

**Untersuchungen zum Einfluß exogener und
endogener Faktoren auf den Pilocarpingehalt von
Pilocarpus microphyllus Stapf ex Wardleworth
unter natürlichen Bedingungen**

Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Jochen Scheerer

aus
Dillenburg

Würzburg 2001

Eingereicht am:
Bei der Fakultät für Pharmazeutische Biologie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:
der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich ehrenwörtlich, daß ich die Dissertation „Untersuchungen zum Einfluß exogener und endogener Faktoren auf den Pilocarpingehalt von *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth unter natürlichen Bedingungen“ selbstständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittelbenutzt habe.

Ich erkläre außerdem, daß diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher außer den mit dem Zulassungsbescheid urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Girona, den

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von März 1996 bis April 2000
in den Einrichtungen der Firma PVP in Parnaíba, Piauí, Brasilien
unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Franz-C. Czygan angefertigt.

Thema und Ergebnisse dieser Dissertation waren bereits Gegenstand von zwei Vorträgen und zwei Publikationen:

Scheerer J, Vieira IGP, Jacob G: Extraction and Analysis of the Natural Active Ingredient Pilocarpin. *BIOforum international*. 1997;1: 38 – 41.

Scheerer J: Fatores que Influenciam a Biosíntese de Alcalóide, Pilocarpina, no Jaborandi. Curso de Licenciatura Plena em Biologia ,25.11.99, Universidade Estadual do Piauí, Brasilien.

Scheerer J: Jaborandi- *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth. *Zeitschrift für Phytotherapie*, 2000; 21: 220-230.

Scheerer J: Portrait und Untersuchungen zur Physiologie von *Pilocarpus microphyllus* Stapf. Pharmazeutisch-Biologisches Seminar, 02.11.2000, Lehrstuhl für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg.

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungen	V
1 Einleitung	1
1.1 Allgemeines	1
1.2 Zielsetzung dieser Dissertation	11
1.3 Grundsätzliche Überlegungen	12
2 Material und Methoden	15
2.1 Versuchspflanze	15
2.1.1 Botanische Beschreibung.....	15
2.1.2 Pflanzenmaterial für die Analysen.....	17
2.1.3 Standort der Versuchspflanzen.....	17
2.1.4 Klima.....	18
2.2 Bodenanalysen	18
2.3 Keimanlagen	19
2.4 Stecklingsversuche	19
2.4.1 Variante A.....	20
2.4.2 Variante B.....	20
2.4.3 Variante C.....	20
2.5 Trocknung	21
2.5.1 Ermittlung der Trocknungsbedingungen.....	21
2.6 Extraktion	21
2.7 Festphasenextraktion	22
2.7.1 Methode der Festphasenextraktion.....	22
2.7.2 Lösungen für die Festphasenextraktion.....	23
2.7.3 Validierung der Methode.....	23
2.7.3.1 Qualitative Validierung.....	23
2.7.3.2 Quantitative Validierung.....	23
2.8 HPLC	24
2.8.1 Geräte.....	24
2.8.2 Analysebedingungen.....	24
2.8.3 Mobile Phase.....	24

2.8.4 Standard.....	24
2.8.4.1 Standardlösung.....	25
2.8.5 Berechnung der Pilocarpingehalte.....	25
2.8.6 Validierung der Methode.....	26
2.8.6.1 Quantitative Validierung.....	26
2.8.6.2 Qualitative Validierung.....	26
2.9 Langzeituntersuchungen.....	26
2.10 Düngung.....	27
2.11 Trocknungsversuche.....	28
2.11.1 Trocknungsvarianten.....	28
2.11.2 Analyse.....	29
2.12 Degradationsanalysen.....	29
2.13 pH-Wert Messungen.....	30
2.14 Analyse frischer Blätter.....	30
2.15 Analyse verschiedener Pflanzenteile.....	30
2.16 Analyse Blutungssaft.....	31
2.17 Chemikalien.....	31
3. Ergebnisse.....	32
3.1 Allgemeine Beobachtungen.....	32
3.1.1 Wachstum und Entwicklung.....	32
3.1.2 Blätter.....	33
3.1.3 Blüten und Früchte.....	35
3.1.4 Wurzel.....	36
3.2 Bodenanalysen.....	36
3.3 Keimanlagen.....	38
3.4 Versuche zur Stecklingsvermehrung.....	39
3.4.1 Stecklingsversuch A.....	39
3.4.2 Stecklingsversuch B.....	39
3.4.3 Stecklingsversuch C.....	40
3.5 Ermittlung der Trocknungsbedingungen.....	40
3.5.1 Untersuchung A.....	40
3.5.2 Untersuchung B.....	41

3.5.3 Untersuchung C.....	42
3.6 Validierung der Fetsphasenextraktion.....	43
3.6.1 Qualitative Validierung.....	43
3.6.1.1 Vergleich der Retentionszeiten in Chromatogrammen des Pilocarpinstandards und von Blattextrakten.....	43
3.6.1.2 Einfluß der Festphasenextraktion auf Pilocarpin.....	44
3.6.2 Quantitative Validierung.....	44
3.6.2.1 Wiederholbarkeit der Festphasenextraktion.....	44
3.6.2.2 Verlust von Pilocarpin während der Elution der Interferenzen.....	45
3.6.2.3 Wiederfindungsrate in Proben bekannter Konzentration.....	45
3.6.2.4 Wiederfindungsrate in gespicktem Extrakt.....	47
3.7 Validierung der HPLC-Methode.....	47
3.7.1 Qualitative Validierung.....	47
3.7.2 Quantitative Validierung.....	49
3.8 Einfluß des vegetativen Zustandes auf den Pilocarpingehalt.....	50
3.9 Untersuchungen zum Einfluß des Blattalters auf den Pilocarpingehalt.....	54
3.10 Untersuchungen von Pflanzen gleicher Abstammung.....	57
3.10.1 Stammpflanze 1864417.....	57
3.10.2 Stammpflanze 1864327.....	58
3.11 Untersuchungen zum Einfluß der Jahreszeit auf den Pilocarpingehalt.....	58
3.12 Untersuchungen zum Einfluß der Lichtverhältnisse auf den Pilocarpingehalt.....	63
3.13 Düngungsversuch.....	65
3.14 Pilocarpingehalte verschiedener Pflanzenteile.....	66
3.14.1 Pilocarpingehalte verschiedener Pflanzenteile der selben Pflanze.....	67
3.14.2 Pilocarpingehalte in Wurzelproben verschiedener Proben.....	68
3.15 Trocknungsversuche.....	69
3.16 Degradationsanalysen.....	70
3. 17 ph-Wert Bestimmung von wässrigen Blattextrakten.....	72
3.18 Analyse frischer Blätter.....	73

3.19 Chromatogrammuster.....	73
4 Diskussion.....	81
4.1 Allgemeine Beobachtungen.....	81
4.2 Bodenanalysen.....	83
4.3 Keimanlagen.....	84
4.4 Stecklingsvermehrung.....	85
4.5 Probentrocknung.....	85
4.6 Festphasenextraktion.....	86
4.7 HPLC-Analysen.....	88
4.8 Einfluß des vegetativen Zustandes auf den Pilocarpingehalt.....	90
4.9 Untersuchungen zum Einfluß des Blattalters auf den Pilocarpingehalt.....	91
4.10 Pflanzen gleicher Abstammung.....	93
4.11 Untersuchungen zum Einfluß der Jahreszeit auf den Pilocarpingehalt.....	94
4.12 Untersuchungen zum Einfluß der Lichtverhältnisse auf den Pilocarpingehalt.....	96
4.13 Düngungsversuch.....	98
4.14 Pilocarpingehalte verschiedener Pflanzenteile.....	99
4.15 Trocknungsversuche.....	101
4.16 Degradationsanalysen.....	102
4.17 ph-Wert Bestimmung von wässrigen Blattextrakten.....	103
4.18 Analyse frischer Blätter.....	104
4.19 Chromatogrammuster.....	105
5 Zusammenfassung.....	107
6 Summary.....	111
7 Literatur.....	115
Anhang.....	119
Danke	
Lebenslauf	

Abkürzungen und Symbole

HPLC	High Performance Liquid Chromatography
μ	Mikro; 10^{-6}
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
Cmol_c	Centimol; 10^{-2}
g	Gramm
K	Kilo; 10^3
l	Liter
m	Mili-, 10^{-3}
M	Molar; mol/l
min	Minute
nm	Nanometer; 10^{-9} Meter
pH	Dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
UV	Ultraviolett

1 EINLEITUNG

1.1 Allgemeines

Pilocarpus microphyllus Stapf ex Wardleworth gehört zur Familie der Rutaceae und stellt heute die wichtigste Quelle des Alkaloides Pilocarpin dar. Es handelt sich um eine alte Arzneipflanze, deren Anwendung in der europäischen Medizin bis ins Ende des neunzehnten Jahrhunderts zurückreicht. In dieser Zeit wurde die Pflanze, beziehungsweise deren Blätter, unter der Bezeichnung "Jaborandi" von Südamerika nach Europa eingeführt.

Mit dem indianischen Wort "Jaborandi" werden bis heute verschiedene Pflanzen der Gattung *Pilocarpus* Vahl bezeichnet. Die Gattung, deren Verbreitungsgebiet sich zwischen Mexiko und Argentinien erstreckt, umfaßt je nach dem systematischen Art-Verständnis der Erstbeschreiber 13 bis 20 Arten. Zu den besonders auffälligen Gattungsmerkmalen der ansonsten eher unscheinbaren kleinen Bäume oder Sträucher gehören die kleinen, grünlichen Blüten, die an end- oder achselständigen Ähren oder Trauben wachsen. Ebenfalls charakteristisch für die Gattung sind die muschelförmigen Teilfrüchte, die schwarze, nierenförmige Samen enthalten.

Im Volksmund wurden, und werden teilweise noch immer, neben *Pilocarpus* auch Pflanzen aus den Familien der Piperaceae und Escrophulariaceae als "Jaborandi" bezeichnet. Erschwerend kommt noch hinzu, daß oftmals verschiedene *Pilocarpus*-Spezies mit dem gleichen Namen bezeichnet werden. Eine gewisse Verwirrung, die im Zusammenhang mit der Verwendung dieser Art-Benennung in der wissenschaftlicher Literatur festgestellt werden kann, ist daher nicht verwunderlich. Der Begriff "Jaborandi" stammt aus der Tupi-Sprache, die von den Indianern im Osten Brasiliens gesprochen wird, und bedeutet in einer weitreichend akzeptierten Übersetzung soviel wie "was verursacht Speichel(fluß)" oder "was produziert Speichel"(18).

Zu den ersten wissenschaftlichen Erwähnungen von "Jaborandi" gehören die Angaben von Souarez de Souza aus dem Jahre 1587. Der Portugiese kam 1570 nach Brasilien und machte während seines siebzehnjährigen Aufenthaltes viele Aufzeichnungen seiner Beobachtungen. Es sollten allerdings über zweihundert Jahre vergehen, ehe diese 1825 von der königlichen Akademie der Wissenschaften in Lissabon veröffentlicht wurden (18).

Im Jahre 1648 wird "Jaborandi" in der *Historia naturalis Brasiliae* erwähnt. Das Werk, herausgegeben von dem Holländer Willem Piso und dem Deutschen Georg Markgraf, war lange eines der Standardwerke für die Tropenmedizin. Beide Wissenschaftler nahmen an der ersten europäischen wissenschaftlichen Expedition nach Brasilien teil, welche zwischen 1638 und 1644 im Rahmen der holländischen Okupation im Nordosten des Landes erfolgte (18, 46). Die Arbeiten von Piso und Markgraf enthalten, neben Berichten über Anwendungen und Wirkungen von "Jaborandi", verschiedene Beschreibungen und Zeichnungen von Pflanzen, die alle als "Jaborandi" bezeichnet werden, deren Habitus jedoch neben *Pilocarpus*- Arten auch denen von Piperaceae entspricht (18).

Während die Einführung von "Jaborandi" nach Europa und in die europäische Medizin auf die Zeit um 1873/ 74 datiert und einem gewissen Dr. Coutinho zugeschrieben wird (18, 43), gibt es Berichte von 1847 über ein blühendes *Pilocarpus*-Exemplar in den Gewächshäusern des Herzogs von Croy in Dülmen. Etwas später soll diese Pflanze nach Gent gelangt sein, wo sie von Lemaire den Namen *Pilocarpus pennatifolius* erhielt (46). Bezüglich des Datums, der Einführung sowie des Namens von Dr. Coutinho und seiner Tätigkeit finden sich recht verschiedene Angaben (9, 18, 43, 46).

Bald nach der Einführung durch Dr. Coutinho wurde die Droge Jaborandi, bestehend aus den Blättern der Pflanzen, zur Behandlung einer Vielzahl von Krankheiten eingesetzt: So zum Beispiel bei Fieber, Bronchitis, Grippe, Lungenentzündung, Laryngitis, Magen- und Darmentzündung, Wassersucht, Nierenerkrankungen, Hydropericard, Psoriasis, Vergiftungen und Neurosen (5, 11). Als besonders herausragende Eigenschaften von Jaborandi wurden die schweißtreibende Wirkung (die Sekretion von drei Litern ist nicht ungewöhnlich (5)) und die starke Anregung der Speichelsekretion, auf die ja schon der indianische Name hinweist, genannt.

Im Gegensatz zu der breiten Anwendung in Europa macht Holmstedt (18) darauf aufmerksam, daß es vergleichsweise wenige Berichte über die Verwendung von "Jaborandi" in der indianischen Medizin gibt. So finden sich in der ethnobotanischen Literatur nur einige Angaben, wonach die Droge bei Vergiftungen und zur Wundheilung angewandt wurde. In seinem Werk *Dicionário das Planta úteis do Brasil* erwähnt Pio Correia, daß die

schweißtreibende Wirkung der Jaborandiblätter von Jägern genutzt wurde, um das olphatische System ihrer Hunde zu reinigen und somit deren Spürsinn zu schärfen (9).

Zwei Jahre nachdem die Droge nach Frankreich gelangt war, isolierten Hardy und Gerrard, unabhängig voneinander, ein Alkaloid aus den Blättern, welches Pilocarpin genannt wurde (5). Es sollte sich herausstellen, daß die Wirkungen der Droge Jaborandi folium im Wesentlichen auf dieses Alkaloid zurückzuführen sind.

Die Aufklärung der Struktur von Pilocarpin begann Anfang diesen Jahrhunderts und wird vor allem Josett und Pinner (5, 17, 29) zugeschrieben. Die absolute Konfiguration wurde im Jahre 1966 durch Hill und Barcza (29) bestimmt, wonach Pilocarpin als (3S-cis)-3-Ethyldihydro-4-[(1-methyl-1H-imidazol-5-yl) methyl]-2(3H)-furanon definiert wird (Abb. 1 A, S. 8).

Um 1900 experimentierte der Darmstädter Augenarzt Adolph Weber mit "Jaborandi" in der Glaukomtherapie. Er arbeitete zunächst mit Blattaufgüssen, später dann mit Pilocarpin als Reinsubstanz, die er von der Firma Merck bezog (46). In diesem Zusammenhang ist es bemerkenswert, daß bereits Piso über die Anwendung von "Jaborandi" bei Augenkrankheiten berichtet hatte (18). Die Tatsache, daß 1883 L. Merck sich in seiner Dissertation mit Pilocarpin beschäftigte, läßt auf die zunehmende Wichtigkeit der Verbindung schließen.

Die Droge Jaborandi folium verlor mit der Reindarstellung des Alkaloids schnell an Bedeutung und findet heute keinerlei Anwendungen mehr. Auch Pilocarpin wurde mit zunehmender Diversifizierung der Pharmazeutika allmählich aus allen ehemaligen Anwendungen verdrängt, blieb aber bis in die jüngste Zeit die wichtigste Substanz in der Glaukomtherapie.

Ausgelöst durch die Forschungen und vielseitigen Anwendungen von Jaborandi stieg die Einfuhr der Blätter nach Europa am Ende des 19. Jahrhunderts relativ schnell an. Ebenfalls, oder gerade deswegen, verstärkte sich das Bedürfnis nach einer wissenschaftlichen Identifizierung des eingeführten Pflanzenmaterials. Im Rahmen der somit einsetzenden wissenschaftlichen Bestimmung wurden die unter der Bezeichnung "Jaborandi" von Coutinho nach Paris gebrachten Pflanzenteile zunächst von Professor Baillon als Blätter von

Pilocarpus pennatifolius identifiziert (43). Es war also die Art, welche von Lemaire anhand des ehemals Dülmener Exemplares benannt worden war.

P. pennatifolius Lem. wurde dann in der Ausgabe des britischen Arzneibuches von 1885 als die offizielle Quelle von "Jaborandi" anerkannt. Dabei wurde auf eine Zeichnung verwiesen, die einer Veröffentlichung von E. M. Holmes aus dem Jahre 1874 entstammte. Holmes hatte in diesem Artikel über kommerzielle Proben von "Jaborandi" eine unbekannte Art abgebildet, die als Pernambuco-Jaborandi bezeichnet wurde (43).

Im Verlauf seiner Forschungen über "Jaborandi" fand Holmes 1892 eine neue Spezies aus der Gattung *Pilocarpus* und nannte diese *Pilocarpus jaborandi*. Seinem Vorschlag folgend löste *Pilocarpus jaborandi* Holmes im britischen Arzneibuch von 1898 *Pilocarpus pennatifolius* Lem. als offizielle Droge ab, da erstere einen höheren Gehalt an Pilocarpin aufwies. Auch in dieser Ausgabe wurde aber wieder auf die Zeichnung von 1874 als Referenz verwiesen (43). Im gleichen Jahr wurde von Dr. Stapf am Herbarium von Kew eine weitere Art des Genus *Pilocarpus* entdeckt, welche er wegen ihrer vergleichsweise kleinen Blätter *Pilocarpus microphyllus* nannte. Obwohl später gezeigt wurde, daß diese Art mindestens genau so viel Pilocarpin enthält wie *P. jaborandi*, und wegen besserer Verfügbarkeit und geringeren Kosten die kommerzielle Bedeutung von *P. jaborandi* bald übertraf, gilt letztere teilweise bis heute als die offizielle Droge (24). Meist aber werden die folgende Arten als Quelle von Pilocarpin angegeben: *P. jaborandi* Holmes, *P. microphyllus* Stapf ex. Wardleworth, *P. pennatifolius* Lem. und *P. racemosus* Vahl. (5, 17, 18, 29) Alle diese Arten haben oftmals mehrere Synonyme und Handelsbezeichnungen (s Tab. 1.1).

Bezüglich der Verbreitung von *P. microphyllus* findet sich in der Literatur eine Vielzahl oftmals sehr unterschiedlicher Angaben. Am häufigsten wird Brasilien, und hier die Bundesstaaten Piauí, Maranhão und Amazonien als Verbreitungsgebiet angegeben (11, 19, 35, 45). Pio Correia nennt als einziges Habitat die Umgebung von Rio de Janeiro (9). Rio wird auch in Hagers Handbuch als Verbreitungsgebiet aufgeführt, allerdings in einem etwas verwirrenden Zusammenhang mit Nordostbrasilien (11). Weiterhin gibt es Angaben über Wuchsorte von *P. microphyllus* in Paraguay, Surinam und Westindien (11, 19, 35). Bei Nachforschungen zu einer Literaturangabe über den Anbau von *P. microphyllus* in der ehemaligen Sowjetunion (35) stellte sich heraus, daß es sich bei diesem Projekt um Pflanzen der Art *P. pinnatifolius* Lem. gehandelt hat (38). An ihren natürlichen Standorten wachsen

die Pflanzen auf unterschiedlichen Böden im Unterwuchs größerer Bäume. Meist sind sie dabei nicht gleichmäßig verteilt, sondern stehen fleckenhaft in Gruppen zusammen.

Tab. 1.1 Übersicht der Synonyme und Handelsbezeichnungen von *Pilocarpus*

Wissenschaftlicher Name	Synonym	Handelsbezeichnung
<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Wardleworth	Jaborandi (19)	Maranhm-Jaborandi (17, 19)
<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf ex Holmes	Arruda brava (19)	
<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf	Arruda do Mato (19) Jaborandi Legitimo (9)	
<i>Pilocarpus jaborandi</i> Holmes	Jaborandi (9, 19)	Pernambuco-Jaborandi (17)
<i>Pilocarpus officinalis</i> Poehl	Arruda do Mato (9)	
<i>Pilocarpus cearensis</i> Rizzini		
<i>Pilocarpus pennatifolius</i> Lem.	Jaborandi do Norte (9) Jaborandi (19)	Paraguay-Jaborandi (17)
<i>Pilocarpus racemosus</i> Vahl.	Bois flambeau caraibe (19)	Guadaloupe-Jaborandi (17)

Bis heute erfolgt die Beschaffung des Pflanzenmaterials überwiegend durch die Blatternte an den natürlichen Standorten der Pflanzen. Obwohl dabei theoretisch nur die Blätter geerntet werden und somit das Überleben der Pflanzen gesichert ist, wurde Jaborandi aus vielen seiner ursprünglichen Habitate verdrängt. Größere Vorkommen von *Pilocarpus* sp. finden sich heute zunehmend nur noch in immer abgelegeneren und schwer zugänglichen Regionen.

An den, von eigens dafür angestellten Kundschaftern, lokalisierten Standorten erfolgt zunächst die manuelle Blatternte. Anschließend wird das Pflanzenmaterial von Trägern zu Depots transportiert, welche für Fahrzeuge erreichbar sind. Hier werden die Blätter getrocknet und dann in Sammeltransporten möglichst schnell an die Produktionsstätten geliefert, da sofort nach der Ernte ein Degradationsprozeß des Pilocarpins einsetzt. Neben den oft schlechten Straßenbedingungen ist auch die Tatsache, daß bestimmte Regionen nur in der Trockenzeit zugänglich sind, die Ursache für die relativ verlustreiche Verzögerung des Transportes der Blätter. In diesem Zusammenhang hat es Versuche gegeben, die Degradation durch eine chemische Behandlung der Blätter vor Ort zu verhindern (52).

Eine andere Möglichkeit zur Lösung dieser Probleme wurde im Anbau von *Pilocarpus* gesehen. In diesem Zusammenhang machte die Firma Merck im Jahre 1981 erste Versuche zur Selektion von geeignetem Pflanzenmaterial. 1989/90 wurden dann 3 Millionen Exemplare von *Pilocarpus*, auf einer firmeneigenen Plantage im brasilianischen Bundesstaat Maranhão, gepflanzt. Auf 300 Hektar sollten jährlich vier Ernten einen Ertrag von 1000 Kg Blattmaterial pro Hektar ermöglichen. Die Pflanzung erfolgte auf einem armen Sandboden, der nach Erfahrungen von Merck das bevorzugte Bodensubstrat von *Pilocarpus* ist, sowie unter automatischer Bewässerung. Die maschinell geernteten Blätter wurden für zwei Tage in der Sonne getrocknet bevor sie zu den Fabrikationsstätten gebracht wurden. Ab 1993 standen Öfen für die Trocknung zur Verfügung (31).

Angaben über den Pilocarpingehalt der Blättern von *P.microphyllus* variieren zwischen 0,45% (4, 12) und 1,0% (11). Oftmals wird der Gehalt an Alkaloiden insgesamt angegeben. Hier liegen die Angaben für *P.microphyllus* im Bereich von 0,76 bis 0,84% (5, 17). Bei der kommerziellen Bewertung der Jaborandiblätter wird auch heute noch der Gesamtgehalt an Alkaloiden zu Grunde gelegt. Danach gibt es folgende Qualitäten: AA > 1%, A = 1%, B 0,85 – 1%, C 0,60 – 0,85 %, D 0,40-0,60%, E <0,40%.

Heutige Produktionsprozesse von Pilocarpin werden auf eine Extraktionsmethode von Chemnitz aus dem Jahre 1928 zurückgeführt (23). Obwohl im Prinzip bekannt, sind die Einzelheiten der Produktionsverfahren gut gehütete Geheimnisse. Auch die Tatsache, daß immer wieder Patente auf Extraktionsverfahren angemeldet wurden, macht das wirtschaftliche Interesse an diesem Alkaloid deutlich (33, 34).

1933 gelang Preobraschenski die Synthese von Pilocarpin (5), die jedoch wegen der relativ hohen Kosten ausschließlich von wissenschaftlichem Interesse geblieben ist.

Über die Synthese von Pilocarpin in der Pflanze ist bis heute relativ wenig bekannt. Es gibt zwar verschiedene Modelle (2, 23, 29) die aber bis jetzt nicht durch experimentelle Daten bestätigt werden konnten. In seiner Dissertation über die Biosynthese und In-vitro-Degradation von Pilocarpin machte Nunes (27) Untersuchungen an Exemplaren von *P. pennatifolius*. In einigen seiner Experimente führte er den Pflanzen potentielle Vorstufen von Pilocarpin zu, die zuvor radioaktiv markiert worden waren. Aus diesen Versuchen ging

hervor, daß die Methylgruppe des L-Methionins die Quelle für die N-Methylgruppe des Pilocarpins ist. Diese Methylierung findet in den Blättern der Pflanzen statt. Es gibt Überlegungen wonach, analog zur Synthese von Nicotin, der Hauptteil des Pilocarpinmoleküls in der Wurzel synthetisiert wird und dem Pilocarpidin (Abb. 1D) entspricht. Nach dieser Theorie wird das Pilocarpidin anschließend in die Blätter transportiert und dort zu Pilocarpin methyliert.

Nachdem sich die Synthese von Pilocarpin als zu kostspielig erwiesen hatte und die Beschaffung des Pflanzenmaterials für die Extraktion zunehmend schwieriger wurde, erschien die Gewebe- und Zellkultur als eine interessante Möglichkeit zur Produktion des Alkaloides. Es wurden verschiedene Methoden entwickelt mit denen es gelang In-vitro-Gewebekulturen von *Pilocarpus* anzulegen. Ausgehend von Fragmenten unterschiedlicher Organe der Pflanze konnte dann sowohl aus Suspensions- als auch aus ausdifferenzierten Kulturen Pilocarpin gewonnen werden. Entscheidend war dabei die Zusammensetzung und zeitliche Abfolge der unterschiedlichen Nährmedien. Die Gehalte an so gewonnenem Pilocarpin liegen jedoch deutlich unter den natürlichen Pilocarpingehalten der Blättern (1, 32, 51).

Neben Pilocarpin enthalten die *Pilocarpus*blätter andere Alkaloide, die sich von dessen Struktur ableiten lassen. Diese, auch als Sekundäralkaloide bezeichneten Verbindungen, sind nicht unbedingt in allen Spezies von *Pilocarpus* gleichermaßen vorhanden. Im Falle von *P. microphyllus* sind bis heute folgende Sekundäralkaloide identifiziert worden: Das 1912 von Pyman identifizierte Pilosin (Abb. 1B) wurde später als Isopilosin (Abb. 1B) bezeichnet, nachdem Voigtländer und Rosenberg (54) 1955 ein Alkaloid isolierten, das unter alkalischen Bedingungen zu Pymans Pilosin isomerisierte (23, 29). Epiisopilosin (Abb. 1B) (21) und Epiisopiloturin (Abb. 1B) wurden aus einer Chemovarietät von *P. microphyllus* isoliert (53). Während in älterer Literatur auch noch Isopilocarpin (Abb. 1C) als Inhaltsstoff von *P. microphyllus* angegeben wird, wurde 1968 gezeigt (23), daß es sich bei dieser Verbindung um ein Produkt handelt, welches erst während des Extraktionsprozesses entsteht, und somit nicht natürlich in der Pflanze vorkommt. Die Sekundäralkaloide haben oft ähnliche, jedoch deutlich schwächere Wirkungen als Pilocarpin.

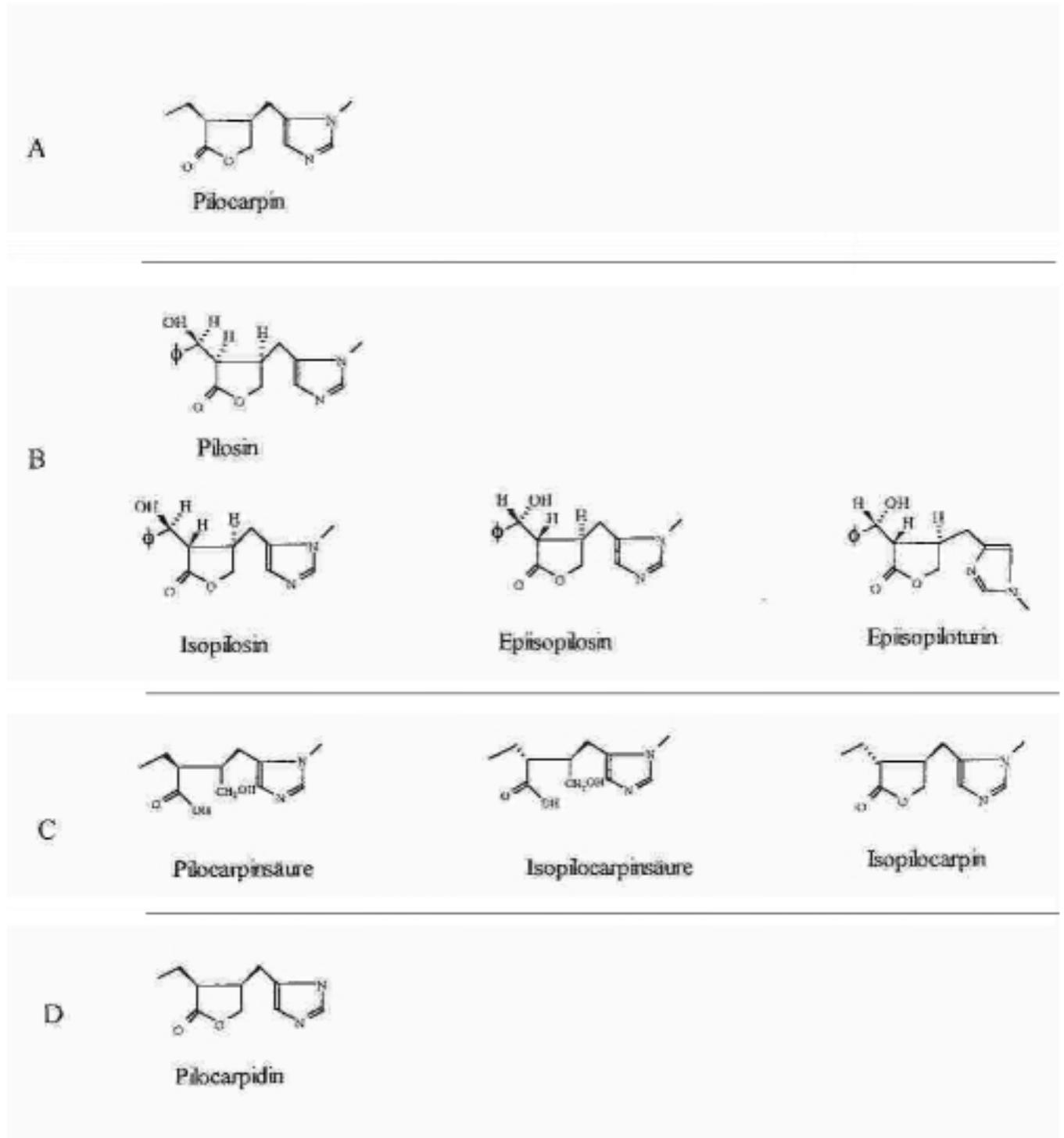


Abb. 1 A: Pilocarpin; B: Sekundäralkaloide; C: Degradationsprodukte von Pilocarpin;
 D: mögliche Vorstufe von Pilocarpin

Bereits 1880 beobachteten Harnack und Meyer eine Veränderung von Pilocarpin, nachdem das Alkaloid erhitzt worden war. Die dabei entstandene Verbindung nannten sie Jaborin. In ähnlichen Versuchen erhielten Petit und Polonovski eine Verbindung, welche nach heutigem Wissenstand, wohl identisch war mit der Substanz, die siebzehn Jahre zuvor von Harnack und Meyer als Jaborin bezeichnet wurde. Die Tatsache, daß sie diese Verbindung Pilocarpidin nannten, führte deswegen zu einer gewissen Verwirrung, da im gleichen Zeitraum die Firma Merck eine andere Substanz isoliert hatte und diese ebenfalls als Pilocarpidin bezeichnete. Während die von Merck isolierte Verbindung bis heute als Pilocarpidin (Abb. 1D) bezeichnet wird, erhielt das Degradationsprodukt von Pilocarpin 1900 von Jowett den Namen Isopilocarpin (Abb. 1C) (5).

Zur gleichen Zeit begann eine Diskussion über das Verhältnis von Pilocarpin zu Isopilocarpin. Während Jowett der Meinung war, es handele sich um Stereoisomere, gingen Pinner und Schwarz davon aus, es müsse sich um Strukturisomere handeln. Es sollte noch etwa zwei Jahrzehnte dauern, bis die Theorie von Jowett bestätigt wurde (5, 29).

Untersuchungen zur Degradation von Pilocarpin zu Isopilocarpin, Pilocarpinsäure (Abb. 1C) und Isopilocarpinsäure (Abb. 1C) sind deswegen von einigem Interesse, da bei der Veränderung des Alkaloides dessen Wirksamkeit wesentlich reduziert wird oder sogar verloren geht. Die Tatsache, daß Pilocarpin unter alkalischen Bedingungen, erhöhten Temperaturen und in wässrigen Lösungen (8) relativ schnell degradiert, ist nicht nur eine Herausforderung an die Nutzung der richtigen Extraktionsmethode, sondern auch an die Art der Anwendungsform.

Da es während der herkömmlichen Extraktionsmethoden sowohl zu einer Alkalinisierung des Extraktes als auch zu erhöhten Temperaturen kommt, findet folglich im Laufe des industriellen Prozesses eine relativ starke Degradation von Pilocarpin zu Isopilocarpin statt. Vergegenwärtigt man sich den relativ geringen Gehalt an Pilocarpin in den Pflanzen, wird die Bedeutung dieser prozessbedingten Degradation noch offensichtlicher. Die Tatsache, daß die älteren Analysemethoden auf ähnlichen Prinzipien basierten wie die Extraktionsprozesse, erklärt, warum man früher Isopilocarpin für einen natürlichen Inhaltsstoff von Jaborandi gehalten hat.

Was für die Extraktion gilt, trifft auch für die reine Substanz zu. Die bedeutendste Anwendung von Pilocarpin liegt bis heute in der Glaukomtherapie. Der Wirkstoff wird dabei oral, meist aber in Form von Augentropfen verabreicht. Da solche Lösungen nicht sehr sauer sein können, besteht auch hier das Problem der Isomerisierung zu dem unwirksamen Isopilocarpin. In einer weiteren Anwendungsform wird Pilocarpin über Kontaktlinsen retardiert über einen längeren Zeitraum abgegeben.

Außer Alkaloiden enthalten die Blätter von *P. microphyllum* 0,25 bis 0,30 % Ätherische Öle (10, 11)

Um das Jahr 1876 begannen Studien zur Pharmakologie von Pilocarpin, in deren Verlauf die stimulierende Wirkung auf das parasympathische Nervensystem entdeckt wurde. Pilocarpin wirkt demnach als Antagonist gegenüber Atropin, jedoch nicht gegenüber Nicotin (18).

Das Parasympathomimetikum Pilocarpin wirkt direkt auf die postganglionären parasympathischen Acetylcholinrezeptoren. Systemisch wirkt es anregend auf die Speichel-, Tränen- und Schweißdrüsen und fördert die Magensaft-, und Bronchialsekretion. Pilocarpin stimuliert die glatte Muskulatur des Magen-Darmtraktes, der Gallenwege, der ableitenden Harnwege sowie der Harnblase (11).

Bei direkter Anwendung am Auge kommt es zu einer Verengung der Pupille durch die Kontraktion des Iris Sphincter. Die Wirkung bei der Glaukomtherapie beruht zum einen auf dieser Miose, zum anderen auf einer Kontraktion des Ciliarmuskels. In beiden Fällen wird der Abfluss des Kammerwassers erleichtert und somit der Augeninnendruck gesenkt.

Bei oraler Anwendung wird der maximale Effekt nach etwa einer Stunde erreicht. Die Wirkungsdauer beträgt zwischen drei und fünf Stunden. Über den Mechanismus des Abbaus liegen keine gesicherten Informationen vor. Pilocarpin wird nicht durch Cholinesterase abgebaut und man nimmt an, daß der Wirkstoff an den Synapsen und im Plasma inaktiviert wird. Pilocarpin und seine Abbauprodukte werden über die Harnwege ausgeschieden.

Außer in der Augenheilkunde, als Antagonist zu Atropin und in der Glaukomtherapie kommen die Inhaltsstoffe von *Pilocarpus* heute auch noch in anderen Bereichen der Medizin, sowie in der Kosmetik zur Anwendung. So wird die stark anregende Wirkung auf die

Speichelsekretion in der Behandlung von Xerostomia ausgenutzt. Es handelt sich dabei um eine Beeinträchtigung der Funktion der Speicheldrüsen, verursacht durch die Strahlentherapie bei Patienten mit Krebs im Kopf-, und Halsbereich. Neben einer allgemeinen Verschlechterung der Lebensqualität kann es durch Xerostomia zu Schwierigkeiten beim Essen und damit verbundener Mangelernährung und Gewichtsverlust kommen. Außerdem sind ein schneller Verfall der Zähne sowie ein erhöhtes Risiko oraler Infektionen mögliche Folgen einer Xerostomie.

Im Bereich der Kosmetik finden Jaborandi- Extrakte Verwendung als Haarwuchsmittel. Die Auszüge, die neben Pilocarpin auch Sekundäralkaloide enthalten können, werden als Tonicum oder in Mischungen mit Shampoos und Salben verwendet. Obwohl immer wieder auf die Wirkung von Pilocarpin als Haarwuchsmittel hingewiesen wird, ist diese bis jetzt nicht durch pharmakologische Untersuchungen erwiesen.

Gemäß der Bedeutung von Jaborandi, beziehungsweise des Pilocarpins, in der Medizin wurden zahlreiche Analysemethoden erarbeitet, die sich entsprechend des technischen Fortschritts entwickelt haben. Wie bei anderen pharmakologisch wirksamen Drogen oder Verbindungen ging es dabei um Identifizierung, Bestimmung der Reinheit und des Gehaltes. Nachdem die Droge bald nach der Reindarstellung von Pilocarpin aus der medizinischen Anwendung verschwand, galt das Interesse dem Alkaloid. Eine Übersicht verschiedener Analysemethoden für Pilocarpin findet sich bei Abdullah (2) und in der U.S. Pharmacopeia 23 (48).

Wegen der Möglichkeit nicht nur Pilocarpin, sondern auch die verwandten Substanzen, sowohl quantitativ als auch qualitativ bestimmen zu können, ist die HPLC zu einer wichtigen Methode in der Pilocarpinanalyse geworden. Die Entwicklung mehrerer verschiedener HPLC-Methoden im Zusammenhang mit Untersuchungen zur Degradation von Pilocarpin unterstreicht diese Bedeutung (6, 8, 20, 49, 55).

1.2 Zielsetzung dieser Dissertation

Bei der industriellen Produktion von Pilocarpin war aufgefallen, daß die Pilocarpus-Blätter aus verschiedenen Lieferungen, beziehungsweise unterschiedlicher Herkunft, nicht nur deutlich unterschiedliche Gehalte an Pilocarpin aufwiesen, sondern sich auch unterschiedlich leicht extrahieren liessen (mündliche Information der Firma PVP).

