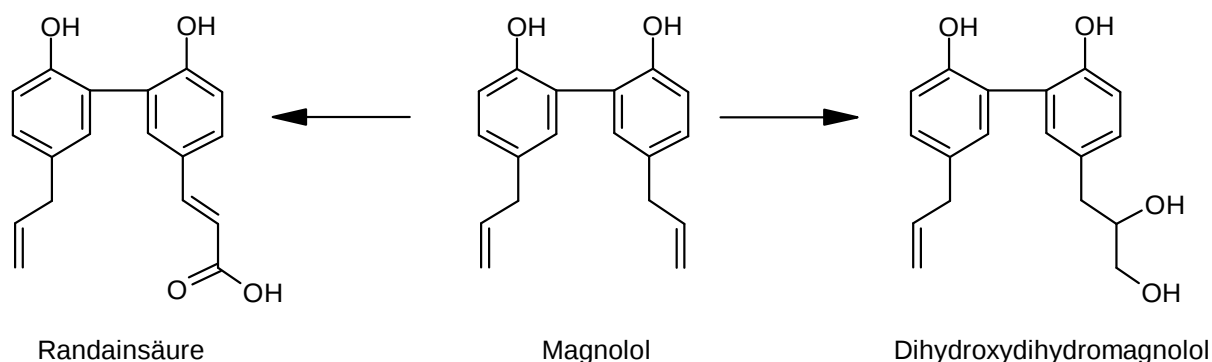


Abbildung 6: Strukturformeln von Magnolol, Randainsäure, Dihydroxydihydromagnolol

<sup>26</sup> Tsai et al., 1995, S. 491ff.

<sup>27</sup> Nakazawa et al., 2003, S. 1583ff.

Eine Analyse des Dekokts gab zusätzlich Aufschluss über die Inhaltsstoffe der Rinde. Sie enthält neben Honokiol und Magnolol auch Syringin, Magnoloside A und B.

Sinapinsäure und Randainsäure sind im Dekokt nicht aufzufinden. Syringin ist wahrscheinlich eine Vorstufe zu der in vivo korrespondierenden Säure Sinapic acid.

Die einmalige Verabreichung von radioaktiv markierten Magnolol zeigte eine Elimination über Faeces und Urin innerhalb der ersten 12 Stunden. Dabei konnte eine kleine Menge an Metaboliten in den Urinproben detektiert werden, welche Magnolol als Hauptbestandteil sowie Randainsäure enthielt.<sup>27</sup>

Des Weiteren wurde einer männlichen Versuchsperson (29 Jahre, 63 Kilogramm) ebenfalls die Rinde in abgekochter Teeform verabreicht. Dessen Urinfraktionen, die für 24 Stunden gesammelt worden sind, ergaben mittels HPLC-Analyse das Vorliegen von Magnolol und seinen Metaboliten Randainsäure und Dihydroxydihydromagnolol.<sup>27</sup>

## 2.5 Biotransformation

Die Biotransformation ist die Umwandlung von Arzneistoffen durch Enzymsysteme des Körpers. Vor allem in der Leber und auch geringfügig in anderen Organen wie Magen, Darm und Lunge erfolgt die Metabolisierung, was eine Entgiftung oder ein Wirkungsverlust zur Folge haben. Wenn diese bereits vor dem Eintritt in die systemische Blutzirkulation erfolgt, spricht man von einem First-pass-Effekt. Ebenso besteht auch die Möglichkeit, Substanzen zu wirksamen Metaboliten umzuwandeln, wie das bei Prodrugs der Fall ist.<sup>28</sup>

Ziel der Biotransformation ist mit Hilfe von Enzymsystemen lipophile Substanzen in hydrophilere, leicht ausscheidbare Stoffe umzuwandeln. Der Vorgang wird dabei in 2 Phasen unterteilt. In der Phase-I werden lipophile Moleküle durch Einführung oder Abänderung funktioneller Gruppen in hydrophile Moleküle umgewandelt, die in der Phase-II mit hydrophilen Substanzen konjugiert werden können.<sup>28</sup>

### 2.5.1 Phase-I-Reaktionen

Die Phase-I-Reaktionen sind sogenannte Funktionalisierungsreaktionen. Die lipophilen Moleküle werden oxidativ, reduktiv oder hydrolytisch verändert. Eine wichtige Rolle spie-

---

<sup>28</sup> Vgl. Hunnius, 2004, S. 974.

len Oxidationsreaktionen, an denen Oxidasen, Monooxygenasen und Dioxygenasen beteiligt sind, wobei den Monooxygenasen die größte Bedeutung beigemessen wird. Die charakteristischen Bestandteile sind Hämoproteine, die in der Membran des endoplasmatischen Reticulums verankert sind und als Cytochrom-P<sub>450</sub>-Enzyme (CYP) bezeichnet werden. Die Leber enthält den höchsten Anteil mit bis zu 95% des P<sub>450</sub>-Enzymgehalts. Im Rahmen dieser Enzymreaktion wird neben dem CYP auch molekularer Sauerstoff benötigt, der von einem Sauerstoffmolekül in den Fremdstoff eingebaut wird. Hier sind neben dem Coenzym-P<sub>450</sub>-Reduktase auch NADPH als Energielieferant beteiligt. Das andere Sauerstoffatom wird zu Wasser reduziert.<sup>29</sup>

Die CYP-Enzyme sind für ihre breite Substratspezifität bekannt, sodass Arzneistoffe mit sehr unterschiedlicher chemischer Struktur durch ein und dasselbe Enzym verstoffwechselt werden können.<sup>29</sup>

Ebenso sind an der Phase-I-Reaktion sogenannte Nicht-P<sub>450</sub>-Oxidationsenzyme beteiligt. Dazu zählen die Alkoholdehydrogenasen, die primäre und sekundäre Alkohole zu Aldehyde und Ketonen dehydrieren. Weiters sind flavinhaltige Monooxygenasen aufzufinden, die sekundäre Amine in Hydroxylamine und tertiäre Amine in N-Oxide umwandeln können. Von Bedeutung in der Phase-I sind die zahlreichen Reduktionenreaktionen, die in der Leber vor allem unter hypoxischen Bedingungen ablaufen. Nitro- und Azoverbindungen werden im Rahmen dieser Reaktion verstoffwechselt.<sup>29</sup>

### 2.5.2 Phase-II-Reaktionen

In der zweiten Phase findet eine Konjugation des Arzneistoffes bzw. seines Phase-I-Metaboliten mit körpereigenen Substanzen statt. Diese Reaktion wird durch spezielle Transferasen katalysiert. Dabei werden funktionelle Gruppen mit sehr polaren, negativ geladenen endogenen Molekülen gekoppelt. Zu den wichtigen und am häufigst auftretenden Kopplungen zählen Glucuronidierung und Sulfatierung, auf die nun näher eingegangen wird.<sup>30</sup>

Phenole, Karbonsäuren, Amine und Alkohole, welche nicht rasch oxidiert werden können, werden mit aktivierter Glucuronsäure konjugiert. Die Glucuronsäure zählt zur Gruppe der starken Säuren, die alkoholische OH-Gruppen enthalten und demnach sehr hydrophil ist.

---

<sup>29</sup> Vgl. Mutschler, 2001, S. 21.

<sup>30</sup> Vgl. Forth, 2004, S. 48.

Sie wird mit Hilfe von UDP-Glukuronyltransferasen (UGT) auf die erwähnten Substrate übertragen. Die daraus entstehenden Reaktionsprodukte sind in der Regel biologisch inaktiv und wegen ihrer Polarität viel schneller aus dem Organismus auszuscheiden als ihre Ausgangssubstanzen. Die UGT-Enzyme werden hauptsächlich in der Leber, aber auch in Nieren, Darm, Lunge, Haut und Gehirn exprimiert.<sup>31</sup>

Erwähnenswert ist, dass UGT-Enzyme von Pflanzen, Bakterien und Viren, aufgrund ihrer Ähnlichkeit der Gene, aus einem gemeinsamen Vorläufergen entstanden sind. Die Enzyme werden in 2 verschiedene Genfamilien eingeteilt. Bei der Unterteilung in Isoformen konnten beim Menschen 17 verschiedene identifiziert werden.<sup>32</sup>

Bei der Sulfatierung werden vor allem Phenole, Alkohole und Amine mit aktiviertem Sulfat konjugiert. Dies geschieht in Anwesenheit von Sulfotransferasen (SULT), welche lösliche Enzyme sind, mit unterschiedlicher Spezifität. Daraus resultieren hydrophile Schwefelsäurehalbeste, die dann mit dem Urin ausgeschieden werden können. Dort wird das Verhältnis von organischem zu anorganischem Sulfat durch die Einnahme von Phenolen oder von Substanzen, die zu Phenolen abgebaut werden, bestimmt. Die cytosolischen Enzyme findet man vor allem in der Leber, daneben auch in den Nieren und Gastrointestinaltrakt.

Da das für die Reaktion notwendige Sulfat aus schwefelhaltigen Aminosäuren gewonnen wird, besitzt der Mensch einen beschränkten Sulfatpool. Wenn der Fremdstoffumsatz sehr hoch wird kann die Sulfatierung von endogenen Substraten z.B. von Steroidhormonen gehemmt werden.<sup>33</sup>

Die Substratumwandlung, die durch Sulfatierung und Glukuronidierung erfolgen, kommt häufig gleichzeitig vor.

Zu den weiteren wichtigen Reaktionen gehören neben der beiden erwähnten, die Methylierung, Acetylierung sowie die Konjugationen mit Aminosäuren (besonders Glycin) und Glutathion.<sup>34</sup>

---

<sup>31</sup> Vgl. Mutschler, 2001, S. 28ff.

<sup>32</sup> Vgl. Forth, 2004, S. 53.

<sup>33</sup> Vgl. Forth, 2004, S. 55.

<sup>34</sup> Vgl. Mutschler, 2004, S. 29ff.

## 3 Experimenteller Teil

### 3.1 Materialien

Die Chemikalien, die zur Analyse verwendet wurden, entsprachen der erforderlichen Reinheit und konnten ohne Vorreinigung benutzt werden.

Die Materialien wurden wie folgt bezogen:

|                                           |                                                              |
|-------------------------------------------|--------------------------------------------------------------|
| Methylhonokiol                            | W. Schühly, Institut f. pharmazeutische Wissenschaften, Graz |
| Methanol (HPLC-Analyse)                   | J.T. Baker, Deventer, NL                                     |
| Ammonacetat 97%                           | Sigma Albrich, Wien                                          |
| Ammonacetat 99,99%                        | Sigma Albrich, Wien                                          |
| β-Glukuronidase Typ B-3 aus boviner Leber | Sigma Albrich, Wien                                          |
| Sulfatase Typ V aus Patella vulgata       | Sigma Albrich, Wien                                          |

Alle nicht angeführten sowohl organischen als auch anorganischen Chemikalien wurden von der Firma Sigma Albrich, Wien, gekauft.

### 3.2 Geräte

HPLC-Anlage: (Shimadzu, Kyoto, Japan)

- Merck Hitachi L-7200 Autoinjektor (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 2 LC6 A Niederdruck-Gradientenpumpen
- CTO-10AC Säulenofen
- SPD 6HV UV/VIS-Detektor
- Interface - D – 7000

HPLC/MS Anlage:

- HPLC: 1100 Series HPLC System (Agilent)

- UV-Detektor: G1315B DAD (Agilent)
- MS: 4000 QTrap (Applied Biosystems)

Sonstige Geräte:

- Waage (Teilung: 0.0001g, Höchstlast: 31g), Sartorius, Göttingen, Deutschland
- pH- Meter Model 250, Orion Research Inc., Boston, MA, USA
- Ultraschallbad Starsonic, 60, PMT, Wien, Österreich
- Ultraturrax T25, IKA-Labortechnik, Staufen im Breisgau, Deutschland
- Zentrifuge Biofudge T13, Heraeus, Deutschland
- Rollpumpe PA-SF, IKA-Labortechnik, Staufen in Breisgau, Deutschland

### **3.3 Methoden**

#### **3.3.1 Die isoliert perfundierte Rattenleber**

Das Modell der isolierten, perfundierten Leber wird vorzugsweise benutzt wenn die hepatische Biotransformation und Disposition von Xenobiotika in einer annähernd physiologischen Umgebung ohne Einfluß anderer Organe und Gewebe untersucht werden soll. Diese Methode hat den Vorteil, dass neben geringen apparativen Aufwand, die Versuchsbedingungen wie Druck, Temperatur, pH-Wert und Ionenkonzentration fast vollständig frei gewählt werden können. Außerdem ragt die Perfusion der isolierten Leber durch ihr breites Anwendungsgebiet und gute Reproduzierbarkeit hervor.

Isolierung des Organs und Vorbereitung der Versuchsanordnung:

Als Leberspender dienten männliche Sprague Dawley Ratten aus der Versuchstierzucht und -haltung der Universität Wien, Himberg, Österreich. (Tabelle 1)

Tabelle 1: Körper- und Lebergewicht der Versuchstiere in g

| Gewicht | Lebergewicht |
|---------|--------------|
| 226g    | 11,0g        |
| 231g    | 14,5g        |
| 194g    | 9,7g         |

Nach Narkotisierung des Versuchstieres mit Thiopental (8- 10mg/100g) wird dessen Leber freigelegt, der Ductus hepaticus abgebunden, angeschnitten, mit einem PE 10-Rohr kanuliert und wieder abgebunden. Im Anschluss finden drei Ligationen statt – an der Vena porta, an der Vena cava inferior, an der Aorta abdominalis und am Ösophagus. Um die Blutgerinnung zu hemmen wird Heparin (1500 IE) in die Milz injiziert und in die Vena porta und Vena cava inferior Glaskanülen (1,5mm) eingeführt. Danach kann die Leber vorsichtig entnommen und gewogen werden und soll rasch – innerhalb von 5 Minuten – an den künstlichen Kreislauf angeschlossen werden.

Während der gesamten Versuchsdauer wird das Perfusionsmedium, Krebs-Henseleit-Puffer (Tabelle 2), mit Hilfe eines Wasserbades bei einer konstanten Temperatur von 41,5°C erwärmt und mit einem Gemisch aus 93% Sauerstoff und 7% Kohlendioxid begast. Mit einer Durchflußrate von 3ml pro Gramm Leber pro Minute wird das Medium über eine Rollpumpe, welche die Peristaltik imitiert, zur Leber transportiert. Diese Bedingungen führen dazu, dass der Puffer, durch Verlust an Wärme und Kohlendioxid, die Leber mit einer Temperatur von 37°C und pH 7,4 erreicht.

Tabelle 2: Zusammensetzung des Perfusionsmediums (Krebs-Henseleit-Puffer)

| Substanz                                          | Konzentration (mMol/l) |
|---------------------------------------------------|------------------------|
| NaCl                                              | 118,1mMol/l            |
| CaCl <sub>2</sub>                                 | 2,6mMol/l              |
| KCl                                               | 4,5mMol/l              |
| NaHCO <sub>3</sub>                                | 25,0mMol/l             |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O              | 1,2mMol/l              |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O | 1,2mMol/l              |

Das effluente Perfusat wird über eine Kanüle abgeleitet und gesammelt. Das Röhrchen aus dem Gallengang wird so platziert, dass die Gallentropfen eine Lichtschranke passieren um die Tropfen zu zählen. Der Gallefluss in mg/g Leber/min kann anschließend mit der folgenden Formel berechnet werden:

$$GF = \frac{F \times G_{\text{Tropfen}}}{G_{\text{Leber}}}$$

GF = Gallefluß in mg/g Leber · min

F = Tropfenfrequenz in Tropfen /min

G<sub>Tropfen</sub> = Tropfengewicht in mg/Tropfen

G<sub>Leber</sub> = Lebergewicht in g

Probenaufbereitung und Durchführung der Perfusion:

Da der Gallefluss stabilisiert werden muss und die Leber gereinigt, wird 25 Minuten mit dem vorher beschriebenen Medium vorperfundiert. Anschließend wird auf eine Lösung der jeweiligen Testsubstanz umgeschaltet und für weitere 90 Minuten perfundiert. Während

des Experiments werden Galle- und Perfusatproben in 5 Minuten-Intervallen gesammelt, wobei als Nullwert das Vorperfusat dient. Über Trockeneis werden die Proben sofort schockgefroren und bis zur HPLC- Analyse bei -20°C gelagert. Für die Analyse sollen die Proben schonend aufgetaut und wie in Tabelle 3 beschrieben aufgearbeitet werden.

