

## Zusammenfassung

Die Wurzeldroge des Meerrettichs (*Armoracia rusticana* G.Gaertn., B.Mey. & Scherb.) wird aufgrund ihres Gehaltes an Glucosinolaten, welche durch Fermentation zu den antibakteriell wirkenden Isothiocyanaten (Senfölen) umgesetzt werden, in der rationalen Phytotherapie gegen Infektionen der Atemwege und der ableitenden Harnwege eingesetzt. Um zu untersuchen, ob weitere Sekundärstoffe aus der Droge neben den Senfölen zur Wirkung beitragen, wurde ein methanolisch-wässriger Extrakt (7/3; V/V) aus Meerrettichwurzeln hergestellt und säulenchromatographisch an Sephadex®LH-20-, Kieselgel- und RP18-Phasen fraktioniert.

Rund 76 Komponenten konnten im Extrakt identifiziert oder weitestgehend charakterisiert werden. Durch LC-MS<sup>2</sup>, kapillarelektrophoretische, dünnschichtchromatografische und NMR-Experimente konnten Kämpferol-3-O-β-D-xylopyranosyl-(1'''→2'')-β-D-galactopyranosid (Cmpd 53), Kämpferol-3-O-β-D-glucopyranosid (Astragalin; Cmpd 58), Kämpferol-3-O-β-D-xylopyranosid (Cmpd 59), Kämpferol-3-O-β-D-glucopyranosyl-7-O-β-D-glucopyranosid (Cmpd 39) und Cmpd 39a ganz, bzw. teilweise strukturell aufgeklärt werden. Außerdem konnten das bisher noch nicht in *A. rusticana* beschriebene Kämpferol-3-O-α-L-rhamnopyranosyl-(1'''→6'')-β-D-glucopyranosid (Nicotiflorin; Cmpd 56), Kämpferol-3-O-β-D-xylopyranosyl-7-O-β-D-glucopyranosid (Populnin-3-O-xylopyranosid; Cmpd 41), Kämpferol-3-O-β-D-xylopyranosyl-(1''''→2''')-β-D-galactopyranosyl-7-O-β-D-glucopyranosid (Cmpd 35), sowie Spirobrassinin (Cmpd 68) strukturell aufgeklärt werden. Des Weiteren konnte mittels LC-MS-Messung ein Strukturvorschlag für Cmpd 73 gemacht werden, welcher darauf hindeutet, dass es sich wahrscheinlich um ein Phenyl-thiazol-Derivat handelt. Außerdem konnte das Vorkommen von *N*-Phenylpropenoyl-L-aminosäureamiden und Lysophosphatidylethanolaminen und -cholinen, die bisher nicht für die Gattung *Armoracia* beschrieben wurden, gezeigt werden.

Der fermentierte, isothiocyanathaltige Extrakt zeigte eine antibakterielle Aktivität gegen uropathogene *Escherichia coli* (Stamm NU14 und UTI89; IC<sub>50</sub>: 2,33; bzw. 2,46 mg/mL) und *Pseudomonas aeruginosa* (Stamm 9027 und 27853; IC<sub>50</sub>: 19,26

bzw. 22,38 mg/mL), während der nicht fermentierte – isothiocyanatfreie – Extrakt gegen diese Pathogene inaktiv war.

Nicht fermentierter Extrakt hemmte die Biofilmbildung von *E. coli* 2980, TOP10, UPEC CFT073 (IC<sub>50</sub>: 4,42; 7,28 bzw. 7,26 mg/mL), jedoch nicht von UPEC J96 und NU14 oder von *P. aeruginosa* 27853 und 9027. Fermentativ umgesetzter Extrakt, welcher jedoch isothiocyanatfrei hergestellt wurde, konnte das *quorum sensing* von *E. coli* TOP10 hemmen (IC<sub>50</sub>: 2,37 mg/mL), wohingegen der nicht fermentierte Extrakt unwirksam war.

Nicht fermentierter Extrakt (4 mg/mL) zeigte eine signifikante Wirkung gegenüber der bakteriellen Adhäsion von UPEC NU14 und *E. coli* 2980 an humanen T24 Blaszellen ohne die Vitalität der eukaryotischen Wirtszellen zu beeinflussen (IC<sub>50</sub>: 4,86; 10,08 mg/mL). Durch Testung von rekombinierten Fraktionen und Berechnungen mittels der *partial least squares regression* Methode (*pls*) konnten für die antiadhäsive Aktivität die Flavonolglykoside Cmpd 56, Cmpd 58, Cmpd 53, Cmpd 59, nicht weiter identifizierte Flavonoid-Glykoside, Fettsäuren, Palmitoyllysolecithin, Histidin und Spirobrassinin, sowie verschiedene Derivate an Lysophosphatidylethanolaminen und -cholinen verantwortlich gemacht werden. Einen zusätzlichen hemmenden Effekt auf die Invasion der Bakterien in die Blaszellen hatte der Extrakt nicht.

Der unfermentierte Extrakt reduzierte die Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) aus LPS-stimulierten RAW 264.7-Makrophagen (IC<sub>50</sub>: 93,08 µg/mL) ohne die Phagozytoserate zu beeinflussen. Der in der *pls* als wirksam prognostizierte Cmpd 35 und das Glucosinolat Sinigrin hatten im Assay eine hemmende Wirkung auf die NO-Freisetzung ab einer Konzentration von 1 mM (IC<sub>50</sub>: 1,04; bzw. 2,47 mM).