Bei der Suche nach entsprechenden Informationen in der Literatur wurden bis auf wenige Hinweise (53) keinerlei Angaben über die Autökologie von *P. microphyllus* gefunden. Auch die Untersuchungen von Nunes zur Biosynthese von Pilocarpin (27) geben keine konkreten Informationen zu Faktoren, die den Pilocarpingehalt beeinflussen könnten. Zudem führte Nunes seine Untersuchungen an Exemplaren von *P. pinnatifolius* durch, die in Töpfen unter Gewächshausbedingungen gehalten wurden. Ein weiteres Problem seiner Arbeit war die geringe Zahl an verfügbaren Versuchspflanzen.

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun Faktoren identifiziert werden, die einen Einfluß auf den Pilocarpingehalt von *P. microphyllus* haben, mit dem Ziel, durch kontrollierte Beeinflussung oder Ausnutzung solcher Faktoren einen höheren Pilocarpingehalt im Ausgangsmaterial für die Pilocarpinproduktion zu erreichen.

1.3 Grundsätzliche Überlegungen

Da in dieser Arbeit der Einfluß exogener und endogener Faktoren unter möglichst natürlichen Bedingungen untersucht werden sollte, wurde der experimentelle Teil in Parnaíba, im brasilianischen Bundesstaat Piauí gelegen, durchgeführt.

Eine wesentliche Voraussetzung für die Realisierung dieser Arbeit war jedoch die Entwicklung einer Methode, welche eine Bestimmung des Pilocarpingehaltes mit den vorhandenen Mitteln erlaubte.

Zur Auswahl der zu untersuchenden Faktoren wurden zunächst Hinweise aus der Literatur zusammengestellt. Weiterhin wurden Probleme und Fragestellungen aus dem Bereich der industriellen Nutzung von *P. microphyllus* berücksichtigt. Aus dieser Liste wurden dann solche Faktoren ausgewählt, deren Untersuchung vor Ort durchführbar erschien.

Auch für *Pilocarpus*-Alkaloide gilt, daß sie wie auch andere sekundäre Naturstoffe, keineswegs Endprodukte des Stoffwechsels sind, sondern vielmehr dynamischen Prozessen von Synthese und Degradation unterliegen. Die Synthese und der Abbau werden dabei gewöhnlich unabhängig voneinander reguliert und sowohl von exogenen als auch von endogenen Faktoren beeinflußt (Barz und Köster 81). Als exogene Faktoren mit Einfluß auf

den Gehalt an Sekundärstoffen werden zum Beispiel Klima, Boden, Düngung, Jahreszeit (13, 22) und besonders der Faktor Licht (4) genannt.

Nach Aussagen von Luckner (22), wonach der Alkaloidmetabolismus in die Zelldifferenzierung sowie in die Entwicklung des ganzen Organismus integriert ist und somit in einem engen Zusammenhang mit anderen biochemischen Aktivitäten und morphologischen Merkmalen steht, dürften Faktoren wie Alter der Pflanzen oder Pflanzenteile, der vegetative Zustand sowie die genetische Herkunft der Pflanzen als endogene Faktoren zu bezeichnen sein.

Unabhängig von den den Pilocarpingehalt beeinflussenden Faktoren schien die Tatsache interessant, daß die Synthese und Lagerung von Sekundärstoffen oft an unterschiedlichen Stellen in der Pflanze erfolgt (13). Nunes (27) kommt in seiner Dissertation zu dem Ergebniss, daß der Hauptteil des Pilocarpinmoleküls, das Pilocarpidin (s. Abb. 1D), in der Wurzel synthetisiert, und nach dem Transport in die Blätter dort zu Pilocarpin methyliert wird. Dies würde der Situation beim Tabak entsprechen, wo das Nicotin in der Wurzel synthetisiert und dann via Xylem in die Blätter transportiert wird.

Unter wirtschaftlichen Gesichtspunkten sind Informationen über den günstigsten Erntezeitpunkt, eventuell besonders gehaltsreiche Pflanzenteile, das geeignetste Bodensubstrat und etwaige andere Kultivierungsmaßnahmen von großem Interesse. Weiterhin könnte wahrscheinlich durch die Auswahl eventuell geeigneterer Varietäten von *P. microphyllus*, sowie durch eine optimale Behandlung des geernteten Pflanzenmaterials die Effizienz der Pilocarpinproduktion gesteigert werden.

Um eventuelle Einflüsse der genannten Faktoren beurteilen und auf die angesprochenen Fragen Antworten geben zu können, wurden folgende Versuche geplant:

- Regelmäßige Analysen derselben Pflanzen über den Zeitraum eines Jahres mit gleichzeitiger Beobachtung des vegetativen Zustandes;
- Analysen von Versuchspflanzen jeweils vor und nach Düngung;
- vergleichende Analysen zwischen jungen und alten Blättern der jeweils selben Pflanzen;

- vergleichende Analysen zwischen Sonnen- und Schattenpflanzen;
- Analysen von Pflanzen gleicher genetischer Abstammung;
- Analyse von Stecklingen gleicher genetischer Herkunft nach Anzucht auf unterschiedlichen Böden;
- Analysen von Blättern, die nach der Ernte auf unterschiedliche Weise getrocknet werden;
- Untersuchungen zur Degradation von Pilocarpin in geernteten Blättern;
- Bestimmung des pH-Wertes unterschiedlich behandelte Blätter
- Analyse frischer Blätter
- Analyse verschiedener Pflanzenteile;
- Analysen des Blutungssaftes;
- Analyse frischer Blätter ohne Trocknung.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Versuchspflanze

2.1.1 Botanische Beschreibung

Pilocarpus mircrophyllus Stapf ex Wardleworth (Abb 2.1.1), auch als *Pilocarpus mircrophyllus* Stapf, *Pilocarpus mircrophyllus* Stapf ex Holmes, Jaborandi Legítimo oder Maranhã Jaborandi bezeichnet, wächst als Strauch oder kleiner Baum in den tropischen Zonen Südamerikas. Die Pflanze, die je nach Region jaborandi, arruda –brava oder arruda do mato heißt, kann bis zu 7,5 m groß werden, bleibt aber meistens deutlich kleiner. Der Habitus entspricht einem Pleiochasium, d.h. mehrere gleichrangige Seitentriebe übergipfeln die Hauptachse.

Die Blätter haben geflügelte Stiele, sind wechsel- bis gegenständig und meist unpaarig gefiedert. Ihre Größe liegt zwischen 5 bis 15 cm Länge und 4 bis 6 cm Breite. Die Blättchen sind oval bis elliptisch, zwischen 2 bis 5,5 cm lang und 1 bis 3,5 cm breit. Sie haben eine unsymmetrische Basis und sind an der Spitze immer eingekerbt. Die Farbe variiert zwischen hellgrün in jungen Stadien bis zu einem dunklen grau-grün bei alten Blättchen. Ganz junge Blattaustriebe sind teilweise rötlich-braun gefärbt, was auf einen relativ hohen Gehalt an Anthocyanen schließen läßt.

Die gestielten, zwittrigen Blüten sitzen auf einzelstehenden Trauben, die bis zu 30 cm lang werden können. Die Blütenstände stehen terminal oder axilliar an den Verzweigungen der Seitentriebe. Die fünfzähligen, oft zahlreichen Blüten sind mit einem Durchmesser von 4 bis 5 mm relativ klein. Auch wegen ihrer durchscheinenden, grünlich-gelben Kelchblätter sind sie eher unscheinbar.

Die schwarzen Samen entwickeln sich in Merikarprien und werden im Zustand der Reife aktiv ausgeschleudert.

Die Unterscheidungsmerkmale zu anderen Arten sind die vergleichsweise kleinen, ungestielten Blättchen, sowie geflügelte Rachis und Blattstiel (19).



Abb. 2.1.1 *Pilocarpus microphyllus* Stapf A: Habitus, B: Frucht, C: Same
Aus Flora Neotropica Monograph 33 (19)

2.1.2 Pflanzenmaterial für die Analysen

Die Untersuchungen dieser Arbeit wurden an insgesamt 52 Exemplaren von *P. microphyllus* Stapf durchgeführt. Bei allen Versuchspflanzen handelte es sich um Sämlinge, die überwiegend im Zeitraum von November 1994 bis Februar 1995 im Zusammenhang der Diplomarbeit mit dem Titel *Versuche zur Kultivierung der Medizinalpflanze Pilocarpus microphyllus Stapf unter besonderer Berücksichtigung von Mykorrhiza* gekeimt waren (41). Das Samenmaterial stammte aus Blattlieferungen für die Firma PVP, in denen sich teilweise ganze Zweigabschnitte mit Fruchtständen befanden. Obwohl bekannt war aus welchen Regionen die jeweiligen Lieferungen stammten, war eine genauere Bestimmung der Herkunft der Samen nicht möglich. Basierend auf Informationen über die Lieferungen kann man aber davon ausgehen, daß das Samenmaterial, aus denen die Versuchspflanzen gezogen wurden, aus der Region um Luzilândia im Bundesstaat Maranhão, sowie aus der Umgebung von Altamira und São Felix do Xingu, beide im Bundesstaat Para gelegen, stammt (siehe Karte im Anhang I).

In einigen Versuchen wurden Pflanzen analysiert, die aus den Samen dieser Sämlinge gezogen worden waren (s. auch 2.3). In diesen Fällen waren die Fruchtstände der entsprechenden Pflanzen mit Netzen versehen worden, in denen die reifen Früchte aufgefangen werden konnten. Auf diese Weise war eine eindeutige Zuordnung von Sämling und Mutterpflanze möglich.

Alle analysierten Versuchspflanzen wurden nummeriert und mit einem Etikett versehen.

2.1.3 Standort der Versuchspflanzen

Die Versuchspflanzen wuchsen in zwei Freilandbeeten auf dem Firmengelände von PVP in Parnaíba (ca. 3° 5'S; 41° 47'W). Die Beete hatten eine Größe von je 7 x 2 Metern und waren im oberen Teil (ca. 20 cm) mit einem sandigen, sehr humosen Bodensubstrat gefüllt. Der Untergrund war sandig und relativ steinig.

Während die Pflanzen in einem der Beete der direkten Sonneneinstrahlung ausgesetzt waren, befand sich das andere Beet im Schatten. Als Schattenspender dienten hier zwei Exemplare von *Passiflora*, die die Strahlungsbedingungen an den natürlichen Standorten simulieren sollten.

Soweit nötig, besonders aber während der Trockenzeit zwischen Juli und Dezember, wurden die Pflanzen bewässert.

2.1.4 Klima

Mit einer Lage von etwa 3° 5'S liegt Parnaíba in den Sommerfeuchten Tropen (42). Wie für die Tropen charakteristisch, sind die Jahreszeiten nicht über Temperaturunterschiede, sondern vielmehr durch die Verteilung der Niederschläge gekennzeichnet. Mit einer winterlichen Trockenzeit von sechs bis sieben Monaten im Zeitraum zwischen Juni bis Dezember gehören die klimatischen Bedingungen in den Bereich der wechselfeuchten Trockensavannen-Klimate (47). Die durchschnittliche Niederschlagsmenge beträgt etwa 1300 mm, wobei dies von Jahr zu Jahr sehr unterschiedlich sein kann. Während in Jahre 1985 zum Beispiel 2877 mm Regen fielen, betrug der entsprechende Wert für das Jahr 1983 nur 523 mm (12). Die mittlere Luftfeuchtigkeit liegt bei etwa 75 % (12), kann aber während der Regenzeit zeitweise auf etwa 90 % steigen. Sehr geringe Schwankungen dagegen gibt es bei den anderen Klimafaktoren. So beträgt die mittlere Temperatur durchschnittlich 27,1° C und variiert im Laufe des Jahres nur um +/- 0,7° C. Die Tageslänge liegt ziemlich genau bei zwölf Stunden und schwankt im Jahresverlauf etwa um +/- 15 Minuten. Die mittlere Photoperiode beträgt etwa 12 Stunden und 50 Minuten und variiert, je nach Jahreszeit ebenfalls um etwa +/- 15 Minuten. Mit etwas über 13 Stunden ist sie am längsten im Dezember und Januar und liegt entsprechend in den Monaten Juni und Juli mit etwa 12 Stunden und 40 Minuten am anderen Ende ihrer Variationsbreite (12).

2.2 Bodenanalysen

Zur Bestimmung der Nährstoffversorgung der Versuchspflanzen wurde aus jedem Beet eine repräsentative Bodenprobe entnommen. Da die Bewurzelung der Pflanzen nur auf den humosen Oberboden beschränkt war, erfolgte die Probennahme nur in den oberen 20 cm.

Die beiden Bodenproben wurden vom Labor der Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) in Parnaíba auf folgende Nährstoffe untersucht: Phosphat (P); Kalium (K); Kalzium (Ca); Magnesium (Mg); Natrium (Na); Schwefel (S) und Aluminium (Al). Außerdem wurde der Anteil an organischer Substanz (OS) bestimmt.

Neben den Nährstoffgehalten erfolgte die Bestimmung folgender Charakteristika der beiden Bodensubstrate: pH-Wert (pH); potentielle Acidität (H+Al); Kationenaustauschkapazität (KAK); Basensättigung (BS) und Aluminiumsättigung (M)

2.3 Keimanlagen

Zur Anzucht von Keimlingen wurden Samen verwendet, die jeweils nach Versuchspflanzen getrennt gesammelt worden waren (s. 2.1.2). Die Samen wurden zunächst folgender Behandlung unterzogen:

1. 10 Sekunden in absoluten Ethanol getaucht;
2. mit destilliertem Wasser gewaschen;
3. ca. 10 Minuten in einer Lösung von Calciumhypochlorid (10 % w/v) gebadet;
4. für eine Minute in 1N Schwefelsäure getaucht;
5. mit destilliertem Wasser gewaschen.

Diese Behandlung war aus Erfahrungen in der Diplomarbeit (41) entwickelt worden und diente hauptsächlich der Oberflächensterilisation der Samen. Zum anderen wurde durch die Säurebehandlung die Samenschale durchlässiger gemacht, was eine schnellere Keimung ermöglichte.

Die vorbehandelten Samen wurden anschließend in Petrischalen überführt, die mit feuchtem, zuvor sterilisiertem, Filterpapier ausgelegt waren. Die Keimung erfolgte an einem hellen Standort unter Umgebungstemperatur.

2.4 Stecklingsversuche

Im Rahmen dieser Versuche wurden unterschiedliche Sproßstecklinge von verschiedenen Versuchspflanzen geschnitten. Die Pflanzenabschnitte wurden dabei jeweils so ausgewählt, daß es in jeder Variante Stecklinge von unverholzten und verholzten Sproßabschnitten gab. Alle Stecklinge waren etwa 15 cm lang und hatten mehrere Internodien, davon immer einen am basalen Abschnitt. Je nach Variante wurden unterschiedlich viele Blätter an den Stecklingen belassen. Folgende drei Varianten wurden angelegt:

2.4.1 Variante A

Die Stecklinge wurden Morgens geschnitten und sofort in Wasser gestellt, um einen Lufteintritt in die Gefäße zu verhindern. Vor dem Einpflanzen wurden sie am basalen Teil verletzt und für etwa 5 Sekunden in eine 0,5%-ige methanolische Lösung von α -Naphthalenacetamid getaucht. Viele der Blätter wurden an den Stecklingen belassen.

Als Bodensubstrat wurde Bausand verwendet, der zuvor zweimal bei 90° C für 24 Stunden sterilisiert worden war. Zwischen den Sterilisationsphasen wurde der Sand für 24 Stunden bei Umgebungstemperatur belassen. In Plastiktöpfen (ca. 3 Liter) wurden die Stecklinge anschließend in eine Art Frühbeet gestellt, in dem sie permanent unter einem feinen Regen gehalten wurden.

2.4.2 Variante B

Die Stecklinge wurden Morgens geschnitten und sofort in Wasser gestellt, um das Eintreten von Luft in die Gefäße zu Verhindern. Vor dem Einpflanzen wurden sie am basalen Teil verletzt und für etwa 10 Sekunden in eine 0,5%-ige methanolische Lösung von α -Naphthalenacetamid getaucht. Anschließend wurden alle bis auf die obersten Blätter entfernt.

Als Bodesubstrat wurde ein grobkörniger Sand verwendet, der nicht sterilisiert wurde. Die Böden der Töpfe wurden zusätzlich mit grobem Kies ausgelegt, um den Wasserablauf noch mehr zu begünstigen. Die Stecklinge wurden dann wie unter 2.4.1 beregnet.

2.4.3 Variante C

Die Stecklinge wurden Morgens, von unterschiedlich altem Pflanzenmaterial, geschnitten und sofort in Wasser gestellt. Vor dem Einpflanzen wurden sie am basalen Teil verletzt und für etwa 10 Sekunden in eine 0,5%-ige methanolische Lösung von α -Naphthalenacetamid getaucht. Auch in dieser Variante wurden nur wenige Blätter an den Stecklingen belassen.

Als Bodensubstrat wurde ein grobkörniger Sand verwendet, der zuvor für 24 Stunden bei 90° C sterilisiert worden war. Anschließend wurden die Stecklinge in Plastiktöpfen (ca. 3 l) an einem hellen Ort ohne direkte Sonneneinstrahlung aufgestellt. Über jeden Steckling wurde ein Glas gestülpt, um die Luftfeuchtigkeit möglichst hoch zu halten. Die Töpfe

wurden in regelmäßigen Abständen gegossen, so daß die Gläser ständig von innen beschlagen waren.

2.5 Trocknung

Mit Ausnahme der Trocknungsversuche (s.2.11) wurden alle Blattproben sofort nach der Ernte getrocknet. Dazu wurden die Blätter nach Versuchspflanzen getrennt auf Stahlblechen verteilt und unter Vakuum für fünf Stunden bei 60° C getrocknet. Die geeigneten Trocknungsbedingungen waren zuvor in einer Versuchsreihe (2.5.1) ermittelt worden.

2.5.1 Ermittlung der Trocknungsbedingungen

Um die Bedingungen für eine schnelle und vollständige Trocknung der Blattproben zu ermitteln, wurden folgende Trocknungsverluste bestimmt:

- a) von drei verschiedenen Blattproben nach 24 Stunden unter Vakuum bei 40° C.
- b) von vier verschiedenen Blattproben nach 4, 5 und 19 Stunden unter Vakuum bei 60° C.
- c) von drei verschiedenen Blattproben nach 6 Stunden bei 60° C und anschließend für 16 Stunden bei 105° C, jeweils unter Vakuum.

Nach der Ermittlung von Frischgewichte (FG) und und Trockengewicht (TG) wurde der Trocknungsverlust nach Gleichung 2.5.1.1 berechnet.

Gleichung 2.5.1.1

$$(FG - TG) \times 100 / FG = \text{Trocknungsverlust in \%}$$

2.6 Extraktion

Die getrockneten Blattproben wurden zunächst mit Hilfe einer elektrischen Kaffeemühle zu einem feinen Pulver vermahlen. Dabei wurde die Rachis der Blätter entfernt, da diese sich schlecht zerkleinern ließ.

Jeweils etwa ein Gramm gemahltes Blattmaterial wurde dann exakt abgewogen und in eine Patrone aus Filterpapier überführt. Die Patronen wurden mit der Pflanzennummer versehen und mit Baumwollwatte verschlossen. So vorbereitet wurden die Proben in einem Soxhlet-Extraktor so lange mit Methanol extrahiert, bis das Lösungsmittel im Extraktionsraum farblos war.

Nach der Extraktion, normalerweise nach etwa vier Stunden, wurde der Extrakt auf etwa 20° C (+/- 3° C) abgekühlt (Umgebungstemperatur im HPLC-Labor) und mit Methanol auf ein Volumen von 250 ml aufgefüllt.

2.7 Festphasenextraktion

Um die Extrakte in eine für HPLC-Analysen geeignete Form zu bringen, wurden die Proben nach der Extraktion mit einem Propylsulfonat-Sorbens nach folgendem Verfahren aufgereinigt:

2.7.1 Methode der Festphasenextraktion

- a) Konditionierung des Sorbens: 2,0ml Methanol, anschließend 5ml Natriumacetat-Puffer (1 M) und dann 2ml 1% Essigsäure in Wasser.

- b) Probenaufgabe: 2.0ml Extrakt mit 0,5ml 1% Essigsäure in Wasser.

- c) Elution der Interferenzen: Nacheinander 2ml 1% Essigsäure in Wasser, 2ml Methanol, 2ml Natriumacetat-Puffer (0,1M, pH 4,4), 2,0ml Methanol.

- d) Elution des Isolats: 6ml einer Mischung aus Methanol/ Phosphatpuffer (50/50).

Die jeweiligen Lösungen wurden in die Säule (3ml) überführt und anschließend unter Überdruck, der mit Hilfe einer Spritze manuell erzeugt wurde, durch das Sorbens (500mg) geleitet. Nach der Elution des Isolats wurde die Säule mit Luft ausgeblasen und das Elutionsvolumen genau bestimmt.

2.7.2 Lösungen für die Festphasenextraktion

Kalilauge 1M:	56,11g KOH mit Wasser auf 1000ml
Phosphatpuffer 0,1M:	1,36g H ₂ KO ₄ P mit Wasser auf 100ml
Natriumacetat-Puffer: 1M:	8,203g C ₂ H ₃ NaO ₂ mit Wasser auf 100ml
0,1M:	0,820g C ₂ H ₃ NaO ₂ mit Wasser auf 100ml
Essigsäure:	1ml konzentrierte Essigsäure mit Wasser auf 100ml

2.7.3 Validierung der Methode

2.7.3.1 Qualitative Validierung

- Die Retentionszeit des Pilocarpin-Peaks aus der Analyse des Standards (s. 2.8.4) wurde mit den Retentionszeiten aus Analysen der nach 2.7.1 aufgereinigten Blattextrakte verglichen.
- Die Analysen des Standards mit und ohne Festphasenextraktion wurden verglichen.

2.7.3.2 Quantitative Validierung

- Es wurden zwei Festphasenextraktionen nach 2.7.1 desselben Blattextraktes durchgeführt, die anschließend mit Hilfe der HPLC (2.8) analysiert wurden.
- Nach jedem Abschnitt der Elution der Interferenzen (2.7.1.c) wurden die Eluate per HPLC entsprechend 2.8 analysiert.
- Eine Standardlösung (s. 2.8.4) mit bekannter Konzentration wurde dem Verfahren nach 2.7.1 unterzogen und anschließend mit Hilfe von HPLC (2.8) analysiert. Das Ergebnis wurde mit dem theoretischen Gehalt verglichen.
- Ein Standard (s. 2.8.4) bekannter Konzentration wurde mit einer bestimmten Menge eines Blattextraktes gemischt. Dieser gespickte Extrakt wurde dann per HPLC nach 2.8 analysiert und das Ergebnis mit dem theoretischen Gehalt verglichen.

2.8 HPLC

Die Pilocarpingehalte der durch Festphasenextraktion aufgereinigten Proben wurde mit Hilfe von HPLC nach einer Methode von Bundgaard (6) bestimmt. Die Berechnungen der entsprechenden Gehalte erfolgten unter Bezug auf einem externen Standard (s.2.8.5), dessen Detektorantwort bei jeder Analysereihe neu bestimmt wurde.

2.8.1 Geräte

Verwendet wurde eine HPLC-Aparatur der Firma Shimadzu mit folgender Ausstattung:

Pumpe:	LC- 10 AS
Detektor:	UV- VIS- SPD- 10 A
Datenprozessor:	C – R6A CHROMATOPAC
Injektionseinheit:	7125 RHEODYNE mit 20 µl Injektionsschleife
Säulenofen:	CTO-10/A
Säule:	Knauer Vertex-Säule mit integrierter Vorsäule 250 x 4,6 mm ID
Sorbens:	LiChrosorb - 60 Si, 5µm

2.8.2 Analysebedingungen

Die mobile Phase wurden mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,2ml/ min unter isokratischen Bedingungen über die Säule geleitet, welche auf 40°C temperiert wurde. Die Messungen erfolgten im UV-Bereich bei 214nm über einen Zeitraum von 12 Minuten.

2.8.3 Mobile Phase

Die mobile Phase bestand aus einem Gemisch von Methanol, Phosphorsäure (2M) und Wasser im Verhältnis 3 : 5 : 92, das 3 % anhydriertes Natriumsulfat enthielt.

2.8.4 Standard

Als Standard wurde Pilocarpin-Base (93,47%) verwendet, da diese Form am ehesten dem Wirkstoff in der Pflanze entspricht. Die Konzentration des Standards wurde unter Bezug auf eine Probe von Pilocarpin-Chlorhydrat (Batch Nr. V-2-9710) der Firma Merck (Konzentration: 100,7%; HPLC) bestimmt. Dazu wurden zunächst methanolische Lösungen beider Proben mit je einer Konzentration von 0,0206mg/ml hergestellt. Von beiden Lösungen wurden dann je drei HPLC-Analysen unter den Bedingungen von 2.8.2 durchgeführt. Aus

den jeweils gemittelten Peakflächen und der bekannten Konzentration von Pilocarpin-Chlorhydrat wurde dann die Konzentration des Standards wie folgt berechnet:

Gemittelte Peakfläche Pilocarpin-Chlorhydrat: 242201,3

Gemittelte Peakfläche Pilocarpin-Base: 224802,0

Konzentration Pilocarpin-Base: $224802,0 \times 100,7 \% / 242201,3 = \mathbf{93,47\%}$

2.8.4.1 Standardlösung

Um eine möglichst gute Vergleichbarkeit der Signale des Standards und der aufgereinigten Proben zu erreichen, wurden etwa 10,0mg Pilocarpin-Base zunächst in 25 ml Methanol gelöst. Anschließend wurden 0,5ml dieser Stammlösung (STL) mit Methanol auf 10ml verdünnt. Die Konzentration dieser Standardlösung (S) lag damit etwa bei 0,020mg/ ml, und wurde mit Hilfe von Gleichung 2.8.4.1 jeweils genau berechnet. Die Standardlösung (S) wurde vor jeder Analysereihe neu angesetzt, da Pilocarpin in Lösungen nur begrenzt stabil ist.

Gleichung 2.8.4.1 Konzentration der Standardlösung

$$\text{MP (mg)} \times 0,9347 / 25 \text{ ml} \times 0,5 \text{ ml} / 10 \text{ ml} = \text{KS in mg/ ml}$$

MP: Menge an Pilocarpin Base; KS: Konzentration der Standardlösung

2.8.5 Berechnung der Pilocarpingehalte

Die Pilocarpingehalte der Blattproben, jeweils bezogen auf 1g trockenes Blattmaterial, wurden mit Hilfe eines externen Standards (2.8.4) ermittelt und nach folgenden Gleichungen 2.8.5.1 und 2.8.5.2 berechnet:

Gleichung 2.8.5.1 Konzentration der Probe

$$\text{PFP} \times \text{KS (mg/ml)} / \text{PFS} \times \text{EV (ml)} / 2 \text{ ml} = \text{KP (mg/ ml)}$$

PFP: Peakfläche Probe; KS: Konzentration Standardlösung; PFS: Peakfläche Standard; EV: Elutionsvolumen der Probe; KP: Konzentration Probe.

Gleichung 2.8.5.2 Pilocarpingehalt der Blätter

$$KP \text{ (mg/ ml) } \times 250 \text{ ml} = \text{Pilocarpingehalt in 1 g Blattmaterial}$$

KP: Konzentration Probe aus Gl. 2.8.5.1

2.8.6 Validierung der Methode

Um zu prüfen, ob die ausgewählte Methode geeignet war, um den Pilocarpingehalt der nach 2.7.1 aufgereinigten Blattextrakte sowohl qualitativ als auch quantitativ zu bestimmen, wurden folgende Versuche durchgeführt:

2.8.6.1.a Quantitative Validierung

Die Standardlösung (2.8.4.1) wurde sowohl mit Wasser als auch mit Methanol als Lösungsmittel angefertigt.

2.8.6.1.b

Die Retentionszeiten aus Analysen des Standards so wie einer Probe von Pilocarpin-Chlorhydrat (2.8.4), beide in Methanol gelöst, wurden mit den Retentionszeiten aus Analysen von Blattextrakten verglichen.

2.8.6.2 Qualitative Validierung

Es wurden sechs Standardlösungen (2.8.4) unterschiedlicher Konzentration analysiert. Die so erhaltenen Werte der Peakflächen wurden in einer Graphik gegen die Konzentrationen aufgetragen.

2.9 Langzeituntersuchungen

Diese Untersuchungen dienten zur Analyse des Pilocarpingehaltes einiger Exemplare von *Pilocarpus microphyllus* Stapf über längere Zeiträume. Dazu wurden sechs Versuchspflanzen ausgewählt (s. Tab. 2.9). Bei der Auswahl wurden nur Pflanzen berücksichtigt, die vor Versuchsbeginn mindestens einmal geblüht hatten und außerdem über genügend Blätter verfügten, um eine kontinuierliche Ernte zu gewährleisten. Drei dieser Pflanzen wuchsen im Schattenbeet, die andere Gruppe war der direkten Sonneneinstrahlung ausgesetzt. Mit Hilfe

von Daten vorheriger Analysen wurde pro Gruppe je eine Pflanze mit vergleichsweise hohem, mittleren und niedrigem Pilocarpingehalt ausgesucht.

Tab. 2.9 Versuchspflanzen zur Untersuchungen zum Einfluß des vegetativen Zustandes auf den Pilocarpingehalt

Nummer der Pflanze	Standort	Relativer Pilocarpingehalt
4193710	Sonne	hoch
5208821	Sonne	mittel
1860457	Sonne	niedrig
7422573	Schatten	hoch
6311302	Schatten	mittel
6319142	Schatten	niedrig

In monatlichen Abständen wurden die Pilocarpingehalte der Blätter mit Hilfe von HPLC (2.8) bestimmt. Dazu wurden am Ende jedes Monats Blattproben genommen, und entsprechend 2.5 sofort nach der Ernte getrocknet. Bei der Auswahl der Blattproben wurden immer darauf geachtet, ausdifferenzierte Blätter, möglichst gleichen Alters, von verschiedenen Stellen der jeweiligen Versuchspflanze zu ernten. Mangels eindeutiger Kriterien muß diese Auswahl jedoch als eher subjektiv eingeschätzt werden. Die trockenen Blätter wurden extrahiert (2.6) und mit Hilfe der Festphasenextraktion, wie unter 2.7 beschrieben, aufgereinigt. Die Pilocarpingehalte wurden nach Gleichung 2.8.5.2 berechnet und in Prozent angegeben.

2.10 Düngung

Die Düngung erfolgte an drei Sämlingen, die aus Samen gleicher Herkunft angezogen worden waren. Nach zweiwöchiger Keimung (s. 2.3) waren die Sämlinge im Januar 1998 zunächst in einen Topf gepflanzt worden. 18 Monate später wurden die etwa 20 cm großen Pflänzchen nebeneinander in das Freilandbeet ohne Schatten gepflanzt und mit folgende Nummern gekennzeichnet: 0754456; 7422593; 9644735.

Eine erste Analyse der Pilocarpingehalte erfolgte im September 1999 im Zusammenhang mit Untersuchungen von Pflanzen gleicher genetischer Herkunft.

Am 2. Dezember 1999 wurden die Pflanzen mit einer Lösung (6g/ 3 l Wasser) eines herkömmlichen Blumendüngers (Tab. 2.10.1) gedüngt, wobei die Flüssigkeitsmenge gleichmäßig auf die Pflanzen verteilt wurde. Weitere Düngergaben erfolgten am 18. Januar und 17. Februar 2000 nach dem gleichen Prinzip.

Etwa einen Monat nach der letzten Düngung, am 21.03.2000, wurden von jeder Pflanze, sowohl von jungen als auch von alten Blättern, Proben genommen und nach den üblichen Verfahren behandelt und analysiert.

Tab. 2.10.1 Zusammensetzung des Düngers

N total 15 %	Mg 0,4 %
P ₂ O ₅ 15 %	Zn 0,05 %
K ₂ O 20%	B 0,05 %
Ca 1,1%	Fe 0,1 %
S 4 %	Mn 0,03 %

2.11 Trocknungsversuche

Verglichen wurden die Trocknung unter Vakuum bei 60° C mit der Trocknung im Schatten und in der Sonne.

Um Unterschiede im Pflanzenmaterial so weit wie möglich auszuschließen, wurde eine größere Menge Blätter unterschiedlichen Alters von verschiedenen Versuchspflanzen geerntet. Nachdem die Rachis der Blätter entfernt worden war, wurden die Blättchen in einem großen Gefäß gründlich vermischt und anschließend in drei gleiche Teile aufgeteilt. Jeder dieser Teile stellte das Ausgangsmaterial für einen der folgenden Versuche dar:

2.11.1 Trocknungsvarianten

- a) Das Blattmaterial wurde unter Vakuum für fünf Stunden bei 60° C getrocknet.
- b) Die Blättchen wurden gleichmäßig auf einem Tablett verteilt, das tagsüber in die Sonne gestellt wurde. Nach Sonnenuntergang wurde das Tablett bis zum nächsten Morgen abgedeckt. Nach drei Tagen wiesen die Blättchen eine ähnliche Konsistenz wie solche aus der Ofentrocknung auf, und die Trocknung wurde beendet.

- c) Die Blättchen wurden gleichmäßig auf einem Tablett verteilt und an einem schattigen, gut gelüfteten Ort gestellt. Nach Sonnenuntergang wurde das Tablett bis zum nächsten Morgen abgedeckt. Nach neunzehn Tagen wiesen die Blättchen eine ähnliche Konsistenz wie die aus der Ofentrocknung auf und die Trocknung wurde beendet.

2.11.2 Analyse

- a) Die erste Analyse der Pilocarpinghalte erfolgte 20 Tage nach der Ernte der Blätter. Bevor Teile der entsprechend getrockneten Blättchen nach der üblichen Methode extrahiert, aufgereinigt und analysiert wurden, wurden diese Teilproben jeder Behandlung nochmals bei 60°C für vier Stunden getrocknet. Damit sollte eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse erreicht werden.
- b) Etwa zwei Monate (63 Tage) nach der Ernte wurden nochmals Proben der unterschiedlichen Behandlungen analysiert. Auch hier erfolgte zunächst eine Trocknung der Proben, um eventuelle Unterschiede in der Feuchtigkeit auszugleichen. Die Trocknung erfolgte aus praktischen Gründen diesmal über Nacht (14 Stunden) ebenfalls bei 60°C.

2.12 Degradationsanalysen

In dieser Versuchsreihe wurden Restproben* aus den Langzeituntersuchungen (s. 2.9), nach bestimmten Zeiträumen erneut analysiert (s. Tab.2.12). Die Proben waren in Plastiksäcken verpackt, unter Umgebungstemperatur und ohne Lichteinwirkung aufbewahrt worden. Vor der Extraktion wurden die Proben für vier Stunden bei 60° C getrocknet und gegebenenfalls gemahlen. Es wurden folgende Analysen gemacht:

Tab. 2.12. Degradationsanalysen

Pflanze Nr./ Datum Anal.	Ernte der Probe			
5208821/ 18.01.00	12/99	09/99	06/99	02/99
6319142/ 23.02.00	11/99	08/99	06/99	-
1860457/ 28.03.00	11/99	08/99	06/99	04/99

* Wegen eines geplatzten Schlauches wurden viele der Restproben unbrauchbar. Dadurch konnten nicht immer die gleichen Zeiträume miteinander verglichen werden.

2.13 pH-Wert Messungen

Unter Zugabe von Wasser, dessen pH-Wert zuvor mit verdünnter Natronlauge auf 7,00 eingestellt worden war, wurden verschiedene Blattproben in einem Mörser zerkleinert. Von den so gewonnenen Extrakten wurde der pH-Wert bestimmt.

2.14 Analyse frischer Blätter

In dieser Untersuchung wurden Pilocarpingehalte von Extrakten (s. 2.6) frischer Blätter mit denen getrockneter Blätter der jeweils selben Pflanzen verglichen. Die frischen Proben wurden kurz vor der Extraktion (s. 2.6) geerntet, nachdem die Vergleichsproben schon getrocknet waren. Die Extraktion und weitere Behandlung (2.7, 2.8) sowohl der frischen als auch der getrockneten Proben erfolgte dann parallel zueinander. Vor der Extraktion waren die frischen Blättchen mit Hilfe eines Mörsers zerkleinert worden. Nach der Aufreinigung mit Hilfe der Festphasenextraktion wurden die Proben mit HPLC analysiert.

Um die Ergebnisse der frischen Blätter mit den trockenen Blattproben vergleichen zu können, mußte der Wassergehalt der frischen Blätter berücksichtigt werden. Dazu wurden die in den *Versuchen zur Ermittlung der Trocknungsbedingungen* (s. 3.5.2) ermittelten Trocknungsverluste nach fünf Stunden, bei 60°C unter Vakuum (s. Tab. 3.5.2 TV5) gemittelt. Nach diesen Ergebnissen wurde für die gegebenen Versuchsbedingungen ein durchschnittlicher Trocknungsverlust von 61% angenommen.

2.15 Analyse verschiedener Pflanzenteile

Neben den Blättern, beziehungsweise den Blättchen wurden auch Sprosse verschiedenen Alters, Blütenstände, Früchte, Knospen und Wurzeln auf ihren Pilocarpingehalt hin untersucht. Die Probenahme der Wurzel war insofern etwas kompliziert, als sich die Wurzeln der einzelnen Pflanzen teilweise sehr stark überlagerten. Um eine genaue Zuordnung zu den entsprechenden Pflanzen zu ermöglichen, wurden deswegen überwiegend stärkere

Wurzelabschnitte geerntet. Im Falle der Sämlinge (s. 3.14.2) wurde jeweils das gesammte Wurzelsystem als Probe verwendet. Die entsprechenden Proben wurden sofort nach der Ernte getrocknet (s.2.5), gemahlen und mit Methanol extrahiert (s. 2.6). Die Extrakte wurden mit Hilfe von Festphasenextraktion (s.2.7.1) aufgereinigt und schließlich per HPLC (s. 2.8) analysiert.

2.16 Analyse Blutungssaft

Um etwaige Hinweise auf den Transport von Pilocarpin in der Pflanzen zu bekommen, sollte der Blutungssaft analysiert werden. Da dieser nach dem Abschneiden von Sproßabschnitten nicht spontan austrat und auch kein Drucktopf vorhanden war, wurde folgende Methode angewand:

Die morgens geschnittenen Sproßabschnitte wurden am basalen Ende mit Teflonband soweit verdickt, daß sie genau in einen Druckschlauch paßten, der an einen Kompressor angeschlossen war. Nach Fixierung der Sproßabschnitte im Druckschlauch wurde unter ständiger Beobachtung der Schnittstelle stufenweise der Druck erhöht. Mit den vorhandenen Mitteln war es aus Sicherheitsgründen nicht möglich den Druck so weit zu erhöhen, daß es zum Austritt von Blutungssaft kam.

2.17 Chemikalien

Methanol für HPLC	VETEC, Rio de Janeiro
Natriumsulfat	VETEC, Rio de Janeiro
Kaliumhydroxid	VETEC, Rio de Janeiro
Natriumacetat	VETEC, Rio de Janeiro
Natriumsulfat	VETEC, Rio de Janeiro
Phosphorsäure	VETEC, Rio de Janeiro
Essigsäure	Casa Americana, Sao Paulo
Kaliumphosphat monobasich	Casa Americana, Sao Paulo
α -Naphthalenacetamid	Sigma
Pilocarpin Base	PVP, Parnaiba
Pilocarpinchlorhydrat	VEGETEX (Merck), Parnaiba
Propylsulfonat-Sorbens (PRS)	ICT, Bad Homburg

3. ERGEBNISSE

3.1 Allgemeine Beobachtungen

Neben den im Kapitel Material und Methoden beschriebenen Untersuchungen und Versuchen, wurden im Verlauf der Arbeit Beobachtungen allgemeiner Art an den Versuchspflanzen gemacht, deren Ergebnisse im Folgenden wiedergegeben werden sollen.