*Tabelle 3: Probenaufbereitung der Galle- und Perfusatproben*

|            | Galleproben                                            | Perfusatproben |
|------------|--------------------------------------------------------|----------------|
| Verdünnung | 5µl Galle, 95µl NH <sub>4</sub> -acetat 5mM,<br>pH 7,4 | Unverdünnt     |
| Verdünnung | 80µl                                                   | 80µl           |

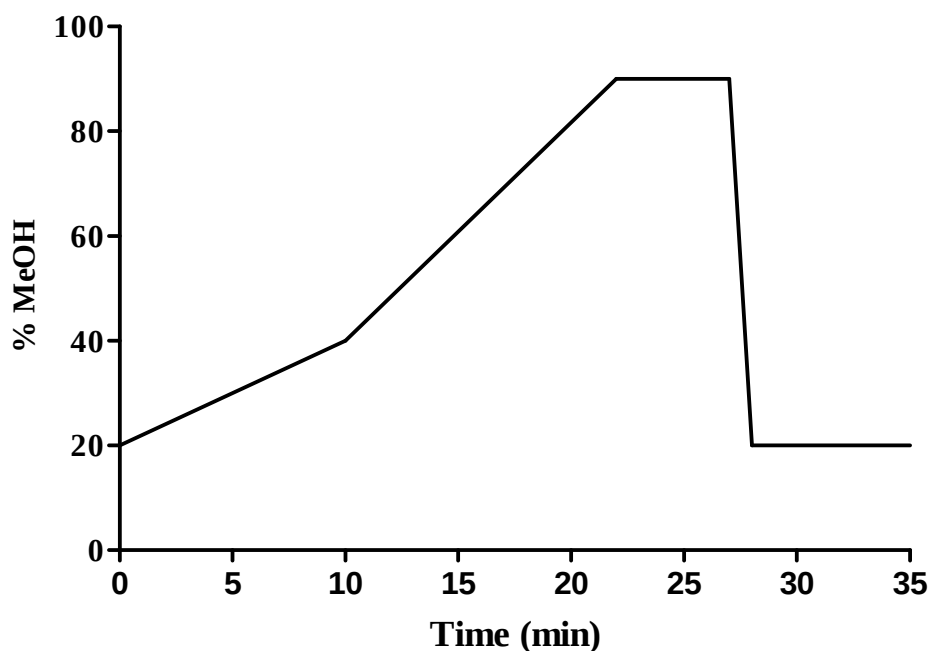
### 3.3.2 HPLC-System

Ein geeignet entwickeltes HPLC-System sorgt für den Nachweis von Methylhonokiol bzw. deren einzelnen Metaboliten sowie die quantitative Bestimmung.

*Tabelle 4: Parameter des HPLC Systems für Methylhonokiol*

|                  | Parameter                                                    |
|------------------|--------------------------------------------------------------|
| Säule            | Hypersil BDS-C18 (5 µM, 250x<br>4.6 I.D., Astmoor, England); |
| Vorsäule         | Hypersil BDS-C18 (5 µM, 10 x<br>4.6 I.D., Astmoor, England)  |
| Säulentemperatur | 15°C                                                         |
| Wellenlänge      | 225 nm                                                       |
| Fluß             | 1 ml/min                                                     |
| Eluent A         | NH <sub>4</sub> -acetat (5mM) pH 7,4                         |
| Eluent B         | Methanol                                                     |
| Injektvolumen    | 80µl                                                         |

Vor der Analyse wurden die beiden Eluenten durch ein 0,45µm Membranfilter filtriert und im Ultraschallbad entgast. Das Mischungsverhältnis der beiden Komponenten wurde entlang der folgenden Gradienten (Abbildung 7) verändert:



| Time | % NH4Ac | %MeOH |
|------|---------|-------|
| 0    | 80      | 20    |
| 10   | 60      | 40    |
| 22   | 10      | 90    |
| 27   | 10      | 90    |
| 28   | 80      | 20    |
| 35   | 80      | 20    |

Abbildung 7: HPLC- Gradient für die Trennung von Methylhonokiol

### 3.3.3 Strukturaufklärung der Metaboliten von Methylhonokiol

Über die Strukturen der Metabolite von Methylhonokiol liegen noch keine Daten vor und somit kann kein Vergleich mit den Retentionszeiten der gefundenen Metabolitenpeaks durchgeführt werden. Schließlich wurden die Strukturen mittels enzymatischer Hydrolyse bzw. LC/MS-Analyse aufgeklärt.

**Enzymatische Hydrolyse der Metaboliten:**

Eine enzymatische Hydrolyse gibt Aufschluss ob eine Konjugation von Methylhonokiol mit Schwefelsäure und/oder Glukuronsäure stattgefunden hat. Dabei wurden jeweils 5 µl Gallenproben mit 20 µl Sulfatase versetzt und 60 Minuten bzw. 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Zu jeweils 2 weiteren 5 µl Gallenproben wurde 20 µl Glukuronidase zugegeben um diese wieder 60 Minuten bzw. 24 Stunden bei 37°C zu inkubieren. Danach werden die Proben einer HPLC-Analyse unterworfen.

**LC/MS:**

Die Metabolite wurden durch die in Kapitel 3.3.2 beschriebene HPLC Systeme voneinander getrennt und anschließend massenspektrometrisch untersucht. In Tabelle 5 werden die Parameter für die LC/MS Messung näher erläutert. Anhand dieser Analysen konnten nun genauere Strukturvorschläge ermittelt werden.

**Parameter für LC/MS Messung:**

|                            |                                             |
|----------------------------|---------------------------------------------|
| <b>Massenspektrometer:</b> | 4000 QTrap (Applied Biosystems)             |
| <b>Quellenparameter:</b>   | TurboIonSpray Electrospray (ESI) source     |
|                            | Curtain Gas: 10 psi (99.5% N <sub>2</sub> ) |
|                            | Collision: Gas High                         |
|                            | Ion Spray Voltage: -4000 V                  |
|                            | Temperature: 550°C                          |
|                            | Ion source gas 1 (sheath gas): 30 psi       |
|                            | Ion source gas 2 (drying gas): 50 psi       |
|                            | Interface heater: ON                        |
|                            | Declustering potential: -30V                |
|                            | Entrance potential: -10V                    |
| <b>Full MS scan:</b>       | Scan range: 260-750 amu, 1 sec scan time    |
|                            | negative polarity                           |
|                            | unit resolution                             |

EPI-Meßmodus: Dynamic fill time (Lineare Ionenfalle wird gefüllt bis eine bestimmte Ionenanzahl erreicht wird und wird dann ausgelesen)  
negative polarity  
Scan speed: 1000 amu/sec  
Cell Exit Potential: -10V

### 3.3.4 Leberextraktion

Die Leberextraktion dient zur Untersuchung von eventuell noch verbliebenen Anteilen an Metaboliten bzw. Methyllhonokiol in der Leber.

Die Leberproben wurden schonend aufgetaut und 500- 600mg Anteile für die Verarbeitung entnommen und gewogen. Pro 100 mg Leber wurden 500 µl Phosphatpuffer pH 7,4, zugegeben (Tabelle 4) und mittels Ultraturrax homogenisiert. Anschließend wurden 2ml des Homogenisats entnommen und 10 Minuten lang zentrifugiert. Danach wurde 1ml von dem Überstand erneut 5 Minuten zentrifugiert. Nun wurden 250 µl von diesem Überstand abgezogen und mit 500 µl reinem Methanol versetzt und nochmals 5 Minuten zentrifugiert. Für die HPLC-Analyse wurden 500 µl des Überstandes benötigt.

Tabelle 5: Parameter für die Leberextraktion

| Ratte            | Gewicht der Leberprobe | Menge an Puffer |
|------------------|------------------------|-----------------|
| Sprague Dawley 1 | 580,7mg                | 2903,6µl        |
| Sprague Dawley 2 | 506mg                  | 2530µl          |
| Sprague Dawley 3 | 632,6mg                | 3163µl          |

### 3.3.5 Auswertung und Statistische Methoden

Mittels externer Eichung wurde die Quantifizierung durchgeführt. Die Proben wurden im Medium der zu vermessenden Proben (Puffer, pH-Wert) vorbereitet und die Konzentrationsbereiche entsprechend den Konzentrationen in den jeweiligen Proben gewählt wurden.

Die Daten, die in dieser Arbeit angeführt sind stellen Mittelwerte aus 3 Einzelbestimmungen dar.

Berechnung der Leberperfusionen:

- Sekretionsgeschwindigkeit (V) im effluenten Perfusat:

$$V \text{ (nmol/ g Leber.min)} = \frac{C \times \text{Flow} \times 1000}{\text{MG} \times \text{LG}} \quad (1)$$

C = Konzentration der Metaboliten in  $\mu\text{g/ml}$

Flow = Durchflußrate in  $\text{ml/min}$

MG = Molekulargewicht

LG = Lebergewicht in g

- Sekretionsgeschwindigkeit in der Galle:

$$V \text{ (nmol/ g Leber.min)} = \frac{C \times \text{GF}}{\text{MG}} \quad (2)$$

C = Konzentration der Metaboliten in  $\mu\text{g/ml}$

MG = Molekulargewicht

- Prozentuelle Verteilung der Metaboliten ( $\text{FM}_x$ ):

$$\text{FM}_x = \frac{\text{CM}_x \times \text{LG} \times 100}{\text{Cin}} \quad (3)$$

---

$CM_x$  = Kumulative Sekretion des jeweiligen Metaboliten im jeweiligen  
Medium in pmol/90min

$C_{in}$  = Kumulative Konzentration der nativen Substanz, die der Leber  
zugeführt wird in pmol/ 90 min

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Trennung und Quantifizierung von Methylhonokiol und dessen Biotransformationsprodukte mittels HPLC

Für die Trennung der Metabolite von Methylhonokiol und um dessen Gehalt analytisch zu bestimmen wurde das in Kapitel 3 beschriebene HPLC-System verwendet.

Zunächst wurden 3 Sprague Dawley Ratten mit einer 10  $\mu$ molären Methylhonokiollösung perfundiert um danach die Galle in 5 Minutenintervallen und ein aliquoter Anteil (10  $\mu$ l) des Perfusates zu sammeln. Anschließend konnten die Biotransformationsprodukte durch die HPLC-Analyse bestimmt werden.

Ebenso wurden Kontrollperfusionen mit einer weiteren Sprague Dawley Rattenleber ohne Methylhonokiol durchgeführt um die Ausscheidung von zusätzlichen bzw. störenden Gallebestandteilen ermitteln zu können (Abbildung 11).

In den Abbildungen 8 und 9 sind vorerst die Eichgerade sowie ein HPLC-Chromatogramm von Methylhonokiol (5  $\mu$ g/ml) mit einer Retentionszeit von 28,75 Minuten ersichtlich.

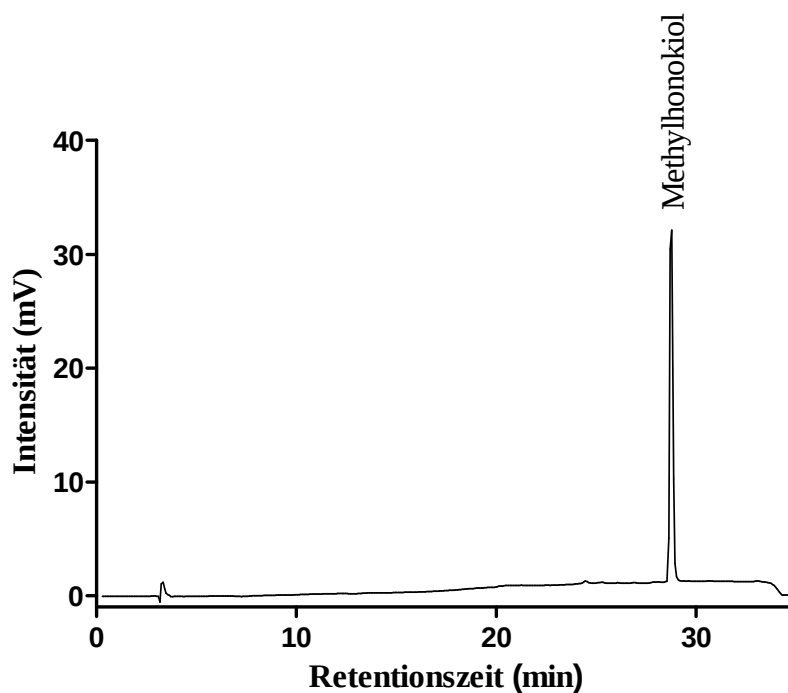


Abbildung 8: HPLC Chromatogramm von Methylhonokiol

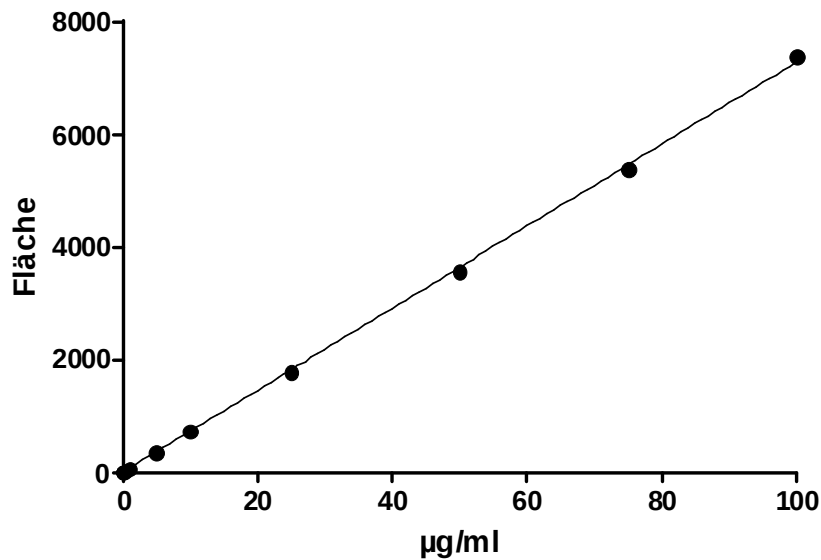


Abbildung 9: Eichgerade für Methylhonokiol

Die Abbildung 10 lässt neben Methylhonokiol mehr als 3 Metabolite erkennen, jedoch konnten nur 3 durch HPLC-MS aufgeklärt werden, deren Retentionszeiten im Bereich von 11 und 29 Minuten liegen (Tabelle 7). Der Metabolit 1 ist strukturell gesehen ein Methylhonokiol-Glucuronid mit zusätzlichem Molekulargewicht von 30, ebenso befindet sich bei Metabolit 2, welches ein Methylhonokiol-Sulfat darstellt, zusätzlich MG 30. Metabolit 3 ist ein Methylhonokiol-Glucuronid. Diese Metabolite sind hier die mengenmäßig bedeutendsten Stoffwechselprodukte.