Unterschiede in den LC-MS-Profilen von Haupt- und Nebenwurzeln der Pflanze, von Drogen-Chargen verschiedener Erntezeitpunkte, sowie der Einfluss der Fermentation und der thermischen Entkeimung ergaben, dass eine chinesische Importware, bestehend aus Nebenwurzeln, weniger Flavonoide und Gluconasturtiin enthält. Eine thermisch entkeimte Charge war enzymatisch weniger aktiv und enthielt weniger an Lysophosphatidylethanolaminen/-cholinen und Palmitoyllysolecithin als die nicht entkeimte Charge.

## Abstract

Roots of horseradish (*Armoracia rusticana* G.Gaertn., B.Mey. & Scherb.) are used within rational phytotherapy against infections of the upper respiratory tract and the urogenital system due to their content of glucosinolates, which, by enzymatic catalysis, decompose to antibacterial isothiocyanates, also known as mustard oils. In order to investigate whether other compounds in addition to the mustard oils contribute to the observed effect, a methanolic extract (7/3; V/V; MeOH/H<sub>2</sub>O) from horseradish roots was prepared and fractionated by column chromatography on Sephadex<sup>®</sup>LH-20, silica gel and RP18 phase.

Around 76 components were identified or widely characterized in the extract. By LC-MS<sup>2</sup>, capillary electrophoretic, thin-layer chromatography and NMR experiments, kaempferol-3-*O*- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 2'')- $\beta$ -D-galactopyranoside (Cmpd 53), kaempferol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (Astragalin; Cmpd 58), kaempferol-3-*O*- $\beta$ -D-xylopyranoside (Cmpd 59), kaempferol-3-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (Cmpd 39) and Cmpd 39a are completely or at least partially structurally identified. In addition, kaempferol-3-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1''' $\rightarrow$ 6'')- $\beta$ -D-glucopyranoside (Nicotiflorine; Cmpd 56), kaempferol-3-*O*- $\beta$ -D-xylopyranosyl-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (Populin-3-*O*-xylopyranoside; Cmpd 41), kaempferol-3-*O*- $\beta$ -D-xylopyranosyl-(1'''' $\rightarrow$ 2''')- $\beta$ -D-galactopyranosyl-7-*O*- $\beta$ -D-glucopyranoside (Cmpd 35), as well as Spirobrassinin (Cmpd 68) are structurally elucidated and are not yet described in *A. rusticana*. Furthermore, a structure suggestion for Cmpd 73 was made by LC-MS measurement, which proposes a phenyl-thiazole derivative. In addition, the occurrence of *N*-phenylpropenoyl-L-amino acid amides and lysophosphatidylethanolamines and -cholines, which have not previously been described for the genus *Armoracia*, could be shown.

The fermented, isothiocyanate-containing extract, showed antibacterial activity against uropathogenic *Escherichia coli* (strain NU14 and UTI89, IC<sub>50</sub>: 2.33; 2.46 mg/mL) and *Pseudomonas aeruginosa* (strain 9027 and 27853, IC<sub>50</sub>: 19.26; 22.38 mg/mL) while the non-fermented, isothiocyanate-free extract was inactive against these pathogens.

Non-fermented extract inhibited biofilm formation of *E. coli* 2980, TOP10, UPEC CFT073 (IC<sub>50</sub>: 4.42, 7.28, and 7.26 mg/mL), but not the biofilm formation of UPEC J96 and NU14 or *P. aeruginosa* 27853 and 9027. Fermented extract, which was made isothiocyanate-

free, was able to inhibit quorum sensing of *E. coli* TOP10 (IC<sub>50</sub>: 2.37 mg/mL), whereas the non-fermented extract was ineffective.

Unfermented extract (4 mg/mL) showed a significant effect on the bacterial adhesion of UPEC NU14 and *E. coli* 2980 to human T24 bladder cells without affecting the vitality of the eukaryotic host cells (IC<sub>50</sub> (extrapolated): 4.86; 10.08 mg/mL ). Testing recombined fractions, the flavonol glycosides Cmpd 56, Cmpd 58, Cmpd 53, Cmpd 59, unidentified flavonoid glycosides, fatty acids, palmitoyl lysolecithin, Histidine, Spirobrassinin, as well as various derivatives of lysophosphatidylethanolamines and -cholines reveal an influence on the bacterial adhesion due to the statistical 'partial least squares regression' method (pls). The extract did not show an additional inhibitory effect on the invasion of bacteria into the bladder cells.

The unfermented extract reduced the release of nitric oxide (NO) from LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages (IC<sub>50</sub>: 93.08 µg/mL), while the phagocytosis rate of the macrophages was unaffected by the extract. Cmpd 35 and the Glucosinolate Sinigrin, which were predicted to be effective in pls, showed an inhibitory effect on NO release in a concentration of 1 mM (IC<sub>50</sub>: 1.04; resp. 2.47 mM).

Differences in LC-MS profiles of major and minor roots, different cultivation sides, from different harvest periods, as well as the influence of fermentation and thermal sterilization revealed that chinese imports, consisting of minor roots, contains less flavonoids and Gluconasturtiin. The thermally sterilized batch was enzymatically less active and contained less lysophosphatidylethanolamines/-cholines and palmitoyl-lysolecithin in comparison to the non-sterilized batch.