3.1.1 Wachstum und Entwicklung

Die Versuchspflanzen zeigten allgemein ein relativ langsames Wachstum, wobei es zwischen den einzelnen Pflanzen deutliche Größenunterschiede gab. Während die durchschnittliche Größe der Versuchspflanzen fünf Jahre nach der Keimung etwa 1,20m betrug, gab es Exemplare die lediglich 0,20m groß waren. Bei gleichem Alter und unter denselben Bedingungen erreichte eine Pflanze eine Größe von ca. 3,00 m.

Dank der Keimanlagen (s. 2.3) war es möglich, die Sämlingsentwicklung genauer zu verfolgen. Über einen Zeitraum von zehn, beziehungsweise neun Monaten wurde die Entwicklung von vier Sämlingen beobachtet. Das Wachstum der einzelnen Pflanzen ist in Abbildung 3.1.1 jeweils als Kurve wiedergegeben.

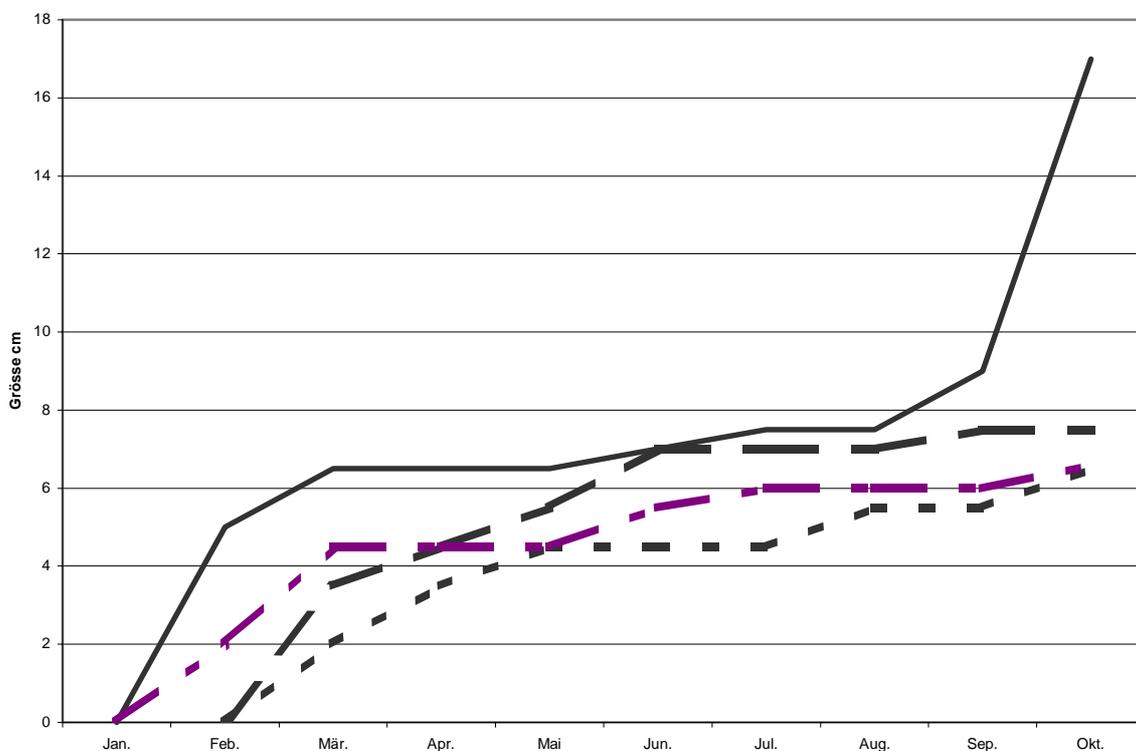


Abb. 3.1.1 Größenentwicklung von vier Sämlingen 1998

Gegen Ende des Beobachtungszeitraumes hatten die Sämlinge jeweils etwa acht Blätter entwickelt.

Außer in der Größe unterschieden sich die Versuchspflanzen auch in ihrem Habitus. Während einige Exemplare reich verzweigt waren und eine buschige, reich beblätterte Wuchsform aufwiesen, hatten andere Pflanzen vergleichsweise wenige Blätter an langen unverzweigten Sprossen.

Unabhängig von Größe und Habitus machten alle Pflanzen einen vitalen Eindruck. Es kam immer wieder zu Ausbildung neuer Blätter und Blütenstände. Letztere zeigten alle Entwicklungsstadien bis hin zu Früchten, aus deren Samen sich nicht nur in den Keimversuchen sondern, auch in den Freilandbeeten auf natürliche Weise Sämlinge entwickelten.

Es war auffallend, daß im Schattenbeet fast kein Unkraut wuchs, während sich, besonders zur Regenzeit, im Beet ohne Schatten ein dichter Bewuchs an Gräsern und anderen Pflanzen zeigte. Die Versuchspflanzen im Schattenbeet zeigten aber keine offensichtlichen Unterschiede in Entwicklung und Vitalität im Vergleich zu den Pflanzen, welche der direkten Sonneneinstrahlung ausgesetzt waren.

3.1.2 Blätter

Die Blätter der Versuchspflanzen waren zwischen 14,4 und 6,7 cm lang und 6,7 bis 3,7 cm breit. Die Länge der Blättchen betrug 4,0 bis 2,9 cm und deren Breite lag zwischen 2,0 bis 1,0cm. Blattstiel und Rachis der Blätter waren geflügelt und die Blättchen ungestielt (s. Abb. 3.1.2.1). Neben Unterschieden in der Größe der Blätter und Blättchen gab es vor allem in Bezug auf die Form und Konsistenz der Blättchen deutliche Unterschiede. Hier reichte das Spektrum von verkehrteilanzettlichen über verkehrteiförmig bis zu elliptischen Blättchen, deren Konsistenz von lederig-hart bis zu weich und durchscheinend variierte (s. Abb. 3.1.2.1). Die Blätter waren im allgemeinen 3 bis 4-zählig gefiedert, wobei aber auch Pflanzen mit nur zwei, oder aber mit bis zu acht Fiederpaaren pro Blatt vorkamen.



Abb. 3.1.2.1 Blätter unterschiedlicher Exemplare von *P. microphyllus* Stapf



Abb. 3.1.2.2 Sehr junge Blätter von *P. microphyllus* Stapf

Auch in Bezug auf die Farbe der Fiederblätter gab es Unterschiede, die aber abgesehen von Einflüssen der Blattkonsistenz offensichtlich weniger auf die Eigenarten der einzelnen Pflanzen als vielmehr auf das Alter der Blätter sowie auf die Lichtverhältnisse am jeweiligen Standort zurückzuführen waren. Im allgemeinen waren die Blätter an sonnigen Standorten heller als solche im Schatten, und jüngere Blätter waren heller als ältere. Ganz junge Blätter waren oft rötlich-braun gefärbt (s. Abb. 3.1.2.2). Die Farbe änderte sich jedoch sehr schnell zu einem Hellgrün, daß dann mit zunehmendem Alter dunkler wurde.

3.1.3 Blüten und Früchte

Die Blüten und Früchte der Versuchspflanzen stimmen weitgehend mit den entsprechenden Beschreibungen von Kaastra (14) überein. Abweichend davon wurden zwischen Diskus und Stigma teilweise einzelne Haare beobachtet, während in der Literatur von unbehaarten Blüten die Rede ist (14). Bei den untersuchten Blüten waren zwar deutlich die beiden Antheren, das Filament und Konnetiv zu sehen, jedoch nicht die in anderen Beschreibungen (10, 14) erwähnten Drüsen an den Antheren.

Für Blütezeit und Fruchtreife ließ sich keinerlei Periodizität feststellen. Im Laufe eines Jahres gab es zu jedem Zeitpunkt immer Blütenstände in verschiedenen Stadien, sowie Früchte an mehreren Versuchspflanzen. Wiederholt konnten sogar an ein und derselben Pflanze gleichzeitig Blütenstände in verschiedenen Stadien und auch Früchte beobachtet werden. Weiterhin ging aus den Beobachtungen hervor, daß bei weitem nicht alle Blütenstände zur Blüte gelangten und sich ebenfalls auch nur relativ wenige Blüten zu Früchten entwickelten.

Bezüglich der Anzahl an Blütenständen pro Pflanze gab es große Unterschiede. Während einige Versuchspflanzen zeitweise über zwanzig Infloreszenzen gleichzeitig aufwiesen, wurden an anderen Exemplaren nur vereinzelte oder auch nie Blütenstände beobachtet. In diesem Zusammenhang ist bemerkenswert, daß alle Pflanzen etwa gleich alt waren und unter den selben Bedingungen wuchsen.

Während normalerweise, die in den Beeten reichlich vertretenden Ameisen nur relativ selten auf den Pflanzen beobachtet werden konnten, waren während der Blüte viele dieser Insekten auf den Pflanzen, und hier besonders auf den Blütenständen zu sehen (s. Abb. 3.1.3)



Abb. 3.1.3 Blütenstand von *P. microphyllus* Stapf

3.1.4 Wurzel

Im Zusammenhang mit den Keimanlagen konnte beobachtet werden, daß die Sämlinge zunächst eine pfahlwurzelähnliche Primärwurzel ausbildeten. Nach der Pflanzung in Töpfe entwickelte sich aber dann ein verzweigtes Wurzelsystem. Auch bei den Versuchspflanzen in den Freilandbeeten war zu sehen, daß *P. microphyllus* Stapf über ein verzweigtes, sehr feiwurzelliges Wurzelsystem in der humosen Bodenschicht verfügte.

3.2 Bodenanalysen

Die Bestimmung der Nährstoffversorgung der Pflanzen in den Versuchsbeeten war aus zweierlei Gründen von Interesse. Zum einen konnten die beiden Standorte im Hinblick auf das Angebot an Nährstoffen und die Bodenverhältnisse miteinander verglichen werden. Zum anderen ließ sich basierend auf diesen Ergebnissen das relative Ausmaß der Düngung (s.2.10) abschätzen.

Die Ergebnisse der in den Laboratorien der Embrapa (s.2.2) durchgeführten Analysen sind in den Tabellen 3.2.1 bis 3.2.4 wiedergegeben

Tab. 3.2.1. Nährstoffgehalte Schattenbeet

P	K	Ca	Mg	Na	Al	S	OS
mg/dm ³	Cmol _c / dm ³	g/Kg					
44,29	0,29	10,90	1,00	0,25	0,06	12,44	117,40

(P) Phosphat; (K) Kalium; (Ca) Kalzium; (Mg) Magnesium; (Na) Natrium; (S) Schwefel; (Al) Aluminium;
(OS) organische Substanz

Tab. 3.2.2 Nährstoffgehalte Sonnenbeet

P	K	Ca	Mg	Na	Al	S	OS
mg/dm ³	Cmol _c / dm ³	g/Kg					
100,66	0,39	14,60	1,70	0,29	0,00	16,71	104,47

(P) Phosphat; (K) Kalium; (Ca) Kalzium; (Mg) Magnesium; (Na) Natrium; (S) Schwefel; (Al) Aluminium;
(OS) organische Substanz

Tab. 3.2.3 Bodeneigenschaften Schattenbeet

pH	H+Al	KAK	BS	M
H ₂ O	Cmol _c / dm ³	Cmol _c / dm ³	%	%
4,90	10,56	23,00	54,08	0,48

(pH) pH-Wert; (H+Al) potentielle Acidität; (KAK) Kationenaustauschkapazität; (BS) Basensättigung; (M) Aluminiumsättigung

Tab. 3.2.4 Bodeneigenschaften Sonnenbeet

pH	H+Al	KAK	BS	M
H ₂ O	Cmol _c / dm ³	Cmol _c / dm ³	%	%
6,42	4,78	21,49	77,75	0,00

(pH) pH-Wert; (H+Al) potentielle Acidität; (KAK) Kationenaustauschkapazität; (BS) Basensättigung; (M) Aluminiumsättigung

3.3 Keimanlagen

Mit dem Ziel die Pilocarpingehalte, beziehungsweise die Zusammensetzung der Blattextrakte, von Pflanzen gleicher genetischer Herkunft analysieren zu können, wurden Sämlinge aus Samenmaterial gezogen, die jeweils nach Versuchspflanzen getrennt gesammelt worden waren (s. 2.1.2). Dazu wurden im Zeitraum von Dezember 1997 bis März 1998 insgesamt drei Keimversuche angelegt (s. 2.3).

Mit Keimraten von bis zu 83,3 % waren die Versuche erfolgreich und die angewandte Methode der Keimanlage somit als prinzipiell geeignet zu bewerten. Andererseits kam es in allen drei Versuchen auch zu wesentlich niedrigeren Keimraten, beziehungsweise oft überhaupt nicht zur Keimung der Samen. Im Einzelnen sind die Ergebnisse der Keimversuche in den Tabellen 3.3.1 bis 3.3.3 dargestellt.

Tab. 3.3.1 Keimanlage A

Beginn: 20.12.97		Auswertung: 05.01.98	
Herkunft/ Pflanze Nr.	Anzahl Samen	Samen gekeimt	Keimrate in %
1864417	10	05	50
2975308	10	0	0
8531164	10	0	0
unbekannt	10	01	10

Tab. 3.3.2 Keimanlage B

Beginn: 03.02.98		Auswertung: 19.02.98	
Herkunft/ Pflanze Nr.	Anzahl Samen	Samen gekeimt	Keimrate in %
1864417	14	02	14,3
7420093	11	0	0
3081539	05	0	0
8531164	10	0	0
2975308	23	01	4,4
5208731	10	0	0
0753366	32	0	0

Tab. 3.3.3 Keimanlage C

Beginn: 07.03.98		Auswertung: 20.03.98	
Herkunft/ Pflanze Nr.	Anzahl Samen	Samen gekeimt	Keimrate in %
1864327	06	05	83,3
3081539	03	0	0

3.4 Versuche zur Stecklingsvermehrung

In der Absicht, genetisch gleiche Versuchspflanzen zu erhalten, wurden drei, jeweils unter 2.4.1, 2.4.2 und 2.4.3 beschriebene, Versuchsreihen zur Stecklingsvermehrung angelegt. Wie nachfolgend beschrieben konnte in keinem Fall eine Bewurzelung der Stecklinge beobachtet werden, weswegen die angewante Methode als nicht geeignet bewertet werden muß.

3.4.1 Stecklingsversuch A

Am 22.01.97 wurden von den Versuchspflanzen 8537134; 1860457 und 9647985 insgesamt 15 Stecklinge vorbereitet, die entsprechend der Beschreibung unter 2.4.1 behandelt wurden. Die Stecklinge wurden so markiert, daß eine Identifizierung der Stammpflanze möglich war.

In ersten Beobachtungen nach zwölf Tagen machten die Stecklinge einen vitalen Eindruck. Schon vorher war allerdings aufgefallen, daß die Töpfe zeitweise bis zum Rand mit Wasser gefüllt waren. Nach einem Wochenende waren am 12.02.97, aufgrund eines Defekts in der Wasserversorgung, alle Stecklinge vertrocknet. Bei Untersuchungen der Stecklinge ergaben sich keine Hinweise auf eine Wurzelbildung.

3.4.2 Stecklingsversuch B

Am 03.03.97 wurden von den Pflanzen 7426003 und 0759386 verschiedene Stecklinge geschnitten. Beim Schneiden der Stecklinge wurde darauf geachtet, daß in ihrem Entwicklungsstadium unterschiedliche Sproßabschnitte verwendet wurden. Die weiteren Bedingungen dieses Versuches sind unter 2.4.2 beschrieben.

Im Verlauf des Versuches verloren nacheinander alle Stecklinge ihre Blätter, wobei diese sich vorher nicht sonderlich verfärbt hatten. Bei anschließenden Untersuchungen wurde

ein fauliger Geruch an den im Substrat steckenden Teilen der Stecklinge bemerkt. Die Rinde war ganz oder teilweise abgelöst. Keiner der Stecklinge zeigte Wurzelbildung.

3.4.3 Stecklingsversuch C

In einem dritten Versuch wurden am 24.02.99 mehrere Stecklinge von der Versuchspflanze Nr. 4193710 geschnitten. Das Pflanzenmaterial wurde so ausgewählt, daß Stecklinge von unterschiedlich alten Sproßteilen geschnitten werden konnten. Basierend auf den Erfahrungen aus den ersten beiden Versuchen wurde diesmal eine andere Behandlung der Stecklinge ausgewählt (s. 2.4.3).

Nach bereits einem knappen Monat hatte ein Steckling schon alle Blätter verloren und roch am basalen Ende faulig. Nach einem weiteren Monat waren alle Stecklinge ohne Blätter. In keinem Fall konnte eine Wurzelbildung beobachtet werden.

3.5 Ermittlung der Trocknungsbedingungen

Die Trocknung der Blätter war eine Voraussetzung für die Vergleichbarkeit der verschiedenen Analysen. Um die Bedingungen für eine möglichst schonende, aber gleichzeitig nicht zu zeitaufwendige Trocknung zu ermitteln, wurden drei Versuchsreihen durchgeführt. Die Berechnung des Trocknungsverlustes erfolgte wie unter 2.5.1 beschrieben.

3.5.1 Untersuchung A

In diesem Versuch wurden drei verschiedene Blattproben für 24 Stunden unter Vakuum bei 40°C getrocknet. Der durchschnittliche Trocknungsverlust betrug 62,4 % , wobei die Ergebnisse (s. Tab. 3.5.1) um maximal 0,7 % variierten.

Tab. 3.5.1. Trocknung für 24 Stunden unter Vakuum bei 40°C

Probe	T(g)	PF(g)	FG (g)	PT (g)	TG (g)	TV (%)
I	41,6865	42,3089	0,6224	41,9182	0,2317	62,8
II	31,5886	32,2859	0,6973	31,8515	0,2629	62,3
III	54,7505	55,6204	0,8699	55,0803	0,3298	62,1

(T) Targewicht Petrischale; (PF) Gewicht Petrischale mit frischer Probe; (FG) Frischgewicht Probe; (PT) Gewicht Petrischale mit trockener Probe; (TG) Trockengewicht Probe; (TV) Trocknungsverlust.

3.5.2 Untersuchung B

In diesem Versuch wurden vier verschiedenen Blattproben für 4, 5 und 19 Stunden unter Vakuum bei 60°C getrocknet. Die Schalen mit den Proben wurden nach jedem Trocknungsabschnitt gewogen und anschließend wieder in den Ofen gestellt. Nach vier Stunden betrug der durchschnittliche Trocknungsverlust aus zwei Proben 63,15%, wobei die Ergebnisse um 1,5% auseinanderlagen. Nach einer weiteren Stunde im Ofen war das Gewicht von vier Proben um durchschnittlich 61,08% reduziert. Die Ergebnisse lagen um bis zu 6,5% auseinander. Am Ende dieser Versuchsreihe, nach insgesamt neunzehn Stunden zeigten die vier Proben einen mittleren Trocknungsverlust von 60,85%. Bei diesen Messungen differierten die Ergebnisse um maximal 6,7%.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 3.5.2 zusammengefaßt.

Tab. 3.5.2 Trocknung für 4, 5 und 19 Stunden unter Vakuum bei 60°C

	PROBE			
	I	II	III	IV
T (g)	38,2240	39,8207	50,5664	47,9389
PF (g)	39,6311	41,2662	51,7136	49,0801
FG (g)	1,4071	1,4455	1,1472	1,1412
PT4 (g)	38,7532	40,3423	-	-
TG4 (g)	0,5292	0,5216	-	-
TV4 (%)	62,4	63,9	-	-
PT5 (g)	38,7525	40,3360	51,0509	48,3983
TG5 (g)	0,5303	0,5153	0,4871	0,4594
TV5 (%)	62,4	64,4	57,8	59,7
PT19 (g)	38,7543	40,3382	51,0535	48,4025
TG19 (g)	0,5303	0,5175	0,4871	0,4636
TV19 (%)	62,3	64,2	57,5	59,4

(T) Targewicht Petrischale; (PF) Gewicht Petrischale mit frischer Probe; (FG) Frischgewicht Probe; (PT) Gewicht Petrischale mit trockener Probe; (TG) Trockengewicht Probe; (TV) Trocknungsverlust; (4, 5 oder 19) nach der entsprechenden Trocknungszeit.

3.5.3 Untersuchung C

Drei verschiedenen Blattproben wurden zunächst für 6 Stunden bei 60°C getrocknet und anschließend gewogen. Am nächsten Tag wurden dieselben Proben für 16 Stunden bei 105°C getrocknet und anschließend wieder gewogen. Die Trocknung erfolgte jeweils unter Vakuum (Ergebnisse s. Tab. 3.5.3).

Der durchschnittliche Trocknungsverlust nach 6 Stunden bei 60°C lag bei 60,6%, wobei die einzelnen Ergebnisse um bis zu 2,5% auseinanderlagen. Nach 16 Stunden bei 105°C betrug der Trocknungsverlust im Durchschnitt 61,5% mit einer Variation von ebenfalls 2,5%.

Zwischen den beiden Trocknungen kam es über Nacht bei allen Proben zu einer Gewichtszunahme. Jeweils auf das Trockengewicht nach der ersten Trocknung (TG60) bezogen, entsprach diese Zunahme bei Probe I 6,2%, bei Probe II 5,3% und bei Probe III 7,0%.

Tab. 3.5.3 Trocknung für 6 Stunden bei 60°C und 16 Stunden bei 105°C

	PROBE		
	I	II	III
T (g)	38,2254	39,8207	50,5647
PF (g)	39,8797	41,4450	51,8323
FG (g)	1,6543	1,6243	1,2676
PT60 (g)	38,8986	40,4634	51,0456
TG60 (g)	0,6732	0,6427	0,4809
TV60 (%)	59,3	60,4	62,1
PT105 (g)	38,8851	40,4429	51,0387
TG105 (g)	0,6597	0,6222	0,4740
TV105 (%)	60,1	61,7	62,6

(T) Targewicht Petrischale; (PF) Gewicht Petrischale mit frischer Probe; (FG) Frischgewicht Probe; (PT) Gewicht Petrischale mit trockener Probe; (TG) Trockengewicht Probe; (TV) Trocknungsverlust; (60 oder 105) nach der entsprechenden Trocknung.

3.6 Validierung der Festphasenextraktion

Um zu untersuchen, ob die unter 2.7.1 beschriebene Methode geeignet war, um sowohl qualitativ als auch quantitativ das Alkaloid Pilocarpin aus der Blattextrakten abzutrennen, wurden verschiedene Versuche durchgeführt (s. 2.7.3), deren Ergebnisse im Folgenden dargestellt werden.

3.6.1. Qualitative Validierung

3.6.1.1 Vergleich der Retentionszeiten in Chromatogrammen des Pilocarpin-Standards und von Blattextrakten.

Die Retentionszeit des Pilocarpin-Peaks in den Analysen des Standards lag im Durchschnitt etwa bei 6,7 Minuten (s. Tab. 3.7.1), wobei die Konzentration der Proben etwa 0,020mg/ ml betrug. Etwa zum gleichen Zeitpunkt, konnte in den jeweiligen HPLC-Analysen verschiedener Blattextrakte ein isolierter Peak beobachtet werden. Obwohl dessen Retentionszeit in auffälliger Weise mit der des Standards übereinstimmte, gab es teilweise Unterschiede von bis zu 0,2 Minuten. In diesem Zusammenhang viel auf, daß die Retentionszeiten des Signals der Blattextrakte sich mit den entsprechend ermittelten Konzentrationen veränderte. Aus diesem Grund wurden Standard-Analysen mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt, um zu untersuchen, ob generell einen Zusammenhang zwischen der Retentionszeit und der Probenkonzentration besteht.

Aus diesen Untersuchungen ging hervor, daß die Retentionszeit von der Probenkonzentration beeinflusst wurde (s. Tab. 3.6.1.1). Je höher der Gehalt an Pilocarpin in der Probe, desto früher wurde das Signal registriert.

Tab. 3.6.1.1 Abhängigkeit der Retentionszeit von der Probenkonzentration

Konzentration	RT 1. Analyse	RT 2. Analyse	RT 3. Analyse	Ø RT
0,004 mg/ ml	6.817	6.805	6.815	6.812
0,008 mg/ ml	6.775	6.775	6.775	6.775
0,010 mg/ ml	6,743	6,753	-	6.748
0,020 mg/ ml	6.692	6,702	-	6.697
0,024 mg/ ml	6.687	6.688	6.688	6.688
0,040 mg/ ml	6.642	6.637	6.647	6.642

RT in Minuten

3.6.1.2 Einfluß der Festphasenextraktion auf Pilocarpin

Um eine mögliche Veränderung des Pilocarpinmoleküls während der Festphasenextraktion zu untersuchen, wurde eine Standardlösung (s. 2.8.4) jeweils vor und nach der Aufreinigung analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.6.1.2 wiedergegeben. Unter Berücksichtigung der Konzentrationsunterschiede, die sich durch die Verdünnung der Probe während der Festphasenextraktion ergeben, waren die Unterschiede in der Retentionszeit vergleichbar mit den Ergebnissen aus 3.6.1.1.

Neben dem Peak mit einer Retentionszeit von etwa 6,7 Minuten wurden in den Chromatogrammen der Blattextrakte noch andere Signale beobachtet. Diese Peaks zeigten sich etwa ein bis drei Minuten nach der Injektion der Proben. In Untersuchungen in denen die Elutionslösung der Festphasenextraktion (s. 2.7.1.d) ohne Probe analysiert wurden, zeigten sich ebenfalls Peaks zu Anfang der Analyse.

Tab. 3.6.1.2 Einfluß der Festphasenextraktion auf Pilocarpin

Probe	Konzentration (mg/ ml)	Retentionszeit (Min)
Standard vor FPE	0,0206	6.952
Standard nach FPE	0,0037	7.11
Standard vor FPE	0,0103	7.002

FPE: Festphasenextraktion

3.6.2 Quantitative Validierung

3.6.2.1 Wiederholbarkeit der Festphasenextraktion

Mit dem Ziel, die Verlässlichkeit der Methode (2.7) zu überprüfen, wurden zwei Proben desselben Blattextraktes parallel auf zwei verschiedenen Säulen aufgereinigt. Die entsprechenden Eluate wurden dann je drei mal in die HPLC injiziert. Sowohl in Bezug auf die beiden Extraktionen, als auch auf die Analysen wurde eine gute Wiederholbarkeit festgestellt.

Bezogen auf die ermittelten Peakflächen (s. Tab. 3.6.2.1.1) betrug der durchschnittliche Unterschied zwischen den beiden parallel aufgereinigten Proben 1269 oder 0,7 % und lag damit in der gleichen Größenordnung wie die Unterschiede zwischen den verschiedenen Analysen der selben Probe.

In Bezug auf die Retentionszeiten des Pilocarpinpeaks in den zwei verschiedenen Proben betrug der durchschnittliche Unterschied 0.012 oder 0,2% (s. Tab. 3.6.2.1.2). Auch hier waren die Unterschiede zwischen den einzelnen Analysen derselben Probe teilweise größer als zwischen den Analysen der unterschiedlichen Proben.

Tab. 3.6.2.1.1 Wiederholbarkeit Peakfläche

Probe	1 Analyse	2. Analyse	3. Analyse	Durchschnitt
I	193930	188017	191084	191010,3
II	192247	191680	192911	192279,3

Tab. 3.6.2.1.2 Wiederholbarkeit Retentionszeiten

Probe	1 Analyse	2. Analyse	3. Analyse	Durchschnitt
I	7.287	7.338	7.285	7.303
II	7.29	7.29	7.292	7.291

3.6.2.2 Verlust von Pilocarpin während der Elution der Interferenzen

Um zu prüfen ob die Festphasenextraktion geeignet war die Blattextrakte so selektiv aufzureinigen, daß kein Pilocarpin vor der eigentlichen Elution (s.2.7.1.d) verloren ging, wurde nach jedem Abschnitt der Aufreinigung eines Blattextraktes (s.2.7.1c) die entsprechenden Elutionslösungen auf einen eventuellen Pilocarpingehalt untersucht.

In keiner der untersuchten Elutionslösungen konnte Pilocarpin identifiziert werden.

3.6.2.3 Wiederfindungsrate in Proben bekannter Konzentration

In zwei verschiedenen Analysen wurde je eine Standardlösung (s.2.8.4), deren Konzentration nach Gleichung 2.8.4.1 berechnet worden war, der Festphasenextraktion unterzogen und die Ergebnisse mit der Ausgangskonzentration verglichen.

Nach den Berechnungen (s.Gl.2.8.5.1) aus den Ergebnissen der HPLC-Analysen ergaben sich Wiederfindungsraten von bis zu 99,2%. Es zeigte sich allerdings, daß je nachdem welche der einzelnen bei den Wiederholungsanalysen ermittelten (s.3.6.2.3.b)

Peakflächen berücksichtigt wurde, die Wiederfindungsraten um bis zu 3,22% variierten. Die Ergebnisse der beiden Analysen sind unter 3.6.2.3 a und b dargestellt.

3.6.2.3a

Zur Herstellung der Standardlösung (S) entsprechend der Beschreibung unter 2.8.4 wurden 10,3 mg Pilocarpin-Base verwendet. Das Elutionsvolumen nach der Festphasenextraktion betrug 5,6 ml.

Ausgangskonzentration (s. Gl. 2.8.4.1):	0,01925 mg/ ml
Peakfläche Standard (PFS):	246046
Peakfläche Probe (PFP):	85866
Konzentration Probe (KP) (s. Gl.2.8.5.1)	0,01881 mg/ ml

Die Wiederfindungsrate in diesem Versuch betrug 97,74 %

3.6.2.3.b

In diesem Versuch wurden zur Herstellung der Standardlösung (S) entsprechend der Beschreibung unter 2.8.4, 10,9 mg Pilocarpin-Base verwendet. Das Elutionsvolumen nach der Festphasenextraktion betrug 5,4 ml. Die Standardlösung wurde dreimal, die Probelösung viermal analysiert.

Ausgangskonzentration (s. Gl. 2.8.4.1):	0,0204 mg/ ml
Peakfläche Standard (PFS):	277061 + 274828 + 275864 / 3 = 275917,66
Peakfläche Probe (PFP):	99768 + 100800 + 101412 + 102996 / 4 = 101244
Konzentration Probe (KP) (s. Gl.2.8.5.1)	0,0202 mg/ ml

Die Wiederfindungsrate in diesem Versuch betrug 99,02 %

Bemerkung:

Würde man nur die 1. Analyse der Probe berücksichtigen (PFP: 99768), käme man auf eine Wiederfindungsrate von 97,57 %.

3.6.2.4 Wiederfindungsrate in "gespicktem Extrakt"

Um die Auswirkungen der Festphasenextraktion auf eine bekannte Menge von Pilocarpin unter den Bedingungen der Aufreinigung eines Blattextraktes zu untersuchen, wurde ein gespickter Extrakt angefertigt. Dazu wurden 0,5 ml einer Standardlösung bekannter Konzentration (s.2.8.4) mit dem Extrakt alter Blätter der Versuchspflanze Nr. 9644735 auf ein Volumen von 10ml aufgefüllt. Die Konzentration des Blattextraktes war zuvor bestimmt worden (s. Düngungsversuch 3.13).

Zunächst wurde die Ausgangskonzentration des "gespickten Extraktes" ermittelt.

- a) Menge an Pilocarpin-Standard: $10,0 \text{ mg} \times 0,9347 / 25 \text{ ml} \times 0,5 \text{ ml} = \mathbf{0,1869 \text{ mg}}$
- b) Menge an Pilocarpin aus dem Blattextrakt: $0,0266 \text{ mg/ml} \times 9,5 \text{ ml} = \mathbf{0,2527 \text{ mg}}$
- c) **Ausgangskonzentration:** $(0,1869 \text{ mg} + 0,2527 \text{ mg}) / 10 \text{ ml} = \mathbf{0,04396 \text{ mg/ml}}$

Die Konzentration der Probe nach der Festphasenextraktion, das Elutionsvolumen betrug 5,8ml, wurde nach Gleichung 2.8.5.1 berechnet, wobei die Peakfläche und die Konzentration des Standards aus den Analysen des Düngungsversuches (s.3.13) übernommen wurden.

Konzentration der Probe: $220258 \times 0,01869 / 284809 \times 5,8 / 2 = \mathbf{0,04192 \text{ mg/ml}}$

Aus dem Vergleich der **Ausgangskonzentration** und der **Konzentration der Probe** ergab sich eine **Wiederfindungsrate von 95,36 %**.

3.7 Validierung der HPLC-Methode

Um zu prüfen, ob die ausgewählte HPLC-Methode (s.2.8) für die Analyse von Pilocarpin aus Blattextrakten von *P.microphyllus* Stapf geeignet war, wurden Versuche zur qualitativen und quantitativen Validierung durchgeführt. Dies zu untersuchen war eine wesentliche Aufgabe der Arbeit.

3.7.1 Qualitative Validierung

Beim Vergleich der Chromatogramme der wässrigen und methanolischen Standardlösungen (2.8.6.1.a) wurde beobachtet, daß das Lösungsmittel einen Einfluß auf die Auflösung des Chromatogrammes und die Retentionszeit von Pilocarpin hatte. Die Analyse der wässrigen Standardlösung zeigte einen gut ausdifferenzierten Peak bei 7.22 Minuten (s.Abb. 3.7.1.1),

während die Probe in methanolischer Lösung ein Signal bei 6.802 Minuten erzeugte, daß weniger gut ausdifferenziert war (s.Abb. 3.7.1.2). In beiden Fällen ist in der Anstiegsphase des Pilocarpinpeaks ein anderes Signal zu erkennen, welches im Fall der wässrigen Lösung auch vom Detektor als solches

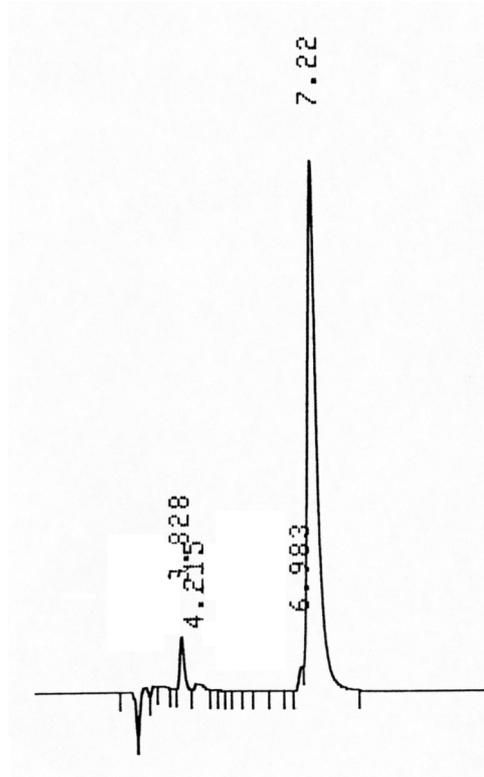


Abb. 3.7.1.1 Chromatogramm einer wässrigen Standardlösung

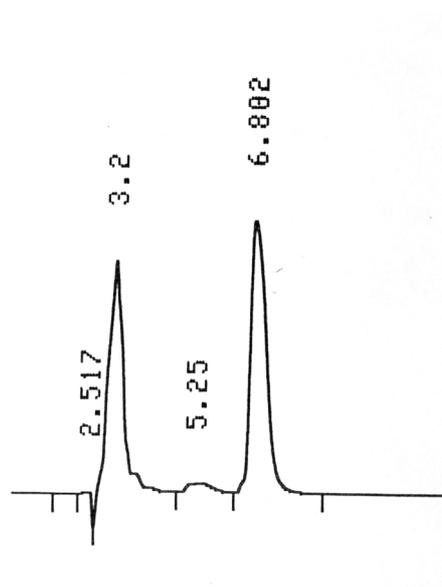


Abb. 3.7.1.2 Chromatogramm einer methanolischen Standardlösung

registriert wurde. Beim methanolischen Standard ist diese Signal zwar noch zu erahnen, wird aber vom Detektor nicht mehr als solches erkannt. Auch zu Beginn der Analysen waren die Chromatogramme der beiden unterschiedlichen Standardlösungen verschieden. In der wässrigen Lösung erschien nach 3.328 und 4.215 Minuten je ein ausdifferenzierter Peak. Im Chromatogramm des in Methanol gelösten Standards wurden mehrere schlecht aufgelöste Signale beobachtet (RT 3.2 und 5.25).

Im Folgenden wurden methanolische Standardlösungen von Pilocarpinchlorhydrat und Pilocarpin-Base analysiert und die entsprechenden Retentionszeiten (s.Tab. 3.7.1.) mit denen von Pilocarpinpeaks der Blattextrakte verglichen (s. 3.6.1.1).

Aus den Ergebnissen wurde geschlossen, daß mit der angewanten HPLC-Methode Pilocarpin in den Blattextrakten identifiziert werden konnte. Bei der Auswertung dieser Analysen wurden in den Chromatogrammen der Pilocarpinstandards außer dem Pilocarpinpeak mit einer Retentionszeit von etwa 6,7 noch weitere Signale beobachtet. Diese, schlecht aufgelösten Peaks traten etwa zwischen 1,5 und 3,5 Minuten nach der Injektion der Probe auf. Die gleichen Signale wurden nach der Injektion von Methanol beobachtet.

Tab. 3.7.1. Retentionszeiten Pilocarpinstandards

Probe	1. Analyse	2. Analyse	3. Analyse	Durchschnitt
Pilocarpin HCl	6.7	6.698	6.7	6.6993
Pilocarpin-Base	6.698	6.698	6.7	6.6986

3.7.2 Quantitative Validierung

Um Aussagen über die Linearität der Detektorantwort im Konzentrationsbereich der Analysen machen zu können, wurden sechs Standardlösungen (2.8.4) unterschiedlicher Konzentration hergestellt und analysiert. Die Ergebnisse wurden in einer Eichkurve (s. Abb. 3.7.2) dargestellt.

Aus der Gegenüberstellung der Konzentrationen der Standardlösungen mit den entsprechenden Detektorantwort ging hervor, daß die Messungen im untersuchten Bereich linear waren.