Tabelle 6: Durchschnittliche Retentionszeiten der Metabolite von Methylhonokiol

| Metabolite | Gallenproben | bzw.  | Perfusatproben |
|------------|--------------|-------|----------------|
| M1         |              | 11,15 |                |
| M2         |              | 14,73 |                |
| M3         |              | 23,44 |                |
| M4         |              | 28,75 |                |

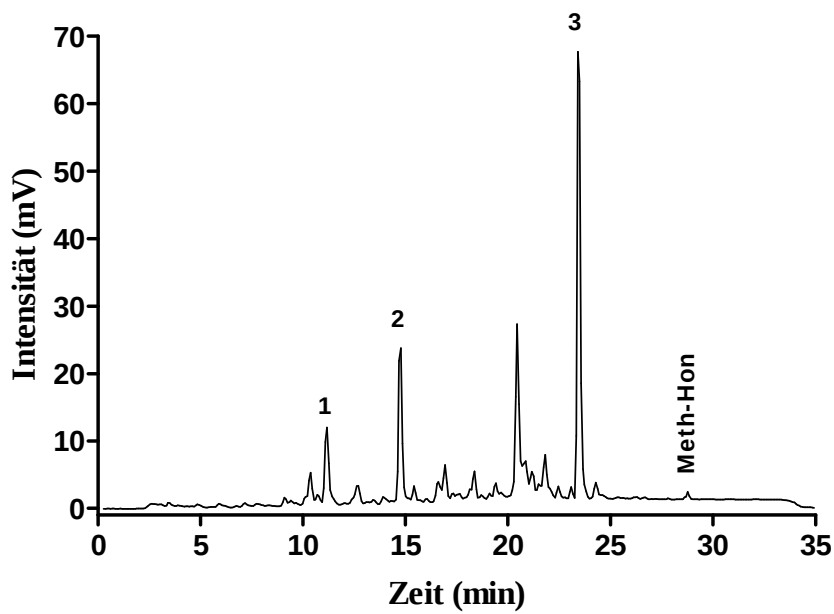


Abbildung 10: Chromatogramm einer Gallenprobe einer Sprague Dawley Versuchsreihe, nach 60 Minuten Perfusion

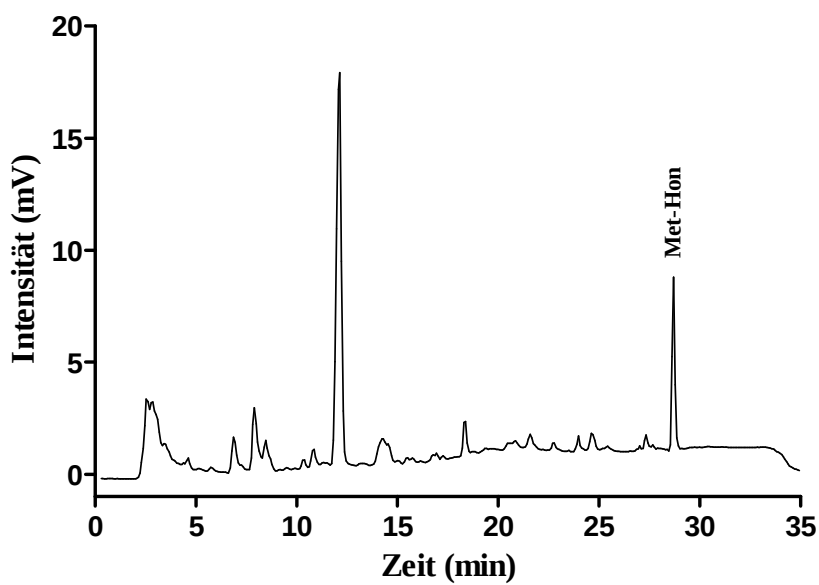


Abbildung 11: Chromatogramm einer Kontrollgalle der Sprague Dawley Versuchsreihe, 60 Minuten, versetzt mit Methylhonokiol

Im Perfusat konnten ebenfalls die 3 Hauptmetabolite detektiert werden, jedoch sind diese nur in kleinen Mengen vorliegend.

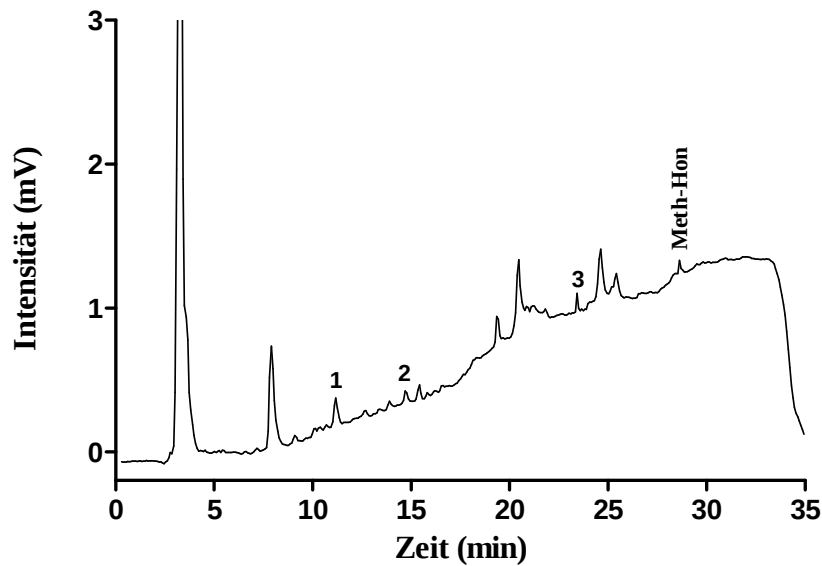


Abbildung 12: Chromatogramm einer Perfusatprobe aus der Sprague Dawley Versuchsserie, nach 60 Minuten Perfusion

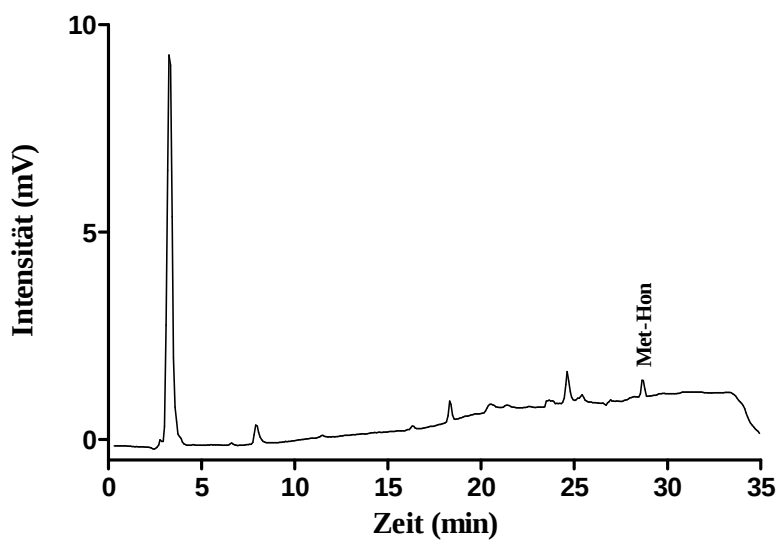


Abbildung 13: Chromatogramm eines Kontrollperfusates der Sprague Dawley Versuchsserie, 60 Minuten, versetzt mit Methylhonokiol

## **4.2 Strukturaufklärung der Biotransformationsprodukte von Methylhonokiol**

### **4.2.1 Enzymatische Hydrolyse**

Dieses Kapitel soll sich näher mit den Strukturen der Metabolite von Methylhonokiol beschäftigen. Die Biotransformationsreaktionen, die in der Leber stattfinden, unterteilen sich wie schon in Kapitel 2.5 beschrieben in Phase I und Phase II Reaktionen. Diese Umwandlungsprozesse sind entscheidend für die schnelle Elimination von lipophilen Arzneistoffen und Fremdstoffen. Die Phase II ist eine wichtige Konjugationsreaktion, bei der funktionelle Gruppen mit endogenen Molekülen gekoppelt werden, wie im Rahmen einer Glucuronidierung und Sulfatierung.

Um herauszufinden ob nun solche Reaktionen stattgefunden haben, wurden zunächst die Gallenproben mit  $\beta$ -Glucuronidase versetzt. Da es zu einer Verminderung der Peakflächen gekommen ist, deutet dieses Ergebnis auf das Vorhandensein von Glucuroniden hin.

Ebenso wurden die Gallenproben auch mit Sulfatase behandelt. Hier konnte zwar keine Verminderung der Peakflächen verzeichnet werden, aber durch die bekanntlich schwierige Abspaltung ist dieses Ereignis als nicht außergewöhnlich zu bezeichnen. Eine gleichzeitige enzymatische Behandlung der Gallenprobe mit Glucuronidase und Sulfatase würde in weiterer Folge zu keinem genaueren Ergebnis führen.

### **4.2.2 Massenspektrometrie (LC/MS)**

Um die Erkenntnisse der Strukturen von Methylhonokiol-Metaboliten zu erweitern wurden diesbezüglich massenspektrometrische Untersuchungen (LC/MS) durchgeführt. Die Metabolite wurden durch das gleiche HPLC-System, das bereits zur quantitativen Analyse verwendet wurde, getrennt und nach Elektronenspray-Ionisierung massenspektrometrisch bestimmt.

Das Massenspektrum des nativen Methylhonokiols (Abbildung 14) zeigt ein Molekülion von  $m/z = 279$  ohne charakteristisches Fragmentationsmuster.

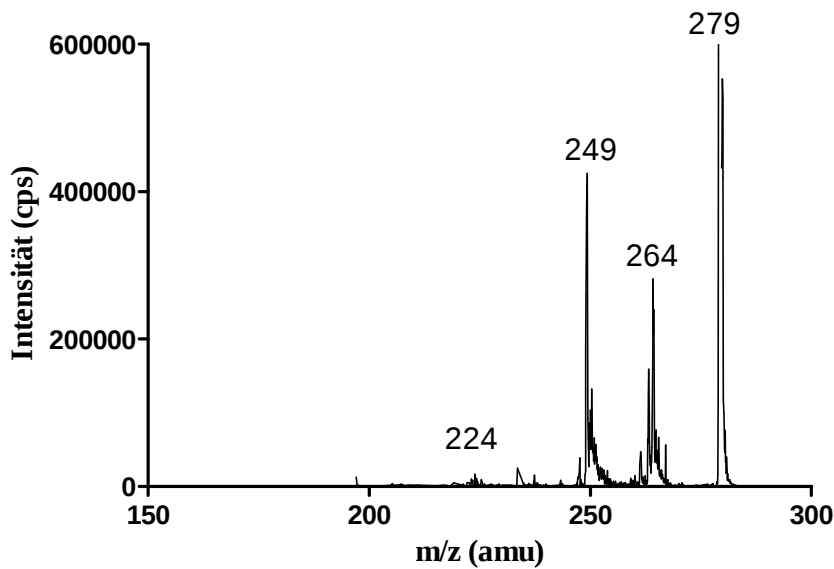


Abbildung 14: Massenspektrum des nativen Methylhonokiol

Beim Metaboliten M1 (Abbildung 15) zeigt sich eine Fragmentationsmuster von  $m/z-1=485$ , das einem Methylhonokiol mit zusätzlicher Massezahl  $m/z = 30$  entspricht, Dieses wurde einer Glucuronidierung unterworfen, dessen genauere Aufklärung aber nicht möglich war.

Die Strukturen der weiteren 6 im Massenspektrum ersichtlichen Ionen konnten ebenfalls nicht genau analysiert werden. Jedoch ist die Abspaltung von immer  $m/Z = 15$  sehr auffällig.

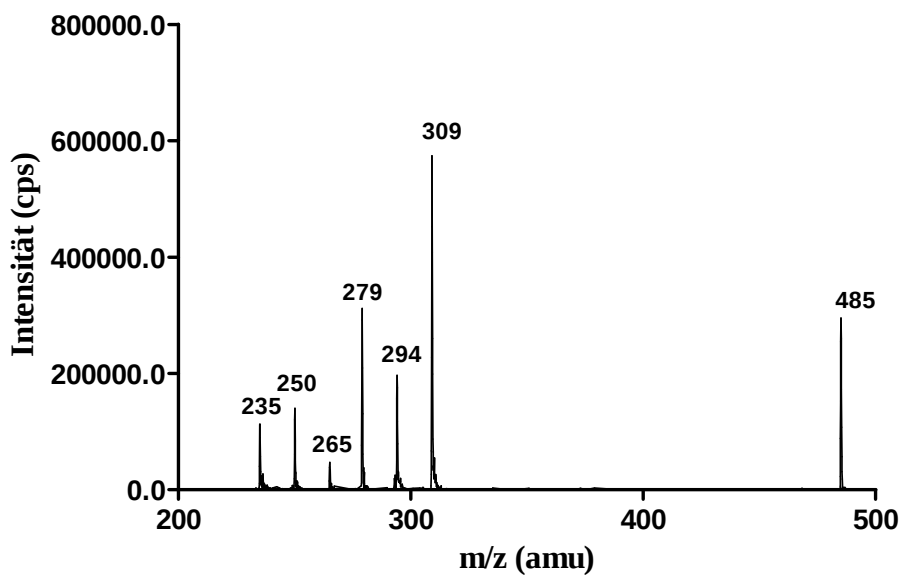


Abbildung 15: Massenspektrum des Metaboliten M1

Das Ergebnis des MS-Spektrums von Metabolit M2 (Abbildung 16) zeigt ein Molekulargewicht von  $m/z-1 = 389$  und stellt eine Sulfatspezies dar. Der Metabolit M2 lässt ein ähnliches Fragmentationsmuster wie Metabolit M1 erkennen. Hier wurde wie bei Metabolit M1 eine zusätzliche Massenzahl  $m/z = 30$  detektiert. Auch die Abspaltung von  $m/z = 15$  bei den übrigen 6 Molekülen ist auffällig.

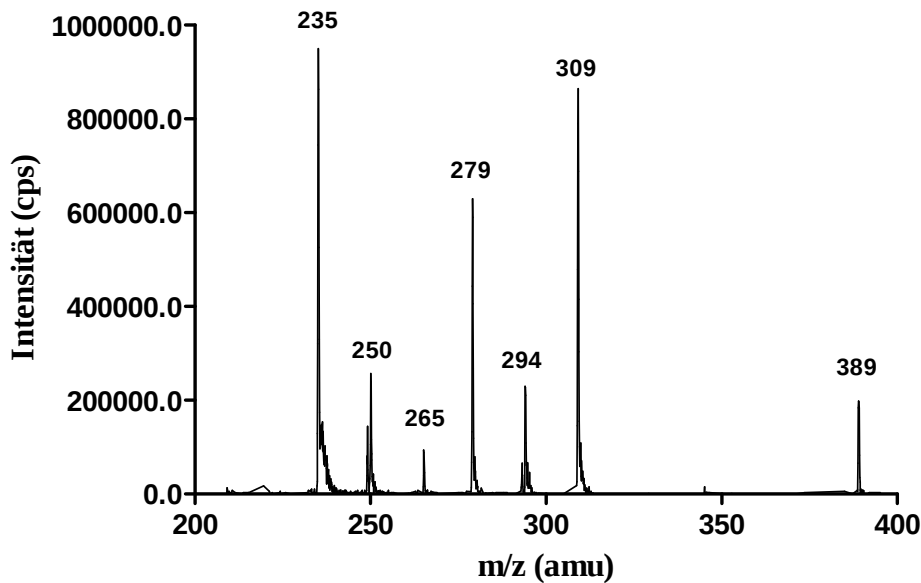


Abbildung 16: Massenspektrum des Metaboliten M2

Das Massenspektrum von Metabolit M3 (Abbildung 17) ist im Vergleich zu den beiden Metaboliten M1 und M2 klar interpretierbar. Nach Abspaltung von  $m/z = 176$  konnte das Fragment von Methylhonokiol  $m/z = 279$  detektiert werden. Der Metabolit M3 entspricht somit einem Methylhonokiol-Glucuronid, dessen Molekulargewicht 455 beträgt.