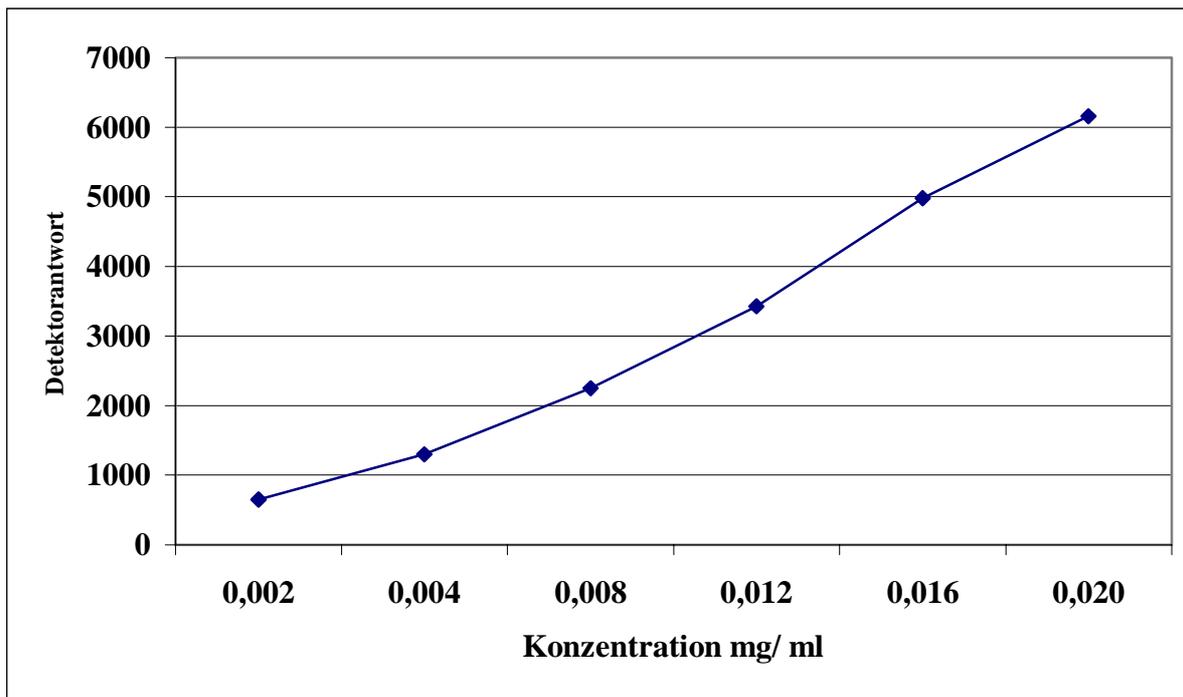


Abb. 3.7.2 Eichkurve zur Linearität der Detektorantwort

3.8 Einfluß des vegetativen Zustandes auf den Pilocarpingehalt

Basierend auf Aussagen, nach denen der Alkaloidmetabolismus unter anderem durch endogene Faktoren wie dem vegetativen Zustand der Pflanze beeinflusst wird (13, 22, 56), wurden die Pilocarpingehalte einiger Versuchspflanzen unter Berücksichtigung von Anzahl und Stadium der Blütenstände, dem Vorhandensein von Knospen, junger Triebe und Blätter sowie Früchten untersucht. Dazu wurden im Zeitraum von Januar bis Oktober 1999 Blattproben von sechs verschiedenen Versuchspflanzen analysiert (s. 2.9), deren vegetativer Zustand zum Zeitpunkt der Blatternte festgehalten wurde. Die ermittelten Pilocarpingehalte (s. Gl. 2.8.5.2) wurden anschließend graphisch den Beobachtungen des vegetativen Zustandes der entsprechenden Pflanze gegenübergestellt (Abb. 3.8.1 – 3.8.6).

Diese Graphiken zeigen zunächst, daß es im Untersuchungszeitraum Schwankungen in den Pilocarpingehalten der Blätter gegeben hat, und zwar mit deutlichen Unterschieden zwischen den einzelnen Pflanzen. Weiterhin wurde deutlich, daß es unter den gegebenen Untersuchungsbedingungen nicht möglich war, einen logischen Zusammenhang zwischen den Pilocarpingehalten und den jeweiligen vegetativen Zuständen der Pflanzen herzustellen. Dies galt nicht nur für die Schwankungen, die an einer Pflanze beobachtet wurden, sondern auch für vergleichbare Zustände bei den verschiedenen Versuchspflanzen. So wurden zum

Beispiel bei Pflanze Nr. 6311302 (s. Abb 3.8.5) sowohl zum Zeitpunkt der höchsten, als auch der niedrigsten Alkaloidgehalte immer junge Blütenstände und junge Blätter beobachtet. Bei Pflanze Nr. 5208821 (Abb. 3.8.3) wurden die höchsten Pilocarpingehalte in Anwesenheit von blühenden, bei Pflanze Nr. 7422573 (Abb. 3.8.6) von alten Blütenständen gemessen.

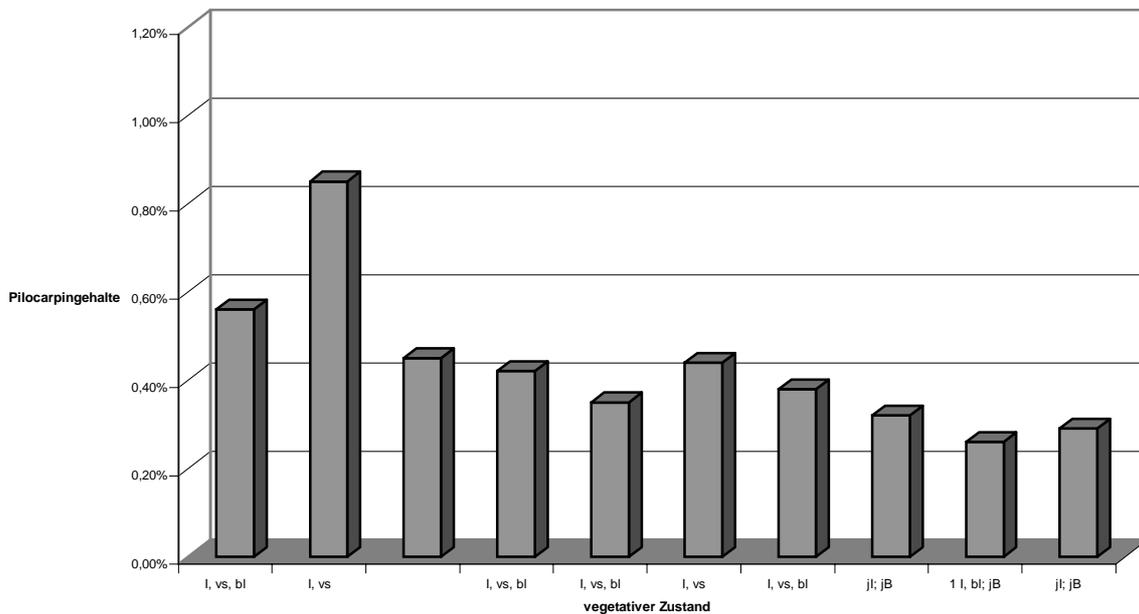


Abb. 3.8.1 Pilocarpingehalt in Blättern der Versuchspflanze Nr. 1860457

I: Blütenstand; B: Blätter; F: Früchte; K: Knospen
a: alt; j: jung; bl: blühend; r: reif; v: viele; vs: verschiedene Stadien

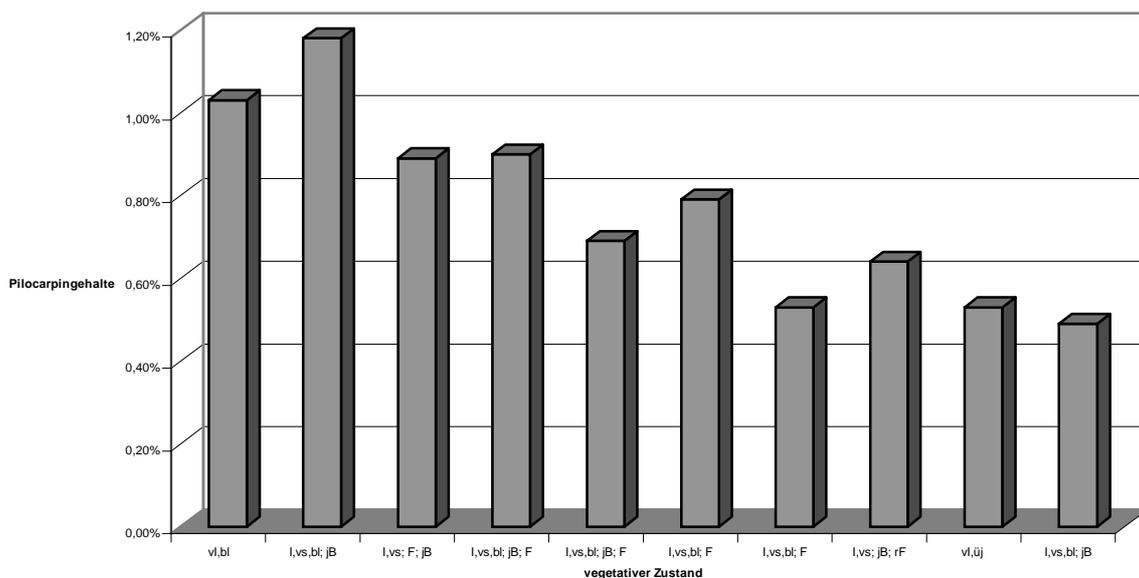


Abb. 3.8.2 Pilocarpingehalt in Blättern der Versuchspflanze Nr. 4193710

I: Blütenstand; B: Blätter; F: Früchte; K: Knospen
a: alt; j: jung; bl: blühend; r: reif; ü: überwiegend; v: viele; vs: verschiedene Stadien

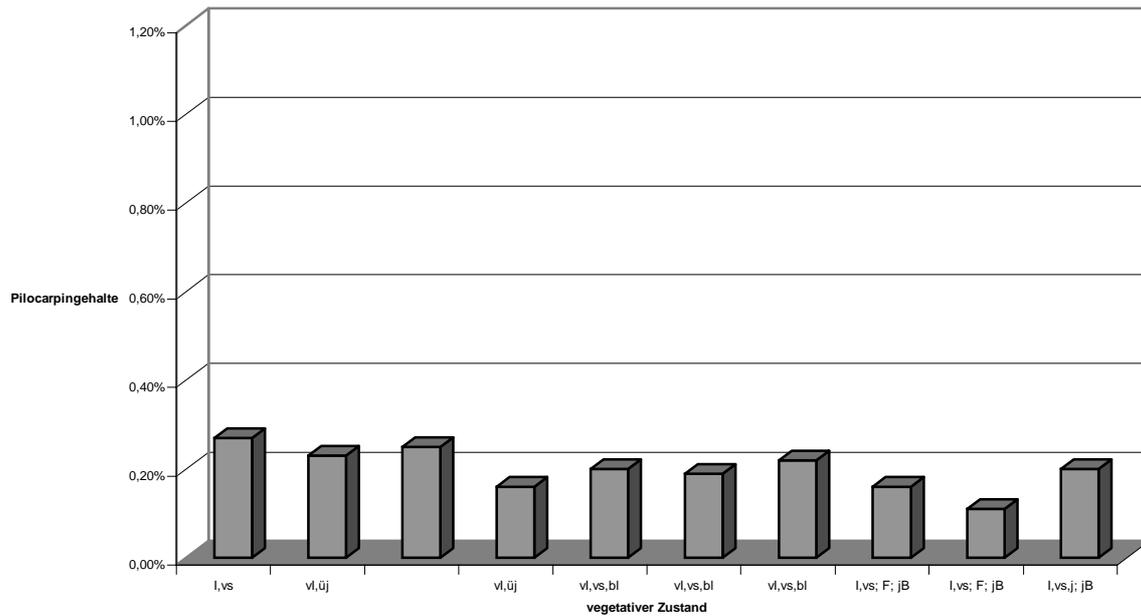


Abb. 3.8.3 Pilocarpingehalt in Blättern der Versuchspflanze Nr. 5208821

I: Blütenstand; B: Blätter; F: Früchte; K: Knospen

a: alt; j: jung; bl: blühend; r: reif; ü: überwiegend v: viele; vs: verschiedene Stadien

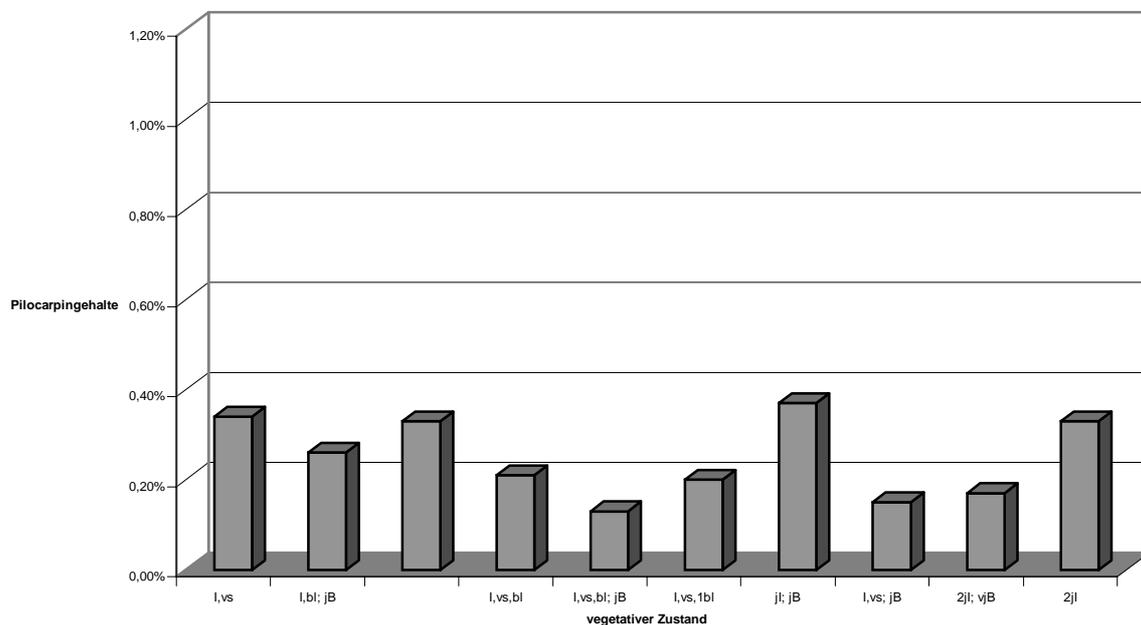


Abb. 3.8.4 Pilocarpingehalt in Blättern der Versuchspflanze Nr. 6319142

I: Blütenstand; B: Blätter; F: Früchte; K: Knospen

a: alt; j: jung; bl: blühend; r: reif; v: viele; vs: verschiedene Stadien

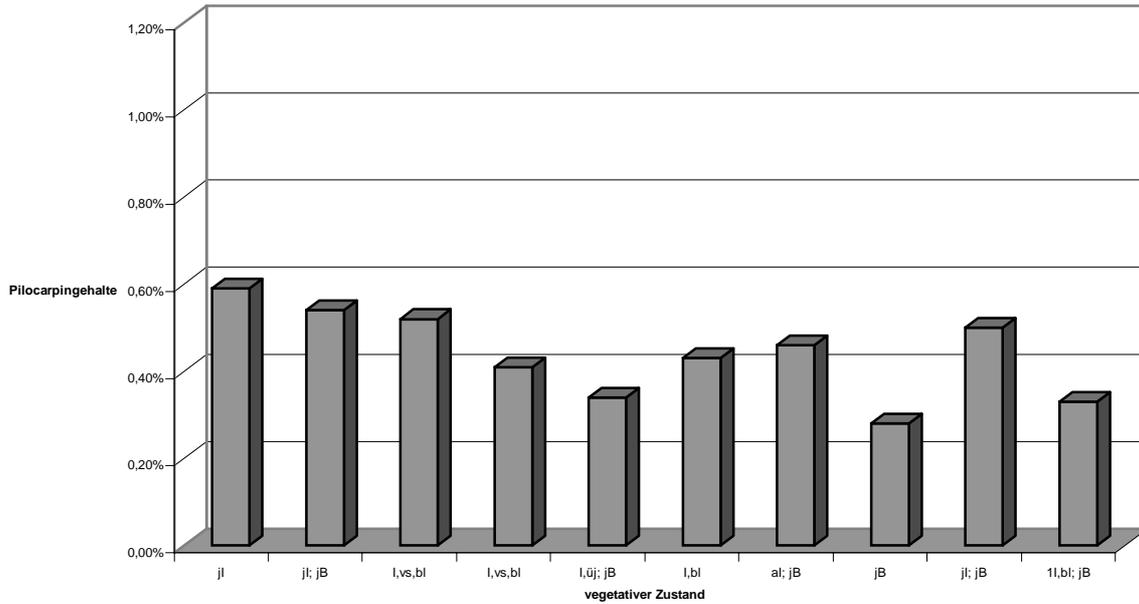


Abb. 3.8.5 Pilocarpingehalt in Blättern der Versuchspflanze Nr. 6311302

I: Blütenstand; B: Blätter; F: Früchte; K: Knospen

a: alt; j: jung; bl: blühend; r: reif; ü: überwiegend v: viele; vs: verschiedene Stadien

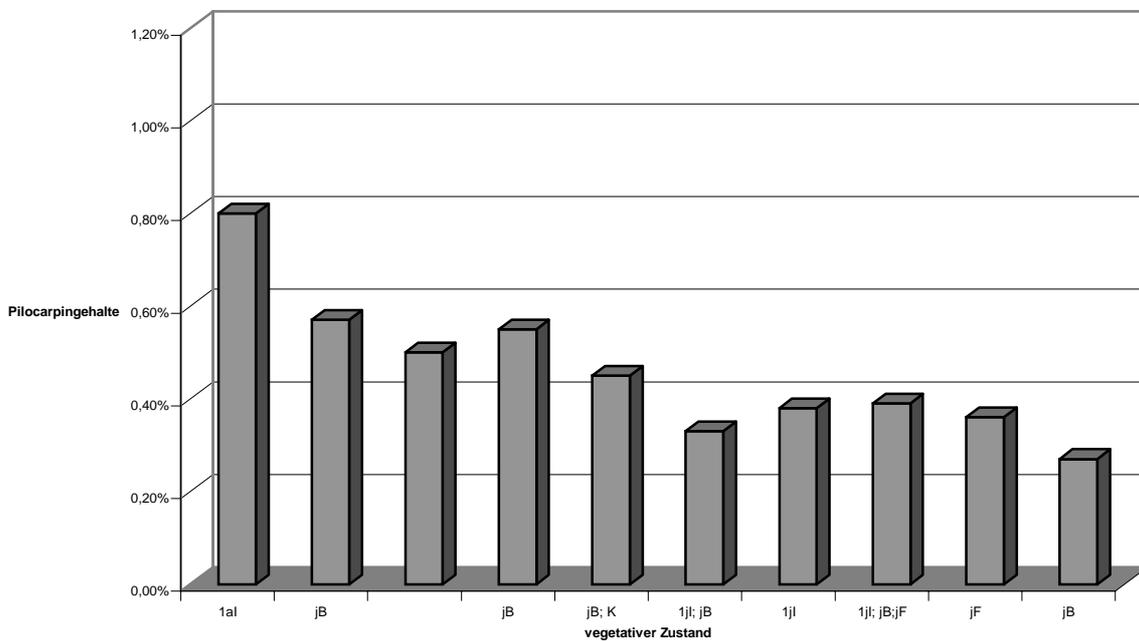


Abb. 3.8.6 Pilocarpingehalt in Blättern der Versuchspflanze Nr. 7422573

I: Blütenstand; B: Blätter; F: Früchte; K: Knospen

a: alt; j: jung; bl: blühend; r: reif; v: viele; vs: verschiedene Stadien

3.9 Untersuchungen zum Einfluß des Blattalters auf den Pilocarpingehalt

Nach Aussagen von Luckner (22) ist der Alkaloidmetabolismus in die Zelldifferenzierung so wie in die Entwicklung des ganzen Organismus integriert und steht somit in einem engen Zusammenhang mit anderen biochemischen Aktivitäten und morphologischen Merkmalen. In diesem Zusammenhang und gestützt von der Tatsache, daß zum Beispiel bei *Camellia sinensis* L. die Gehalte an Koffein und Catechin mit zunehmendem Blattalter abnehmen (36), wurde das Alter der Blätter als ein potentieller Faktor mit Einfluß auf den Pilocarpingehalt bewertet.

Um zu untersuchen in wie weit das Blattalter den Pilocarpingehalt der Blätter beeinflusst, wurden von sechzehn verschiedenen Versuchspflanzen jeweils gleichzeitig junge und alte Blätter geerntet und analysiert. Die Behandlung der Proben sowie die Analyse erfolgte nach den üblichen Methoden (s. 2.5 bis 2.8).

Wie aus Abbildung 3.9.1 zu erkennen ist, hatten die jungen Blätter immer höhere Pilocarpingehalte als die vergleichsweise älteren Blätter der gleichen Pflanze. Im Durchschnitt betrug dieser Unterschied 69,33 %, variierte jedoch teilweise beträchtlich je nach Versuchspflanze.

In diesem Zusammenhang sind die in Abbildung 3.9.2 wiedergegebenen Ergebnisse sehr aufschlußreich. Hierbei handelt es sich um die Darstellung der Pilocarpingehalte dreier Blattproben unterschiedlichen Alters von Pflanze Nr. 419874. Als Kriterien zur Einteilung der Proben in verschiedene Altersklassen wurden die Farbe der Blätter sowie ihre Größe berücksichtigt (s. Tab. 3.9.1). Es wurde beobachtet, daß mit zunehmendem Alter der Blätter der Pilocarpingehalt deutlich sank. Während die sehr jungen Blätter 1,28 % Pilocarpin enthielten, hatte sich der Gehalt bei den jungen, aber schon ausdifferenzierten Blättern mit 0,60 % etwa halbiert. In den alten Blättern wurden lediglich 0,07 % des Imidazolalkaloids nachgewiesen. Der Unterschied im Pilocarpingehalt zwischen sehr jungen und alten Blättern betrug etwa 94 %. Die entsprechenden Unterschiede bei den Versuchspflanzen 3086609 und 1860475 lagen in ähnlicher Größenordnung (s. Abb. 3.9.1).

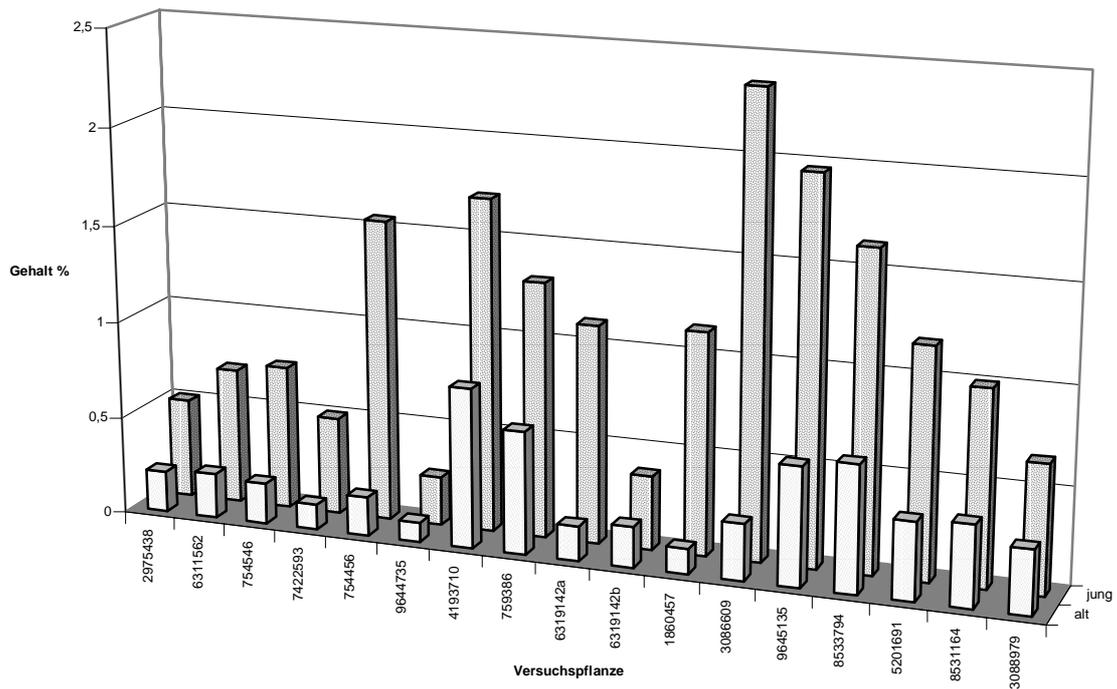


Abb. 3.9.1 Pilocarpingehalte junger und alter Blätter der jeweils selben Versuchspflanzen

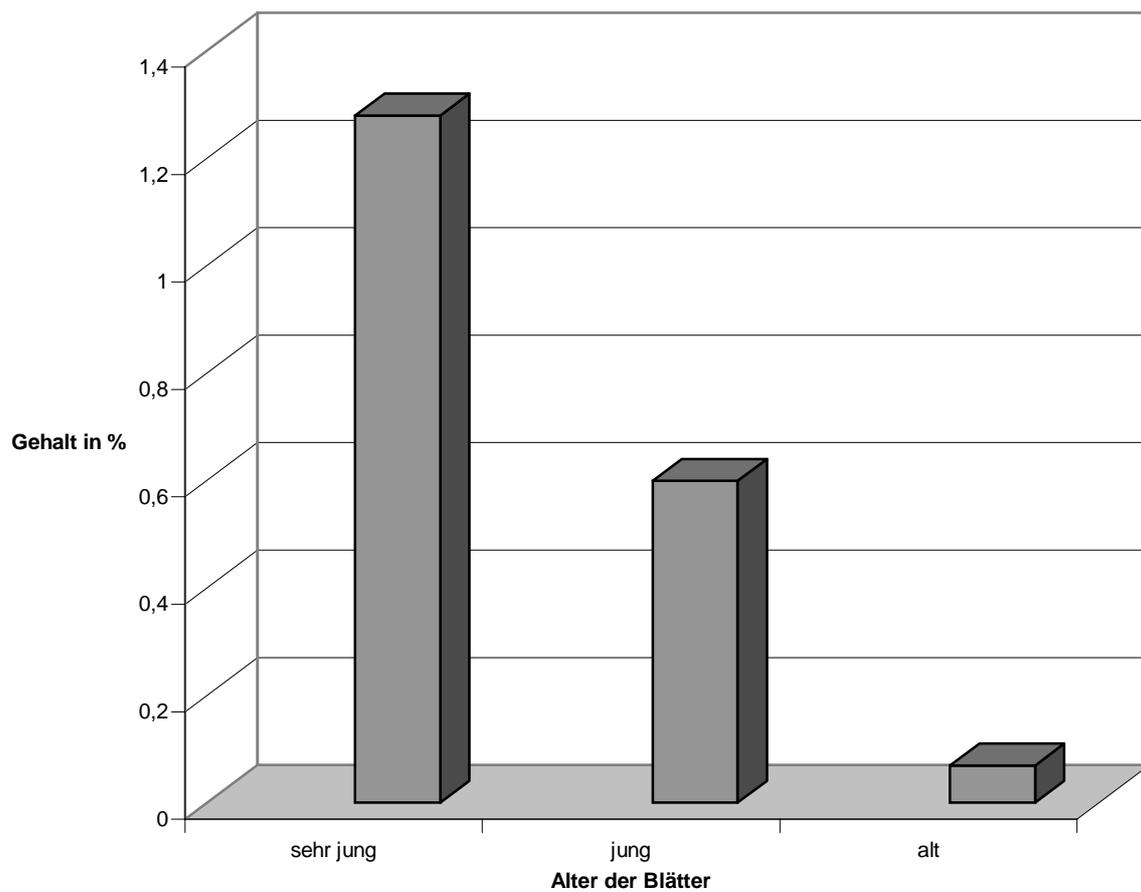


Abb. 3.9.2 Pilocarpingehalte in unterschiedlich alten Blättern von Pflanze Nr. 4198740

Tab. 3.9.1 Morphologische Merkmale der Blattproben von Pflanze Nr. 4198740

Altersklasse der Blätter	Morphologische Merkmale
Sehr jung	rötlich- braun, sehr weich, nicht ausdifferenziert
jung	hellgrün, weich, ausdifferenziert
alt	Dunkelgrün, fest, ausdifferenziert

3.10 Untersuchungen von Pflanzen gleicher Abstammung

Ziel dieser Untersuchungen war es herauszufinden, ob der Pilocarpingehalt in *P. microphyllus* Stapf genetisch determiniert ist. Basierend auf der Tatsache, daß der Sekundärstoffwechsel der Pflanzen auf eigenem genetischen Material beruht (22), sowie auf Beobachtungen, nach denen die Blätter der Versuchspflanzen teilweise sehr unterschiedliche Pilocarpingehalte aufwiesen, sollten Untersuchungen an genetisch identischen Pflanzen durchgeführt werden. Da es in mehreren Versuchen nicht gelungen war Stecklinge der Versuchspflanzen herzustellen (s. 3.4), wurden schließlich Blattproben von Sämlingen gleicher genetischer Herkunft (s. 3.3) analysiert. Dies allerdings in dem Wissen, daß es sich genetisch gesehen nicht um absolut identische Pflanzen handelte.

3.10.1 Stammpflanze 1864417

Fünf Samen dieser Pflanze waren am 05.01.1998 gekeimt (s. 3.3.1) und wurden zunächst in Töpfe gepflanzt, bevor sie nach einem Zeitraum von achtzehn Monaten in das Sonnenbeet gepflanzt wurden. Im Beet wurden die Pflanzen dann einzeln nummeriert. Nach zwei weiteren Monaten wurden Proben von alten, das heißt ausdifferenzierten Blättern jeder Pflanze genommen und analysiert. Zu diesem Zeitpunkt war eine zweifelsfreie Identifikation der Stammpflanze nicht mehr möglich.

Die drei Sämlinge unterschieden sich in den Pilocarpingehalten ihrer alten Blätter (s. Tab. 3.10.1) um bis zu knapp 50 %. Bei den Analysen fiel auf, daß sich die Chromatogramme der einzelnen Blattproben im Muster der Peakverteilung sehr ähnlich waren.

Tab. 3.10.1 Pilocarpingehalte in Sämlingen von Pflanze Nr. 1864417

Sämling Nr.	Pilocarpingehalt
0754456	1,96 mg/ g
7422593	1,27 mg/ g
9644735	0,99 mg/ g

3.10.2 Stammpflanze Nr. 1864327

Am 20.03.1998 waren fünf Samen dieser Versuchspflanze gekeimt (s. 3.3.3) und wurden in zwei Töpfe gepflanzt. Die Töpfe wurden in der Nähe der Stammpflanze aufgestellt, um möglichst vergleichbare Wachstumsbedingungen zu garantieren. Nach etwa zwei Jahren, am 25.02.2000, wurden die drei verbliebenen Sämlinge geerntet. Da die Sämlinge zum Zeitpunkt der Ernte nur etwa 20 cm groß waren und nur über eine geringe Menge Blätter verfügten, wurden jeweils alle Blätter einer Pflanze zu einer Probe vereinigt. Am selben Tag wurde auch eine Blattprobe der Stammpflanze genommen.

Die Pilocarpingehalte aller Proben (s. Tab. 3.10.2) variierten maximal um 21,1 %. Die Gehalte der Sämlinge untereinander unterschieden sich nur um 12,4 %. Auch hier konnten Ähnlichkeiten in den Chromatogrammen der einzelnen Proben festgestellt werden, wobei sich die Peakmuster der Sämlingsproben untereinander ähnlicher waren als gegenüber dem Muster der Stammpflanze (s. auch Abb 3.19.7 – 3.19.10).

Tab. 3.10.2 Pilocarpingehalte von Pflanzen gleicher genetischer Herkunft

Probe	Pilocarpingehalt
Stammpflanze Nr. 1864327	4,64 mg/ g
1. Sämling	4,05 mg/ g
2. Sämling	3,66 mg/ g
3. Sämling	4,18 mg/ g

3.11 Untersuchungen zum Einfluß der Jahreszeit auf den Pilocarpingehalt

Da die dynamischen Prozesse von Synthese und Degradation von Naturstoffen jahreszeitlich bedingten Schwankungen unterliegen können (13,22) sollte in diesem Versuch der mögliche Einfluß der Jahreszeit auf die Pilocarpingehalte in *P. microphyllus* Stapf untersucht werden.

Im Zeitraum von Januar 1999 bis Januar 2000 wurden dazu in monatlichen Abständen Blattproben von sechs verschiedenen Versuchspflanzen analysiert (s. 2.9). Nach dreizehn Monaten wurden die ermittelten Pilocarpingehalte jeder Pflanze graphisch dargestellt (s. Abb. 3.11.1-3.11.6) und ausgewertet.

Bei allen Versuchspflanzen wurden im Untersuchungszeitraum mehr oder weniger starke Schwankungen der Pilocarpingehalte beobachtet, die entsprechend der Auswahl (s. Tab. 2.9) auf unterschiedlichem Niveau lagen.

Während die Pilocarpingehalte in den Blättern von Pflanze 4193710 (Abb. 3.11.3) im Laufe des Jahres stetig abnahmen, konnte bei allen anderen Versuchspflanzen ein wellenförmiges Muster in den Schwankungen beobachtet werden. Dieses soll hier am Beispiel von Abbildung 3.11.4 erläutert werden: Nach einem relativ hohen Pilocarpingehalt im Januar, kam es bis etwa Juni zunächst zu einem kontinuierlichen Absinken der Gehalte. Nach einem kurzfristigem Anstieg in den Monaten Juli und August lagen die Gehalte im Oktober wieder etwa auf dem Niveau vom Juni, bevor sie dann bis zum Jahresende wieder anstiegen. Abgesehen von einigen Ausreißern und zeitlichen Verschiebungen der jeweiligen Minimalwerte, war dieses Muster bei allen Versuchspflanzen mehr oder weniger deutlich zu erkennen.

Die Pilocarpingehalte der Versuchspflanzen waren im Januar 2000 im Durchschnitt um 0,17 % niedriger als zu Beginn der Untersuchungen im Januar 1999. Die durchschnittlichen Pilocarpingehalte der einzelnen Versuchspflanzen, so wie die jeweiligen Höchst- und Tiefstwerte sind in den Abbildungen 3.11.1 – 3.11.6 angegeben.

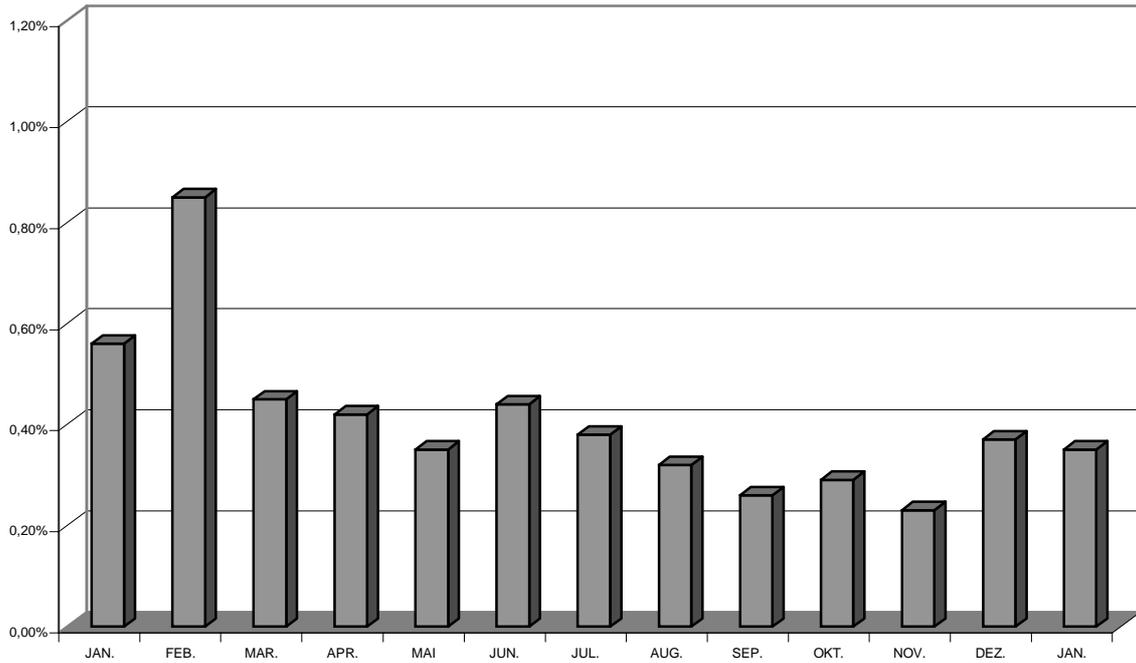


Abb.3.11.1 Pilocarpingehalte von Januar 1999 bis Januar 2000 der Pflanze Nr. 1860457 ;Ø: 0,41 %; Min.: 0,23 %; Max.: 0,85 %

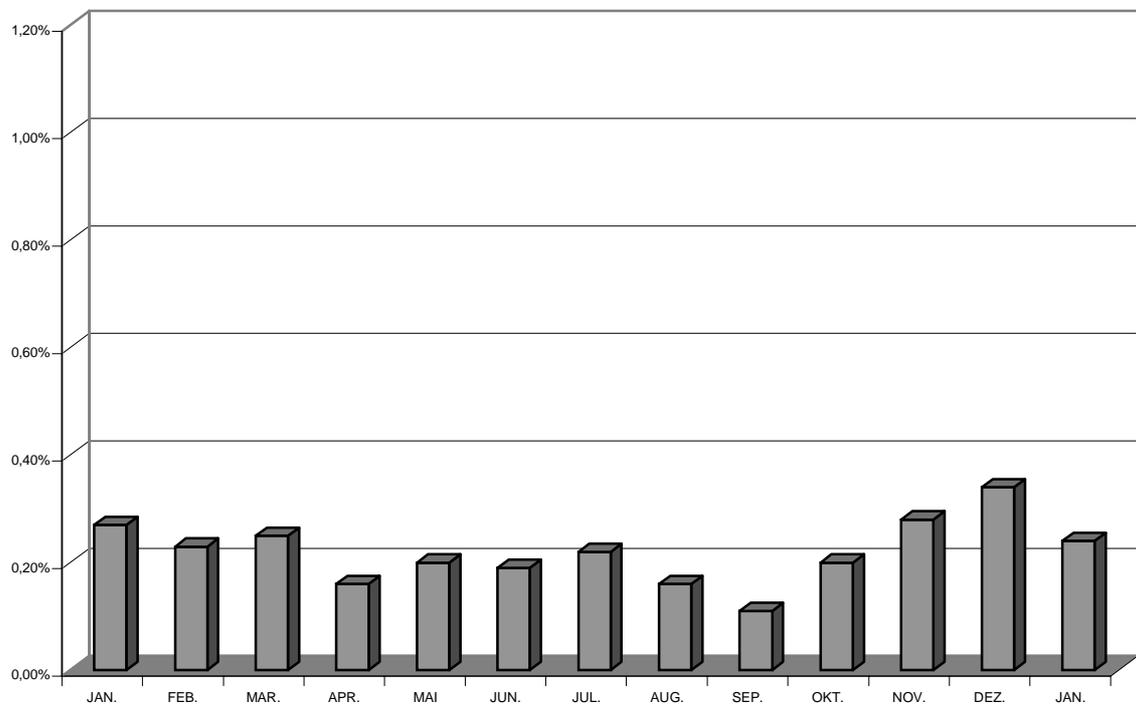


Abb. 3.11.2 Pilocarpingehalte von Januar 1999 bis Januar 2000 der Pflanze Nr.5208821; Ø: 0,23 %; Min.: 0,11 %; Max.: 0,34 %