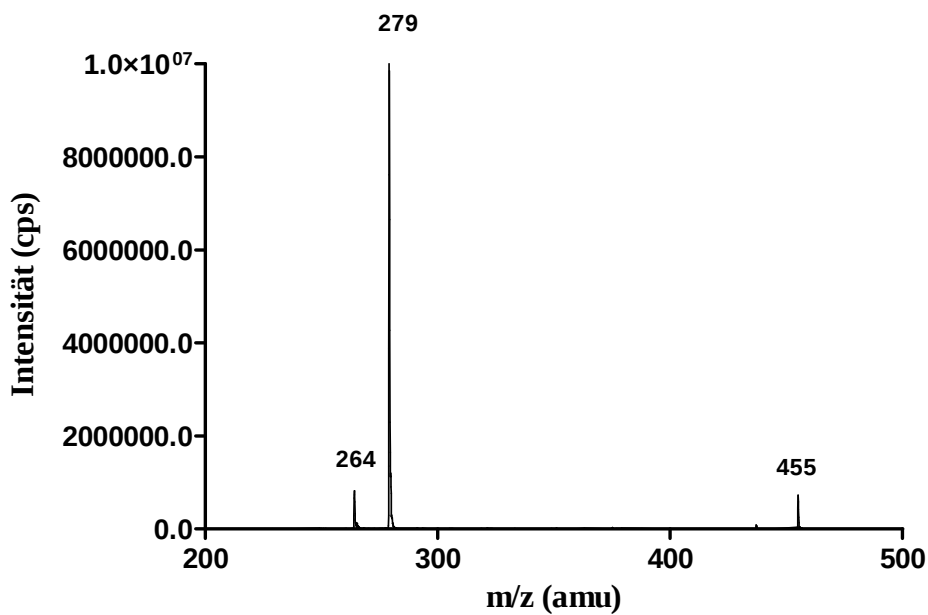


Abbildung 17: Massenspektrum des Metaboliten M3

### **4.3 Metabolismus von Methylhonokiol in der isolierten perfundierten Leber und im Perfusat von Sprague Dawley Ratten**

#### **4.3.1 Einfluss von Methylhonokiol auf den Gallefluss in Sprague Dawley Ratten**

Der Gallefluss der Sprague Dawley Ratten wurde während der Perfusion mittels Lichtschrankenmessung analysiert. Die Zugabe von Methylhonokiol bewirkt eine Zunahme des Galleflusses von 1,0 g/g Leber/min auf 1,17 g/g Leber/min, welche in der Abbildung 18 ersichtlich ist. Dieser Wert sinkt kontinuierlich nach 85 Minuten auf 0,62 g/g Leber/min ab.

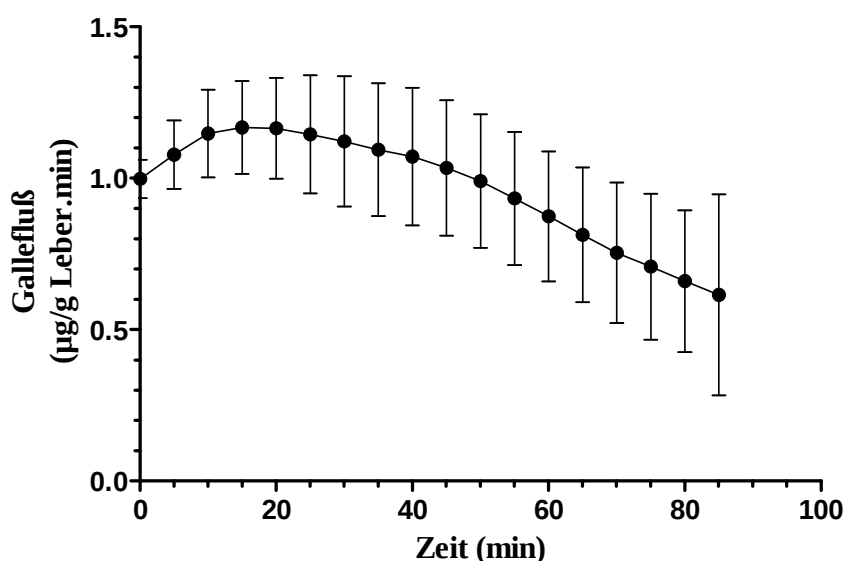


Abbildung 18: Einfluss von Methylhonokiol auf den Gallefluß auf Sprague Dawley Ratten

#### 4.3.2 Sekretionsgeschwindigkeit der Metabolite in die Galle

Das Modell der isolierten perfundierten Rattenleber ist eine geeignete Methode, die hepatische Biotransformation von Methylhonokiol ohne störende Einflüsse anderer Organe und Gewebe erfassen zu können.

Nach Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Methylhonokiol zum Perfusionsmedium wurden Gallenproben in Intervallen von 5 Minuten gesammelt um diese dann der HPLC-Analyse zu unterwerfen. Die erhaltenen Peakflächen wurden anschließend mit Hilfe der Eichgeraden als  $\mu\text{g/ml}$  Werte berechnet. Um die Sekretionsgeschwindigkeit ( $\text{pmol/g Leber.min}$ ) ermitteln zu können und auch damit verbunden geringfügige Schwankungen der Sekretion zu erkennen, müssen das Lebergewicht in g und Gallefluß für das jeweilige Zeitintervall in  $\text{ml/min}$  angegeben werden. Der statistische Mittelwert wurde aus den Werten der einzelnen Versuchstiere gebildet und ebenso die dazugehörige Standardabweichung berechnet. In den folgenden Abbildungen wird die durchschnittliche Sekretion der Metabolite in die Galle innerhalb von 80 Minuten graphisch dargestellt.

Der Sekretionsverlauf von Methylhonokiol in Abbildung 19 zeigt einen Anstieg nach 20 Minuten auf einen Maximalwert von 7,2 pmol/g Leber, wobei das Niveau annähernd gleich bleibt. Nach einer Zeit von 50 Minuten ist ein kontinuierlicher Kurvenabstieg zu verzeichnen.

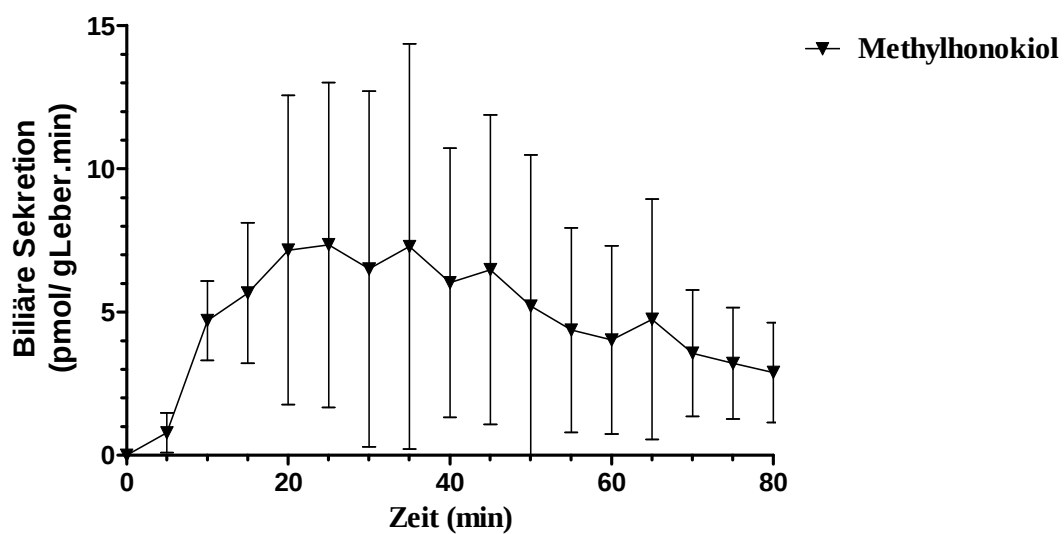


Abbildung 19: Durchschnittliche Sekretionsgeschwindigkeit von Methylhonokiol in die Galle von Sprague Dawley Ratten

*Tabelle 7: Mittelwerte und Stanardabweichung (SD) der Sekretionsgeschwindigkeit von Methylhonokiol (MH) in die Galle von Sprague Dawley Ratten (n=3)*

| Zeit (min) | MH   | ± | SD   |
|------------|------|---|------|
| 0          | 0.00 |   | 0.00 |
| 5          | 0,79 |   | 0,68 |
| 10         | 4,69 |   | 1,38 |
| 15         | 5,65 |   | 2,44 |
| 20         | 7,16 |   | 5,39 |
| 25         | 7,34 |   | 5,66 |
| 30         | 6,50 |   | 6,20 |
| 35         | 7,28 |   | 7,06 |
| 40         | 6,02 |   | 4,69 |
| 45         | 6,47 |   | 5,39 |
| 50         | 5,20 |   | 5,27 |
| 55         | 4,37 |   | 3,56 |
| 60         | 4,02 |   | 3,28 |
| 65         | 4,74 |   | 4,19 |
| 70         | 3,56 |   | 2,20 |
| 75         | 3,21 |   | 1,94 |
| 80         | 2,88 |   | 1,74 |

Die Sekretionskurve des Metaboliten M1, welche in Abbildung 20 ersichtlich ist, lässt einen steilen Anstieg erkennen, der nach 35 Minuten bei 120,4 pmol/g Leber.min persistiert. Langsam, aber stetig flacht die Kurve merklich wieder ab wobei schließlich nach 80 Minuten nun ein Wert von 38,6 pmol/g Leber.min erreicht wird.

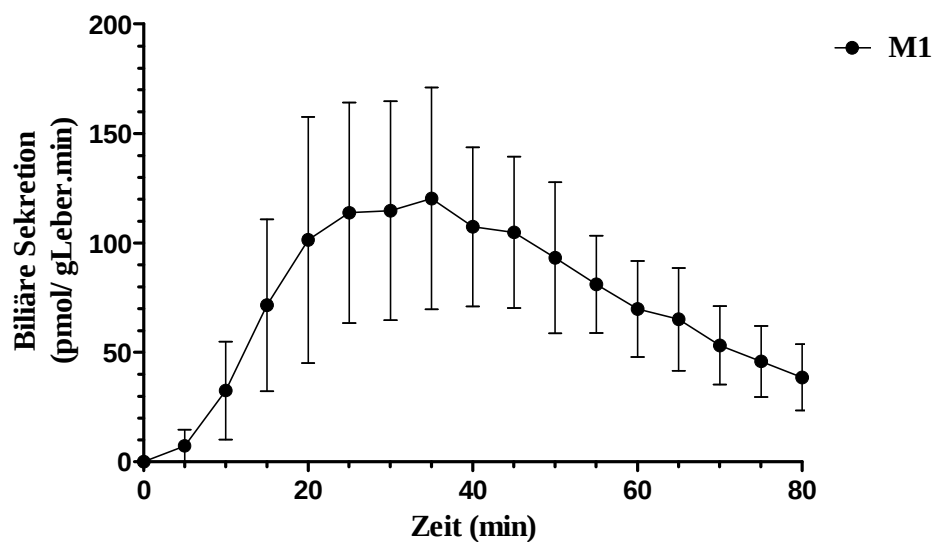


Abbildung 20: Durchschnittliche Sekretionsgeschwindigkeit des Metaboliten M1 in die Galle von Sprague Dawley Ratten

*Tabelle 8: Mittelwerte und Standardabweichung der Sekretionsgeschwindigkeit des Metaboliten M1 in die Galle von Sprague Dawley Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min*

| Zeit (min) | M1     | ± | SD     |
|------------|--------|---|--------|
| 0          | 0.00   |   | 0.00   |
| 5          | 7,33   |   | 7,32   |
| 10         | 32,58  |   | 22,32  |
| 15         | 71,50  |   | 39,22  |
| 20         | 101,43 |   | 56,18  |
| 25         | 113,73 |   | 50,40  |
| 30         | 114,78 |   | 49,99  |
| 35         | 120,38 |   | 50,66  |
| 40         | 107,34 |   | 36,37  |
| 45         | 104,88 |   | 34,591 |
| 50         | 93,27  |   | 34,48  |
| 55         | 81,06  |   | 22,23  |
| 60         | 69,90  |   | 21,92  |
| 65         | 65,10  |   | 23,56  |
| 70         | 53,16  |   | 17,91  |
| 75         | 45,88  |   | 16,26  |
| 80         | 38,55  |   | 15,20  |

In Abbildung 21 wird die Exkretionskurve des Metaboliten M2 verdeutlicht. Der in den ersten 10 Minuten langsame Anstieg geht schließlich in einen steilen Kurvenverlauf über. Der Maximalwert befindet sich bei 280,1 pmol/g Leber.min. Nach einer 15 minütigen Plateauphase zeigt die Kurve im Gegensatz zu Metabolit M2 nur einen flachen Abfall. Außerdem wird nach 80 Minuten ein Wert von 146,6 pmol/g Leber.min verzeichnet.

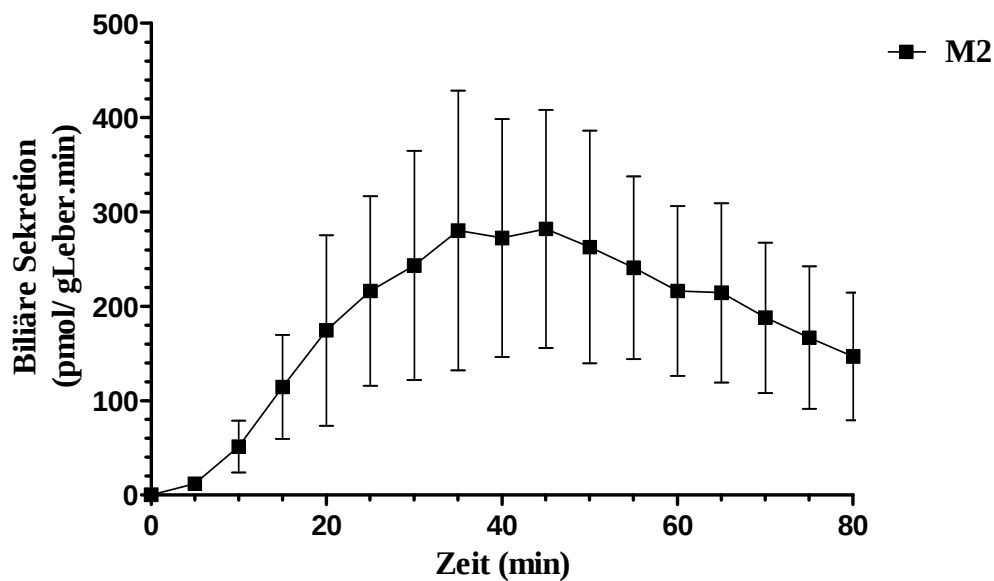


Abbildung 21: Durchschnittliche Sekretionsgeschwindigkeit des Metaboliten M2 in die Galle von Sprague Dawley Ratten in einem Zeitintervall von 80 Minuten

*Tabelle 9: Mittelwerte und Standardabweichung der Sekretionsgeschwindigkeit des Metaboliten M2 in die Galle von Sprague Dawley Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min*

| Zeit (min) | M2     | ± | SD     |
|------------|--------|---|--------|
| 0          | 0.00   |   | 0.00   |
| 5          | 11,81  |   | 2,66   |
| 10         | 51,30  |   | 27,39  |
| 15         | 114,35 |   | 55,01  |
| 20         | 174,31 |   | 100,87 |
| 25         | 216,08 |   | 100,30 |
| 30         | 243,18 |   | 121,49 |
| 35         | 280,14 |   | 148,19 |
| 40         | 272,20 |   | 126,06 |
| 45         | 281,83 |   | 126,04 |
| 50         | 262,68 |   | 123,33 |
| 55         | 240,64 |   | 96,83  |
| 60         | 216,09 |   | 89,67  |
| 65         | 214,18 |   | 94,97  |
| 70         | 187,77 |   | 79,71  |
| 75         | 166,56 |   | 75,56  |
| 80         | 146,58 |   | 67,55  |

Die stark ansteigende Sekretionskurve des Metaboliten M3, welche in Abbildung 22 zu erkennen ist, lässt auf eine hohe Sekretionsrate der Perfusion schließen. Zu Beginn steigert sich die Kurve signifikant und erreicht nach 25 Minuten einen Wert von 630,8 pmol/g Leber.min. Dieser Level bleibt annähernd gleich und steigert sich nach 35 Minuten abermals auf einen Höchstwert von 641,0 pmol/g Leber.min. Schließlich flacht die Kurve langsam und kontinuierlich ab. Nach 80 Minuten ist ein Wert von 314,5 pmol/g Leber.min zu verzeichnen, welcher im Vergleich zu Metabolit M1 und M2 um ein Vielfaches höher ist und sich somit deutlich von den beiden unterscheidet.