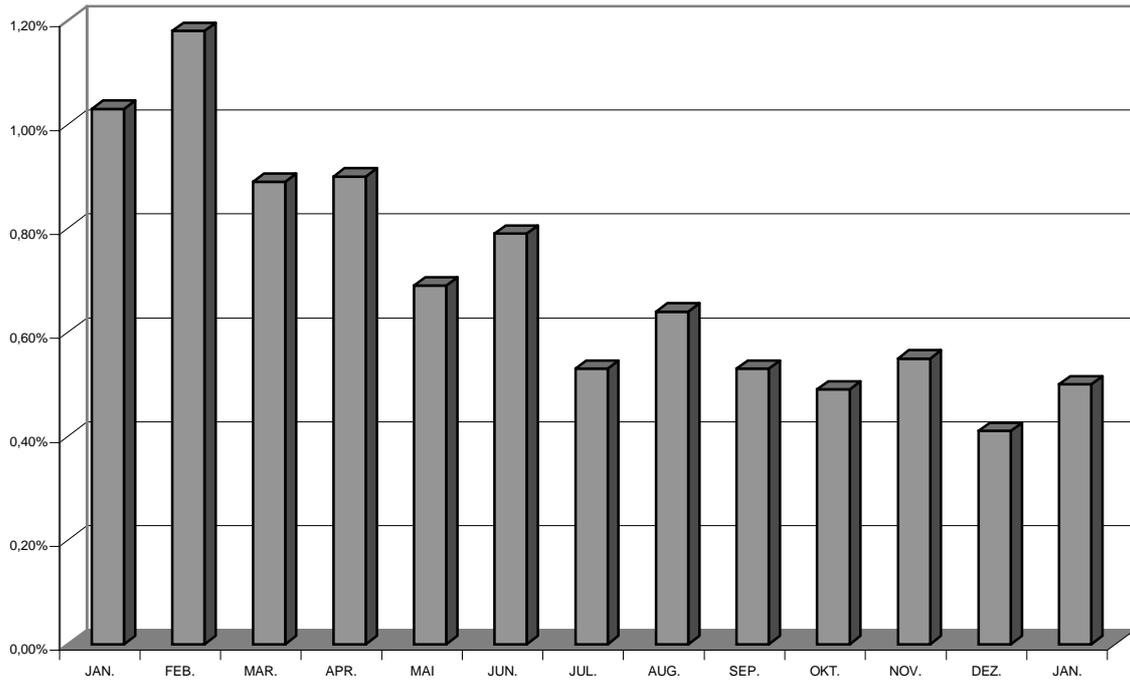


Abb. 3.11.3 Pilocarpingehalte von Januar 1999 bis Januar 2000 der Pflanze Nr.4193710; Ø: 0,70 %; Min.: 0,41 %; Max.: 0,1,18 %

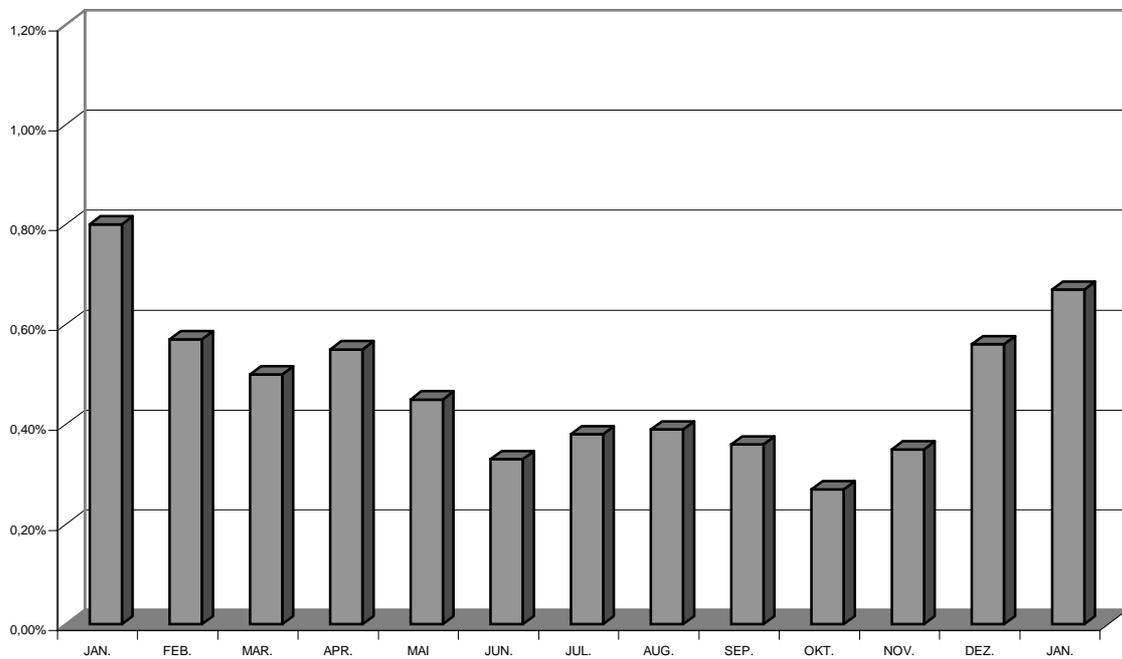


Abb. 3.11.4 Pilocarpingehalte von Januar 1999 bis Januar 2000 der Pflanze Nr.7422573
Ø: 0,48 %; Min.: 0,27 %; Max.: 0,80 %

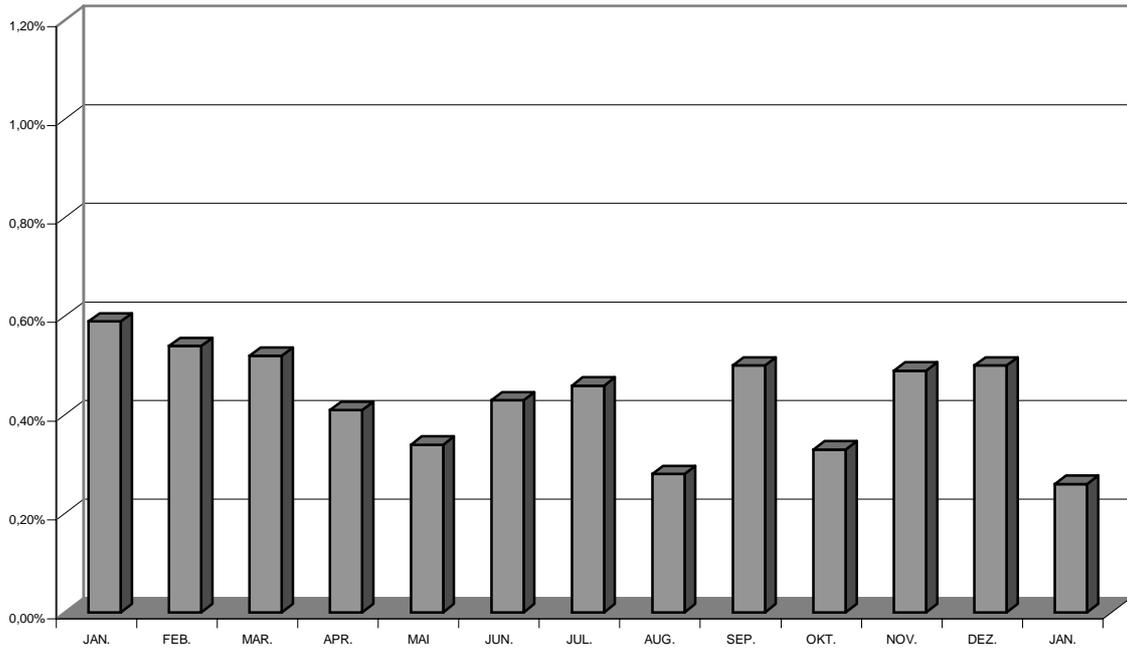


Abb. 3.11.5 Pilocarpingehalte von Januar 1999 bis Januar 2000 der Pflanze Nr.6311302
Ø: 0,42 %; Min.: 0,20 %; Max.: 0,59 %

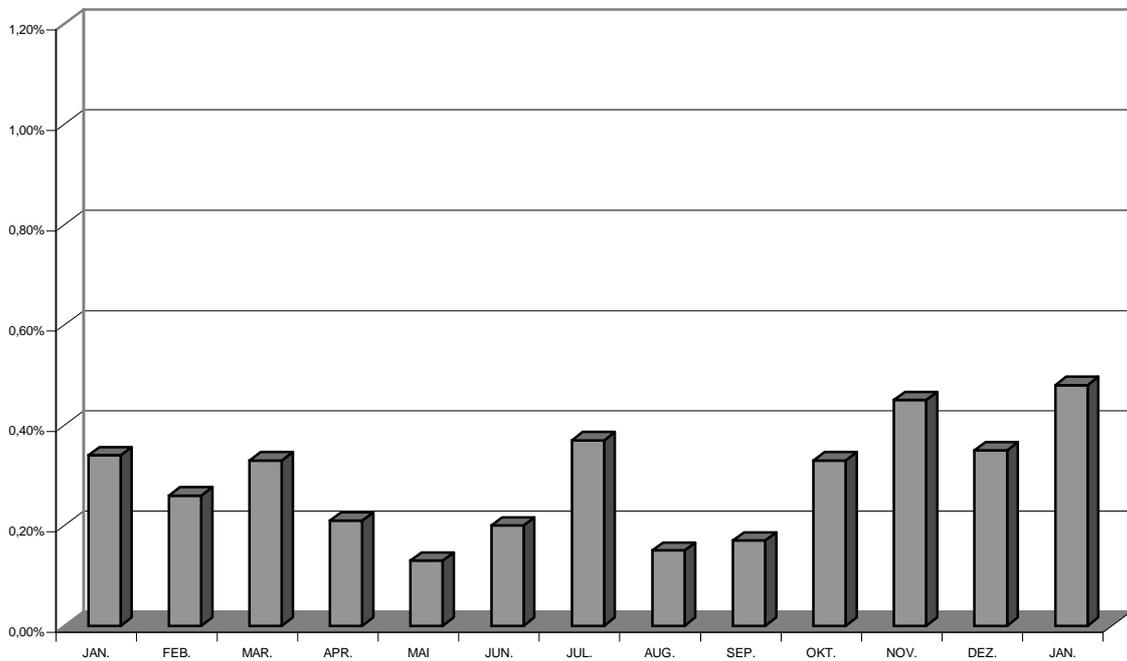


Abb. 3.11.6 Pilocarpingehalte von Januar 1999 bis Januar 2000 der Pflanze Nr.6319142
Ø: 0,29 %; Min.: 0,13 %; Max.: 0,48 %

3.12 Untersuchungen zum Einfluß der Lichtverhältnisse auf den Pilocarpingehalt

Unter den exogenen Faktoren mit Einfluß auf den Metabolismus von Naturstoffen wird der Faktor Licht besonders hervorgehoben (4). Um die Auswirkungen unterschiedlicher Strahlungsbedingungen auf den Pilocarpingehalt von *P. microphyllus* Stapf untersuchen zu können, waren die Versuchspflanzen in Freilandbeete mit und ohne Beschattung gepflanzt worden (s. 2.1.3). In diesen Untersuchungen wurde auf die Ergebnisse der *Untersuchungen zum Einfluß des Blattalters auf den Pilocarpingehalt* (s. 3.9) zurückgegriffen. Von den sechzehn Versuchspflanzen stammten acht aus dem Schattenbeet, die andere Hälfte war der natürlichen Sonnenstrahlung ausgesetzt. Die in den Analysen von 3.9 ermittelten Pilocarpingehalte junger und alter Blätter der selben Pflanze wurden zunächst gemittelt. Die so erhaltenen Durchschnittswerte wurden je nach Standort der Pflanze in zwei Gruppen eingeteilt (s. Tab. 3.12).

Bei der Auswertung der Ergebnisse wurde deutlich, daß die niedrigsten Pilocarpingehalte in Blattproben von Sonnenpflanzen zu finden waren. Die höchsten Gehalte des Alkaloids dagegen fanden sich in den Blättern der Schattenpflanzen. Eine Betrachtung der Durchschnittswerte bestätigt, daß die Blätter der Schattenpflanzen mit einem Gehalt von 8,99 mg/ g deutlich mehr Pilocarpin enthalten, als die der Sonnenpflanzen mit 5,71 mg Pilocarpin pro Gramm Trockengewicht. Der Unterschied entspricht 36,55 % (s. Abb.3.12).

Tab. 3.12. Durchschnittliche Pilocarpingehalte der Pflanzen nach Standort

Sonnenbeet		Schattenbeet	
Pflanze Nr.	Ø Pilocarpingehalt	Pflanze Nr.	Ø Pilocarpingehalt
2975438	3,65 mg / g	759386	9,68 mg / g
6311562	4,56 mg / g	6319142	4,74 mg / g*
754546	4,75 mg / g	3086609	13,29 mg / g
7422593	3,15 mg / g	9645135	12,85 mg / g
754456	8,73 mg / g	8533794	11,43 mg / g
9644735	1,77 mg / g	5201691	7,90 mg / g
4193710	12,64 mg / g	8531164	7,07 mg / g
1860457	6,39 mg / g	3088979	4,97 mg / g

* Durchschnittliches Ergebnis aus 2 Analysen der selben Pflanze

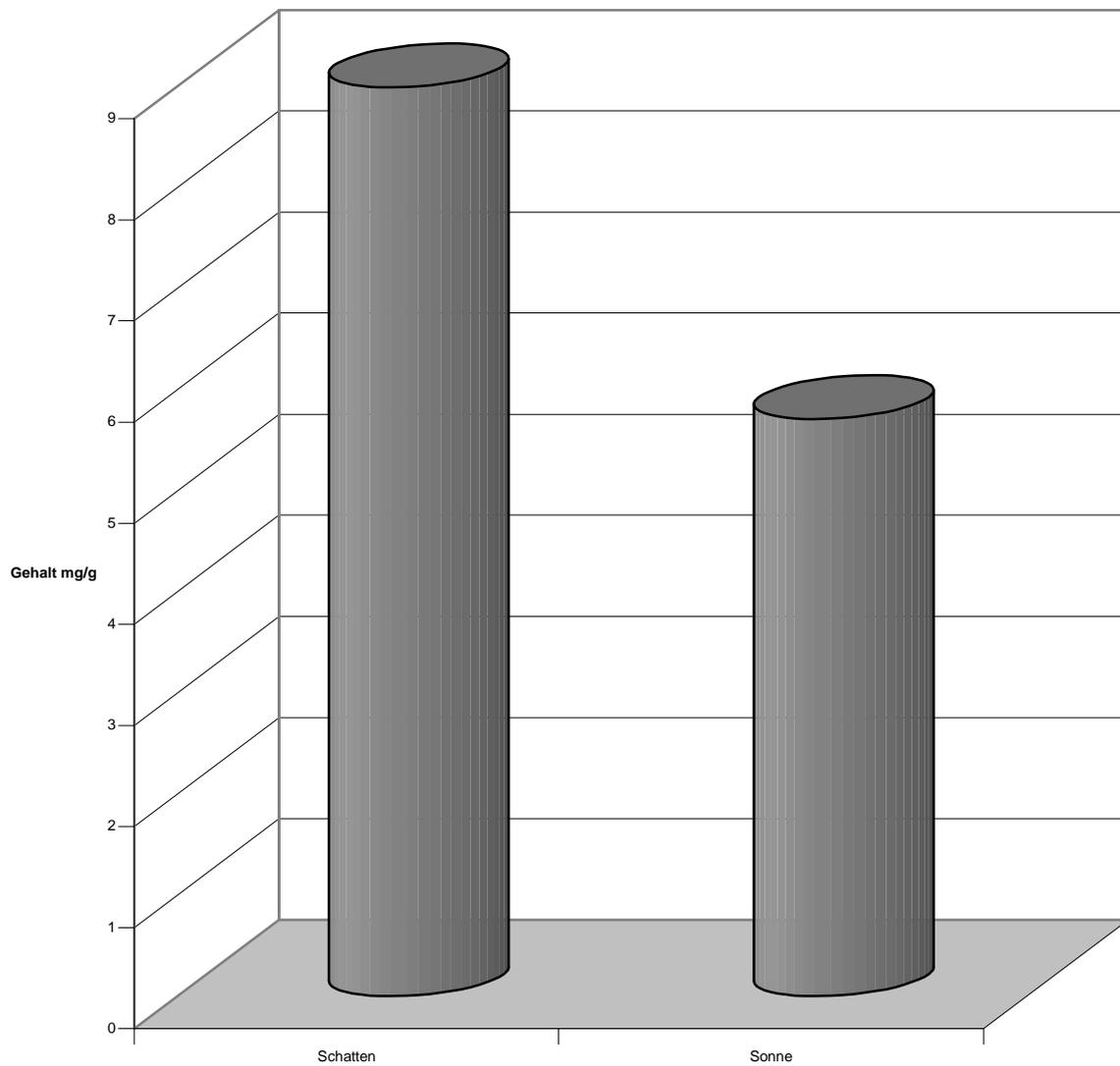


Abb. 3.12 Vergleich der Pilocarpingehalte in Blattproben von je 8 Sonnen und Schattenpflanzen.

3.13 Düngungsversuch

Zu den exogenen Faktoren mit einem theoretischem Einfluß auf den Metabolismus von Pilocarpin in *P. microphyllus* Stapf gehören die Nährstoffe (13, 22). Mit dem unter 2.10 beschriebenen Düngungsversuch sollte untersucht werden, ob eine Zugabe von Nährstoffen sich auf den Pilocarpingehalt auswirkt. Bei den Probenahmen an den drei Versuchspflanzen wurde jeweils versucht, die Blätter so auszuwählen, daß der Unterschied zwischen jungen und alten Blättern möglichst groß war. Da aber nicht immer an jeder Pflanze junge Blätter gleichen Alters zu finden waren, wurde der vegetative Zustand der Probe festgehalten (s. Tab.3.13.1).

Tab. 3.13.1 Beschreibung des vegetativen Zustandes der Blattproben

Probe	vor der Düngung	nach der Düngung
7422593 jung	Nicht ausgewachsene Blätter; hellgrün, teilweise rötlich	ausgewachsene Blätter, hellgrün
7422593 alt	ausgewachsene Blätter, dunkelgrün	ausgewachsene Blätter, dunkelgrün
0754456 jung	Nicht ausgewachsene Blätter; hellgrün, teilweise rötlich	ausgewachsene Blätter, hellgrün
0754456 alt	ausgewachsene Blätter, dunkelgrün	ausgewachsene Blätter, dunkelgrün
9644735 jung	ausgewachsene Blätter, grün; geringer Unterschied zu alt	Nicht ausgewachsene Blätter; hellgrün, teilweise rötlich
9644735 alt	ausgewachsene Blätter, dunkelgrün	ausgewachsene Blätter, dunkelgrün

Die Auswertung des Versuches erbrachte eine durchschnittliche Steigerung des Pilocarpingehaltes um 50 % nach der Düngung der Pflanzen. Mit Ausnahme der jungen Blätter von Pflanze Nr. 0754456 war der Pilocarpingehalt in allen Proben nach der Düngung höher als vor der Zugabe der Nährstoffe (s. Tab.3.13.2). Besonders auffällig war der Anstieg der Pilocarpingehalte in den Proben der alten Blätter. Hier lagen die durchschnittlichen Werten um 291 % höher als vor der Düngung. Bei den jungen Blättern machte das verbesserte Nährstoffangebot im Durchschnitt eine Erhöhung um lediglich 5,5 % des Pilocarpingehaltes aus (s. Tab. 3.13.3).

Die Pilocarpingehalte in den Tabellen 3.13.2 und 3.13.3 wurden nach Gleichung 2.8.5.2 berechnet und sind in mg pro Gramm trockenes Blattmaterial angegeben.

Tab. 3.13.2 Pilocarpingehalte der Blattproben in Abhängigkeit von der Düngung

Probe	Pilocarpingehalt vor der Düngung	Pilocarpingehalt nach der Düngung
7422593 jung	5,02 mg/ g	5,98 mg/ g
7422593 alt	1,27 mg/ g	5,95 mg/ g
0754456 jung	15,50 mg/ g	9,14 mg/ g
0754456 alt	1,96 mg/ g	3,97 mg/ g
9644735 jung	2,55 mg/ g	9,22 mg/ g
9644735 alt	0,99 mg/ g	6,65 mg/ g

Tab. 3.13.3 Durchschnittliche Änderung der Pilocarpingehalte der Blattproben in Abhängigkeit von der Düngung

	vor der Düngung	nach der Düngung	Differenz
Gesamt	4,54 mg/ g	6,81 mg/ g	+2,27 mg/g (50 %)
Junge Blätter	7,69 mg/ g	8,11 mg/ g	+0,42 mg/ g (5,5 %)
Alte Blätter	1,41 mg/ g	5,52 mg/ g	+4,11 mg/g (291 %)

3.14 Pilocarpingehalte verschiedener Pflanzenteile

Sekundärstoffe kommen nicht in allen Organen, Geweben und Zellen in gleichen Mengen vor (22), und die Orte ihrer Synthese und Akkumulation sind häufig voneinander getrennt (13). In seiner Dissertation stellt Nunes (27) die Hypothese auf, daß in Exemplaren von *P. pennatifolius* der größte Teil des Pilocarpinmoleküls, das sogenannte Pilocarpidin, in der Wurzel synthetisiert wird und erst nach dem Transport in die Blätter zu Pilocarpin methyliert wird.

Um Informationen über die Verteilung und Konzentrationen von Pilocarpin in *P. microphyllus* Stapf zu bekommen, wurden verschiedene Pflanzenteile auf ihren Gehalt an

dem Imidazolalkaloid analysiert. Die Probenahme, Aufarbeitung und Analyse der Proben erfolgte wie bei den Blattproben (s. 2.15).

3.14.1 Pilocarpingehalte verschiedener Pflanzenteile derselben Pflanze

Um einen direkten Vergleich zu ermöglichen, stammten die unterschiedlichen Proben zunächst von den jeweils selben Pflanzen. An unterschiedlichen Tagen wurden von den Versuchspflanzen Nr. 3088979 und 4199080 jeweils verschiedene Proben genommen und analysiert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.14.1 wiedergegeben.

Tab. 3.14.1 Pilocarpingehalte verschiedener Pflanzenteile derselben Pflanze

Probe	Pflanze Nr. 3088979	Pflanze Nr. 4199080
Junge Blätter	6,64 mg/ g	-
Alte Blätter	3,29 mg/ g	5,32 mg/ g*
Unverholzter Sproß	3,01 mg/ g	5,43 mg/ g
Verholzter Sproß	0,66 mg/ g	2,62 mg/ g
Wurzel	2,45 mg/ g	0,73 mg/ g
Grüne Früchte	-	4,85 mg/ g
Knospen	8,32 mg/ g	-
Junge Blütenstände	4,44 mg/ g	-

* Ausdifferenzierte Blätter vom unverholzten Sproß

Bei der Betrachtung der Ergebnisse von Pflanze 3088979 fällt auf, daß die höchsten Pilocarpingehalte in Proben mit jungem Pflanzenmaterial gefunden wurden. Weiterhin ist der im Vergleich zur entsprechenden Probe bei Pflanze 4199080 relativ hohe Pilocarpingehalt der Wurzel bemerkenswert. Unabhängig von der Probe waren die Peakmuster in den jeweiligen Chromatogrammen identisch.

Die Pilocarpingehalte aller Proben von Versuchspflanze Nr. 4199080, die grüne Pflanzenteile enthielten, lagen auf einem ähnlichen Niveau. Hierbei sind die nahezu gleichen Gehalte der Probe mit unverholztem Sproß und der mit Blättern, die an diesem Sproß wuchsen, bemerkenswert. Auch bei diesen Untersuchungen wurden große Ähnlichkeiten zwischen den Peakmustern der einzelnen Proben beobachtet.

Die Ergebnisse aus den Analysen der beiden Pflanzen zusammenfassend, lassen sich folgende vier Gruppen von Pflanzenteilen bilden, deren Pilocarpingehalte jeweils in der selben Größenordnung liegen:

I	II	III	IV
Kospen	unverholzte Sprosse	grüne Früchte	verholzte Sprosse
Junge Blätter	alte Blätter	junge Blütenstände	Wurzeln

3.14.2 Pilocarpingehalte in Wurzelproben verschiedener Proben

Da in den ersten Analysen (3.14.1) recht unterschiedliche Pilocarpingehalte in den Wurzelproben gefunden wurden, sollten mit diesen Untersuchungen mehr Informationen über die Situation in den Wurzeln gewonnen werden. Dazu wurden Proben der Stammpflanze und der Sämlinge aus den in Kapitel 3.10.2 beschriebenen Versuchen verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.14.2 dargestellt.

Tab. 3.14.2 Pilocarpingehalte in Wurzelproben verschiedener Proben

Versuchspflanze	Pilocarpingehalt
Nr. 1864327	4,64 mg/g
1. Sämling	1,04 mg/ g
2. Sämling	1,56 mg/g
3. Sämling	1,29 mg/ g

Auffällig war zunächst der relativ hohe Gehalt an Pilocarpin in den Wurzeln der Pflanze Nr. 1864327. Mit 4,64 mg/ g enthielt die Wurzelprobe genau so viel Pilocarpin wie die am selben Tag geernteten Blätter dieser Pflanze (s. Tab. 3.10.2). Demgegenüber lagen die Pilocarpingehalte in den Wurzeln der Sämlinge deutlich niedriger, aber auf ähnlichem Niveau.

Die Peakmuster der Chromatogramme aller Analysen waren sehr ähnlich, unterschieden sich jedoch deutlich von den Chromatogrammen der Blattanalysen (s. 3.10.2).

3.15 Trocknungsversuche

Die Behandlung von Arzneipflanzen beziehungsweise deren Teile nach der Ernte hat einen maßgeblichen Einfluß auf die Qualität und Haltbarkeit der entsprechenden Drogen (14). Dem Trocknungsprozeß kommt hierbei eine zentrale Rolle zu. Auf der einen Seite werden die Drogen beim Trocknen durch das Unterbinden von enzymatischen Prozessen und mikrobiologischem Verderb haltbar gemacht, andererseits kann es aber auch zu einem Abbau der Wirkstoffe kommen (37). Im Fall von *Pilocarpus* stellt die Trocknung insofern ein Problem dar, da es oftmals an den natürlichen Standorten nicht möglich ist, die Blätter sofort nach der Ernte zu trocknen. Aus praktischen und finanziellen Gründen kommt an solchen Standorten auch nur eine natürliche Trocknung in Frage.

In dieser Versuchsreihe wurden zwei Varianten der natürlichen Trocknung einer künstlichen Trocknung gegenübergestellt (s. 2.11.1). Jeweils 20 beziehungsweise 63 Tage nach der Ernte des Pflanzenmaterials wurden die unterschiedlich getrockneten Proben analysiert. Die Pilocarpingehalte wurden entsprechend der Gleichung 2.8.5.2 berechnet und beziehen sich wie üblich jeweils auf 1 Gramm trockenes Blattmaterial.

In beiden Analysen wurden in der Ofen-Variante die jeweils höchsten Pilocarpingehalte nachgewiesen. Nach zwanzig Tagen hatten die im Schatten getrockneten Blätter einen höheren Gehalt an Pilocarpin als die Blätter der Sonnen-Variante. Dieses Verhältnis war jedoch nach 63 Tagen umgekehrt (s. Tab. 3.15.1). Es fällt auf, daß die Ergebnisse der Ofen- und Sonnen-Variante 63 Tage nach der Ernte um etwa 18% höher liegen als in den ersten Analysen. Der Pilocarpingehalt der im Schatten getrockneten Blätter lag dagegen um etwa 25% niedriger als nach 20 Tagen (s. Tab. 3.15.1).

Tab. 3.15.1 Pilocarpingehalte der Trocknungsvarianten

Analyse	Ofen	Sonne	Schatten
Nach 20 Tagen	3,00 mg / g	2,22 mg / g	2,53 mg / g
Nach 63 Tagen	3,56 mg / g	2,61 mg / g	1,89 mg / g

Die Sonnentrocknung erschien nach etwa drei Wochen zunächst als die ungünstigste Variante. Nach einem Zeitraum von etwa zwei Monaten jedoch hatten die im Schatten getrockneten Blätter die bei Weitem niedrigsten Pilocarpingehalte.

Aus der Gegenüberstellung der jeweiligen Trocknungsvarianten (s. Tab. 3.15.2) ging hervor, daß die künstliche Trocknung deutlich höhere Pilocarpingehalte der Blätter zur Folge hatte als die Varianten der natürlichen Trocknung. Beim Vergleich der beiden natürlichen Varianten lagen die Pilocarpingehalte der im Schatten getrockneten Blätter nach zwanzig Tagen um 12,25 % über den Werten der Sonnen-Variante. Nach 63 Tagen jedoch wurde in den Blättern der Sonnen-Variante 27,58 % mehr Pilocarpin gefunden als in der Probe aus der Schattentrocknung.

Tab. 3.15.2 Gegenüberstellung der Trocknungsvarianten

Varianten	Differenz nach 20 Tagen	Differenz nach 63 Tagen
Ofen / Sonne	+ 26,66 %	+ 26,68 %
Ofen / Schatten	+ 15,66 %	+ 46,91 %
Sonne / Schatten	- 12,25 %	+ 27,58 %

3.16 Degradationsanalysen

Es ist allgemein bekannt, daß eine unsachgemäße Lagerung von Drogen zu einer Degradation der entsprechenden Wirkstoffe führen kann. Im Zusammenhang mit der Herstellung von Pilocarpin weist Hamerslag (11) allerdings darauf hin, daß die Blätter von *Pilocarpus* selbst bei Lagerung unter kühlen und trockenen Bedingungen im Laufe eines Jahres bis zu 50 % ihres Pilocarpingehaltes verlieren können. Unter Ausnutzung von Restproben der Langzeituntersuchungen (s. 2.9) wurden in dieser Versuchsreihe Blattproben mit einer Lagerzeit von bis zu einem knappen Jahr auf einen möglichen Abbau von Pilocarpin hin analysiert (s. 2.12).

Je nach Probe und Lagerzeit wurden Verluste im Pilocarpingehalt zwischen etwa fünf und knapp dreißig Prozent festgestellt. Im Folgenden werden die Ergebnisse nach Versuchspflanzen getrennt aufgeführt.

Wie aus Tabelle 3.16.1 zu erkennen ist, haben sich die Pilocarpingehalte in den Blattproben der Versuchspflanze Nr. 5208821 im Zeitraum von elf Monaten um maximal 6,35 % verringert. Die Ergebnisse der Probe vom Dezember 1999 wurden nicht

berücksichtigt, da ein Anstieg des Pilocarpingehaltes in getrockneten Blättern schlecht erklärbar ist.

Tab. 3.16.1 Pilocarpingehalt von Versuchspflanze Nr.5208821 in Abhängigkeit der Lagerung der Blätter

Ernte	Gehalt bei Ernte	Gehalt am 18.01.00	Differenz
12/ 99	3,40 mg/ g	3,76 mg/ g	+0,36 mg/ g (9,57%)
09/99	1,14 mg/ g	1,08 mg/ g	- 0,06 mg/ g (5,26%)
06/99	1,83 mg/ g	1,74 mg/ g	- 0,09 mg/ g (4,92%)
02/99	2,36 mg/ g	2,21 mg/ g	- 0,15 mg/ g (6,35%)

Bei den Wiederholungsanalysen der Blattproben von Versuchspflanze Nr. 6319142 konnte eine mit zunehmender Lagerzeit verstärkte Degradation beobachtet werden (Tab. 3.16.2). Nach drei Monaten war der Pilocarpingehalt der Probe um 7,85 % gegenüber dem Vergleichswert gesunken. Nach sechs Monaten wurde 11,64 % und nach acht Monaten 17,10 % weniger Pilocarpin in den Proben gefunden als zum Zeitpunkt der Ernte.

Tab. 3.16.2 Pilocarpingehalt von Versuchspflanze Nr. 6319142 in Abhängigkeit der Lagerung der Blätter

Ernte	Gehalt bei Ernte	Gehalt am 23.02.00	Differenz
11/99	4,46 mg/ g	4,11 mg/ g	- 0,35 mg/ g (7,85%)
08/99	1,46 mg/ g	1,29 mg/ g	-0,17 mg/g (11,64%)
06/99	1,93 mg/ g	1,60 mg/ g	-0,33 mg/g (17,10%)

Mit bis zu 28,47 % wurden in den Proben der Pflanze Nr. 1860457 der stärkste Abbau von Pilocarpin in dieser Versuchsreihe beobachtet. Es ist außerdem bemerkenswert, daß die Degradation nach drei Monaten mit 27,95 % nur unwesentlich geringer ausgefallen war als nach 10 Monaten Lagerzeit (s. Tab. 3.16.3).

Tab. 3.16.3 Versuchspflanze Nr. 1860457

Ernte	Gehalt bei Ernte	Gehalt am 28.03.00	Differenz
11/99	2,29 mg/ g	1,65 mg/ g	-0,64 mg/g (27,95%)
08/99	3,13 mg/ g	2,59 mg/ g	-0,45 mg/g(17,25%)
06/99	4,39 mg/ g	3,28 mg/ g	-1,11 mg/ g(25,28%)
04/99	4,18 mg/ g	2,99 mg/ g	-1,19 mg/ g(28,47%)

Unter den ausgewählten Analysebedingungen war es in keinem Fall möglich einen Anstieg etwaiger Degradationsprodukte in den HPLC-Chromatogrammen zu erkennen.

3.17 pH-Wert Bestimmung von wässrigen Blattextrakten

In der Literatur über Pilocarpin wird immer wieder auf die Bedeutung des pH-Wertes im Zusammenhang mit der Degradation dieses Imidazolalkalodes hingewiesen (2, 8, 27). Um Informationen bezüglich der pH-Situation in unterschiedlich getrockneten Blättern zu erhalten, wurden wässrige Extrakte verschiedener Blattproben analysiert (s. 2.13). Bei den Proben handelte es sich zum einen um Blätter aus den verschiedenen Behandlungen der Trocknungsversuche (s. 2.11) und zum anderen um frische Blätter, deren pH-Wert sofort nach der Ernte bestimmt wurde.

Wie in Tabelle 3.17 dargestellt, lagen alle gemessenen Werte im sauren pH-Bereich, wobei der pH- Wert der im Schatten getrockneten Blätter schon als neutral zu bewerten war. Die sauersten Bedingungen wurden in den Proben der Ofen- und Sontrocknung registriert. Der pH-Wert des Extraktes der frischen Blätter lag zwischen den beiden anderen Werten jedoch mehr in den sauren Bereich verschoben.

Tab. 3.17 pH-Werte verschiedener Blattextrakte

Probe	pH-Wert
Frische Blätter	5,82
Getrocknete Blätter (Ofenvariante)	5,44
Getrocknete Blätter (Sonnenvariante)	5,44
Getrocknete Blätter (Schattenvariante)	6,73

3.18 Analyse frischer Blätter

Die Trocknung der Pilocarpusblätter dient im allgemeinen zunächst zur Haltbarmachung der Droge. Im Zusammenhang dieser Dissertation wurden die Proben aber hauptsächlich getrocknet, um eine einheitliche Bezugsgröße für die Ergebnisse zu schaffen. Inwiefern das Trocknen der Blätter einen Einfluß auf den Extraktionsprozeß beziehungsweise die Pilocarpingehalte hatte, sollte in dieser Untersuchung ermittelt werden.

Dieser Versuch wurde entsprechend der Beschreibung in Kapitel 2.14 mit Proben der Pflanzen Nr. 5208821 und 4193710 durchgeführt. Mit Hilfe der in den HPLC-Analysen ermittelten Peakflächen wurden nach Gleichung 2.8.5.1 die Pilocarpinkonzentrationen der einzelnen Proben berechnet. Um die Ergebnisse der frischen Blätter mit den trockenen Blattproben vergleichen zu können, wurde ein Trocknungsverlust von 61 % angenommen (s.2.14).

Nach diesen Berechnungen enthielten die frischen Blätter von Pflanze Nr. 4193710 32,7% mehr Pilocarpin als die zuvor getrocknete Blattprobe. Bei den Proben von Pflanze Nr. 5208821 dagegen lag der Pilocarpingehalt der frischen Blätter um 19,7 % unter dem Wert der getrockneten Blätter. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.18 dargestellt. In den Chromatogrammen der frischen Blätter wurden die gleichen Peaks beobachtet wie bei den entsprechenden Analysen der Extrakte getrockneter Blätter.

Tab. 3.18 Pilocarpingehalte frischer und getrockneter Blätter

Pflanze Nr.	Gehalt frischer Blätter	Gehalt getrockneter Blätter
4193710	17,51 mg/ g	11,78 mg/ g
5208821	1,89 mg/ g	2,36 mg/ g

3.19 Chromatogrammmuster

Im Verlauf der Untersuchungen war aufgefallen, daß sich in den Chromatogrammen der einzelnen Analysen bestimmte Muster in der Peakverteilung wiederholten. Aus Gründen, die in den Kapiteln 3.6.1.2 und 3.7.1 besprochen wurden, konnten bei diesen Vergleichen nur Signale mit einer Retentionszeit von über 4 berücksichtigt werden.

Eine genauere Betrachtung dieser Muster führte zu folgenden Ergebnissen:

In den Analysen der Langzeituntersuchungen (2.9) war die Peakverteilung in den Chromatogrammen von Blattextrakten derselben Pflanze über einen Zeitraum von bis zu 12 Monaten immer gleich (Vgl. Abb. 3.19.1 und 3.19.2). Die einzigen Unterschiede lagen in den Relationen der einzelnen Signale zueinander.

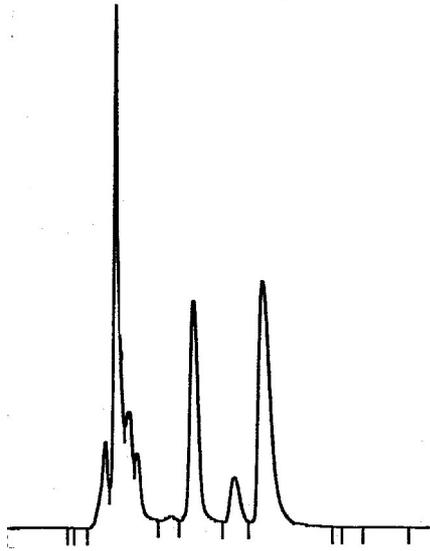


Abb. 3.19.1 Chromatogramm der Pflanze 4193710 im Januar 1999

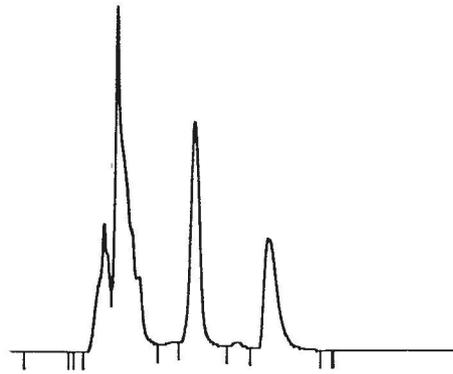


Abb. 3.19.2 Chromatogramm der Pflanze 4193710 im Januar 2000

Dies war besonders ausgeprägt beim Vergleich der Signalspektren junger und alter Blätter derselben Pflanze (Vgl. Abb. 3.19.3 und 3.19.4).

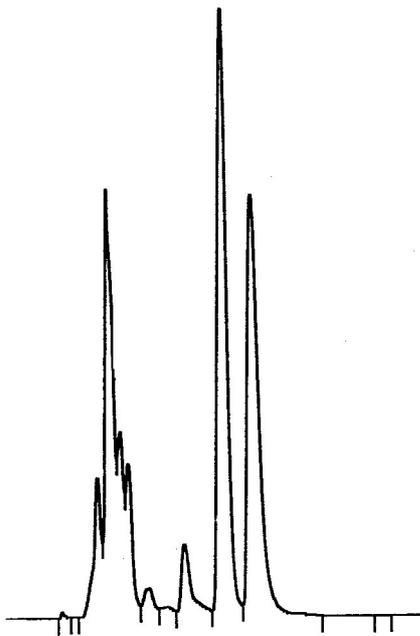


Abb. 3.19.3 Chromatogramm junger Blätter der Pflanze 4193710 im März 1999

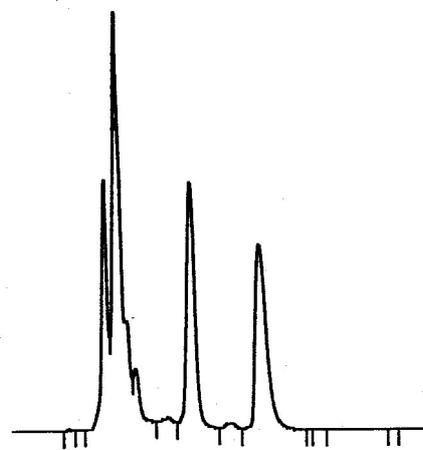


Abb. 3.19.4 Chromatogramm alter Blätter der Pflanze 4193710 im März 1990

Die Detektoraufzeichnungen der Analysen verschiedener Pflanzenteile derselben Pflanze zeigten im Falle der oberirdischen Organe ebenfalls immer die gleichen Peaks, wenn auch in verschiedenen Größenverhältnissen. In den Abbildungen 3.19.5 und 3.19.6 sind die Chromatogramme einer Blattprobe und solche einer Probe unverholzter Sprosse von Pflanze Nr. 4199080 dargestellt.

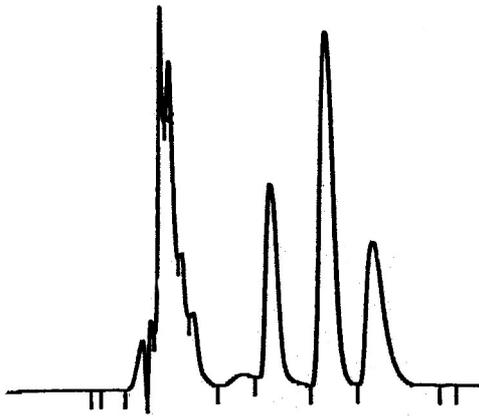


Abb. 3.19.5 Chromatogramm einer Blattprobe von Pflanze Nr. 4199080

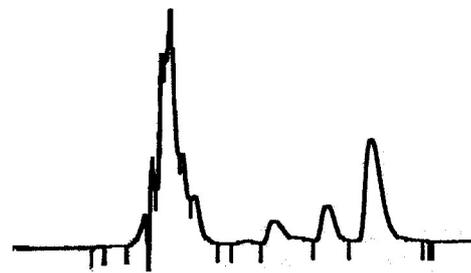


Abb. 3.19.6 Chromatogramm einer unverholzten Sproßprobe von Pflanze Nr. 4199080

Wurzelproben zeigten bis auf eine Ausnahme demgegenüber veränderte Chromatogramme.

Während sich die Chromatogrammuster verschiedener Pflanzen normalerweise unterschieden, waren sich solche von Individuen gleicher Abstammung oftmals sehr ähnlich. In einer Untersuchung (3.10.2) waren die Sämlinge sich in diesem Aspekt untereinander ähnlicher als jeweils gegenüber der Stammpflanze. Abbildung 3.19.7 zeigt das Chromatogramm der Stammpflanze Nr. 1864327. In den Abbildungen 3.19.8 – 3.19.10 sind die Chromatogramme der drei Sämlinge dargestellt.

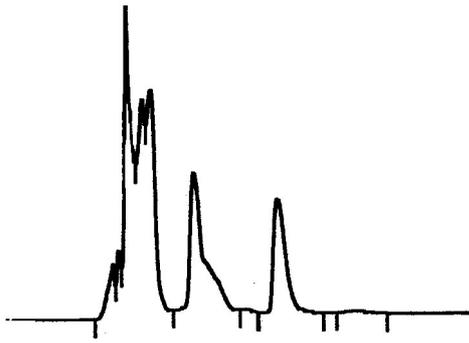


Abb. 3.19.7 Chromatogramm von Pflanze Nr. 1864327

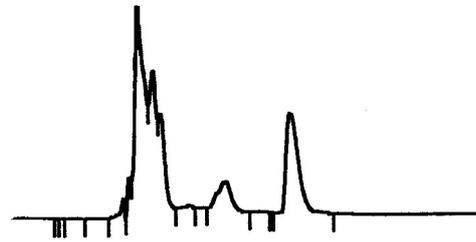


Abb. 3.19.8 Chromatogramm von Sämling 1

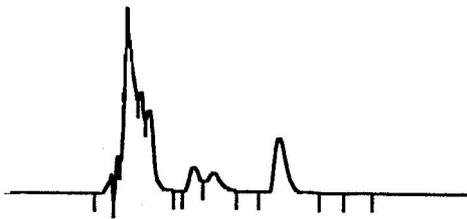


Abb. 3.19.9 Chromatogramm von Sämling 2

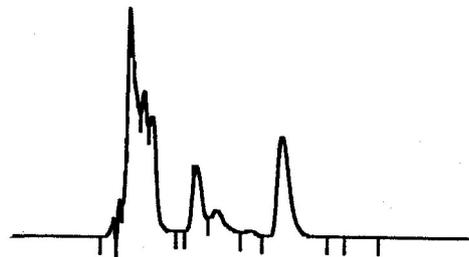


Abb. 3.19.10 Chromatogramm von Sämling 3

Bei allen Unterschieden zwischen den Signalspektren der verschiedenen Exemplare von *P. microphyllus* Stapf ließen sich die Pflanzen jedoch in Gruppen mit ähnlichen Mustern einteilen. Versuche, diese auf der Zusammensetzung der Chromatogramme beruhenden Gruppen mit morphologischen Merkmalen der Blätter in einen Bezug zu bringen, waren erfolglos.

Am Beispiel der folgenden drei Abbildungen wird deutlich, daß Versuchspflanzen mit vergleichbaren Chromatogrammmustern sich in ihrer Blattmorphologie deutlich unterscheiden können (Abb.3.19.11 – 3.19.13).

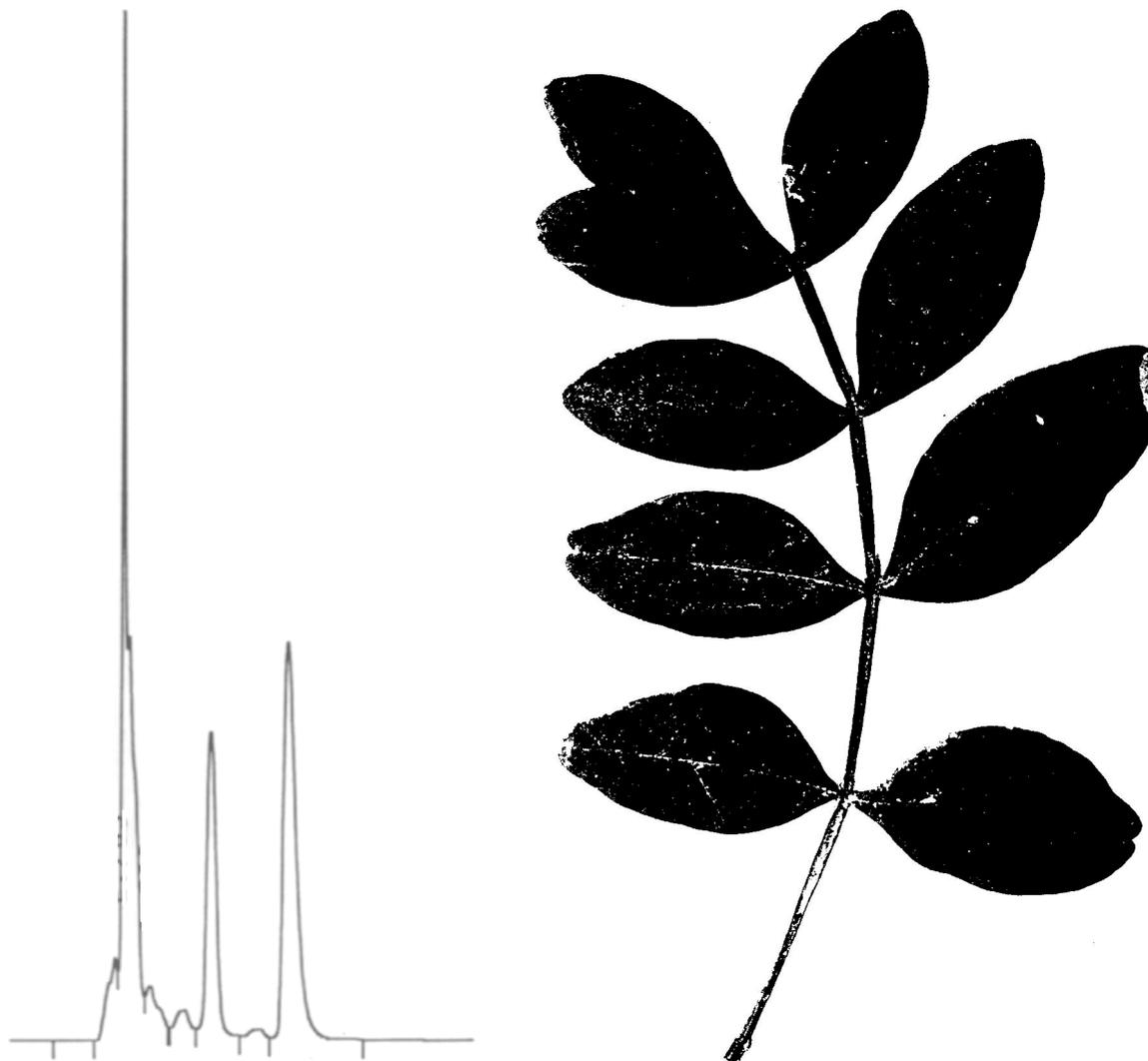


Abb. 3.19.11 Chromatogramm und Fotokopie eines Blattes von Pflanze Nr. 4199320

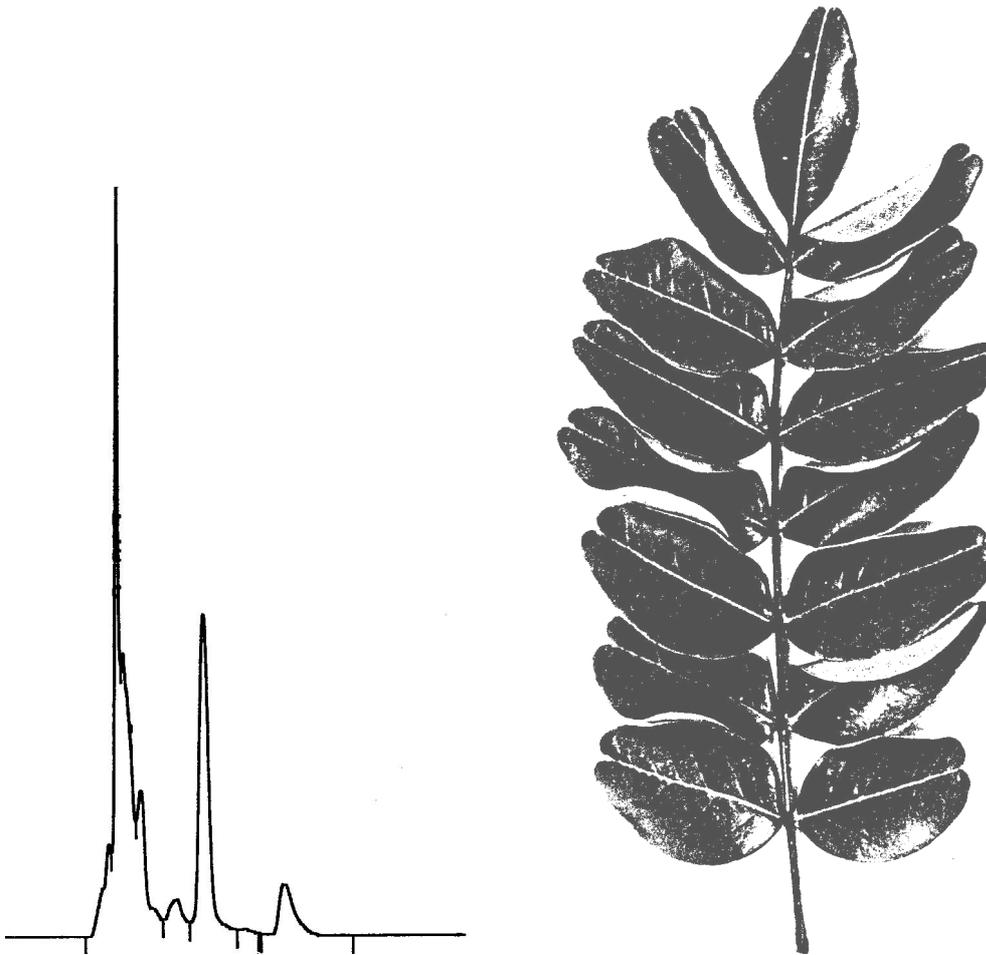


Abb. 3.19.12 Chromatogramm und Fotokopie eines Blattes von Pflanze Nr. 2975708

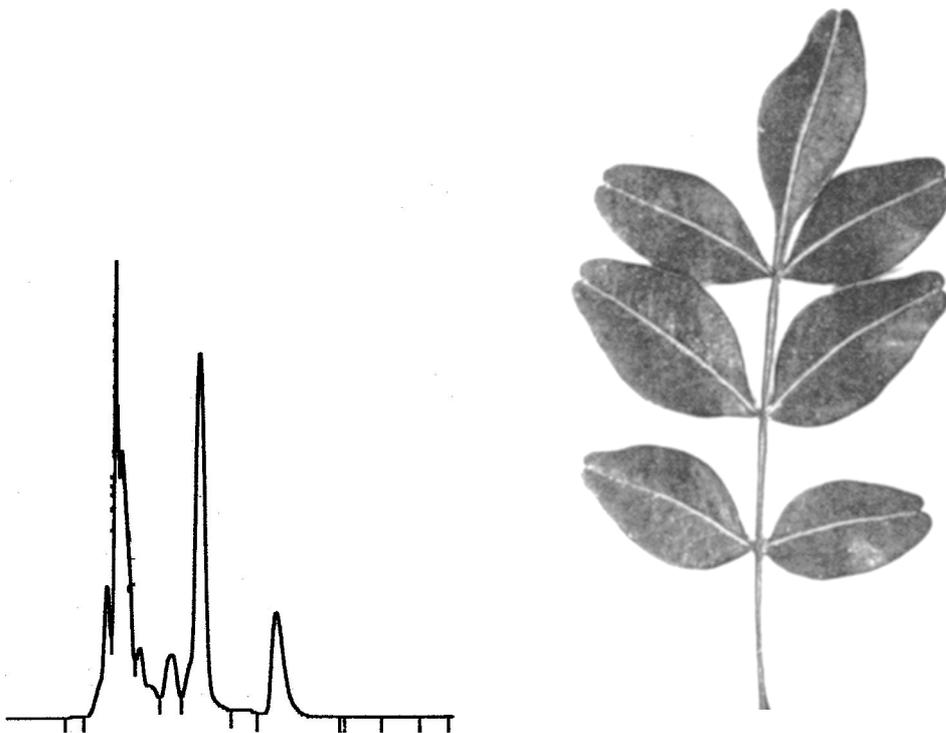


Abb. 3.19.13 Chromatogramm und Fotokopie eines Blattes von Pflanze Nr. 2975308

Während sich morphologisch gesehen die Blätter der Pflanze Nr. 2975308 (Abb. 3.19.13) und solche der folgenden Abbildungen (Abb. 3.19.14, 3.19.15) relativ ähnlich sind, unterscheiden sich die entsprechenden Signalspektren jedoch deutlich voneinander.

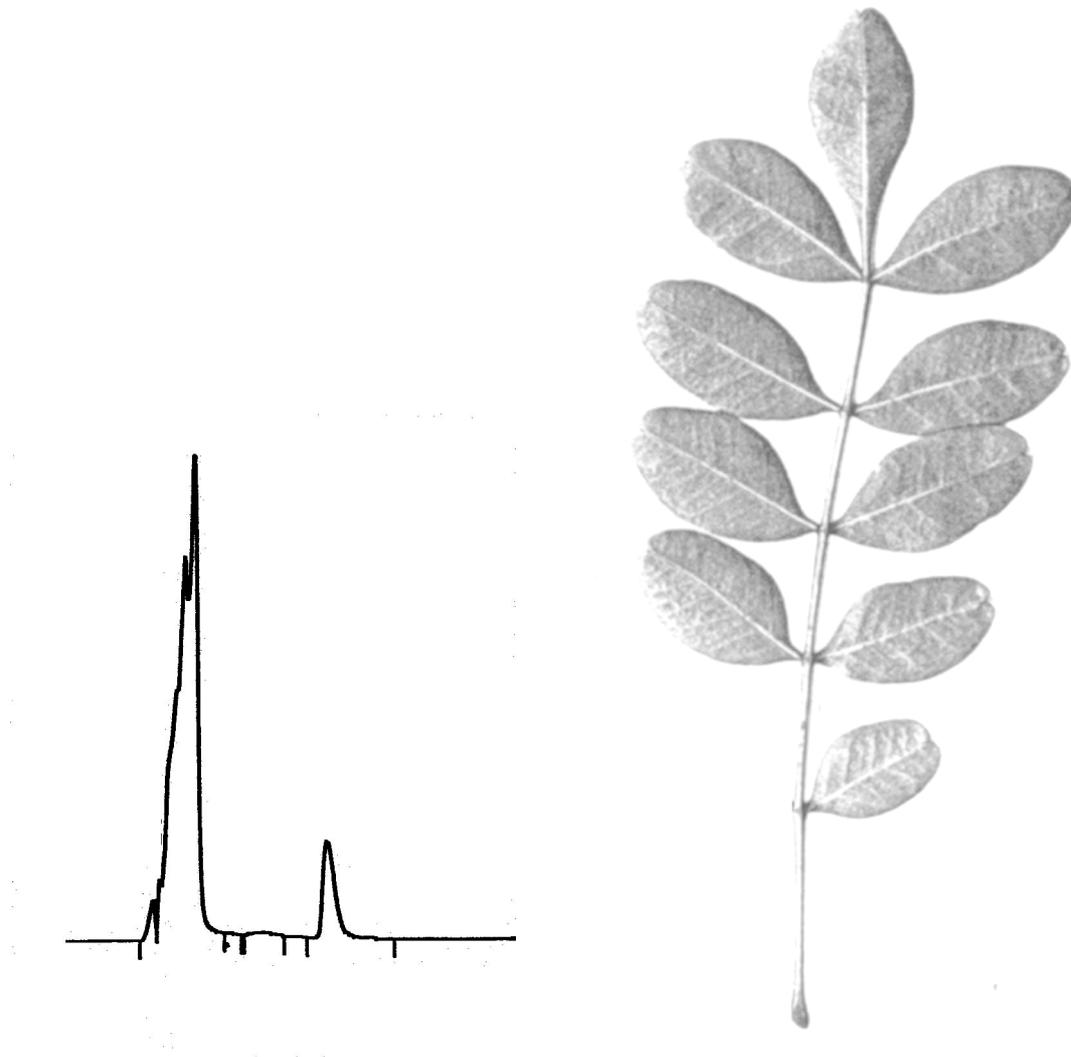


Abb. 3.19.14 Chromatogramm und Fotokopie eines Blattes von Pflanze Nr. 1860457

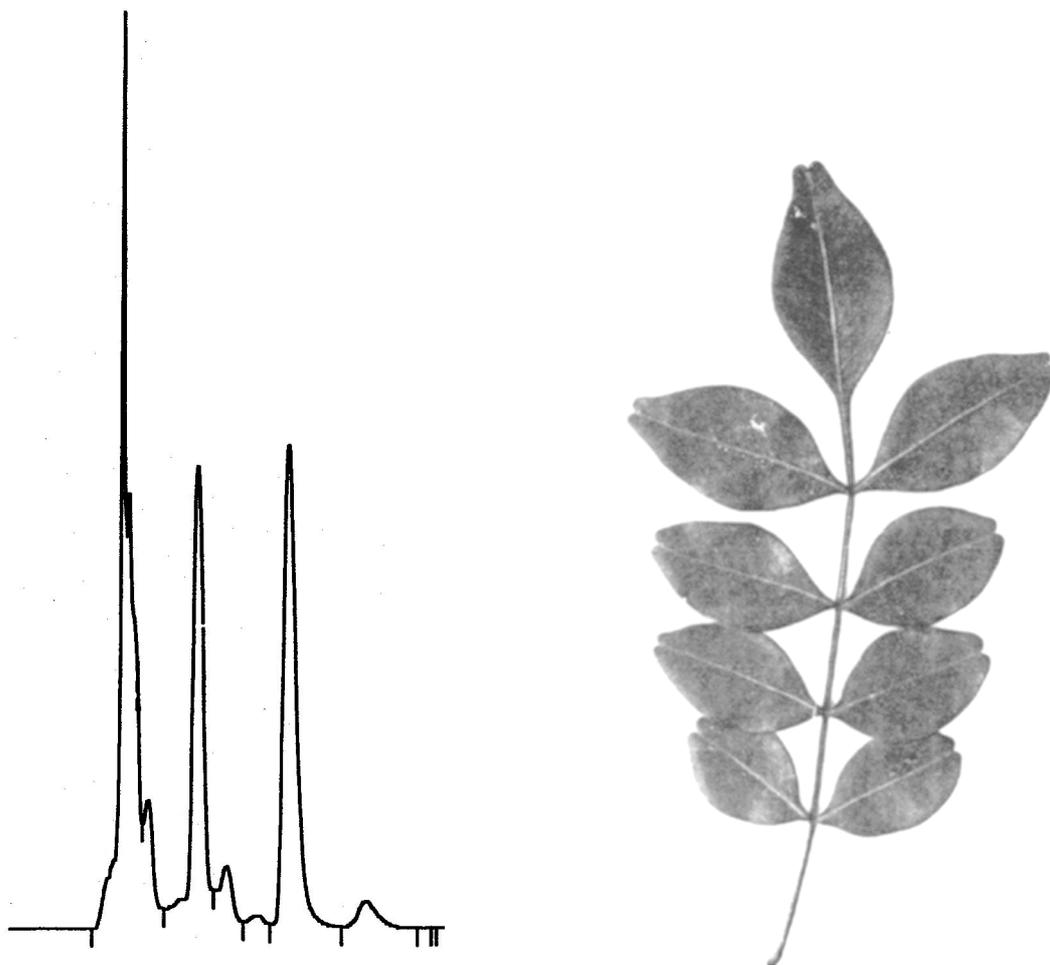


Abb. 3.19.15 Chromatogramm und Fotokopie eines Blattes von Pflanze Nr. 3088009

4 DISKUSSION

In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse und Beobachtungen, die im Laufe der Untersuchungen gewonnen beziehungsweise gemacht wurden, kritisch diskutiert werden. Das heißt, die einzelnen Resultate werden bezüglich ihrer Aussagekraft hinterfragt und gegebenenfalls in einen größeren Kontext gestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die Ergebnisse in der Reihenfolge von Kapitel 3 besprochen.

4.1 Allgemeine Beobachtungen

Wie schon aus der Überschrift deutlich wird, sollen hier zunächst nicht die Ergebnisse gezielter Versuche diskutiert, sondern vielmehr die an den Versuchspflanzen gemachten Beobachtungen besprochen werden. Diese schienen insofern interessant, als es relativ wenige Beschreibungen über die Art *Pilocarpus microphyllus* Stapf und deren Lebensweise gibt.

Vor jeder weiteren Besprechung der Resultate dieser Arbeit soll an dieser Stelle festgehalten werden, daß die Versuchspflanzen als Vertreter Art *P. microphyllus* Stapf ex Wardleworth identifiziert wurden. Diese Klassifizierung basierte auf dem Vergleich der vegetativen Merkmale der Pflanzen mit entsprechenden Beschreibungen in der Literatur (11,19).

Die Tatsache, daß die durchschnittliche Größe der Versuchspflanzen nach fünf Jahren nur etwa 1,20 m betrug, steht in einem gewissen Gegensatz zu Angaben von Kaastra (19), nach denen die Pflanzen zwischen 3 und 7,5 m groß werden. Diese Diskrepanz könnte in den Wachstumsbedingungen der Freilandbeete begründet sein. Andererseits wurden in eigenen Beobachtungen an natürlichen Standorten von *Pilocarpus microphyllus* Stapf überwiegend Exemplare vorgefunden, die in ihrer Größe den Versuchspflanzen entsprachen (41). Außerdem spricht ein etwa drei Meter großes Exemplar dafür, daß in den Beeten durchaus die Bedingungen für stärkeres Wachstum gegeben waren. Daneben läßt die Größe von zwanzig Zentimetern einer Versuchspflanze die Bandbreite deutlich werden, in denen sich die *Pilocarpus*-Pflanzen unter gleichen äußeren Bedingungen entwickeln können.

Die Beobachtungen der Sämlinge in den ersten zehn Monaten nach der Keimung ließen eine relativ langsame Entwicklung von *Pilocarpus microphyllus* Stapf erkennen. Daraus wird deutlich, daß die Durchführung dieser Arbeit nur möglich war, weil auf eine

relativ große Anzahl von Versuchspflanzen zurückgegriffen werden konnte, die geraume Zeit vorher im Rahmen einer Diplomarbeit (41) aus Samen angezogen worden waren. Aufgrund der Entfernungen der natürlichen Standorte von *Pilocarpus microphyllus* Stapf zu entsprechend eingerichteten Laboratorien ist eine Arbeit mit Wildpflanzen nur schwer durchführbar. Auf die Schwierigkeiten bei der Beschaffung von Pflanzenmaterial hatte bereits Nunes in seiner Dissertation (27) hingewiesen. So beruhen die Ergebnisse seiner Arbeit im wesentlichen auf vier Exemplaren von *P. pennatifolius* Lem.

Das Wachstum der Versuchspflanzen unter Lichtverhältnissen, die es anderen Pflanzenarten nicht erlauben sich zu entwickeln, dürfte auf eine Anpassung an die Stahlungsbedingungen der natürlichen Standorten von *Pilocarpus microphyllus* Stapf zurückzuführen sein. Dort wächst die Art im Unterwuchs größerer Bäume. Bemerkenswert ist allerdings die Fähigkeit der Pflanzen, sich auf die Verhältnisse bei unverminderter Sonneneinstrahlung einstellen zu können. Rein äußerlich machten sich die unterschiedlichen Strahlungsbedingungen in der Farbe der Blätter bemerkbar. Auf die Frage, ob es auch Auswirkungen auf die Physiologie der Pflanzen gegeben hat, soll zu einem späteren Zeitpunkt eingegangen werden.

Der Einfluß der Sonnenstrahlung auf die Blattfarbe (intensives Licht = hellgrün; schattiger = dunkelgrün) war insofern von Bedeutung, als dieses Kriterium zur Einschätzung des Blattalters damit von einem zweiten Faktor abhängig war.

Die Beobachtungen, wonach es während des ganzen Jahres zur Ausbildung mehr oder weniger zahlreicher Infloreszenzen und entsprechenden Früchten kam, stehen zunächst im Gegensatz zu Literaturangaben (19), wonach die Blütezeit von *P. microphyllus* Stapf zwischen Februar und März, teilweise auch bis Juni liegt, und die Früchte dann im September reif sind. Eine eventuell veränderte Rhythmik der Blütenbildung könnte durch die künstlichen Bedingungen, insbesondere durch eine regelmäßige Bewässerung in den Freilandbeeten begründet sein. Andererseits liegen die Wuchsgebiete von *P. microphyllus* Stapf heute überwiegend in Regionen mit einem Klima ohne ausgeprägte Trockenzeiten (42,47).

In Bezug auf die Bestäubungsart bei *P. microphyllus* Stapf kann aus der Tatsache, daß während der Blüte vermehrt Ameisen auf den Infloreszenzen beobachtet wurden,

geschlossen werden, daß es sich hierbei um Zoophilie handelt. Dafür sprechen auch das Vorhandensein des intrastaminalen Diskus so wie der Blütenbau. Wie aus Abbildung 3.1.3 zu erkennen ist, handelt es sich um relativ robuste Blüten, die für Insekten wie Ameisen leicht zugänglich sind. Auch ihre eher unauffällig grünliche Färbung entspricht der Beschreibung von Käferblumen, die zu den Insektenblumen gezählt werden (44). Als eine Alternative zur Tierblütigkeit kann die Windbestäubung in Betracht gezogen werden. Die exponierte Narbe und die dazu relativ weit abstehenden Fruchtblätter (s. Abb. 3.1.3) sprechen durchaus für diese Möglichkeit. Berücksichtigt man aber die Bedingungen an den natürlichen Standorten von *P. microphyllus* Stapf, so sind diese sicher nicht als besonders windexponiert und blumentierarm (44) zu charakterisieren.

Abschließend soll noch hervorgehoben werden, daß die Versuchspflanzen einen vitalen Eindruck machten und alle Entwicklungsstadien durchliefen. Neben dem Wachstum konnten die verschiedenen Stadien der Blütenbildung mit anschließender Fruchtreife beobachtet werden. Aus reifen Samen entwickelten sich nach Selbstausaat Sämlinge, deren Wachstum dem der Pflanzen aus den Keimanalgen entsprach. Diese Tatsachen verstärken die Aussagekraft der Ergebnisse dieser Arbeit.

4.2 Bodenanalysen

Nach den Ergebnissen der Bodenproben handelte es sich in beiden Beeten um ein sehr stark humoses Bodensubstrat. Im Vergleich mit entsprechenden Werten von Bodenproben natürlicher Standorte von *P. microphyllus* Stapf (41, s. Anhang II) war der Anteil an organischer Substanz hier knapp doppelt so hoch. Obwohl nicht analysiert, dürfte somit die Stickstoffversorgung im allgemeinen als gut zu bewerten sein (39). Was die pH-Werte angeht, waren die Bedingungen im Schattenbeet als stark sauer zu bewerten, was einen verringerten Anteil an austauschbaren Ca, Mg, Na, und K-Ionen zur Folge bedeutet haben dürfte (39). Das Substrat des Sonnenbeetes dagegen war schwach sauer und dürfte eine entsprechend bessere Verfügbarkeit der Nährstoffe aufgewiesen haben (39). Die pH-Bedingungen beider Substrate lagen jedoch innerhalb des Spektrums, welches an den natürlichen Standorten vorgefunden wurde (41). Ebenso waren die Werte für Kalium und Magnesium in den Proben der Versuchsbeete ähnlich dem Gehalt der Standortsböden an diesen beiden Nährstoffen.

Im Gegensatz zu den Böden der natürlichen Standorte wurde im Substrat der Beete deutlich weniger Natrium gefunden. Während die Verhältnisse bei Kalzium und Phosphat genau umgekehrt waren, differierten die Werte für ersteres lediglich um den Faktor zwei bis drei. Beim Phosphat dagegen waren die deutlichsten Unterschiede zu beobachten. Hier war die Versorgung in den Freilandbeeten zehn bis zwanzigmal besser als unter natürlichen Bedingungen vorgefunden.

Zusammenfassend kann man also sagen, dass sich die Substrate in den Versuchsbeeten im wesentlichen in ihrer Phosphatversorgung und dem unterschiedlichen pH-Werten unterschieden. Abgesehen von den hohen Phosphatwerten waren die Bedingungen jedoch in beiden Beeten mit den Bodenverhältnissen von natürlichen Standorten vergleichbar.

4.3 Keimanlagen

Wie schon in Kapitel 3.3 angesprochen, waren die relativ hohen Keimraten von 50 % beziehungsweise 83,3% eine Bestätigung der angewandten Methode. Die Tatsache, daß es teilweise auch zu deutlich niedrigeren Keimraten und oft überhaupt nicht zur Keimung der Samen gekommen war, läßt die Schwierigkeiten der Sämlingsbeschaffung deutlich werden. Nunes (27) erwähnt gescheiterte Keimversuche im Zusammenhang mit der extrem schwierigen Beschaffung von Pflanzenmaterial. Der Grund für die Mißerfolge in beiden Fällen dürfte in der mit zunehmendem Alter der reifen Samen rasch abnehmenden Keimfähigkeit zu erklären sein. In anderen Untersuchungen (41) wurde ein starkes Absinken der Keimraten schon wenige Monate nach der Samenreife beobachtet. Nach einem Jahr war es dann unter den gegebenen Bedingungen überhaupt nicht mehr zu einer Keimung gekommen.

Um möglichst hohe Keimraten zu erzielen, müßten die Samen möglichst bald nach der Reife, beziehungsweise dem Ausschleudern aus der Samenschale, zum Keimen gebracht werden. Will man vergleichende Analysen an Sämlingen gleicher Herkunft machen, ist dies insofern ein Problem, als normalerweise die Menge gleichzeitig reifer Samen der selben Pflanze nicht besonders groß ist.

4.4 Stecklingsvermehrung

Da die vegetative Vermehrung von Angiospermen über Stecklinge eine durchaus gängige Methode darstellt und mit Pflanzen der unterschiedlichsten Familien erfolgreich ist, war das Scheitern der Stecklingsvermehrung wahrscheinlich methodisch bedingt.

Davon ausgehend, daß die Wahl der Stecklingsform prinzipiell keinen Einfluß auf den Erfolg der Vermehrung vieler Pflanzen hat (16), erfolgte die Auswahl der Methode nach praktischen Gesichtspunkten. Nachdem eine Vermehrung über Wurzelstecklinge zu genetisch verschiedenen Pflanzen führen kann und die Variante der Blattstecklinge als relativ kostspielig und aufwendig gilt (16), fiel die Wahl auf die Methode der Sproßstecklinge. Die angewandte Methode (s. 2.4) basierte auf Beschreibungen von Mitchell et al. (26) sowie Hartman und Kester (16).

Ein wesentlicher Grund für das Ausbleiben der Wurzelbildung in den ersten beiden Varianten (s. 2.4.1, 2.4.2) dürfte in der mangelhaften Bewässerung beziehungsweise dem dadurch verursachten Sauerstoffmangel im Bodensubstrat zu suchen sein. Die Tatsache, daß es auch in in der dritten Variante (s. 2.4.3) zum Absterben der Stecklinge gekommen ist, verlangt jedoch nach anderen Erklärungen, da es hier nicht zu Staunässe kam. Hierzu kann auf Aussagen verwiesen werden, nach denen der optimale Zeitpunkt zur Ernte des Stecklingsmaterials je nach Art unterschiedlich ist (16). Die Auswahl sowie die Art der Applikation der die Wurzelbildung fördernden Substanzen spielt ebenfalls eine nicht unwesentliche Rolle in der erfolgreichen Bewurzelung von Stecklingen (26).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Stecklingsvermehrung offensichtlich aufwendiger ist als eine Vermehrung über Samen.

4.5 Probentrocknung

Aufgrund der unter 3.5 dargestellten Ergebnisse aus Untersuchungen zur Ermittlung der Trocknungsbedingungen erfolgte die Probentrocknung während dieser Arbeit immer bei 60°C und unter Vakuum. Unter diesen Bedingungen wurden die Pflanzenproben dann für jeweils fünf Stunden getrocknet. Gegenüber der Variante von 24 Stunden bei 40° C (s. Tab. 3.5.1) war der durchschnittliche Trocknungsverlust zwar etwas geringer, der Zeitaufwand

aber wesentlich günstiger. Hier sprachen einzig die geringeren Schwankungen der Trocknungsverluste, 0,7% bei vierundzwanzig Stunden gegenüber 6,5% bei 60°C für fünf Stunden, für die längere Variante. Unter Berücksichtigung der Tatsache, daß nach sechs Stunden bei 60°C die Variationen im Gewicht der Proben mit 2,5% identisch waren mit den entsprechenden Unterschieden nach 16 Stunden bei 105°C (s. 3.5.3), erschien eine Verlängerung der Trocknungszeiten aber nicht sinnvoll. Hinzu kam noch, daß sich zwischen den beiden Trocknungen in Untersuchung C (3.5.3) das Gewicht der einzelnen Proben von einem Tag auf den anderen zwischen 5,3 und 7,0% erhöht hatte. Der Unterschied in der Gewichtszunahme war also fast so hoch wie die Variation der Ergebnisse.

Bei einer Beurteilung aller Ergebnisse dieser Arbeit, die sich auf das Trockengewicht beziehen, muß also immer ein gewisser, methodisch bedingter Fehler berücksichtigt werden.

4.6 Festphasenextraktion

Die Aufreinigung der Blattextrakte war eine Voraussetzung für die Analyse der Pilocarpingehalte unter Verwendung von HPLC (25). Da die Festphasenextraktion sehr selektive Extraktionen von Verbindungen aus unterschiedlichsten Medien ermöglicht und in hochgereinigten und konzentrierten Isolaten resultiert (50) erschien diese Methode als prinzipiell geeignet für die Untersuchungen dieser Arbeit. Nachdem eine auf die Bedingungen der Extraktion von Pilocarpin aus methanolischen Blattextrakten angepaßte Methode entwickelt worden war, wurden Versuche zu deren Validierung durchgeführt (s. 2.7.3).

Die Beobachtung von Signalen in den Chromatogrammen von aufgereinigten Blattextrakten, deren Retentionszeiten dem eines Pilocarpin-Standard-Peaks sehr ähnlich waren, führte zu der Schlußfolgerung, daß es sich hierbei um dasselbe Alkaloid handelte. Geringe Unterschiede in der Retentionszeit ließen sich auf deren Abhängigkeit von der Probenkonzentration zurückführen (s. Tab. 3.6.1.1). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß die Analysen einer Standardprobe von Pilocarpin jeweils vor und nach der Aufreinigung durch das PRS-Sorbens vergleichbare Retentionszeiten erbrachten (s. Tab. 3.6.1.2).

Man kann also sagen, daß die entwickelte Methode für den qualitativen Nachweis von Pilocarpin in Blattextrakten von *P. microphyllum* Stapf geeignet war. Neben der

Konzentrationsabhängigkeit der Retentionszeit dürften diesbezügliche Unterschiede zwischen einzelnen Proben teilweise auch mit der Tatsache erklärbar sein, daß sowohl die Injektion der Proben als auch das Auslösen der Aufzeichnung manuell erfolgten.

Diese Annahme wird sowohl bei Betrachtung der Ergebnisse zur Reproduzierbarkeit der Festphasenextraktion als auch in den Resultaten zur Wiederfindungsraten von Proben bekannter Konzentration bestätigt. Im ersten Fall waren die Unterschiede in Retentionszeit und Peakflächen zwischen zwei verschiedenen Proben jeweils geringer als in den Wiederholungsanalysen derselben Probe (s. Tab. 3.6.2.1.1. und 3.6.2.1.2). Für eine Probe bekannter Konzentration (s. 3.6.2.3) variierten die Wiederfindungsraten um 3,22%, je nachdem welche der vier ermittelten Peakflächen man für die Berechnung verwendete.

Im allgemeinen sprachen aber Wiederfindungsraten in Proben bekannter Konzentration von bis zu 99,02% (s. 3.6.2.3.B) und die gute Reproduzierbarkeit der Retentionszeiten und Peakflächen in zwei parallel durchgeführten Extraktionen (s. 3.6.2.1) auch aus quantitativer Sicht für die angewandte Festphasenextraktion. Die ebenfalls im Zusammenhang mit der quantitativen Validierung durchgeführten Analysen mit einem gespickten Extrakt (s. 3.6.2.4) ergaben lediglich eine Wiederfindungsrate von 95,36%. Der Verlust von etwa 4,6% Pilocarpin war insofern nicht leicht zu erklären, als in anderen Versuchen während der Elution der Interferenzen kein Pilocarpin in den Waschlösungen festgestellt werden konnte (3.6.2.2).

Als mögliche Ursachen für die vergleichsweise geringe Wiederfindungsrate in der Analyse des gespickten Extraktes könnte man ein Überladen des PRS-Sorbens, eine nicht lineare Detektorantwort oder eine Kombination beider Faktoren annehmen. Durch die Zugabe einer gewissen Menge an Standard zu dem Blattextrakt war es mit 0,04396 mg/ml (s. 6.2.3.4) zu einer Probenkonzentration gekommen, welche mehr als doppelt so hoch war wie in den Analysen von Proben bekannter Konzentration.