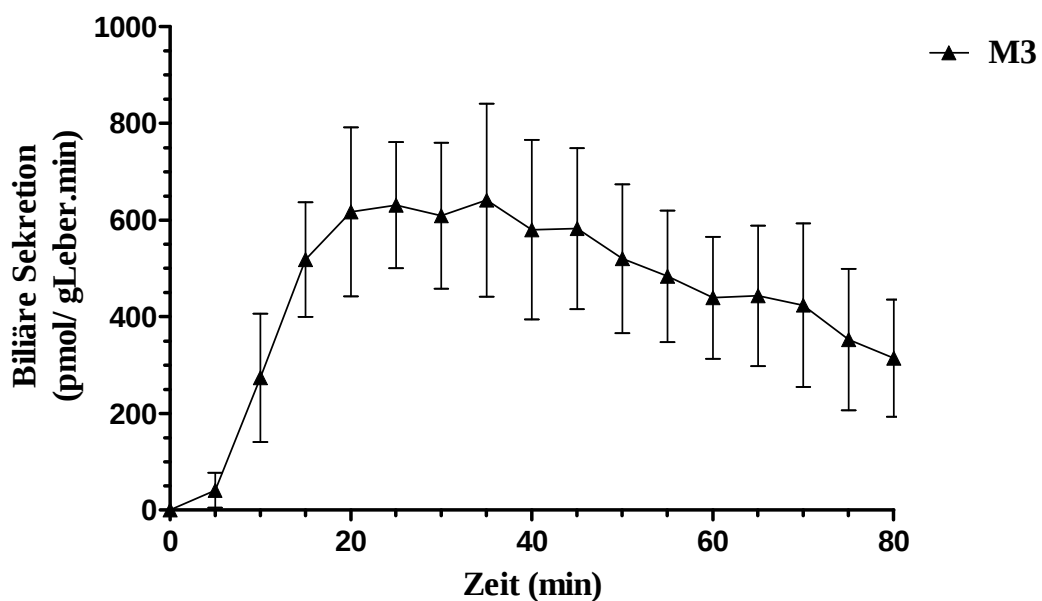


Abbildung 22: Durchschnittliche Sekretionsgeschwindigkeit des Metaboliten M3 in die Galle von Sprague Dawley Ratten

*Tabelle 10: Mittelwerte und Standardabweichung der Sekretionsgeschwindigkeit des Metaboliten M3 in die Galle von Sprague Dawley Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min*

| Zeit (min) | M3     | ± | SD     |
|------------|--------|---|--------|
| 0          | 0.00   |   | 0.00   |
| 5          | 41,13  |   | 35,71  |
| 10         | 273,57 |   | 132,66 |
| 15         | 518,37 |   | 118,61 |
| 20         | 616,75 |   | 174,82 |
| 25         | 630,84 |   | 130,57 |
| 30         | 608,60 |   | 150,97 |
| 35         | 641,02 |   | 199,41 |
| 40         | 579,83 |   | 185,93 |
| 45         | 582,10 |   | 166,50 |
| 50         | 519,66 |   | 154,16 |
| 55         | 483,46 |   | 135,67 |
| 60         | 439,34 |   | 126,04 |
| 65         | 443,00 |   | 145,19 |
| 70         | 424,01 |   | 169,15 |
| 75         | 352,62 |   | 146,12 |
| 80         | 314,51 |   | 120,99 |

#### 4.3.3 Sekretionsgeschwindigkeit der Metabolite ins Perfusat

Neben den Gallenproben, die während der Perfusion der Leber in 5 minütigen Intervallen gesammelt worden sind, wurden zusätzlich auch aliquote Anteile des Perfusats entnommen um via HPLC-Analyse zu detektieren. Auch hier wurde die Sekretionsgeschwindigkeit in pmol/g Leber.min unter Berücksichtigung der Lebergewichte in g der einzelnen Versuchstiere und die Durchflußgeschwindigkeit in ml/min berechnet. Die folgenden Abbildungen zeigen den durchschnittlichen Efflux von Methylhonokiol sowie seinen Metaboliten in das Perfusat von Sprague Dawley Ratten während eines Zeitraumes von 80 Minuten.

Die Sekretionskurve von Methylhonokiol, welche in Abbildung 23 ersichtlich ist, zeigt erst nach 10 Minuten einen signifikanten Anstieg. Nach 15 Minuten wird ein Wert von 28,3 pmol/g Leber.min erreicht, welcher sich nochmals nach 30 Minuten auf dem Höchstwert von 33,0 pmol/g Leber.min steigert. Mit Ausnahme kleinerer Abweichungen bleibt nun die Kurve auf diesem Level konstant.

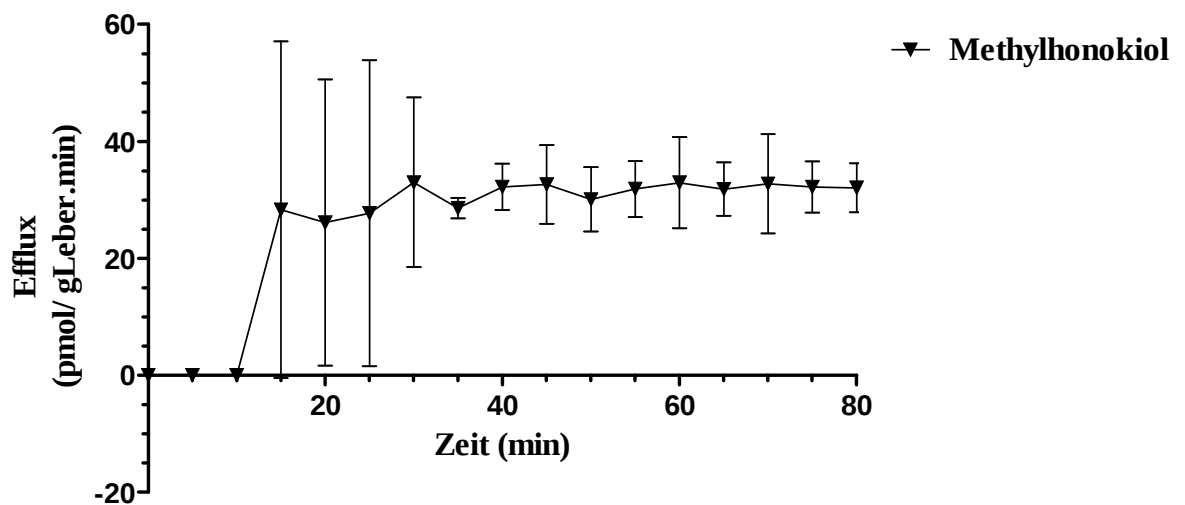


Abbildung 23: Durchschnittlicher Efflux von Methylhonokiol in das Perfusat von Sprague Dawley Ratten innerhalb von 80 Minuten

*Tabelle 11: Mittelwerte und Standardabweichungen der Sekretionsgeschwindigkeit von Methylhonokiol ins Perfusat von Sprague Dawley Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min*

| Zeit (min) | MH    | ± | SD    |
|------------|-------|---|-------|
| 0          | 0.00  |   | 0.00  |
| 5          | 0.00  |   | 0.00  |
| 10         | 0.00  |   | 0.00  |
| 15         | 28,30 |   | 28,78 |
| 20         | 26,11 |   | 24,46 |
| 25         | 27,71 |   | 26,15 |
| 30         | 32,99 |   | 14,47 |
| 35         | 28,56 |   | 1,72  |
| 40         | 32,20 |   | 3,93  |
| 45         | 32,64 |   | 6,73  |
| 50         | 30,08 |   | 5,49  |
| 55         | 31,84 |   | 4,79  |
| 60         | 32,92 |   | 7,80  |
| 65         | 31,83 |   | 4,56  |
| 70         | 32,74 |   | 8,51  |
| 75         | 32,21 |   | 4,35  |
| 80         | 32,05 |   | 4,18  |

Die Exkretionskurve des Metaboliten M1 ist in Abbildung 24 dargestellt. Erst nach 10 Minuten ist eine Änderung in der Exkretion ersichtlich. Dann zeigt die Kurve eine kontinuierliche Erhöhung wobei nach 40 Minuten ein Wert von 166,9 pmol/g Leber.min. gemessen wird. Nun ist eine Sättigung der Exkretion zu erkennen mit einem Höchstwert von 199,6 pmol/g Leber.min nach 75 Minuten.

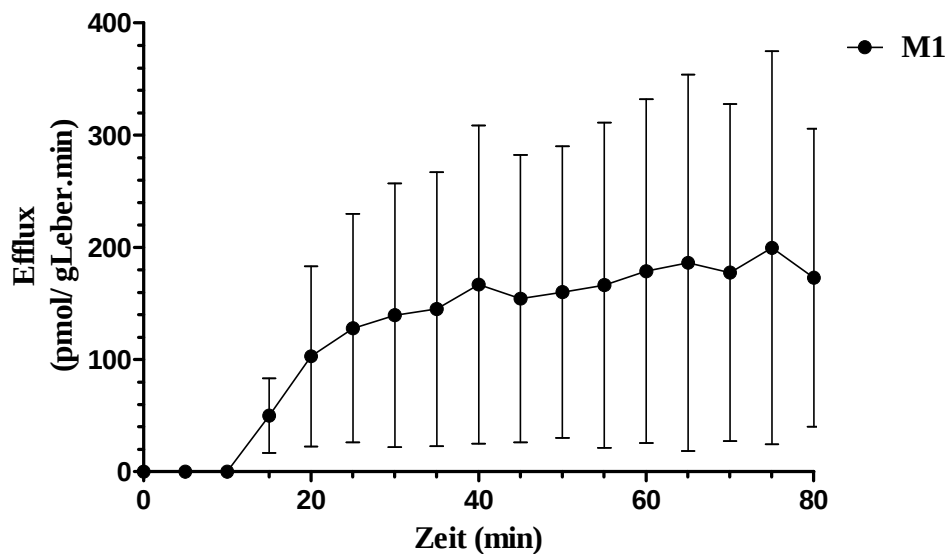


Abbildung 24: Durchschnittlicher Efflux des Metaboliten M1 in das Perfusat von Sprague Dawley Ratten innerhalb von 80 Minuten

*Tabelle 12: Mittelwerte und Standardabweichung der Sekretionsgeschwindigkeit des Metaboliten M1 ins Perfusat von Sprague Dawley Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min*

| Zeit (min) | M1     | ± | SD     |
|------------|--------|---|--------|
| 0          | 0.00   |   | 0.00   |
| 5          | 0.00   |   | 0.00   |
| 10         | 0.00   |   | 0.00   |
| 15         | 50,05  |   | 33,24  |
| 20         | 102,85 |   | 80,11  |
| 25         | 127,96 |   | 101,82 |
| 30         | 139,39 |   | 117,44 |
| 35         | 144,98 |   | 122,06 |
| 40         | 166,92 |   | 141,81 |
| 45         | 154,24 |   | 128,08 |
| 50         | 160,07 |   | 129,97 |
| 55         | 166,39 |   | 144,95 |
| 60         | 178,76 |   | 153,13 |
| 65         | 186,22 |   | 167,79 |
| 70         | 177,55 |   | 150,14 |
| 75         | 199,57 |   | 175,01 |
| 80         | 172,87 |   | 132,81 |

Wie in Abbildung 25 ersichtlich ist kann ein Anstieg der Sekretionskurve erst nach 35 Minuten verzeichnet werden. In den darauffolgenden 15 Minuten erfolgt die Steigung anfangs langsam und nach 55 Minuten steiler. Die Maximalgeschwindigkeit der Kurve, die einen Wert von 170,47 pmol/g Leber.min beinhaltet, kann nach 80 Minuten Perfusion vermessen werden.

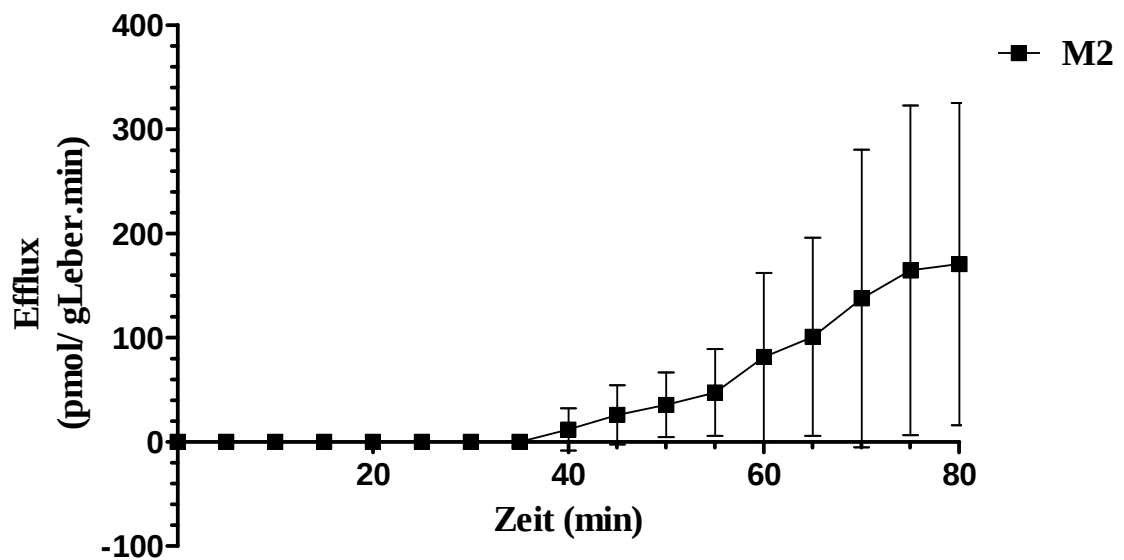


Abbildung 25: Durchschnittlicher Efflux des Metaboliten M2 in das Perfusat von Sprague Dawley Ratten innerhalb von 80 Minuten

*Tabelle 13: Mittelwerte und Standardabweichung der Sekretionsgeschwindigkeit des Metaboliten M2 ins Perfusat von Sprague Dawley Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min*

| Zeit (min) | M2     | ± | SD     |
|------------|--------|---|--------|
| 0          | 0.00   |   | 0.00   |
| 5          | 0.00   |   | 0.00   |
| 10         | 0.00   |   | 0.00   |
| 15         | 0.00   |   | 0.00   |
| 20         | 0.00   |   | 0.00   |
| 25         | 0.00   |   | 0.00   |
| 30         | 0.00   |   | 0.00   |
| 35         | 0.00   |   | 0.00   |
| 40         | 11,75  |   | 20,36  |
| 45         | 25,62  |   | 28,52  |
| 50         | 35,50  |   | 31,06  |
| 55         | 47,23  |   | 41,56  |
| 60         | 81,25  |   | 80,84  |
| 65         | 100,63 |   | 95,04  |
| 70         | 137,44 |   | 143,01 |
| 75         | 164,42 |   | 158,15 |
| 80         | 170,46 |   | 154,74 |

Die Exkretionskurve des Metaboliten M3, welche in Abbildung 26 zu erkennen ist, zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die des Metaboliten M2. Der Perfusionsvorgang erfolgt nach 50 Minuten langsam und stetig, der schließlich nach 65 Minuten zunimmt. Wie anhand der Kurve zu erkennen ist befindet sich der Höchstwert von 108,0 pmol/g Leber.min nach 80 Minuten Vermessungszeit.