Die quantitative Aussagekraft der Ergebnisse dieser Arbeit ist also in so weit zu relativieren, als der Pilocarpingehalt in Proben mit einer Konzentration von mehr als 0,02mg/ml; das entspricht einem Gehalt von 5 mg/g Trockengewicht oder 0,5%, tendenziell zu niedrig bewertet wurden.

Insgesamt lassen die Ergebnisse der Validierungsversuche den Schluß zu, daß es sich bei der angewandten Festphasenextraktion um eine sowohl qualitativ als auch quantitativ geeignete Methode zur Aufreinigung von Blattextrakten von *P. microphyllus* handelt.

4.7 HPLC-Analysen

Die Ergebnisse dieser Arbeit beruhen im wesentlichen auf HPLC-Analysen aufgereinigter Blattextrakte von *P. microphyllus*. Die angewandte Methode (s. 2.8) basiert auf einem Verfahren, welches von Bundgaard (6) für eine gleichzeitige Bestimmung von Pilocarpin und dessen Degradationsprodukten in wässrigen Lösungen entwickelt wurde. Nach dem Vergleich mehrerer Verfahren (8,20,48,49,55) war diese Methode ausgewählt worden, da sie bei vergleichsweise kurzen Analysezeiten die Bestimmung von Pilocarpin, Isopilocarpin, Pilocarpinsäure und Isopilocarpinsäure ermöglichen sollte.

Der zunächst durchgeführte Vergleich von Standardproben, die entweder in Wasser oder in Methanol gelöst worden waren, ergab, daß die Verwendung wässriger Proben zu besser ausdifferenzierten Chromatogrammen führte (s. 3.7.1). Da sich aber mit Änderung des Lösungsmittels auch die Retentionszeit von Pilocarpin und das Chromatogramm insgesamt relativ stark veränderten, wurde im weiteren mit Methanol als Lösungsmittel gearbeitet, um eine Vergleichbarkeit mit den Blattextrakten zu gewährleisten (s.2.7.1).

Durch einen Vergleich der Analysen zweier unterschiedlicher Pilocarpinstandards, die in Methanol gelöst waren, mit denen von Blattextrakten (s. 3.7.1) konnte zunächst gezeigt werden, daß mit dieser Methode Pilocarpin auch in methanolischen Lösungen nachgewiesen werden kann. Während jedoch Bundgaard (6) eine Retentionszeit von etwa 12 Minuten für Pilocarpin angibt (s. Abb. 4.7.1), zeigten sich die Pilocarpinpeaks in den Validierungsversuchen bereits nach etwa 6.8 Minuten (s. Abb. 3.7.1.2). Diese beschleunigte Elution wurde auf die veränderte Probenmatrix zurückgeführt. In weiteren Analysen konnte ferner gezeigt werden, daß die zu Beginn der Analysen, etwa zwischen 1,0 und 3,5 Minuten, auftretenden Peaks in Standard- und Blattproben auf Methanol (s. 3.7.1) beziehungsweise auf Bestandteile der Elutionslösung der Festphasenextraktion (s. 3.6.1.2) zurückzuführen waren. Diese auf den Lösungsmitteln beruhenden Systempeaks lagen also in einem Bereich, in dem man unter Berücksichtigung der beschleunigten Elution die Signale von Pilocarpinsäure und Isopilocarpinsäure (Abb. 4.7.1) erwarten könnte.

Aufgrund dieser Beobachtungen kann man sagen, daß die angewante HPLC-Methode sich zwar für die Analyse von Pilocarpin in methanolischen Lösungsmitteln eignet, eine gleichzeitige Bestimmung von Pilocarpinsäure und Isopilocarpinsäure unter diesen Bedingungen aber nicht möglich war.

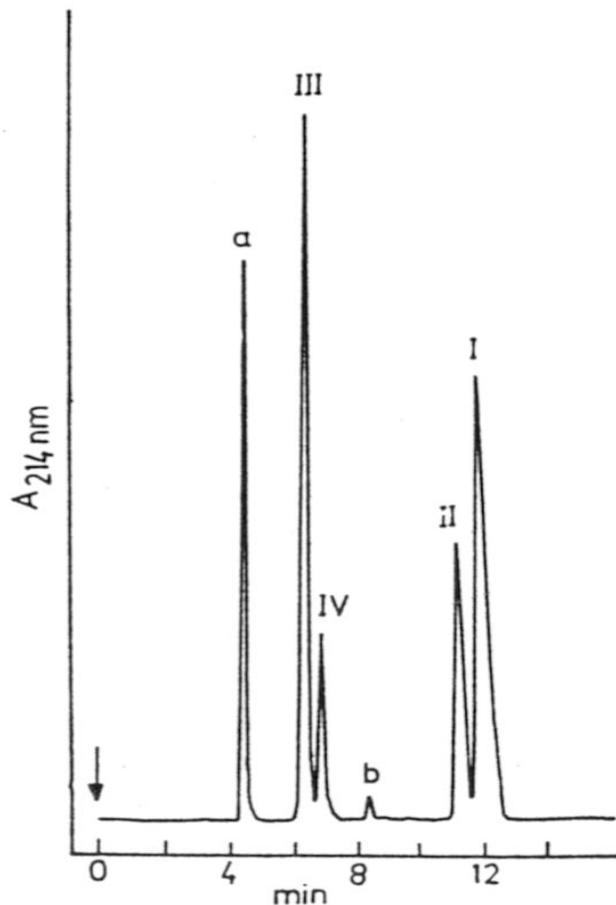


Abb. 4.7.1 HPLC-Chromatogramm Pilocarpin und Degradationsprodukte nach Bundgaard (6). I Pilocarpin; II Isopilocarpin; III Pilocarpinsäure; IV Isopilocarpinsäure; a Nitrat; b unbekanntes Abbauprodukt von Pilocarpin.

Was die Bestimmung von Isopilocarpin angeht kann man zwar sagen, daß auch in den methanolischen Proben ein entsprechendes Signal auftaucht (Vgl. Abb. 3.7.1.2 mit Abb. 4.7.1), wegen der schlechten Auflösung jedoch auf differenzierte Aussagen verzichtet werden muß.

Aus dem im Rahmen der quantitativen Validierung gewonnenen Ergebnissen (s. 3.7.2) kann geschlossen werden, daß die Linearität der Detektorantwort im

Konzentrationsbereich von 0,002 bis 0,020 mg/ml für die Zwecke der Analysen zufriedenstellend war.

4.8 Einfluß des vegetativen Zustandes auf den Pilocarpingehalt

In der Literatur über pflanzliche Arzneistoffe wird immer wieder darauf hingewiesen, daß es bei der Drogengewinnung nicht nur auf die richtigen Pflanzenteile, sondern auch auf den Erntezeitpunkt ankommt. In Bezug auf letzteres werden für die Gewinnung von Blattdrogen im allgemeinen die Stadien der beginnenden Blüte sowie der gesamten Blühzeit als günstigste Erntezeitpunkte angegeben (14, 37). Im Falle von Alkaloiden dagegen kommt es nach Aussagen von Wiermann (56) bei beginnender Blüte zu einer Reduzierung, wenn nicht gar zum Stillstand der Biosynthese der Alkaloide.

Betrachtet man die Ergebnisse aus den Untersuchungen zum Einfluß des vegetativen Zustandes von *P. microphyllus* Stapf auf den Pilocarpingehalt in den Blättern (s. 3.8), kann man sagen, daß die Blütenbildung offensichtlich in keinem Stadium einen Einfluß auf die Akkumulation des Alkaloids in diesen Organen hatte. Die Resultate widersprechen in diesem Fall eindeutig den Angaben, wonach zur Blütezeit die höchsten Wirkstoffgehalte in den Blättern gefunden werden, stehen jedoch insofern nicht im Widerspruch zu den Aussagen von Wierman (56), da dieser sich nur auf die Synthese von Alkaloiden bezieht. Nach Barz und Koester (4) sind Synthese und Umsatz von Sekundärstoffen nämlich nicht nur nebeneinander möglich, sondern gewöhnlich auch unabhängig voneinander reguliert. Mit anderen Worten, der Gehalt an Pilocarpin in den Blättern von *P. microphyllus* Stapf würde nicht mit Beginn der Blüte zunehmen, da die Biosynthese des Imidazolalkaloides reduziert oder ausgesetzt ist, aber auch nicht abnehmen, da der Turnover nicht von der Blütenbildung beeinflusst wird. Im Kontext mit Wiermanns Aussage muß auch noch festgehalten werden, daß Synthese und Speicherung von Sekundärstoffen oftmals an unterschiedlichen Orten stattfinden (13).

Die beobachteten Schwankungen der Pilocarpingehalte während des Untersuchungszeitraumes lassen sich somit zum Beispiel durch Turnover-Prozesse erklären, die zeitlich versetzt zu den Beobachtungen der vegetativen Stadien ablaufen und von diesen

nicht beeinflusst werden. Außerdem könnten sich die Auswirkungen mehrerer Faktoren überlagert haben.

Wie bereits in Kapitel 4.1 angesprochen wurde, konnte an den Versuchspflanzen keine definierte Blütezeit ausgemacht werden, da es während des ganzen Jahres zur Ausbildung mehr oder weniger zahlreicher Infloreszenzen kam. Was im Zusammenhang mit der Blütenbildung diskutiert wurde, kann auch für die Phasen mit Knospen, jungen Blättern oder Früchten angenommen werden. Auch hier wurde kein logischer Zusammenhang zwischen den jeweiligen vegetativen Merkmalen und den Pilocarpingehalten der ausdifferenzierten Blätter festgestellt.

4.9 Untersuchungen zum Einfluß des Blattalters auf den Pilocarpingehalt

Die Ergebnisse aus Kapitel 3.9, wonach der Gehalt an Pilocarpin in den Blättern sehr stark vom Alter dieser Organe abhängig war, stehen im Einklang mit Resultaten anderer Untersuchungen, bei denen in jungen Blättern jeweils auch die höchsten Gehalte der entsprechenden Substanzen gefunden wurden. So nehmen die Gehalte an Koffein und Catechin in den Blättern von *Camellia sinensis* L. mit zunehmendem Alter ab (36). In *Petroselinum hortense* wurde eine enge Verbindung zwischen dem Blattalter und der Akkumulierung von Flavonglykosiden sowie von der Aktivität einiger Enzyme festgestellt, welche in der Biosynthese dieser Substanzen eine Rolle spielen (56). Luckner (22) und Endress (13) weisen darauf hin, daß die Bildung von Sekundärstoffen in die Differenzierungsprogramme der Zellen eingebunden ist und die Biosynthese dieser Substanzen normalerweise auf bestimmte Entwicklungsstadien und/ oder spezialisierte Zellen begrenzt bleibt. Nach Luckner (22) ist die Hauptursache für die Ausprägung des Sekundärstoffwechsels die phasenabhängige Bildung der beteiligten Enzyme während eines bestimmten Entwicklungszustandes.

Mit einer solchen Phasenabhängigkeit könnten die Ergebnisse der Untersuchungen von Blättern unterschiedlichen Alters derselben Pflanze (s. Abb. 3.9.2) erklärt werden. Danach würde der hohe Pilocarpingehalt in den sehr jungen Blättern auf die Aktivität von Enzymen zurückzuführen sein, die während der Differenzierungsvorgänge der Blattentwicklung gebildet werden. Nachdem die Wachstumsprozesse abgeschlossen sind, würde eine entsprechend sinkende oder ausbleibende Enzyymbildung zu einer Reduzierung

beziehungsweise zum Stillstand der Pilocarpinsynthese führen. In diesem Zusammenhang müßte dann davon ausgegangen werden, daß das in den jungen Blätter synthetisierte Pilocarpin auch dort gespeichert wird. Andererseits weist Wierman (56) darauf hin, daß ein Anstieg von Sekundärstoffen in bestimmten Entwicklungsstadien nicht zwangsläufig mit einer De-novo-Synthese verbunden sein muß. Die hohen Pilocarpingehalte in den jungen Blättern könnten danach auch das Ergebnis einer zunehmenden Akkumulation des Alkaloids in diesen Organen sein. In diesem Falle würde die Biosynthese nicht in den Blättern stattfinden, sondern Pilocarpin vom Ort seiner Synthese in diese transportiert werden. Für ein solches Szenario spricht eine Methylierung von Pilocarpidin zu Pilocarpin, die Nunes (27) in den Blättern von *P. pennatifolius* Lem. nachgewiesen hat. Nach Endress (13) nämlich zeigen Sekundärstoffe Veränderungen in ihrer chemischen Struktur, während sie transportiert werden. Das Pyridin-Alkaloid Ricinin zum Beispiel liegt in seiner Transportform ebenfalls demethyliert vor (13).

Kommt man auf die eigentliche Fragestellung dieser Untersuchungen zurück, sind die Überlegungen zu Ort und Steuerung der Synthese von Pilocarpin nur ein Teilaspekt der Problematik. Da man heute davon ausgeht, daß es sich bei Sekundärstoffen nicht um Endprodukte der entsprechenden Stoffwechselwege handelt, sondern vielmehr um Substanzen, die einem Metabolismus unterliegen (4), geht es hier also auch um die Frage, inwieweit das Entwicklungsstadium der Blätter sich auf die Prozesse von Lagerung und Umsatz von Pilocarpin auswirkt.

Eine mögliche Erklärung für die hohen Pilocarpingehalte in jungen Blättern besteht im Einfluß von Phytohormonen, welche Änderungen in der Speicherkapazität von Zellen verursachen können (4). Da die Regulation der Hormone im Zusammenhang mit dem Differenzierungsprogrammen der Zelle steht, könnte somit eine Verbindung zwischen der Speicherkapazität der Blätter und ihrem Alter erklärt werden.

Schließlich könnten die unterschiedlichen Pilocarpingehalte verschieden alter Blätter auch dadurch zustande kommen, daß sich die Umsatzraten mit dem Alter verändern. Diese Überlegungen basieren auf Aussagen, wonach sich viele Sekundärstoffe in einem Gleichgewichtszustand befinden (4), in dem sich Synthese und sogenannte Turnover-Reaktionen die Waage halten. Nach Luckner (22) hängen die Halbwertzeiten von

Sekundärstoffen in diesen Reaktionen vom physiologischen Zustand, also auch vom Alter der entsprechenden Organismen ab.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind insofern von praktischer Bedeutung, als durch eine gezielte Ernte von möglichst jungen Blättern die Menge an Pilocarpin im Ausgangsmaterial für die Herstellung des Alkaloids deutlich erhöht werden kann.

4.10 Pflanzen gleicher Abstammung

Beim Sekundärstoffwechsel von Pflanzen handelt es sich um spezielle Stoffwechselwege, die entweder auf einige wenige Arten und sogar Varietäten beschränkt, oder aber weit verbreitet sein können (4). Nach Luckner (22) beruht dieser Stoffwechsel auf eigenem genetischen Material. Unterschiede im Pilocarpingehalt in den Blättern verschiedener Exemplare von *P. microphyllus Stapf*, die unter denselben Bedingungen wachsen, könnten demnach nicht nur im jeweiligen physiologischen Zustand, sondern auch genetisch determiniert sein.

Obwohl entsprechende Untersuchungen (s.3.10) an Sämlingen und somit nicht völlig identischen Pflanzen durchgeführt wurden, konnten in einem Fall relativ ähnliche Pilocarpingehalte in verschiedenen Sämlingen und deren Stammpflanze festgestellt werden (s. 3.10.2). In einer zweiten Versuchsreihe unterschieden sich die einzelnen Sämlinge jedoch um knapp 50% in den Pilocarpingehalten ihrer Blätter. Basierend auf diesen Ergebnissen kann man insgesamt also nicht sagen, daß der Pilocarpingehalt genetisch determiniert ist.

Ein Schwachpunkt dieser Untersuchungen war sicherlich die geringe Anzahl an Sämlingen jeweils gleicher Herkunft, wodurch einzelne Werte sehr stark das Ergebnis beeinflussen konnten. Da die Versuchsanlage allerdings eine Vorbereitungszeit von knapp zwei Jahren benötigten und die Verfügbarkeit von Sämlingen gleichen Alters von jeweils den selben Versuchspflanzen begrenzt ist (s. 4.3), ist dies wahrscheinlich als ein generelles Problem bei der Arbeit mit Sämlingen zu bewerten.

Bei zukünftigen Untersuchungen in diesem Zusammenhang sollte auf eine ausreichende Zahl an Stecklingen oder Pflanzenmaterial aus Zellkulturen zurückgegriffen werden.

4.11 Untersuchungen zum Einfluß der Jahreszeit auf den Pilocarpingehalt

Die tages- und jahresrhythmische Phänomene in der Akkumulation von Sekundärstoffen wurden an verschiedenen Pflanzen beobachtet. Bei *Baptisia*, *Lupinus* und *Sarothamnus* zum Beispiel kommt es jeweils früh morgens, nachts oder am frühen Nachmittag zur Bildung von Alkaloiden. Ein Beispiel für die anuelle Rhythmik liefern die Alkaloidgehalte von *Atropa belladonna*, die mit 0,7 % im Juni sieben Mal höher sind als im April (13). Der vielseitige Einfluß des sichtbaren Lichts auf den Sekundärstoffwechsel wird deutlich, wenn man berücksichtigt, daß neben der Synthese auch der Abbau entsprechender Metabolite durch Änderungen der Lichtverhältnisse beeinflusst wird (4). Diurnale und jahreszeitliche Rhythmen sind das Ergebnis von Änderungen entsprechender Enzymaktivitäten im Laufe eines Tages oder Jahres und beruhen wahrscheinlich auf Änderungen von Temperatur und Strahlungsbedingungen (13).

Bevor die Ergebnisse der Untersuchungen zu Jahresrhythmik der Pilocarpingehalte von *P. microphyllus* Stapf diskutiert werden, soll an dieser Stelle nochmal an die Problematik bei der Probenauswahl (s. 2.9) erinnert werden. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus den Untersuchungen zum Einfluß des Blattalters (s. 3.9) muß man davon ausgehen, daß die Blattproben bezüglich ihres Alters nicht völlig identisch waren. Einzelne Ergebnisse sollten deshalb nicht überbewertet werden.

Obwohl auf der ersten Blick recht unterschiedlich, war mit einer Ausnahme bei allen untersuchten Pflanzen ein wellenförmiges Muster in den Pilocarpingehalten zu erkennen (s. 3.11). Dieses Muster war je nach Versuchspflanze mehr oder weniger deutlich ausgeprägt und abgesehen von einigen Ausreißern relativ ähnlich zwischen den verschiedenen Pflanzen.

Da die Pflanzen nach je Bedarf künstlich bewässert wurden, scheiden jahreszeitliche Schwankungen der Niederschlagsmengen als Ursache der beobachteten Rhythmik aus, oder müssen zumindest als sehr verwischt angesehen werden. Ein anderer Klimafaktor, welcher sich im Jahresverlauf deutlich verändert, ist die relative Luftfeuchtigkeit. Obwohl für den Untersuchungszeitraum keine entsprechenden Angaben vorliegen, kann doch aufgrund von Ergebnissen langjähriger Wetterbeobachtungen (12, s. Anhang III) geschlossen werden, daß die beobachtete Rhythmik der Pilocarpingehalte in keinem Zusammenhang mit dem Verlauf der relativen Luftfeuchtigkeit stand.

Was den Temperaturverlauf und die Änderungen der Strahlungsbedingungen betrifft, ist in beiden Fällen die Variationsbreite im Jahresverlauf relativ gering (s.2.1.4). Der Verlauf der Photoperiode beziehungsweise der Tageslänge läßt sich insofern mit den jeweiligen Höchstwerten der Pilocarpingehalte zu Anfang und Ende des Jahres in Verbindung setzen, als auch hier zum Jahreswechsel das Maximum der Variationsbreite erreicht wird. Der vorübergehende Anstieg der Alkaloidgehalte Mitte des Jahres ist dadurch aber nicht zu erklären.

Man kann also sagen, daß zwar jahreszeitliche Schwankungen in den Pilocarpingehalten beobachtet wurden und diese auch in gewissem Maße ein einheitliches Muster aufwiesen, diese Rhythmik aber nicht mit einem klimatischen Faktor in Verbindung gebracht werden konnte.

Eine andere Möglichkeit zur Erklärung der beobachteten Änderung der Pilocarpingehalte könnte in einem diurnalen Rhythmus begründet sein. Solche Phänomene wurden unter anderem bei *Papaver somniferum* (22) und *Atropa belladonna* (13) beobachtet. Im letzteren Fall traten bei der selben Art also sowohl jahreszeitliche (s. oben) als auch diurnale Rhythmen auf. Da die Blattproben für die Analysen nicht unbedingt immer zur gleichen Tageszeit geerntet worden waren, könnten tageszeitliche Einflüsse eine Rolle gespielt haben. Bei künftigen Untersuchungen zum Thema Rhythmik der Pilocarpingehalte sollten also eventuelle tageszeitliche Phänomene berücksichtigt werden.

Die Tatsache, daß die Pilocarpingehalte in den Blättern der Versuchspflanzen am Ende der Untersuchungen im Durchschnitt um 0,17% niedriger lagen als zu Beginn der Versuche, könnte mit der kontinuierlichen Ernte von Blättern erklärt werden. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit Beobachtungen, wonach Blätter von Pflanzen, die öfter beerntet wurden, niedrigere Pilocarpingehalte aufwiesen als solche von Pflanzen an bis dahin "unberührten" Standorten (Informationen der Firma PVP).

4.12 Untersuchungen zum Einfluß der Lichtverhältnisse auf den Pilocarpingehalt

Die unterschiedlichen Lichtverhältnisse an sonnigen und schattigen Standorten haben allgemein einen bedeutenden Einfluß auf Pflanzen. So haben sich zum Beispiel im Laufe der Evolution Sonnen- und Schattenpflanzen herausgebildet, die sich jeweils morphologisch und physiologisch an die entsprechenden Bedingungen angepasst haben. Aber auch zwischen den Blättern ein und derselben Pflanze können Sonnen- und Schattenblätter anhand ihrer Anatomie unterschieden werden. Während Sonnenblätter ein oftmals mehrschichtiges Palisadenparenchym ausbilden, ist dieses in Blättern, die einer geringeren Lichtintensität ausgesetzt sind, nur einschichtig oder fehlt sogar völlig. Außerdem haben Sonnenblätter gegenüber Schattenblättern ein höheres spezifisches Gewicht (44). Die Unterschiede beschränken sich aber nicht nur auf den zellulären Aufbau der Blätter, sondern machen sich auch im Chlorophyllgehalt und auf physiologischer Ebene bemerkbar. So haben Schattenblätter normalerweise höhere Chlorophyllgehalte pro Einheit als Sonnenblätter. Auch zeigen sie besonders große Grana, in denen bis zu 100 Thylakoide übereinander gestapelt sein können. Das Verhältnis von Chlorophyll a/b ist in Schwachlichtblättern verringert und die Leistungsfähigkeit des Photosystems II gegenüber System I relativ gesehen gesteigert. Dadurch kann eventuell die verstärkte Anregung des Photosystems I durch den hohen Infrarot-Anteil der Schattenstrahlung kompensiert werden. Schließlich besitzen Schattenblätter auch noch eine größere Photosyntheseeinheit als Sonnenblätter, das heißt mehr Pigmentmoleküle sind mit einer Elektronentransportkette verknüpft (44).

Ausgehend von dem allgemeinen Einfluß der Lichtverhältnisse auf den Bau und die Physiologie von Blättern und Pflanzen ist es nicht verwunderlich, daß ebenfalls Auswirkungen auf den Sekundärstoffwechsel beobachtet wurden. Teilweise wurde darauf auch schon im vorigen Kapitel eingegangen.

Der Unterschied von 36,55% in den Pilocarpingehalten der Sonnen- und Schattenpflanzen (s. Abb.3.12) war so deutlich, daß mit diesen Untersuchungen ein Einfluß der Lichtverhältnisse als gesichert angenommen werden kann. Die Aussagekraft der Ergebnisse ist insofern als gut zu bewerten, da sowohl junge und alte Blätter berücksichtigt wurden (s. 3.12).

Eine mögliche Erklärung der Tatsache, daß in den Blättern der Schattenpflanzen deutlich mehr Pilocarpin nachgewiesen werden konnte, liegt in den Aussagen von Endress (13). Danach stellen Chloroplasten eine autonome Region für die Synthese von verschiedenen Sekundärstoffen dar. Eine erhöhte Anzahl von Chloroplasten in den Blättern der Schattenpflanzen könnte somit zu einer verstärkten Synthese von Pilocarpin führen. Aber nicht nur für die Synthese, sondern auch für die Speicherung von Sekundärstoffen scheinen Chloroplasten teilweise eine Rolle zu spielen. So wurden Lupinen-Alkaloide nur in chloroplastenhaltigem Gewebe gefunden (56). Der höhere Chlorophyllgehalt der Schattenblätter einerseits und das größere spezifische Gewicht der Sonnenblätter auf der anderen Seite könnten also in solch einem Fall die Differenz in den Pilocarpingehalten erklären.

In einem anderen Szenario könnte die erhöhte Strahlungsintensität an den sonnigen Standorten die Degradation von Pilocarpin beschleunigen. Hierbei wäre ein mögliches Gleichgewicht zwischen Synthese und Abbau (4) mehr in Richtung Abbau verschoben.

Da die Beschattung von *P. microphyllus* Stapf in einem der Freilandbeete mit Hilfe von *Passiflora* (s. 2.1.3) erfolgte und somit relativ natürliche Lichtverhältnisse darstellte, muß neben den quantitativen Unterschieden der Lichtverhältnisse auch die unterschiedliche Strahlungsqualität der beiden Standorte berücksichtigt werden. In diesem Zusammenhang dürften im Schatten die Veränderungen im roten Spektralbereich (siehe oben) von besonderer Bedeutung sein. Eine dadurch ausgelöste differenzierte Genaktivierung durch das Phytochromsystem (44) könnte einen Einfluß auf Enzyme haben, die mit dem Pilocarpinmetabolismus in Verbindung stehen.

Aus praktischer Sicht sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen insofern von Bedeutung, als ein Anbau von *P. microphyllus* Stapf unter Schatten eine Steigerung der Pilocarpingehalte von mehr als 30% gegenüber einem Anbau in der Sonne zur Folge haben dürfte. Inwieweit eine solche Maßnahme aber aus technischen Gründen realisierbar und wirtschaftlich ist, müßte wahrscheinlich genauer untersucht werden.

4.13 Düngungsversuch

Der Einfluß des Bodensubstrats beziehungsweise der Nährstoffversorgung von Pflanzen auf deren Gehalt an Sekundärstoffen wird wiederholt erwähnt (4, 13, 22).

Die Analysen von Blattproben verschiedener Versuchspflanzen jeweils vor und nach einer Düngung (s. 2.10) ergaben, daß sich nach der Verbesserung des Nährstoffangebotes die Pilocarpingehalte der Blätter um durchschnittlich 50% erhöht hatten (s. 3.13). Interessanterweise erfolgte diese Steigerung des Alkaloidgehaltes aber nicht bei allen Blättern in gleichem Maße, sondern war offensichtlich vom Alter der Photosyntheseorgane abhängig. Während in jungen Blättern nach der Düngung lediglich ein um 5,5% erhöhter Gehalt an Pilocarpin festgestellt wurde, betrug die entsprechende Steigerung in den alten Blättern 291% (s. Tab. 3.13.3). Hierbei muß man jedoch berücksichtigen, daß die jungen Blätter, die nach der Düngung geerntet wurden, überwiegend älter waren als die entsprechenden Proben vor der Nährstoffzugabe (vgl. Tab. 3.13.1). Betrachtet man die Ergebnisse im Fall von jungen Blättern der Pflanze Nr. 9644735 wird die Größenordnung deutlich, in der die Ergebnisse bei den jungen Blättern von den Altersunterschieden der Proben beeinflusst worden sind. Da die Proben der alten Blätter aber in allen Fällen altersmäßig vergleichbar waren, kann der positive Einfluß der Düngung auf die Pilocarpingehalte der Blätter von *P.microphyllus* Stapf als gesichert gelten.

Bei einem Vergleich der Bodenanalysen (s. 3.2) mit den Nährstoffmengen, die den Pflanzen bei der Düngung zugeführt wurden (s. Tab. 2.10), wird deutlich, daß nicht alle Nährelemente von gleicher Bedeutung gewesen sein dürften.

Während die Pflanzen nach der Düngung etwa die neunfache Menge an Kalium und dreimal mehr Phosphat zur Verfügung hatten als vorher, war die Menge an zugeführtem Kalzium etwa äquivalent des Bodengehaltes. In Bezug auf die Magnesiumversorgung der Versuchspflanzen war die Düngung unerheblich. Leider können zur Stickstoffversorgung an dieser Stelle keine Angaben gemacht werden. Dieses Element wurde bei den Nährstoffanalysen der Bodenproben nicht berücksichtigt. Wie aber bereits in Kapitel 4.2 erwähnt, dürfte der Ausgangsgehalt an Stickstoff, aufgrund des hohen Anteils an organischer Substanz als gut zu bewerten sein.

In künftigen Versuchen zum Einfluß von Nährstoffen sollten verschiedene Dünger verwendet werden, um die Rolle einzelner Elemente genauer zu definieren.

Für die praxisbezogene Anwendung sind die gewonnenen Ergebnisse deshalb besonders interessant, da durch eine einfache Düngung die Pilocarpingehalte der alten Blätter, und damit dem Großteil der Blattmasse deutlich erhöht werden kann.

4.14 Pilocarpingehalte verschiedener Pflanzenteile

Im Zusammenhang mit der Thematik dieser Arbeit schien die Frage nach dem Ort der Speicherung von Pilocarpin deshalb interessant, da Sekundärstoffe nicht in allen Organen, Geweben und Zellen eines Organismus in gleichen Mengen vorkommen (22, 56). Im Falle von Pilocarpin geht Nunes (27) davon aus, daß der größte Teil des Alkaloids, das Pilocarpidin, zunächst in den Wurzeln synthetisiert wird. Entsprechend seiner Hypothese wird diese Verbindung dann in die Blätter transportiert, wo es durch eine Methylierung zunächst zur Bildung und anschließend zur Speicherung von Pilocarpin kommt.

In einem gewissen Widerspruch zu dieser Theorie wurde nicht nur in den Blättern, sondern auch in den Wurzeln von *P. microphyllus* Stapf Pilocarpin nachgewiesen und zwar teilweise in relativ hohen Konzentrationen (vgl. Tab. 3.14.2). Das Model von Nunes müßte also insofern verändert werden, als neben der Synthese auch die Lagerung von Pilocarpin in den Wurzeln stattfindet. Eine Überlegung, die durch Aussagen gestützt wird, nach denen die Biosynthese von Sekundärstoffen normalerweise auf spezialisierte Zellen begrenzt ist, während Alkaloide oft in Vakuolen akkumuliert sind (13).

Eine andere Erklärungsmöglichkeit für diese Ergebnisse wäre, daß die Biosynthese nicht in den Wurzeln stattfindet, es aber außer in den Blättern auch hier zu einer Akkumulation der Verbindung kommt.

Aus den weiteren Ergebnissen dieser Untersuchungen (s. 3.14.1) wird deutlich, daß in allen Organen von *P. microphyllus* Stapf Pilocarpin in mehr oder weniger großen Mengen nachgewiesen werden konnte. Daß die höchsten Pilocarpingehalte dabei in Knospen und jungen Blättern gefunden wurden, steht im Einklang mit den Ergebnissen der *Untersuchungen zum Einfluß des Blattalters auf den Pilocarpingehalt* (s.3.9). Da es sich

dabei jedoch um verschiedene Pflanzenteile handelt, liegt der Gedanke nahe, daß die Ursache der erhöhten Akkumulation weniger in bestimmten Organen als in für junge Gewebe charakteristischen Strukturen oder Bedingungen zu suchen ist. In diesem Zusammenhang ist folgende Beschreibung einer Untersuchung von Weissenböck und Sachs (in 56) bemerkenswert:

Nach der Einteilung in drei verschiedene Zonen wurden unter anderem die entsprechenden PAL-Aktivitäten der jeweiligen Blattgewebe im Verlauf der Entwicklung eines *Avena*-Sämlings gemessen. Dabei wurde beobachtet, daß sich die Enzymaktivität in der meristematischen Zone nach dem Erreichen eines Maximums auf einem hohen Niveau hielt, während es in der Scheitel- und Streckungszone nach gewisser Zeit ein Absinken der PAL-Aktivität kam.

Beide Forscher kamen zu der Überzeugung, daß die meristematische Zone sehr wahrscheinlich für die Bildung von Zimtsäure und deren Derivaten in allen sich aus diesen Zellen ableitenden Blattgewebe verantwortlich war.

Entsprechend diesem Beispiel könnte es sich bei Meristemzellen um die oben angesprochenen spezialisierten Zellen handeln, die in *P. microphyllus* Stapf für die Pilocarpinsynthese verantwortlich sind. Die Tatsache, daß meristematische Gewebe, wenn auch in sehr unterschiedlichem Ausmaß, in allen Pflanzenteilen vorkommen, steht in Übereinstimmung mit den Beobachtungen, wonach in allen Organen der Versuchspflanzen Pilocarpin gefunden wurde.

Eine weitere Beobachtung bestand darin, dass offensichtlich in grünen Pflanzenteilen mehr Pilocarpin enthalten war als in Organen ohne Chlorophyll, und das abgesehen von den jungen Organen die Gehalte in allen grünen Pflanzenteilen recht ähnlich waren. An dieser Stelle sei wieder auf Aussagen verwiesen, nach denen Chloroplasten nicht nur eine autonome Region für die Synthese verschiedener Sekundärstoffe darstellen (13), sondern chlorophyllhaltiges Gewebe auch als Speicherort für Alkaloide in Frage kommt (56) (vgl. auch 4.12).

Die vergleichsweise niedrigen Pilocarpingehalte in verholzten Sprossen könnten auf den relativ hohen Anteil von totem Gewebe zurückzuführen sein. Da hier und in den

Wurzeln keine Chloroplasten vorkommen, kann man davon ausgehen, daß die Synthese von Pilocarpin entweder nicht von diesen Plastiden abhängig ist, oder der Pilocarpingehalt dieser beiden Organe auf eine Akkumulation des anderorts synthetisierten Alkaloids zurückzuführen ist.

Sowohl in den Wurzel als auch in verholzten Sprossen wurden recht unterschiedliche Mengen an Pilocarpin nachgewiesen. Um genauer Aussagen zu eventuellen Einflüssen vom Alter der Organe oder anderen Faktoren machen zu können, müßten weitere Untersuchungen an jeweils mehr Proben gemacht werden.

4.15 Trocknungsversuche

Aus den Ergebnissen der Trocknungsversuche geht eindeutig hervor, daß die Ofentrocknung in Bezug auf die Erhaltung des Pilocarpingehaltes die günstigste Behandlung darstellt. Die Tatsache, daß nach 63 Tagen mehr Pilocarpin in den Blättern der Ofen und Sonnenvarianten gefunden wurde als nach 20 Tagen (s. Tab. 3.15.1), läßt sich durch die längere Trocknung (s.2.11.2) und dem damit erhöhten Trocknungsverlust erklären. Da sich das Verhältnis der Pilocarpingehalte in den Blättern dieser beiden Varianten zueinander nach 63 Tagen nicht geändert hatte, kann man davon ausgehen, daß etwaige Degradationsprozesse zum Stillstand gekommen sind beziehungsweise gleichmäßig verliefen. Während also, trotz unterschiedlicher Trocknungsverluste, gezeigt werden konnte, dass eine beschleunigte Trocknung zur Stabilisierung des Pilocarpingehaltes in den geernteten Blättern führt, lassen die Resultate der Schattenvariante auf andauernde Umsetzungsprozesse schließen. Dieser Abbau in den im Schatten getrockneten Blättern wird besonders deutlich, wenn man die nach 20 und 63 Tagen ermittelten Gehalte mit den jeweiligen Werten der Ofenvariante vergleicht (s. Tab. 3.15.2).

Bezogen auf die praktische Anwendung erscheint es also ratsam das geerntete Blattmaterial von *P. microphyllum* Stapf so schnell wie möglich zu trocknen. Während allgemein eine Schattentrocknung gegenüber der Trocknung unter voller Sonneneinstrahlung als günstiger angesehen wird (37), hat sich im Falle von *Jabrandi folium* letztere Methode als vorteilhafter erwiesen. Die natürlichen Standorte von *P. microphyllum* Stapf liegen jedoch überwiegend in abgelegenen Waldgebieten, in denen es normalerweise keine größeren Freiflächen gibt, die eine Trocknung unter der Sonne ermöglichen würden. Ein schneller

Transport zu Standorten, an denen dann eine entsprechende Trocknung erfolgen könnte, würde je nach Methode zur Erhöhung der Pilocarpinausbeute um bis zu etwa 45 % führen.

4.16 Degradationsanalysen

Im Vergleich mit der Trocknung und Lagerung kommerzialisierter Pilocarpinblätter müssen die Bedingungen, bei denen die Blattproben in dieser Arbeit ausgesetzt waren, als günstig eingestuft werden. So erfolgte die Trocknung unmittelbar nach der Ernte, wobei die Kapazität des Ofens bei weitem unterschritten und so eine gleichmäßige Trocknung garantiert wurde. Die Proben wurden nach den Analysen in Plastiksäcken verpackt und lichtgeschützt aufbewahrt. Betrachtet man die Tatsache, daß es in keiner der Untersuchungen zu einer Degradation von mehr als 28,47% gekommen ist, vor dem Hintergrund der Aussage von Hammerslag (15), wonach es auch bei guten Lagerbedingungen im Laufe eines Jahres zu einem Abbau von 50% kommen kann, spricht dieses Ergebnis für die Behandlung der Blattproben. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Trocknungsversuche (s. 4.15) ist die relativ hohe Degradation, auf die sich Hammerslag (15) bezieht, wahrscheinlich auch nicht ein Problem der Lagerung, sondern vielmehr eine Frage der angewandten Trocknung.

Wenn aber die allgemeine Behandlung der Blattproben als günstig angenommen werden kann, ist es verwunderlich, daß die einzelnen Versuche der Degradationsanalysen zu relativ unterschiedlichen Ergebnissen geführt haben. Da man davon ausgehen kann, daß alle Proben in gleichem Zustand gelagert wurden, sind unterschiedliche Abbauraten der entsprechenden Pilocarpingehalte wahrscheinlich auf Einflüsse während der Lagerung zurückzuführen.

Obwohl alle die durch einen Wasserschaden (s. 2.12) offensichtlich betroffenen Plasiksäcke entfernt worden waren, ist es möglich, daß die Proben der Pflanze 1860457 Schaden genommen haben. Eine entsprechend erhöhte Feuchtigkeit würde eine Erklärungsmöglichkeit für die vergleichsweise hohen Verluste an Pilocarpin bieten.

Abgesehen von einem Wert, der als Ausreißer angesehen werden muß, machen die Ergebnisse von Proben der Versuchspflanze 52008821 (s. Tab. 3.16.1) deutlich, daß nach einer entsprechenden Behandlung und unter günstigen Bedingungen die Blätter von *P. microphyllus* Stapf auch nach einem Jahr nur relativ wenig an Pilocarpin verloren haben.

Basierend auf den Resultaten der Trocknungsversuche und Degradationsanalysen dieser Arbeit kann man also sagen, daß nach entsprechender Trocknung und bei lichtgeschützter Lagerung die Blätter von *P. microphyllus* Stapf über den Zeitraum eines Jahres relativ verlustfrei aufbewahrt werden können.