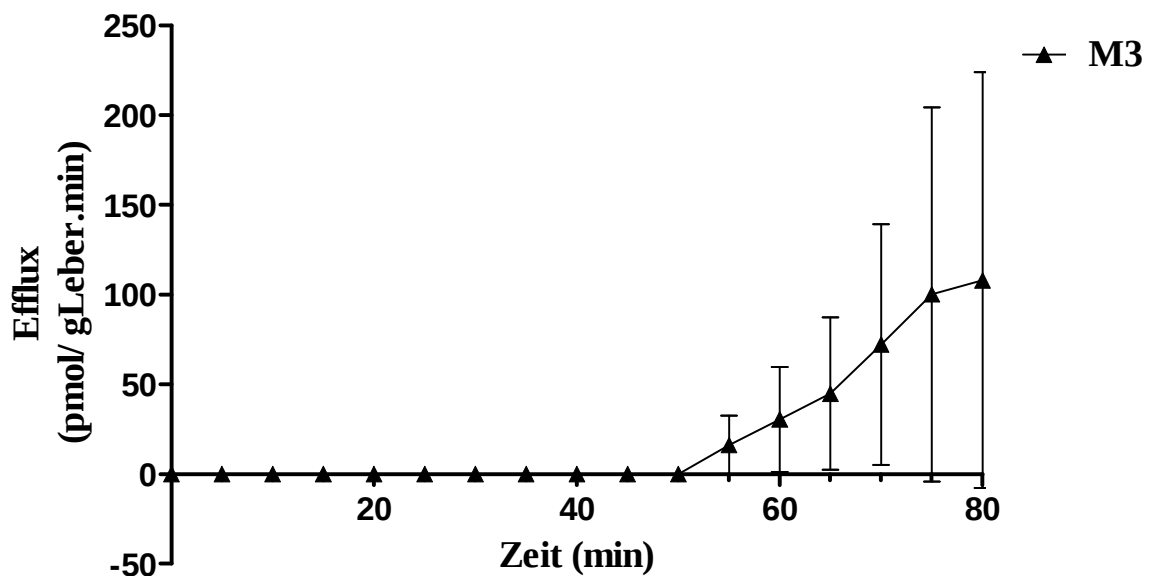


Abbildung 26: Durchschnittlicher Efflux des Metaboliten M3 in das Perfusat von Sprague Dawley Ratten innerhalb von 80 Minuten

*Tabelle 14: Mittelwerte und Standardabweichung der Sekretionsgeschwindigkeit der Metaboliten M3 in das Perfusat von Sprague Dawley Ratten (n=3) in pmol/g Leber.min*

| Zeit (min) | M3     | ± | SD     |
|------------|--------|---|--------|
| 0          | 0.00   |   | 0.00   |
| 5          | 0.00   |   | 0.00   |
| 10         | 0.00   |   | 0.00   |
| 15         | 0.00   |   | 0.00   |
| 20         | 0.00   |   | 0.00   |
| 25         | 0.00   |   | 0.00   |
| 30         | 0.00   |   | 0.00   |
| 35         | 0.00   |   | 0.00   |
| 40         | 0.00   |   | 0.00   |
| 45         | 0.00   |   | 0.00   |
| 50         | 0.00   |   | 0.00   |
| 55         | 16,07  |   | 16,37  |
| 60         | 30,43  |   | 29,27  |
| 65         | 44,82  |   | 42,39  |
| 70         | 72,15  |   | 67,07  |
| 75         | 100,10 |   | 104,28 |
| 80         | 108,02 |   | 115,84 |

#### **4.3.4 Kumulative biliäre Sekretion von Methylhonokiol und seinen Metaboliten in der Galle**

Die Abbildungen 27 und 28 veranschaulichen eine hohe Ausscheidungsrate des Metaboliten M3, der den höchsten Anteil an der kumulativen Sekretion in der Galle zu verzeichnen hat. Weiters ist ersichtlich, daß Methylhonokiol in seiner unveränderten Form einen geringen Prozentsatz von 0,48% aufweist.

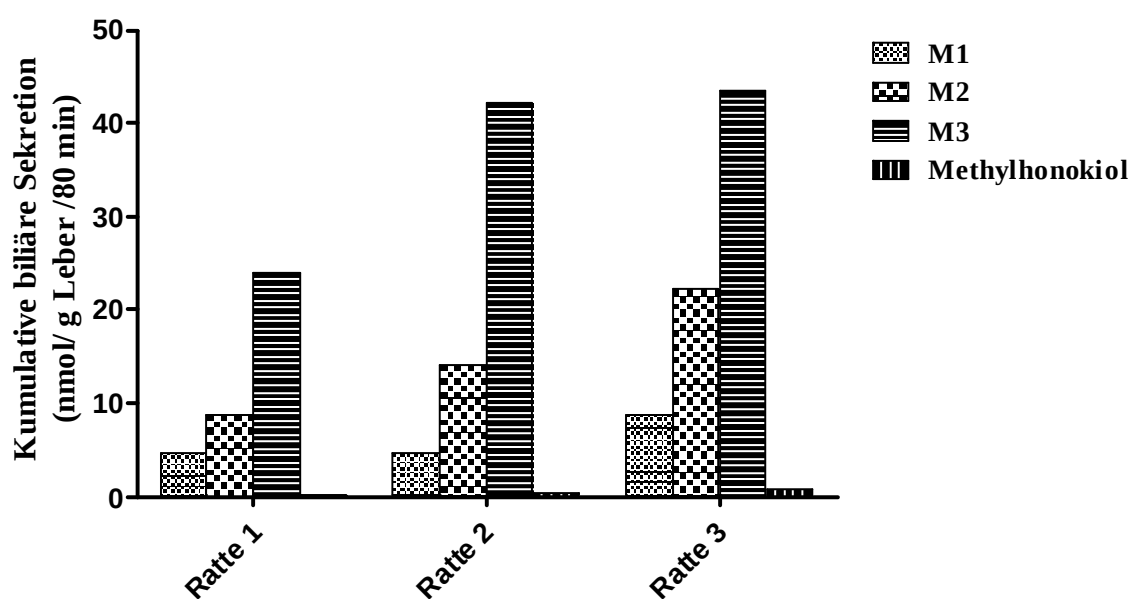


Abbildung 27: Kumulative biliäre Sekretion der Metabolite M1, M2, M3 und Methylhonokiol in der Galle von Sprague Dawley Ratten in einem Zeitintervall von 80 Minuten

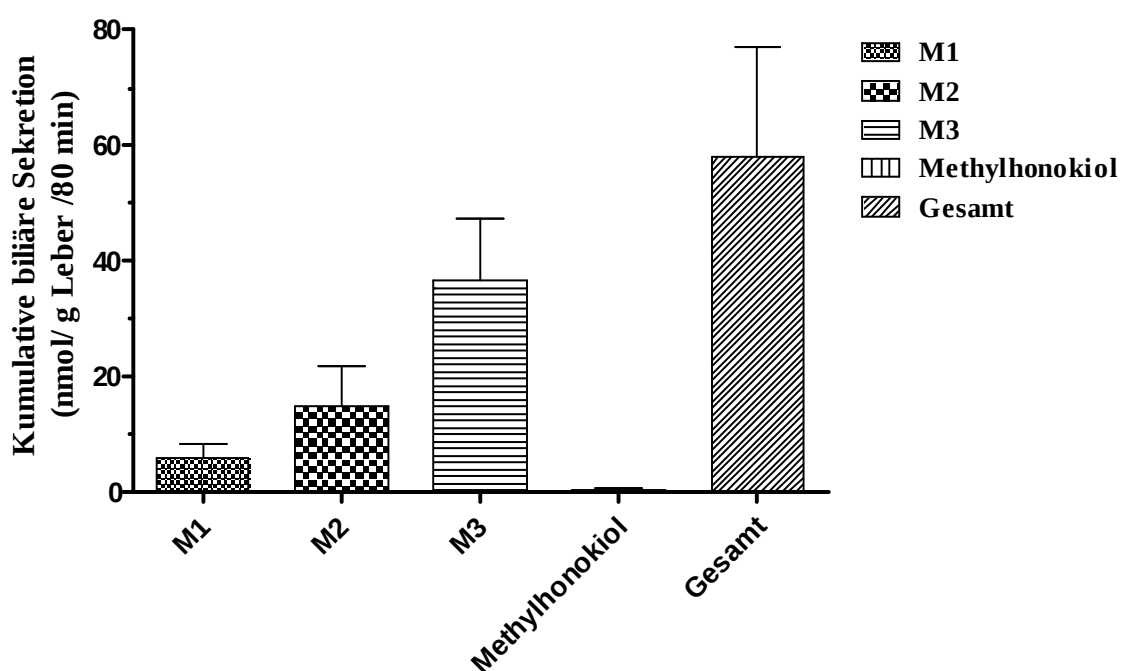


Abbildung 28: Gesamte kumulative biliäre Sekretion der Metabolite M1, M2, M3 und Methylhonokiol in der Galle von Sprague Dawley Ratten in einem Zeitintervall von 80 Minuten

Tabelle 15: Mittelwerte und Standardabweichungen der kumulativen biliären Sekretion in der Galle von Sprague Dawley Ratten ( $n=3$ ) in nmol/g Leber/80 Minuten

|    | MW    | $\pm$ | SD    |
|----|-------|-------|-------|
| M1 | 6,00  |       | 2,38  |
| M2 | 15,03 |       | 6,74  |
| M3 | 36,55 |       | 10,87 |

#### 4.3.5 Kumulative biliäre Sekretion von Methylhonokiol und deren Metabolite im Perfusat

Wie anhand der Abbildungen 29 und 30 ersichtlich ist, ist die Exkretion des Metaboliten M1 in allen 3 Versuchsratten ausschlaggebend. Bei der 1. Versuchsratte konnte sogar ein Wert von 20,0 nmol/g Leber/80min analysiert werden. Das unmetabolisierte Methylhonokiol zeigt eine Ausscheidung von annähernd 2,0%. M2 verzeichnet ebenso in der 1. Versuchsratte eine höhere Verstoffwechslung als bei den beiden Vergleichsratten.

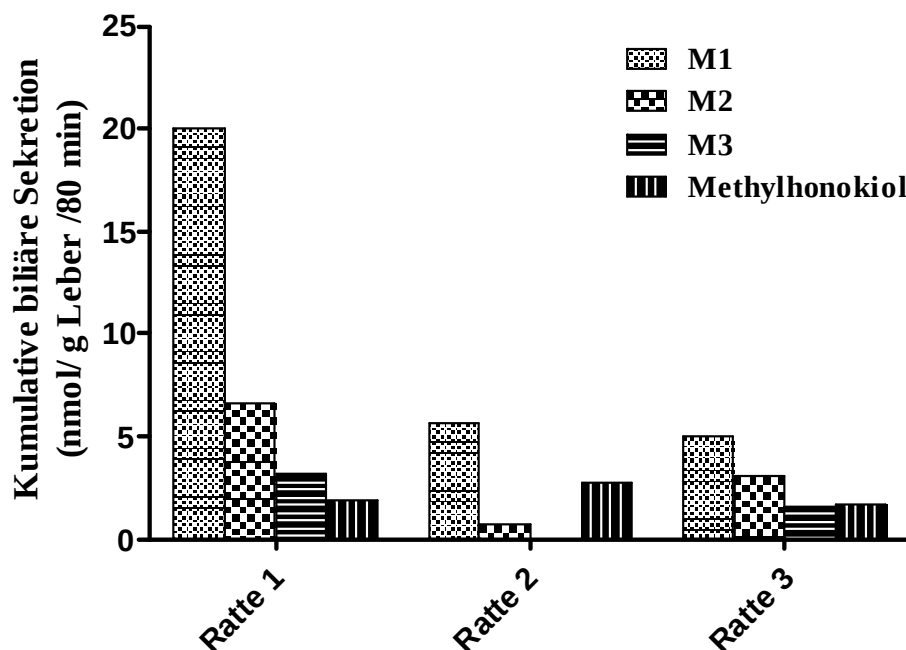


Abbildung 29: Kumulative biliäre Sekretion der Metabolite M1, M2, M3 und Methylhonokiol im Perfusat von Sprague Dawley Ratten in einem Zeitintervall von 80 Minuten

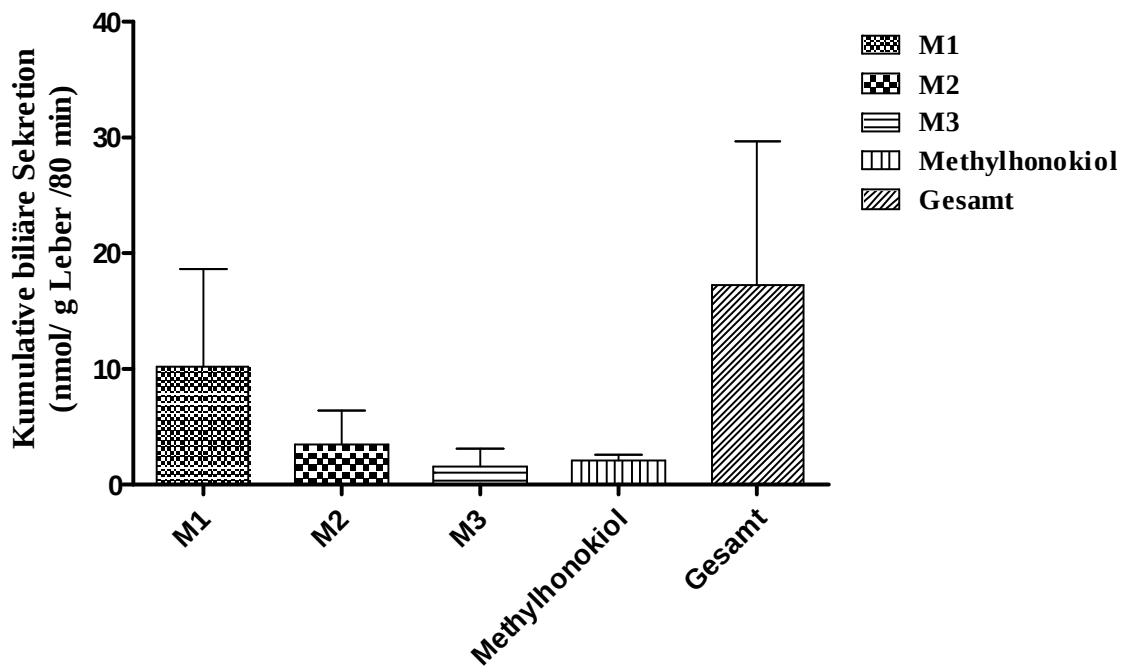


Abbildung 30: Gesamte kumulative biliäre Sekretion der Metabolite M1, M2, M3 und Methylhonokiol im Perfusat von Sprague Dawley Ratten

Tabelle 16: Mittelwert und Standardabweichungen der kumulativen biliären Sekretion im Perfusat von Sprague Dawley Ratten (n=3) in nmol/g Leber/80 Minuten

|    | MW    | ± | SD   |
|----|-------|---|------|
| M1 | 10,20 |   | 8,50 |
| M2 | 3,44  |   | 3,02 |
| M3 | 1,58  |   | 1,57 |

#### 4.4 Prozentuelle Verteilung der Metabolite in Galle und Perfusat von Sprague Dawley Ratten

Dieses Kapitel beschäftigt sich eingehender mit der prozentuellen Verteilung der einzelnen Metabolite bzw. aller Metabolite, die an der Gesamtsekretion in Galle und im Perfusat zu ermitteln sind. Die bei der HPLC-Analyse entstandenen Flächen wurden unter den Konzentration/Zeitkurven ( $\mu\text{g/ml}$ ) berechnet und graphisch dargestellt.

In Abbildung 31 sind die unterschiedlichen Anteile der Metabolite in der Galle und im Perfusat ersichtlich. Der Metabolit M3 mit einem prozentuellen Anteil von 0,92 % in der Galle erscheint als Hauptmetabolit, während sein Prozentsatz im Perfusat nur 0,12 % beträgt. Der Metabolit M1 hingegen zeigt im Perfusat einen Wert von 0,76 %, welcher in der Galle wesentlich kleiner (0,18 %) ist. Der Metabolit M2 befindet sich in der Galle sowie im Perfusat annähernd auf gleichem Niveau. Ebenso konnte auch das unmetabolisierte Methylhonokiol im Perfusat mit 0,07 % ermittelt werden.

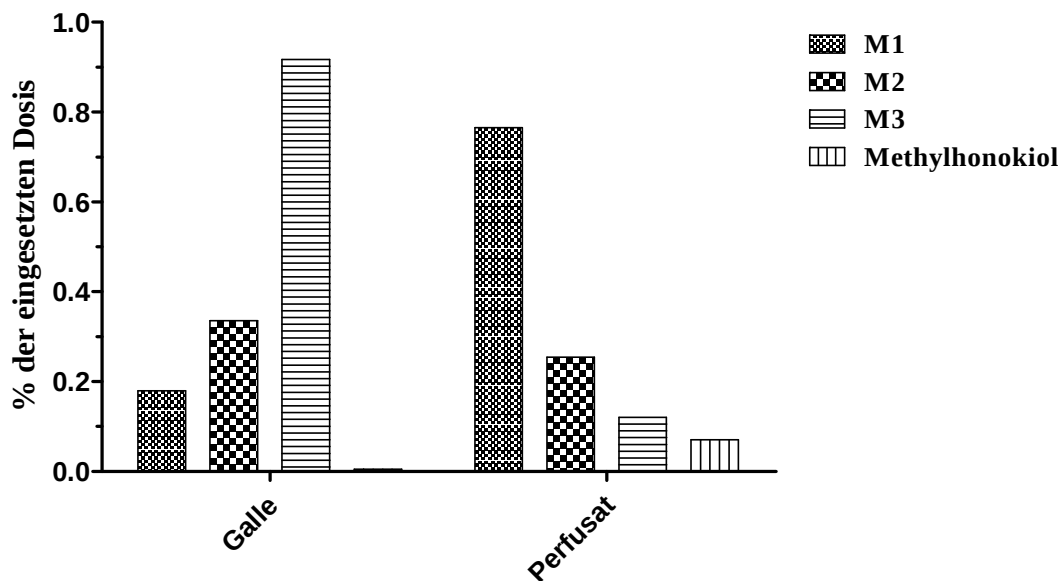


Abbildung 31: Prozentuelle Anteile der einzelnen Metabolite und von Methylhonokiol an der Sekretion in Galle und Perfusat bei der 1.Sprague Dawley Versuchsratte

Es ist deutlich zu erkennen, dass Metabolit M3 (Abbildung 32) mit 2,13 %, welcher in der Galle gefunden wurde, die höchste Ausscheidungsrate besitzt. Jedoch konnte diese im Perfusat nicht erfasst werden. Bei den Anteilen des Metaboliten M1 in der Galle und auch im Perfusat sind keine signifikanten Unterschiede zu vermerken. Weiters beträgt der Gehalt des Metaboliten M2 in der Galle 0,71 %, wohingegen im Perfusat ein kleinerer Teil von 0,03 aufzufinden war. Das unmetabolisierte Methylhonokiol mit 0,14 % im Perfusat wurde ebenfalls detektiert.

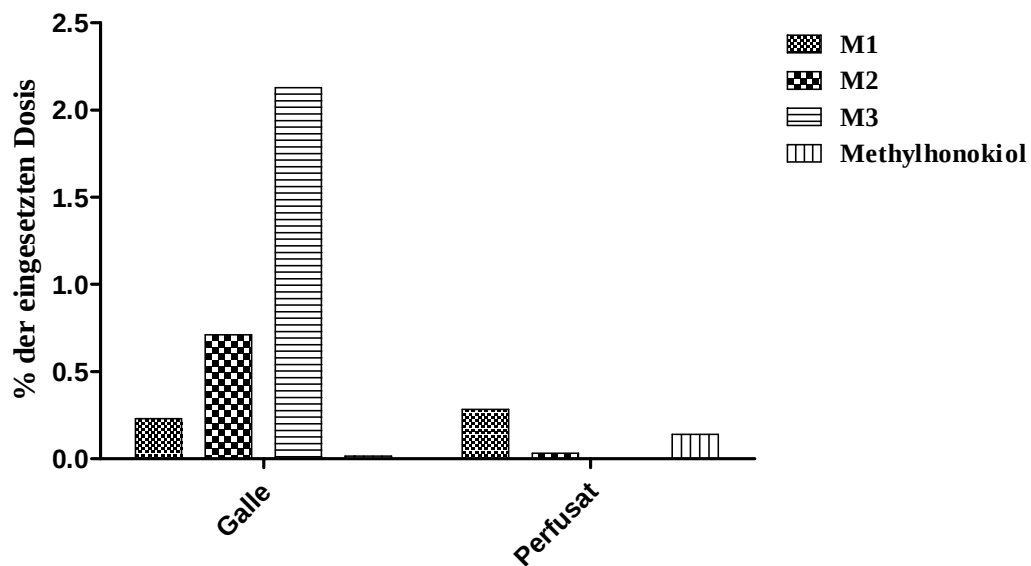


Abbildung 32: Prozentuelle Anteile der einzelnen Metabolite und von Methylhonokiol an der Sekretion in Galle und Perfusat bei der 2.Sprague Dawley Versuchsratte

Ähnlich zu den Abbildungen 31 und 32 wird auch in Abbildung 33 veranschaulicht, dass Metabolit M3 mit 1,46 % in der Galle wieder den größten Mengenanteil besitzt. Im Perfusat kann hingegen nur ein Wert von 0,05 % ermittelt werden. Metabolit M2 zeigt im Perfusat eine Ausscheidungsrate von 0,10 % und Metabolit M1 0,17 %. In der Galle ist zu erkennen, dass die Werte der beiden Metabolite im Vergleich zum Perfusat etwas höher liegen - bei Metabolit M1 0,30 % und bei Metabolit M2 0,75 %. Das unmetabolisierte Methylhonokiol wurde in der Galle mit einem Anteil von 0,024 % und im Perfusat mit 0,055 % analysiert.

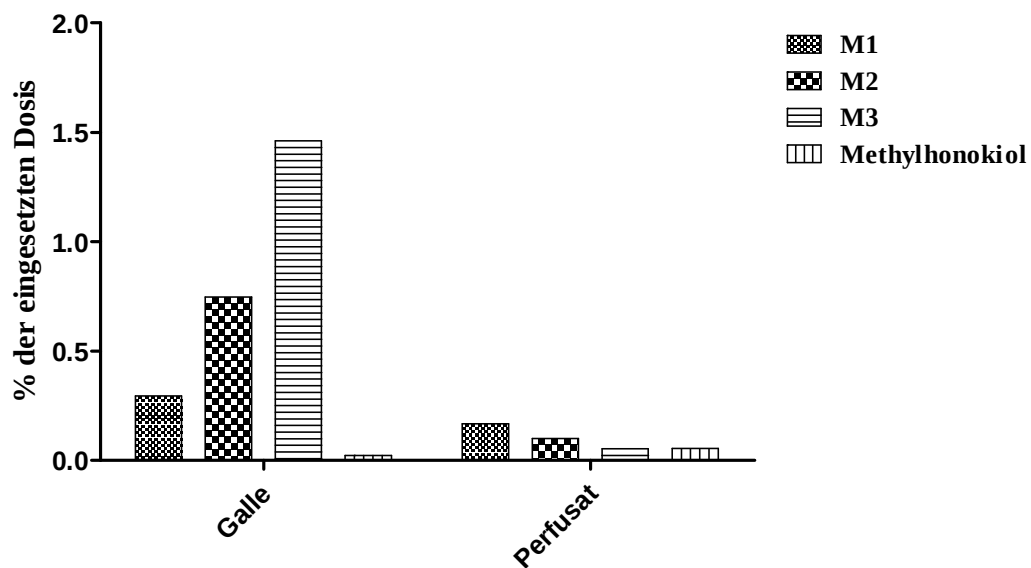


Abbildung 33: Prozentuelle Anteile der einzelnen Metabolite und von Methylhonokiol an der Sekretion in Galle und Perfusat bei der 3.Sprague Dawley Versuchsratte

Die Abbildung 34 soll die Mengenanteile der einzelnen Metabolite sowie von Methylhonokiol in der Galle und im Perfusat veranschaulichen, welche an der Gesamtsekretion beteiligt sind. Eindeutig kann festgestellt werden, daß eine vermehrte Ausscheidung über die Galle im Vergleich zum Perfusat stattgefunden hat.

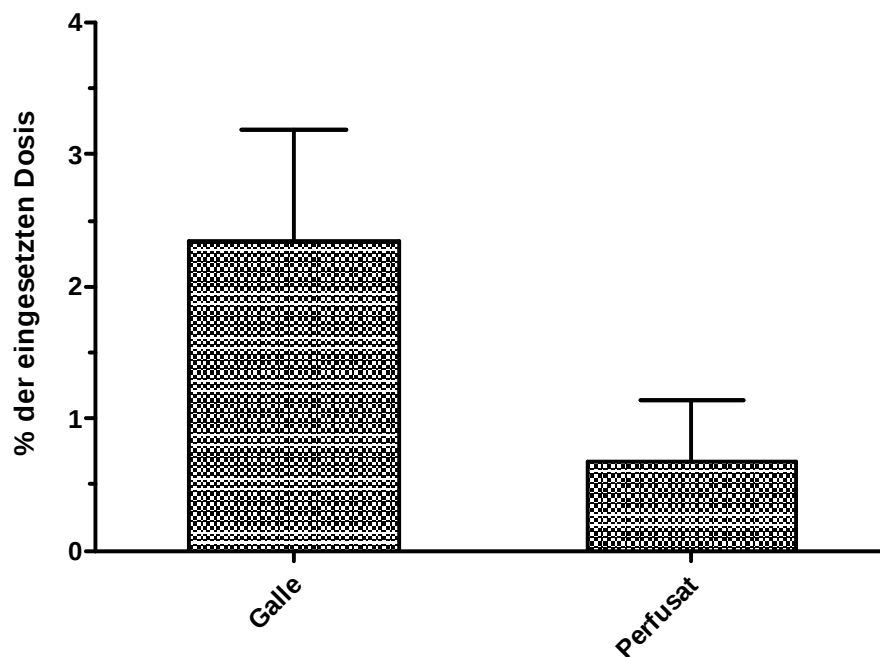


Abbildung 34: Prozentuelle Anteile der Metabolite sowie von Methylhonokiol an der Gesamtsekretion in Galle und Perfusat

## 5 Diskussion

Erstmalig wurde im Rahmen dieser Arbeit die Biotransformation von Methylhonokiol untersucht. Anhand des Modells der isoliert perfundierten Rattenleber konnten Galle und Perfusatproben entnommen und via HPLC Analysen die Biotransformationsprodukte ermittelt werden.

Wie aus Abbildung 35 entnommen werden kann, wurde der Großteil von Methylhonokiol zu drei relevanten Metaboliten verstoffwechselt, wobei zwei Biotransformationsprodukte einem modifizierten Methylhonokiol entsprechen, das einer weiteren Glucuronidierung bzw. einer Sulfatierung unterworfen wurde. Als 3. Metabolit konnte Methylhonokiol-Glucuronid nachgewiesen werden.

Einige Studien über Magnolol, einer strukturähnlichen Verbindung zu Methylhonokiol, belegen ebenso eine Glucuronidierung als Hauptmetabolisierungsweg in der Leber. Tsai und Mitarbeiter verabreichten einer Gruppe von männlichen Sprague Dawley Ratten peroral 20 mg/kg Magnolol. Schließlich wurden mit Hilfe von Punktionen Plasmafraktionen gesammelt und diese einer HPLC-Analyse unterworfen. Nach anschließender Behandlung mit  $\beta$ -Glucuronidase führte dies zu einer Erhöhung der erhaltenen Peakfläche, das eine Abspaltung von Glucuroniden nahelegt.<sup>27</sup> Eine Glucuronidierung von Magnolol konnten auch Hattori und Mitarbeiter nachweisen. Nach peroraler Verabreichung von [<sup>14</sup>C]-Magnolol konnte in der Galle von Ratten als Hauptmetabolit Magnolol-2-O-glucuronid nachgewiesen werden.<sup>26</sup>

In einem weiteren Versuch die Biotransformationsprodukte Magnolol näher zu erforschen bereiteten Nakazawa und Mitarbeiter ein Dekokt der Rinde von *Magnolia officinalis*. Nach dessen oraler Verabreichung an Ratten und einer männlichen Versuchsperson konnten in den jeweiligen Harnfraktionen zwar keine Glucuronide bzw. Sulfate sondern Dihydroxydihydromagnolol und dessen Oxidationsprodukt Randainsäure ((3-[2,6-dihydroxy-5'(2-

---

<sup>27</sup> Vgl. Tsai et al., 1995, S. 491ff.

<sup>26</sup> Vgl. Hattori et al., 1986, S. 5010ff.

propenyl)[1,1'-biphenyl]-3-yl)-(E)-2,propensäure) identifiziert werden.<sup>28</sup> Als Grund für das Nichtauffinden von Glucuroniden und Sulfaten kann die Vorbehandlung der jeweiligen Harnfraktionen mit  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase angesehen werden, das somit ein Auffinden konjugierter Metaboliten ausschließt.