4.17 pH-Wert Bestimmung von wässrigen Blattextrakten

Neben den Trocknungsversuchen und den Degradationsanalysen stehen auch diese Untersuchungen im Zusammenhang mit dem Abbau von Pilocarpin in geernteten Blättern. Erste Hinweise auf einen Zusammenhang der Umwandlung von Pilocarpin und dem pH-Wert ergaben sich bereits Ende des 19. Jahrhunderts in den Arbeiten von Petit und Polonovski (in 5). Da diese Reaktionen zu einer Einschränkung beziehungsweise dem völligen Verlust der pharmakologischen Wirkung von Pilocarpin führen, hat es immer wieder Bemühungen gegeben, die Mechanismen der entsprechenden Reaktionen aufzuklären. So wurde von Nunes (27) ein Reaktionsschema vorgeschlagen, nach dem die Degradation des Alkloids in alkalischem Milieu in drei Schritten abläuft. Zunächst kommt es danach zur Hydrolyse von Pilocarpin, wobei Pilocarpinsäure gebildet wird. Bei dieser Reaktion erfolgt eine Öffnung des Lactonringes. Parallel dazu führt eine Epimerisierung von Pilocarpin zur Bildung von Isopilocarpin, das anschließend wiederum durch Hydrolyse zu Isopilocarpinsäure umgewandelt werden kann. In einer von Chung et al (8) veröffentlichten Studie wird die Hydrolyse von Pilocarpin als eine zyklische Reaktion dargestellt, die sowohl von sauren als auch von basischen Ionen katalysiert wird. In ihrer Veröffentlichung zur Stabilität von Pilocarpin in Pufferlösungen kommen Baechlin und Etter (in 2) zu dem Ergebnis, daß das Gleichgewicht und die Stabilität von Pilocarpin sehr stark vom pH-Wert abhängig ist. Bei einem pH-Wert von 4 fanden sie 87%, bei pH 6 nur noch 49% intaktes Pilocarpin. Heute geht man im allgemeinen davon aus, daß Pilocarpin in Lösungen mit einem pH-Wert von 4–5 relativ stabil ist (2,8).

Was für die isolierte Substanz gilt, trifft auch für die Verbindung in den Blättern von *Pilocarpus* zu. Um die Degradation von Pilocarpin im Zeitraum zwischen Ernte und Verarbeitung der Blättern zu unterbinden, wurde ein Verfahren entwickelt, welches die Stabilität von Pilocarpin auch in nicht getrockneten Blättern gewährleistet (51). Es handelt sich hierbei um eine Ansäuerung des Blattmaterials auf einen pH-Wert unter 5.

Betrachtet man sich nun die pH-Werte, die in den Extrakten der unterschiedlich getrockneten Blätter gemessen wurden (s. Tab 3.17), fällt es nicht schwer, den vergleichsweise starken Abbau von Pilocarpin in der Schattenvariante (vgl. 4.15) auf oben beschriebene Reaktionen zurückzuführen. Inwiefern neben Hydrolyse und Epimerisierung auch noch enzymatische Reaktionen (23) beim Abbau von Pilocarpin eine Rolle spielen, kann hier nicht entschieden werden.

Der im Extrakt frischer Blätter gemessene pH-Wert von 5,82 entspricht nach den oben zitierten Erkenntnissen theoretisch einem Milieu, welches sich ungünstig auf die Stabilität von Pilocarpin auswirken müßte. Da es aber in lebenden Blättern dennoch nicht zu einer entsprechenden Degradation kommt, ist sicher dadurch zu erklären, daß es sich bei diesem Ergebniss um einen Mischwert handelt, welcher nicht die pH-Bedingungen am Ort der Lagerung von Pilocarpin widerspiegelt.

4.18 Analyse frischer Blätter

Diese Untersuchungen wurden durchgeführt, um Hinweise auf einen möglichen Einfluß der Trocknung auf den Pilocarpingehalt von Pilocarpusblättern zu bekommen. Neben dem pH-Wert werden auch erhöhte Temperaturen für die Degradation von Pilocarpin verantwortlich gemacht (5).

Informationen aus diesen Analysen waren vor dem Hintergrund mehrerer Gesichtspunkte interessant. Zum einen sollte mit dieser Arbeit der Einfluß verschiedener Faktoren auf den Pilocarpingehalt von *P. microphyllus* Stapf unter so weit wie möglich natürlichen Bedingungen untersucht werden, also auch bezogen auf einen möglichst natürlichen Pilocarpingehalt. Zum anderen könnte es aus wirtschaftlichen Gesichtspunkten interessant sein zu sehen, ob eventuell durch eine direkte Extraktion des Pflanzematerials sofort nach der Ernte (nur bei Plantagenanbau realisierbar) auf eine zeit- und kostenaufwendige Trocknung verzichtet werden könnte.

Leider waren die Resultate der entsprechenden Analysen aber so ambivalent (s. Tab. 3.18), daß keine Aussagen zu den genannten Fragestellungen gemacht werden können. Das Scheitern des Versuches ist sehr wahrscheinlich auf die Tatsache zurückzuführen, daß es

jeweils zwischen den getrockneten und frischen Blättern zu große Altersunterschiede gegeben hat.

Bei künftigen Untersuchungen zu diesem Aspekt muß also besonders auf diesen Faktor geachtet werden. Ebenfalls wäre es denkbar, zeitversetzte Analysen, vor und nach der Trocknung, von ein und derselben Probe zu machen.

4.19 Chromatogrammmuster

Vor der Diskussion der im Kapitel 3.19 aufgeführten Punkte soll zunächst betont werden, daß es sich bei Angaben zu den Chromatogrammmustern insofern um subjektive Aussagen handelt, als außer dem Pilocarpinpeak kein anderes Signal identifiziert werden konnte. Aufgrund der Variation in den Retentionszeiten verschiedener Analysen könnte es somit zu fehlerhaften Interpretationen gekommen sein.

Trotz dieser Einschränkung liefert eine Betrachtung der Chromatogrammmuster interessante Hinweise. So ist es bemerkenswert, daß offenbar die Zusammensetzung des Blattextraktes, bezogen auf die unter den gegebenen Bedingungen nachweisbaren Verbindungen, charakteristisch für die jeweilige Pflanze ist. Die ausgeprägten Signale können zwar im Laufe eines Jahres schwanken, an der grundsätzlichen Zusammensetzung des Chromatogrammes ändert sich jedoch nichts (s. Abb. 3.19.1 und 3.19.2). Weiterhin scheint dieses Charakteristikum nicht von Entwicklungsstadien beeinflußt zu werden (vgl. Abb. 3.19.3 und 3.19.4) oder auf bestimmte Organe beschränkt zu sein (s. Abb. 3.19.5 und 3.19.6). Abgesehen von den Wurzeln ist die Zusammensetzung der nachweisbaren Sekundärstoffe also offenbar für die ganze Pflanze ein kennzeichnendes Merkmal.

Die Beobachtungen, wonach unterschiedliche Pflanzen ähnliche Signalspektren aufweisen und dies auch bei Pflanzen gleicher Abstammung der Fall war (vgl. Abb. 3.19.7 bis 3.19.10), läßt den Schluß zu, daß es innerhalb der Spezies *P. microphyllus* Stapf bestimmte Varietäten geben könnte. Da das Verhältnis von Pilocarpin zu den sogenannten Sekundäralkaloiden in den Blättern den Herstellungsprozeß beeinflußt, würde dies zum Beispiel erklären warum, Blattmaterial unterschiedlicher Herkunft unabhängig vom Pilocarpingehalt verschieden gute Erträge liefert (mündliche Information PVP). Als weitere Hinweise für diese Hypothese können Aussagen von Voigtländer et al. (54) herangezogen

werden, nach denen im Zusammenhang mit den Sekundäralkaloiden Pilosin und Isopilosin verschiedene Muster in unterschiedlichen Proben von *P. microphyllus* Stapf gefunden wurden. In einem anderen Artikel werden in Bezug auf das Vorkommen von Epiisopiloturin in *P. microphyllus* Stapf sogar die Bezeichnungen Varietät und Chemovarietät verwendet (53).

Da man heute davon ausgeht, daß der Sekundärstoffwechsel genetisch determiniert ist und das Vorkommen bestimmter Sekundärmetabolite auf chemische Rassen begrenzt sein kann (22), ist es durchaus denkbar, daß die unterschiedlichen Chromatogrammmuster in *P. microphyllus* Stapf auf genetisch unterschiedlich determinierten Enzymaktivitäten beruhen.

Ein aus praktischen Gründen wünschenswerten Zusammenhang zwischen der chemischen Zusammensetzung der Blattextrakte und ihrer Morphologie war nicht festzustellen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In Form von Blattaufgüssen der Droge Jaborandi wurde das Imidazolalkaloid Pilocarpin bereits 1876 von Weber in der Glaukomtherapie eingesetzt (46). Es war bis vor kurzem der wichtigste Wirkstoff zur Behandlung dieser Augenkrankheit. Obwohl seit 1933 ein Verfahren zur synthetischen Herstellung dieser Verbindung bekannt ist, wird Pilocarpin bis heute aus den Blättern einiger Vertreter der Gattung *Pilocarpus* Vahl extrahiert. Die bei weitem wichtigste Quelle für das entsprechende Pflanzenmaterial ist die Art *P. microphyllus* Stapf, welche überwiegend an unzugänglichen Standorten in abgelegenen Regionen Brasiliens wächst. Der Pilocarpingehalt der Blätter beträgt durchschnittlich weniger als 1%, und variiert relativ stark. Neben den niedrigen Gehalten an Pilocarpin und der dadurch entsprechend aufwendigen und kostspieligen Beschaffung des Blattmaterials, stellen die Degradationsprozesse, die während der Lagerung und der Verarbeitung der Blätter ablaufen, ein großes Problem bei der Gewinnung des Wirkstoffes dar.

Mit dieser Arbeit sollten, vor anwendungsbezogenem Hintergrund, die Einflüsse endogener und exogener Faktoren auf den Pilocarpingehalt von *P. microphyllus* Stapf unter natürlichen Bedingungen untersucht werden. Ziel dabei war es, ein möglichst breit gefächertes Informationsspektrum zu erstellen, auf dessen Basis eine Steigerung des Pilocarpingehaltes im Ausgangsmaterial der Pilocarpinproduktion ermöglicht werden sollte. Methodisch bedingt handelt es sich bei den Ergebnissen demnach zum Teil mehr um allgemeine Hinweise und Tendenzen als um detaillierte Resultate.

Aus den Beobachtungen, die im Verlauf der Arbeit an den Versuchspflanzen gemacht wurden, ging hervor, daß die Entwicklung von *P. microphyllus* Stapf vergleichsweise langsam verlief. In einen Zeitraum von fünf Jahren betrug die durchschnittliche Größe der Pflanzen 1,20 Meter, wobei die Variationsbreite zwischen 0,20 und 3,00 Metern lag. Die Art bei der keine ausgeprägte Blütezeit festgestellt werden konnte, erwies sich als sehr schattentolerant, zeigte aber auch an Standorten mit voller Sonneneinstrahlung keine Veränderungen in ihrer Entwicklung. Die Form der Infloreszenzen sowie die Tatsache, daß während der Blütezeit vermehrt Ameisen auf den Blütenständen beobachtet wurden, lassen vermuten, daß es sich bei der Bestäubung um Zoophilie handelt.

Blätter und Blättchen der Versuchspflanzen wiesen alle Merkmale auf, welche in der Literatur (11, 19) als charakteristisch für *P. microphyllus* Stapf angegeben werden. Unabhängig davon wurden aber relativ große Unterschiede bezüglich der Anzahl und Form der Blättchen, sowie der Farbe und Konsistenz festgestellt. Was die Färbung der Blättchen betraf, konnte gezeigt werden, daß diese sowohl von der Lichtintensität am Standort, als auch vom Alter der Blätter abhängig war. Sonnenblätter waren vergleichsweise heller als Schattenblätter und jüngere Blätter waren ebenfalls heller als ältere. Ganz junge Blätter waren oft rötlich braun gefärbt. Die Blattfärbung spielte bei den Untersuchungen insofern eine bedeutende Rolle, als sie neben der Konsistenz und Blattfolge als Kriterium zur Bewertung des Blattalters herangezogen wurde (siehe unten).

Mit dem Ziel, Pflanzenmaterial gleicher genetischer Herkunft untersuchen zu können, wurde versucht, die Pflanzen über Keimlinge und Sprossteklinge zu vermehren. Während erstere Versuche zu Keimraten von bis zu mehr als 80% führten, blieben die Bemühungen einer Stecklingsvermehrung trotz unterschiedlicher Ansätze erfolglos.

Im Zusammenhang mit Untersuchungen zum Einfluß endogener Faktoren auf den Pilocarpingehalt in den Blättern, wurden vegetative Merkmale (Blüten, Knospen, Früchte und Blattaustriebe) den jeweiligen Gehalten gegenübergestellt. In einem Zeitraum von zehn Monaten konnten bei keiner der Versuchspflanzen ein Zusammenhang zwischen dem jeweiligen vegetativen Zustand und der Menge an Pilocarpin in den Blättern festgestellt werden.

Während der vegetative Zustand von *P. microphyllus* Stapf keine offensichtlichen Auswirkungen auf den Pilocarpingehalt der Blätter hatte, ergaben die Versuchsreihen zum Blattalter einen deutlichen Einfluß dieses endogenen Faktors. In zahlreichen Analysen konnte gezeigt werden, daß junge Blätter durchschnittlich 70% mehr Pilocarpin enthalten als alte Blätter der jeweils selben Pflanze. Dieses Phänomen läßt sich zum Beispiel mit der phasenabhängigen Bildung bestimmter Enzyme während der Differenzierungsvorgänge der entsprechenden Gewebe erklären. Ein möglicher Hormoneinfluß wäre ebenfalls an die Differenzierungsprogramme gebunden.

Die Bestimmungen der Pilocarpingehalte von Sämlingen gleicher genetischer Herkunft ließ keine genetische Determination des Pilocarpingehaltes erkennen. Die

Chromatogrammspektren innerhalb der entsprechenden Verwandtschaftsgruppen waren jedoch relativ ähnlich. Die Aussagekraft dieser Analysen ist aber insofern eingeschränkt, als es sich bei Sämlingen um genetisch nicht völlig identische Pflanzen handelt.

Pilocarpin wurde in unterschiedlichen Konzentrationen in allen Teilen von *P. microphyllus* Stapf nachgewiesen. Im Einklang mit den Untersuchungen zum Blattalter, wurden die höchsten Gehalte dabei in jungen Geweben gefunden. Beachtenswert war hier außerdem die Tatsache, daß das Alkaloid auch in den Wurzeln, und zwar in Konzentrationen von bis zu 4,64 mg/g, nachgewiesen werden konnte. Nach Aussagen von Nunes (27) findet zwar der Großteil der Biosynthese von Pilocarpin in diesen Organen statt; die dort entstandene Verbindung, das Pilocarpidin, wird dann aber erst nach dem Transport in die Blätter zu Pilocarpin methyliert.

In Langzeitbeobachtungen über den Zeitraum eines Jahres, konnten in allen Fällen Schwankungen im Pilocarpingehalt der Blätter beobachtet werden. Bis auf eine Ausnahme verliefen diese Änderungen nach einem ähnlichen Muster, welches sich jedoch nicht mit klimatischen Faktoren in einen logischen Zusammenhang bringen ließ. Tendenziell enthielten die Blätter danach im Dezember und Januar sowie im Juli höhere Gehalte an Pilocarpin als in den übrigen Monaten des Jahres.

Als ein exogener Faktor mit deutlichem Einfluß auf den Pilocarpingehalt der Blätter, wurden die Strahlungsverhältnisse identifiziert. Bei vergleichenden Analysen von Versuchspflanzen, welche in einem Schattenbeet wuchsen, mit solchen, die der vollen Sonneneinstrahlung ausgesetzt waren, wurde deutlich, daß die Schattenpflanzen durchschnittlich etwa 37% mehr Pilocarpin enthielten. Die Beschattung der entsprechenden Pflanzen erfolgte durch Blätter von *Passiflora*, weswegen zur Erklärung der Beobachtungen nicht nur die quantitativen Unterschiede, sondern auch die Auswirkungen einer veränderten Lichtqualität berücksichtigt werden mußten. Demnach könnte sich neben morphologischen Unterschieden zwischen Sonnen- und Schattenblättern eine Veränderung des Spektralbereiches, über das Phytochromsystem, auf die Biosynthese von Pilocarpin auswirken.

In einem Düngungsversuch konnte gezeigt werden, daß sich die Nährstoffversorgung entscheidend auf den Pilocarpingehalt auswirken kann. Nach dreimaliger Zugabe eines

Düngers, welcher vor allem die Phosphat- und Kaliumversorgung der Pflanzen verbesserte, wurden Mengen an Pilocarpin gefunden, welche um bis zu knapp 300% über den Werten vor der Düngung lagen.

Experimente mit unterschiedlichen Methoden zur Trocknung von geernteten Pilocarpusblättern ergaben, daß die Art der Trocknung einen entscheidenden Einfluß auf den Gehalt an Pilocarpin in den Blättern nach der Ernte hat. Nach einer Ofentrocknung an Stelle der normalerweise üblichen Schattentrocknung, enthielten die Blätter 46,91% mehr Pilocarpin. Auch gegenüber einer Trocknung unter Sonneneinstrahlung verbesserten sich die Resultate bei der Ofenbehandlung um fast 27%. In parallel durchgeführten Analysen zeigten die im Schatten getrockneten Blätter mit 6,7 einen deutlich höheren pH-Wert als die Proben der anderen Varianten mit einem pH von 5,44. Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit Angaben, wonach die Degradation von Pilocarpin stark vom pH-Wert beeinflußt wird (2, 7,8).

Unter günstigen Lagerbedingungen konnten Pilocarpusblätter für mindestens ein Jahr ohne größere Verluße an Pilocarpin aufbewahrt werden.

Im Laufe dieser Arbeit ergaben sich aus den Chromatogrammspektren der verschiedenen Analysen Hinweise auf verschiedene, möglicherweise chemische, Varietäten innerhalb der Art *P.microphyllus* Stapf. Pflanzen mit jeweils ähnlichen Spektren zeigten jedoch keinerlei Gemeinsamkeiten in morphologischen Aspekten ihrer Blätter.

6. SUMMARY

As far back as 1876 the imidazol alkaloid Pilocarpine was applied by Weber in the therapy of glaucoma (46), in the form of infusions which he prepared from the leaves of the drug Jaborandi. It has been until recently the most important active ingredient in the treatment of this eye disease. Even though since 1933 there exists a method for the synthesis of Pilocarpine, the alkaloid is still obtained by extraction from leaves of some *Pilocarpus* species. Today *P. microphyllus* Stapf, which grows predominantly in inaccessible tropical parts of remote regions in Brazil, is by far the most important source of Pilocarpine. Leaves of this species contain an average of less than 1% of the alkaloid and the content varies strongly. Besides the low contents of Pilocarpine and the costly procedures to obtain the leaves, the degradation processes represent a big problem in the production of the active ingredient. Such degradation processes occur during the storage and the treatment of the leaves.

In this dissertation the influence of endogenous and exogenous factors that possibly affect on the content of Pilocarpine in *P. microphyllus* Stapf under natural conditions has been analyzed. The goal has been to obtain a wide spectrum of information, which should facilitate the increase of the Pilocarpine content in the raw material of the production. Thus, due to methodical reasons, the outcome of this work is partly more about general references and tendencies than about very detailed results.

Based on the observations realized on the experimental plants during this work, it followed that the development of *P. microphyllus* Stapf was comparatively slow. In a period of time of five years the average size of the plants was 1,20 meters, with a range between 0,20 and 3,00 meters. No distinctive period of blossom could be determined. The plant proved to be very tolerant towards shade, although in conditions with full sunlight the plants did not show alterations in their development. The form of inflorescences as well as the fact that while in blossom an increased number of ants was observed on the inflorescences, lead to the conclusion that the kind of pollination could be characterized as zoophily.

The leaves of the experimental plants showed all the features indicated in the bibliographical reference (11, 19) as characteristic for the species *P. microphyllus* Stapf.

Nevertheless, relatively important differences within the species were observed concerning the number and the form of the leaves, as well as the color and consistency. It could be shown that the color of the leaves was dependent both on the intensity of the light in the natural habitat and on their age. Shade leaves were comparatively darker than sun leaves, and old leaves were also darker than young ones. Very young leaves were often reddish brown. The leaf color represented in so far an important role in the investigation, as besides the consistency and the sequence of the leaves, the color was used to evaluate its age as well (see below).

To obtain genetically identical plant material, attempts were made to propagate plants by seedlings and stem-cuttings. The seedling experiments resulted in germination rates of more than 80%, meanwhile various cutting attempts did not lead to any success.

In studies regarding the influence of endogenous factors on the content of Pilocarpine in the leaves, vegetative features (flowers, buds, fruits) were compared with the respective Pilocarpine contents. During a 10 months observation period no correlation could be determined between the vegetative characteristics and the content of Pilocarpine.

Unlike vegetative features, the age of the leaves was determined as an endogenous factor with a significant influence on the Pilocarpine content. In numerous analysis it could be shown that young leaves contain in average 70% more Pilocarpine than old ones of the same plant. An explanation for this observation could be the phase-dependent formation of certain enzymes during development stages in the differentiation process of the respective tissues. A possible influence of hormones could be also correlated to those differentiation processes.

The analysis of Pilocarpine content of seedlings of genetically identical origin did not show any genetic determination of the Pilocarpine content. The chromatogram patterns within related plants were, however, quite similar. In any case it has to be considered that seedlings are genetically not completely identical.

Pilocarpine was found in all parts of *P. microphyllum* Stapf. In compliance with the results of the investigation regarding the influence of age, the highest contents were found in young tissues. Noteworthy is the fact that the alkaloid was also found in the roots, in

quantities up to 4,64 mg/g. According to Nunes (27), the main part of the biosynthesis of Pilocarpine takes place in the roots. However, the so formed compound Pilocarpidin is methylated to Pilocarpine just after its transport into the leaves.

In observations made during a period of time of one year, fluctuations of the Pilocarpine content in the leaves were found in all cases. Besides one exception, those fluctuations showed a similar pattern. Accordingly, leaves contained more Pilocarpine in December, January and July than during the rest of the year. However, no correlation with climatic factors could be found.

Radiation conditions were identified as an external factor with significant influence on the Pilocarpine content of the leaves. In analysis comparing leaves of plants growing in full sunlight and those growing under shade, the average content of Pilocarpine of the latter was 37% higher. As shade was provided by leaves of *Passiflora* plants, not only differences in quantity but also in light quality should be considered. Accordingly, morphological differences between sun-, and shade leaves, as well as changes of the light spectrum via the phytochrome system, could influence the biosynthesis of Pilocarpine.

In an experiment with a fertilizer it could be shown that the nutrient supply has a significant importance on the Pilocarpine content. After a three times application of a fertilizer, which mainly improved the phosphate and potassium supply of the plants, up to 300% more Pilocarpine was found compared with contents before the application.

Experiments with different drying techniques of harvested leaves revealed that the applied drying method has a decisive influence on the Pilocarpine content of the leaves. Comparing drying in an oven with the usual shade drying, the first method lead to 46,91% more Pilocarpine in the leaves. In comparison with sun drying, the oven method was 27% more effective as well. Parallel analysis revealed that the pH value of 6,7 in leaves dried in the shade was significantly higher than the pH value of the other samples with 5,44. Those observations fit with information that degradation of Pilocarpine is strongly influenced by the pH value (2,7,8).

Under suitable conditions it has been possible to store dried *Pilocarpus* leaves for at least one year without important loss in Pilocarpine.

Based on the chromatograms obtained during this dissertation, indications for different, possibly chemical, varieties of the species *P.microphyllus* Stapf were revealed. Nevertheless, there were no common morphological features in the leaves of plants with similar chromatogram patterns.

7. LITERATUR

1. A Process for preparing Alkaloids. International Publication number WO 90/12102
2. Abdullah A, Al-Badr, Hassan Y, Aboul-Enein: Pilocarpine. In: Florey K (Hrsg.): Analytical Profiles of Drug Substances. 1983; 12: 386 –427.
3. Aperfeiçoamento em processo para a obtenção de composições cosméticas, destinadas ao cuidado, conservação e regeneração do cabelo e respectivas composições. Carta Patente No PI 9303355-9.
4. Barz W, Köster J: Turnover and Degradation of Secondary (Natural) Products. In: Conn E E (Hrsg.): The Biochemistry of Plants. Vol. 7, Academic Press, New York. 1981; 35 – 84.
5. Battersby AR, Openshaw HT: The Jaborandi Alkaloids. In: Manske R F H, Holme HL (Hrsg.) The Alkaloids Chemistry and Physiology. 1953; 3: 206 –246.
6. Bundgaard H, Hansen SH: Hydrolysis and epimerization kinetics of pilocarpin in basic aqueous solution as determined by HPLC. International Journal of Pharmaceutics. 1982;10: 281-289.
7. Carvalho JCT: Jaborandi. Revista Racine.1999;48: 69.
8. Chung PH, Chin TF, Lach JL: Kinetics of the Hydrolysis of Pilocarpine in Aqueous Solution. J. Pharm. Sci.. 1970; 59: 1300 – 1306.
9. Corrêa M Pio: Jaborandi. Dicionário das Plantas úteis do Brasil. Vol. 5. Ministerio da Agricultura, Rio de Janeiro. 1996; 360 –369.
10. Craveiro AA, Andrade CHS, Matos FJA, Alencar JW: Essential oils from brazilian Rutaceae. I. Genus Pilocarpus. Journal of Natural Products. 1979; 42/ 6: 669 – 671.
11. Eilert U: Monographie Pilocarpus. In: Hänsel R, Keller K, Rimpler H, Schneider G (Hrsg.): Hagers Handbuch de Pharmazeutischen Praxis 6 Drogen P -Z. Springer Verlag, Stuttgart. 127 –135.
12. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropequária-EMBRAPA: Boletim Agrometeorológico I. Titulo, II Serie. EMBRAPA-CNPAl, Parnaíba (PI). 1990.
13. Endress R: Plant Cell Biotechnology. Springer.1994.
14. Ennet D: Heilpflanzen und Drogen, 2. Aufl. Bibliographisches Institut, Leipzig. 1990.
15. Hamerslag F E: Alkaloids of Pilocarpus. In: The Technology and Chemistry of Alkaloids. Van Nostrand, New York. 1950.

16. Hartmann, Kester: Plant propagation principles and practices. Prentice-Hall Inc., Engelwood Clifs, NJ. 1959; 177-265.
17. Henry TA: The Plant Alkaloids. 4 Ed. Blankiston, Philadelphia. 1949; 621-629.
18. Holmstedt B, Wassen SH, Schultes RE: Jaborandi: An interdisciplinary Appraisal. Jurnal of Ethnopharmacology. 1997; 1: 3 -21
19. Kaastra RC: Pilocarpinae (Rutaceae). In: Flora Neotropica. The New York Botanical Garden. 1982; Monograph 33.
20. Kennedy JM, McNamara PE: High –Performance Liquid Chromatographic Analysis of Pilocarpine Hydrochloride, Isopilocarpin, Pilocarpic Acid and Isopilocarpic Acid in Eye –Drop Preparations. Journal of Chromatography. 1981; 212: 331-338.
21. Löwe W, Pook KH: Pilosin und Epiisopilosin. Liebigs Ann. Chem. 1973; 1476 –1479.
22. Luckner M, Diettrich B: Die Regulation des Sekundärstoffwechsels. In: Czygan FC: Biogene Arzneistoffe. Vieweg & Sohn, Braunschweig/ Wiesbaden.1984: 45-59.
23. Maat L, Beyerman HC: Pilocarpine: A Jaborandi Alkaloid. In: Brossi A: The Alcaloids. Academic Press, New York. 1983; 22: 284 –302.
24. Merck Index , Twelfth Edition. p.1277. 1996.
25. Meyer VR: Praxis der Hochleistungs-Flüssigchromatographie, 7 Aufl.. Salle Sauerländer. 1992.
26. Mitchel JW, Marth PC, Tukey HB, Wells JS: Stem-Cutting Method. In: Mitchel JW Livingston GA (Hrsg.): Methods of Studying Plant Hormones and Growth-Regulating Substances. Agriculture Handbook No. 336. US State Dep. Of Agriculture, Washington. 1968; 79-81.
27. Nunes MA: Pilocarpine: Studies on its biosynthesis and in vitro degradation. University of California, San Francisco, Ph.D., 1974. Chemistry, pharmaceutical.
28. Oral Pilocarpin Hydrochloride for Radiation- induced Dry Mouth. <http://oncolink.upenn.edu/pia/salagen.html>. 1996.
29. Pelletier SW (Ed.): Alkaloids: Chemical and Biological Perspectivs. Vol. 2. John Wiley & Sons Inc., New York.
30. Pilocarpine. [http:// www.gsm.com](http://www.gsm.com). 1998.
31. Pinheiro CUB: Jaborandi (Pilocarpus Sp., Rutaceae): A wild species and its rapid transformation into a crop. Economic Botany. 1997; 51/ 1: 49-58.
32. Procédé de producion de pilocarpine. Europäisches Patentamt. Publikationsnummer 0 674 007 A1

33. Process for the Extraction and Purification of Alkaloids: International Publication number WO 95/01984
34. Process for the Extraction and Purification of Pilocarpine: US Patent Office 3,631,059
35. Rehm S: Spezieller Pflanzenbau in den Tropen und Subtropen. In: Rehm S (Hrsg.). Handbuch der Landwirtschaft und Ernährung in den Entwicklungsländern. 2. Aufl., Band 4. Ulmer, Stuttgart.1989; 530.
36. Rehm S, Espig G: The Cultivated Plants of the Tropics and Subtropics. Verlag Josef Margraf, Weikersheim. 1991; 256.
37. Rimpler H: Biogene Arzneistoffe, 1 Aufl., 1. Nachdr. G. Fischer, Stuttgart. 1997.
38. Saraev PJ: Kultura lekarstvennych rastenij. Medgiz, Moskva. 1952.
39. Schachtschabel P, Blume H-P, Brümmer G, Hartge K-H, Schwertmann U: Scheffer/Schachtschabel. Lehrbuch der Bodenkunde. 13. Aufl., Enke, Stuttgart. 1992.
40. Scheerer J, Vieira IGP, Jacob G: Extraction and Analysis of the Natural Active Ingredient Pilocarpin. BIOforum international. 1997;1: 38 – 41.
41. Scheerer J: Versuche zur Kultivierung der Medizinalpflanze *Pilocarpus microphyllus* Stapf unter besonderer Berücksichtigung von Mykorrhiza. Georg-August-Universität zu Göttingen, Diplomarbeit, 1995. Pflanzenphysiologisches Institut.
42. Schulz J: Die Ökozonen der Erde. Ulmer, Stuttgart. 1988.
43. Shellard EJ: Jaborandi: A note on the contribution of EM Holmes to the identification of commercially available *Pilocarpus* and species. Journal of Ethnopharmacology. 1997; 1: 407 –410.
44. Sitte P, Ziegler H, Ehrendorfer F, Bresinsky A: Strassburger Lehrbuch der Botanik. 33. Aufl., G. Fischer, Stuttgart. 1991; 749-750.
45. Souza MP: Jaborandi. Constituintes químicos ativos de plantas medicinais brasileiras. Edições UFC Laboratório de Produtos Naturais, Fortaleza. 1991.
46. Strozki FE: Pilocarpin – der Weg einer Pflanze in die Medizin. PZ. 1991;136: 282 –286.
47. Troll C, Pfaffen KH: Jahreszeitenklimata der Erde. CVK und Schroedel Geographische Verlagsgesellschaft, Berlin. 1968.
48. USP XXIII. S. 1226
49. Van Ackeren JL, Venable RM, Wainer IW: Separation and Analysis of Pilocarpine, Isopilocarpine, and Pilocarpic Acid by Reversed Phase Liquid Chromatography: Collaborative Study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1984; 67/ 5: 924 – 926.

50. Van Horne K C (Hrsg.): Handbuch zur Festphasenextraktion. 1 Aufl., Internationale Chemie-Technik GmbH, Bad Homburg. 1993.
51. Verfahren zur Herstellung von Pilocarpin aus in vitro-Kulturen von Pilocarpus. Patent Nr. DE 4009392 A1.
52. Verfahren zur Stabilisierung von Alkaloiden: Patent Nr. DE 3743834 A1
53. Voigtländer HW, Balsam G, Engelhardt M, Pohl L: Epiisopiloturin, ein neues Pilocarpus-Alkaloid. Arch. Pharm. 1978; 311: 927 – 935.
54. Voigtländer HW, Rosenberg W: Über Isopilosin und Pilosin. Archiv der Pharmazie. 1952; 292: 579 – 585.
55. Weber JD: Pilocarpine Hydrochloride in Ophthalmic Solutions: Modification of High-Pressure Liquid Chromatographic Determination and Survey. Journal of the AOAC. 1976; 59/ 6: 1409 – 1415.
56. Wiermann R. Secondary Plant Products and Cell and Tissue Differentiation. 86 –113.

Anhang I

Übersichtskarte von Nord-Brasilien



Anhang II

Analyseergebnisse von Bodenproben natürlicher Standorte von *P. microphyllus* Stapf

	Standorte		
	Xingu 1	Xingu 2	Luzilandia
pH in Wasser	4,37	5,02	6,42
Leitfähigkeit(μ S)	380	530	390
C (%)	3,90	2,40	3,75
N (%)	0,34	0,21	0,34
P (ppm)	3,35	7,38	4,69
K (ppm)	121,89	139,30	174,00
Na (ppm)	16,42	16,42	41,05
Ca ²⁺ (meq/100ml)	1,70	5,10	8,50
Mg ²⁺ (meq/100ml)	0,50	2,00	2,50
Al ³⁺ frei (meq/100ml)	0,00	0,00	0,00
Al ³⁺ geb. (meq/100ml)	1,47	0,53	0,41
org. Subst.(%)	6,72	4,13	6,47

Anhang III

Zusammenstellung der Werte für die relative Luftfeuchtigkeit in % im Zeitraum von 1978 bis 1987 im Município Parnaíba, Brasilien (aus 12).

ANO	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ	MED
1978	77.0	76.0	84.0	82.0	80.0	78.0	73.0	70.0	70.0	69.0	69.0	70.0	74.8
1979	78.0	79.0	88.0	87.0	83.0	80.0	74.0	72.0	71.0	72.0	70.0	73.0	77.3
1980	83.0	79.0	87.0	88.0	85.0	80.0	80.0	73.0	72.0	71.0	72.0	76.0	78.8
1981	76.0	79.0	86.0	87.0	83.0	77.0	73.0	71.0	70.0	70.0	70.0	73.0	76.3
1982	73.0	78.0	78.0	78.0	74.0	71.0	69.0	69.0	70.0	70.0	70.0	71.0	72.6
1983	77.0	82.0	85.0	84.0	78.0	72.0	74.0	72.0	68.0	71.0	70.0	70.0	75.3
1984	75.0	76.0	82.0	78.0	83.0	74.0	72.0	70.0	69.0	70.0	70.0	74.0	74.4
1985	74.0	84.0	83.0	80.0	74.0	75.0	71.0	70.0	70.0	69.0	69.0	71.0	74.2
1986	78.0	77.0	85.0	82.0	83.0	78.0	75.0	70.0	70.0	68.0	70.0	73.0	75.8
1987	76.0	77.0	82.0	78.0	82.0	76.0	73.0	71.0	68.0	69.0	70.0	71.0	74.4
MED	76.7	78.7	84.0	82.4	80.5	76.1	73.4	70.8	69.8	69.9	70.0	72.2	75.4

Lebenslauf

Name: Jochen Scheerer
Geburtsdatum: 08.07.67
Geburtsort: Dillenburg

Schulbildung

8/ 1973 – 7/ 1977 Grundschole der Stadt-Schole Biedenkopff
9/ 1977 – 6/ 1986 Lahntalschole-Gymnasium Biedenkopff
05.06.1986 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

7/ 1986 – 9/ 1987 Stabskompanie V./TSLw 2

Akademische Ausbildung

10/1988 – 9/ 1991 Studium Biologie-Diplom an der Technischen Hochschule Darmstadt

25.06.1991 Diplom-Vorprüfung

10/1991 – 11/1995 Studium Biologie-Diplom an der Georg-August-Universität Göttingen

2/1995 – 10/1995 Anfertigung der Diplomarbeit: ‘‘Versuche zur Kultivierung der Medizinalpflanze *Pilocarpus microphyllus* Stapf unter besonderer Berücksichtigung von Mykorrhiza’’ unter Anleitung von Herrn Prof. J.E. Graebe, Ph.D.

19.10.1995 Diplom- Hauptprüfung

Seit 10/1995 Eingeschriebener Student an der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg im Studiengang Biologie-Promotion. Anfertigung der Dissertation mit dem Titel: ‘‘Untersuchungen zum Einfluß exogener und endogener Faktoren auf den Pilocarpingehalt von *Pilocarpus microphyllus* Stapf ex Wardleworth unter natürlichen Bedingungen’’ in Parnaiba, Brasilien unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Franz-C. Czygan.

Berufliche Tätigkeit

3/ 1996- 3/ 2000 Leiter der Abteilung für Qualitätskontrolle der Firma PVP in Parnaiba, Brasilien

2/ 1998- 3/2000 Leiter des Qualitätslabors der Firma PVP in Parnaiba, Brasilien

Seit 9/2000 Umweltbeauftragter der Firma Curtidos Codina in Vic, Spanien

DANKE

Bei Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Franz C. Czygan möchte ich mich ganz herzlich für die Annahme dieser Arbeit und sein Engagement bedanken. Von seiner freundlichen Betreuung habe ich nicht nur fachlich, sondern auch menschlich sehr profitiert.

Zu besonderem Dank bin ich Herrn Dr. Marc Theophil Jacob verpflichtet. Ohne sein Interesse am Thema dieser Dissertation wäre diese Arbeit nicht entstanden. Außerdem möchte ich mich für seine sachkundigen Hinweise und Ratschläge bedanken.

Herrn Prof. Dr. Wolfram Hartung danke ich vielmals für die Übernahme des Korreferates und seine Anregungen und Hinweise zu dieser Arbeit.

Gustavo möchte ich ganz herzlich für seinen fachlichen Beistand und die freundschaftliche Unterstützung danken.

Vielen Dank an alle Mitarbeiter der Firma PVP, die mir bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren. Besonders an Socorro und Itelvina für ihre Hilfe im Labor, und an Francisco für die gärtnerische Betreuung der Pflanzen.

Ein herzliches Dankeschön an die Studentinnen und Studenten der Universität von Piauí, die mir während ihrer Praktikantenzeit, bei der Katalogisierung der Versuchspflanzen behilflich waren.

Vielen herzlichen Dank an Frau Revels für Ihre stetige Hilfsbereitschaft und die Bewältigung des bürokratischen Teils dieser Arbeit.

Meinen Eltern danke ich besonders herzlich für ihr Interesse am Fortgang dieser Arbeit und ihre Unterstützung.

Der Firma ITC danke ich für die kostenlosen Proben der Festphasensorbentien und das Informationsmaterial.

Ein besonderes Dankeschön an Xevi für die Überlassung seines Computers auf dem diese Dissertation geschrieben wurde.

Ganz besonders möchte ich mich bei Familie Jacob für die herzliche Aufnahme und ihre freundschaftliche Unterstützung für meine Familie und mich bedanken.

Ein großes Dankeschön an Axel, Katrin und Volker für die Durchsicht der Arbeit und die Hilfe beim Korregieren.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei Anny für ihre Geduld und ihr Verständnis bedanken. Vor allem aber für ihre Bereitschaft mit mir nach Brasilien zu gehen.