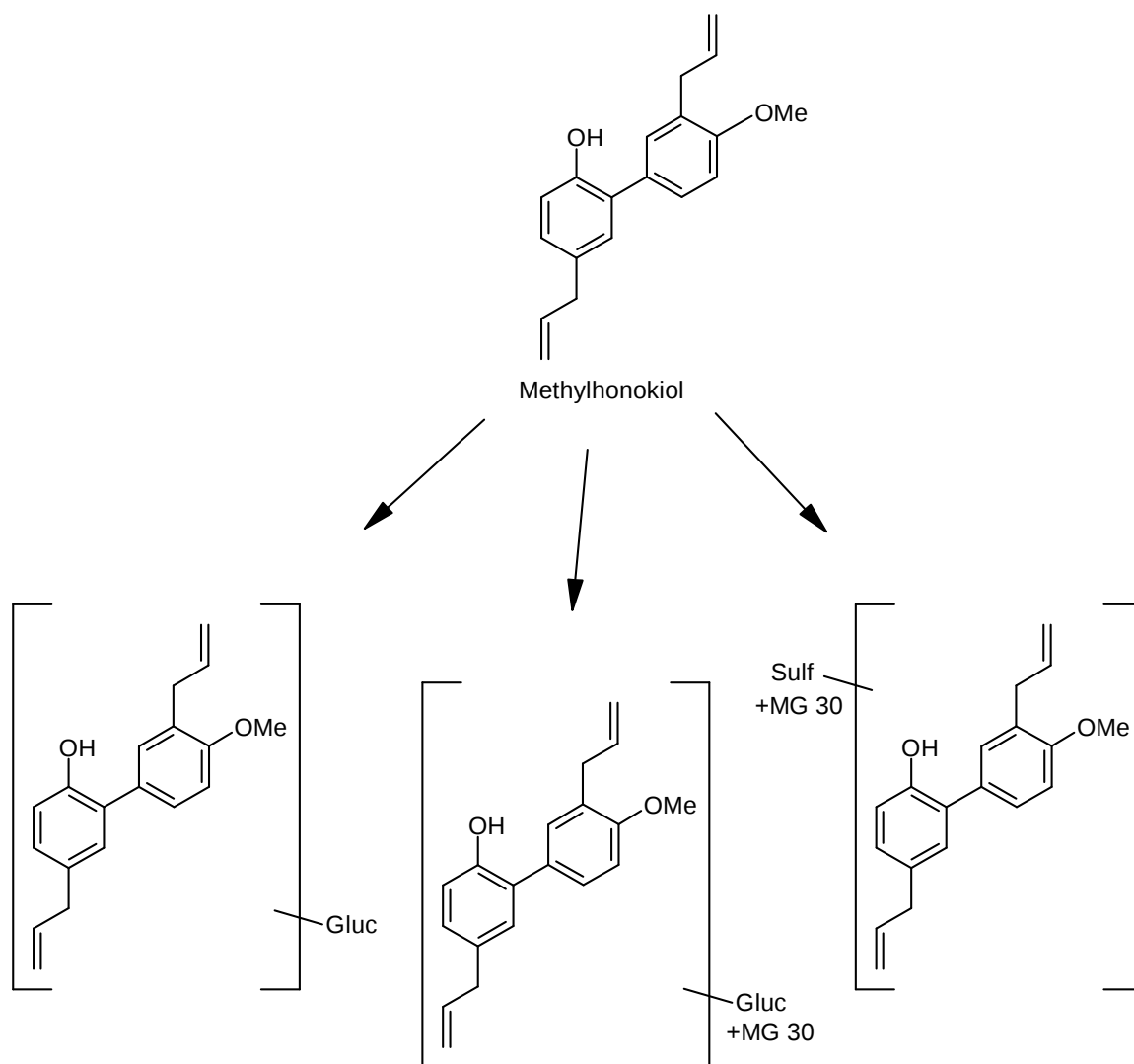


Abbildung 35: Metabolisierungsweg von Methylhonokiol

In einem Tierversuch konnte auch eine Isomerisierung von Magnolol gezeigt werden. Interessanterweise wird Magnolol hierbei zu Isomagnolol und in weiterer Folge zu Dihydro-

<sup>28</sup> Vgl. Nakazawa et al., 2003, S. 1583ff.

verbindungen und Tetrahydromagnolol umgewandelt.<sup>25</sup> Ob Methylhonokiol auf enzymatischem Wege ebenfalls isomere Formen bzw. Dihydro- und Tetrahydroverbindungen bildet kann derzeit nicht gesagt werden. In alle Galle und Perfusatproben konnten wir jedoch neben den bereits erwähnten drei Hauptmetaboliten auch noch weitere kleine Biotransformationsprodukte nachweisen, deren Struktur aufgrund der geringen Konzentration nicht zugeordnet werden konnte.

Daten über die Metabolite von Methylhonokiol belegen eine hohe Ausscheidungsrate über die Galle. Methylhonokiol unterliegt somit einer starken Biotransformation und weist eine geringe Bioverfügbarkeit auf. Dieses Ergebnis deutet auf die Besonderheit eines high E Drugs hin. Methylhonokiol dürfte daher nicht mit dem Enzymsystem Cytochrom P450 konkurrieren. Diese Eigenschaft wird als besonders wichtig erachtet, da 90% der im Handel befindlichen Arzneistoffe über diese Enzyme abgebaut werden.

Analog zu unseren Versuchen in der isolierten perfundierten Rattenleber, wo Methylhonokiolmetabolite bevorzugt über die Galle ausgeschieden werden, beschrieben auch Hattori und Mitarbeiter in Ratten für die Biotransformationsprodukte von Magnolol eine bevorzugte biliäre Elimination. In den Fäzes konnten daher bis zu 53% der verabreichten Magnololdosis gefunden werden.<sup>39</sup>

Neben der Leber dürfte auch eine Verstoffwechselung von Methylhonokiol über den Darm eine große Rolle spielen. Weiters dürften Glucuronide und Sulfate nach biliärer Exkretion im Darm durch  $\beta$ -Glucuronidase und Sulfatase, wieder reorbiert und somit einen enterohepatischen Kreislauf durchlaufen.

Bis dato konnte noch nicht aufgeklärt werden ob die Metabolite von Methylhonokiol eine pharmakologische Wirkung zeigen bzw. ob sie stärker wirksam sind als die native Verbindung. Aktive Metabolite sind von zahlreichen Arzneistoffen bekannt. So zeigt Morphin-3,6-Glucuronid eine viel höhere Aktivität als Morphin und erst durch den Einfluß von Sulfotransferasen kann aus unwirksamen Minoxidil der wirksame Metabolit Minoxidil-Sulfat gebildet werden. Glucuronide und Sulfate von Methylhonokiol könnten im Blut auch durch

---

<sup>25</sup> Vgl. Hattori et al., 1984, S. 5010ff.

$\beta$ -Glucuronidase und Sulfatasen wieder in die native Verbindung gespalten werden und so leichter die Blut-Hirn Schranke durchdringen.

Für eine pharmakologische Aktivität der Metabolite spricht die Untersuchung von Maruyama und Mitarbeiter im Falle Honokiols, welche eine anxiolytische Wirkung im Tierversuch bei einer Dosierung von 0.2 mg/kg aufzeigt. Die Substanz verursacht im Gegensatz zu Diazepam keine Muskelrelaxation, Müdigkeit oder motorischen Dysfunktion.<sup>19</sup>

---

<sup>19</sup> Vgl. Maruyama et al., 1999, S. 97ff.

## 6 Zusammenfassung

Seit über 2000 Jahren beschäftigt sich die Traditionell Chinesische Medizin mit der Heilkunde von Magnolia Arten. Auch die Indianerstämme Louisianas bedienten sich von deren heilenden Wirksamkeit.

Mittels dieser Arbeit sollte nun die Substanz Methylhonokiol, welche zu den Inhaltsstoffen der Magnolia grandiflora zu zählen ist, eingehender untersucht werden. Das Hauptaugenmerk wurde hierbei auf deren Verstoffwechselung in der Leber und Galle von Versuchsratten gelegt.

Es stellte sich die Frage wie sich diese Substanz in der Leber verändert. Um dies näher zu ergründen, wurde Methylhonokiol anhand der isoliert, perfundierten Rattenleber, ohne Einfluss von Organen und Gewebe untersucht. Die Leber wurde aus Sprague Dawley Ratten entnommen und mit einer 10  $\mu$ molären Methylhonokiollösung perfundiert. Anschließend wurden Galle- sowie Perfusatproben in 5 Minutenintervallen gesammelt und diese einer HPLC- Analyse unterworfen. In den Leber- und Galleproben wurden neben Methylhonokiol auch 3 Hauptmetabolite gefunden. Die Strukturen konnten einigermaßen über Massenspektrometrie und enzymatische Hydrolyse aufgeklärt werden. Die MS Auswertung verdeutlichte die Glucuronidierung von Methylhonokiol, sowie die Entstehung einer Sulfatspezies. Zusätzlich wurden die Gallenproben mit  $\beta$ -Glucuronidase versetzt, was eine Reduktion der Peakflächen zur Folge hatte. Nach dem Zusatz von Sulfatase konnte keine Verminderung entdeckt werden, was jedoch durch die bekanntlich schwierige Abspaltung als nicht außergewöhnlich zu bezeichnen wäre.

Schließlich konnte aufgezeigt werden, dass Methylhonokiol größtenteils metabolisiert wird und deren Hauptausscheidungsweg über die Galle erfolgt. Nur ein verschwindend kleiner Prozentsatz von Methylhonokiol war in der Galle und in der Leber aufzufinden.

## 7 Literaturverzeichnis

- 1 Schühly W, Khan I, Fischer N, The Ethnomedicinal Uses of Magnoliaceae from the Southeastern United States as Leads in Drug Discovery. *Pharmaceutical Biology*, **2001**; 39: 63-69
  
- 2 Brockhaus, Enzyklopädie, 19. Auflage, 14. Band, F.A. Brockhaus, Mannheim; **1991**, p 40
  
- 3 Abbildung entnommen aus: URL: [www.greenlife-herbal.com/database/houpo.htm](http://www.greenlife-herbal.com/database/houpo.htm)
  
- 4 Maruyama Y, Kuribara H, Overview of the Pharmacological Features of Honokiol. *CNS Drug Review*; **2000**, 6:35-44
  
- 5 Paulus E, Ding Yu-he, Handbuch der traditionellen chinesischen Heilpflanzen, Haug Verlag, Heidelberg; **1987**, p 243-244
  
- 6 Brickell Ch, Barthlott W, Die große Pflanzenenzyklopädie, Dorling Kindersley Verlag GmbH, Starnberg; **2004**, p 661
  
- 7 Danert S, Fukarek F, Hanelt P, Helm J, Kruse J, Lehmann Ch, Schultze-Motel J, *Urania Pflanzenreich Höhere Pflanzen I*, Urania- Verlag, Leipzig/Jena/Berlin; **1971**, p 303
  
- 8 Andrew Chevallier, Das große Lexikon der Heilpflanzen, Dorling Kindersley Verlag GmbH, München/Starnberg; **2001** , p 231

- 9 Fischer N, Qi Song, Biologically Active Lignans and Neolignans from Magnolia Species. *Revista de la Sociedad de México*; **1999**, 43: 211-218
- 10 Maruyama Y, Kuribara H, Overview of the Pharmacological Features of Honokiol. *CNS Drug Review*; **2000**, 6: 35-44
- 11 Blaschek W, Hänsel R, Holzgrabe U, Keller K, Reichling J, Rimpler H, Schneider G, Hagers Handbuch der Pharmazeutischen Praxis 5., **1992**, 3.Auflage, p 156
- 12 Rao KV, Davis TL, Constituents of Magnolia grandiflora, Cyclocolorenone. *Planta Medica*; **1982**, 44: 249-50
- 13 Maruyama Y, Kuribara H, Overview of the Pharmacological Features of Honokiol. *CNS Drug Review*; **2000**, 6: 40-41
- 14 Lin YR, Chen HH, Ko CH, Chan MH, Neuroprotective activity of honokiol and magnolol in cerebellar granule cell damage. *European Journal of Pharmacology*, **2006**, 537(1-3): 64-69
- 15 Kuo-Tong L, Su-Man L, Shinag-Suo H, Chun-Lien Ch, Shen-Kou T, Honokiol Ameliorate. *Planta Medica*; **2003**, 69: 130-134
- 16 Lee J, Jung E, Lee J, Jung E, Park J, Jung K, Lee S, Hong S, Park J, Park E, Kim J, Park S, Park D, Anti-inflammatory effects of magnolol and honokiol are mediated through inhibition of the downstream pathway of MEKK-1 in NF-kappaB activation signalling. *Planta Medica*; **2005**, 71: 338-43.

- 17 Chen F, Wang T, Wu YF, Gu Y, Xu XL, Zheng S, Hu X, Honokiol: a potent chemotherapy candidate for human colorectal carcinoma. *World Journal of Gastroenterology*; **2004**; 10: 3459-63
- 18 Kuribara H, Stavinocha W, Maruyama Y, Honokiol, a putative anxiolytic agent extracted from *Magnolia* bark, has no Diazepam-like side effects in mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; **1999**, 51: 97-103
- 19 Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M, Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH Stuttgart; **2001**, 8. Auflage, p 19
- 20 Nielsen M, Wang X, Ai J, Honokiol and Magnolol selectively interact with GABA<sub>A</sub> Receptor Subtypes in vitro. *Pharmacology*; **2001**; 63: 34-41
- 21 Kuribara H, Kishi E, Kimura M, Weitraub S, Maruyama Y, Comparative assessment of anxiolytic-like activities of honokiol and derivatives. *Pharmacology and Behavior*; **2000**, 67: 597-601
- 22 Irie T, Miyamoto E, Kitagawa K, Maruyama Y, Inoue K, Inagaki C, An anxiolytic agent, dihydrohonokiol-B, inhibits ammonia-induced increases in the intracellular Cl<sup>-</sup> of cultured rat hippocampal neurons via GABA<sub>C</sub> receptors. *Neuroscience Letters*; **2001**, 312: 121-123
- 23 Maruyama Y, Kuribara H, Kishi E, Weintraub S, Ito Y, Confirmation of the anxiolytic-like effects of dihydrohonokiol following behavioural and biochemical assessments. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*; **2001**, 53: 721-725

- 24 Hattori M, Sakamoto T, Endo Y, Kakiuchi N, Kobashi K, Mizuno T, Namba T, Metabolism of Magnolol from Magnolia Cortex. I. Chemical and Pharmaceutical Bulletin; **1984**, 32: 5010-5017
- 25 Hattori M, Endo Y, Takebe S, Kobashi K, Noboru F, Namba T, Metabolism of Magnolol from Magnolia Cortex. II. Chemical and Pharmaceutical Bulletin; **1986**, 34: 158-167
- 26 Tsai TH, Chou CJ, Chen CF, Glucuronidation of magnolol assessed using HPLC/fluorescence. Planta Medica; **1995**, 61: 491-492.
- 27 Nakazawa T, Yasuda T, Ohsawa K, Metabolites of orally administered Magnolia officinalis extracts in rats and man and its antidepressant-like effects in mice. Journal of Pharmacy and Pharmacology; **2003**, 55: 1583-1591
- 28 H.P.T. Ammon, Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch, 9. Auflage, de Gruyter Verlag, Berlin, New York, **2004**, p 974
- 29 Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M, Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH Stuttgart, **2001**, 8. Auflage, p 21
- 30 Forth W, Henschler D, Rummel W, Allg. und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Urban & Fischer Verlag, **2004**, p 48
- 31 Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M, Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH Stuttgart, **2001**, 8. Auflage, p 28-29

- 32 Forth W, Henschler D, Rummel W, Allg. und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Urban & Fischer Verlag, **2004**, p 53
- 33 Forth W, Henschler D, Rummel W, Allg. und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, Urban & Fischer Verlag, **2004**, p 55
- 34 Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M, Mutschler Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH Stuttgart, **2001**, 8. Auflage, p 29-30

## 8 Lebenslauf

Name: Romana Bruckmüller

Geburtsdatum: 11. 10. 1981

Geburtsort: Gmünd (NÖ)

Staatsbürgerschaft: Österreich

### Ausbildung:

1988 – 1992 Volksschule Gmünd

1992 – 2000 Bundesrealgymnasium Gmünd

Juni 2000 Matura

seit Oktober 2000 Studium der Pharmazie an der Universität  
Wien