

**Lignane und lignanhaltige Asteraceenextrakte – estrogene und
antioxidative Eigenschaften und stereochemische Aspekte der
Biosynthese**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Ulrike Müller

geb. am: 15.02.1973 in Säckingen

Gutachter /in

1. Prof. Dr. B. Dräger

2. Prof. Dr. W. Sippl

3. Prof. Dr. M. Petersen

Halle (Saale), 21.04.2010

Meinen Eltern

Teile dieser Arbeit sind in folgende Veröffentlichungen eingegangen:

Zeitschriftenartikel:

Ulrike Müller, Yahya Mrestani, Reinhard Neuber, Birgit Dräger Chiral separation of the plant lignan matairesinol by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 2008, 29, 3582–3587

Elke Aehle, Ulrike Müller, Wolfgang Sippl, Stefan Willför, Birgit Dräger Estrogen and antiestrogen activity of lignans, Paper in Vorbereitung

Vorträge:

Ulrike Müller Wirksamkeit von Phytoestrogenen – Ein Bioassay zur Bestimmung estrogener Aktivität. Statusseminar im Innoregio-Projekt „Rephyna“, 21.09.2005, Magdeburg

Ulrike Müller, Nadine Mehnert, Birgit Dräger Lignane in Asteraceenfrüchten. „Sektionstreffen: Pflanzliche Naturstoffe“ der Deutschen Botanischen Gesellschaft, 1. - 3. Okt. 2006, Kaub/Rhein

Ulrike Müller Lignane in Asteraceenfrüchten. Estrogene und antioxidative Aktivität Statusseminar im Innoregio-Projekt „Rephyna“, 09.11.2006, Magdeburg

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Lignane	1
1.1.1	Nomenklatur, Vorkommen und Bedeutung von Lignanen.....	1
1.1.2	Biosynthese mit stereochemischen Aspekten	4
1.1.2.1	Grundzüge der Biosynthese	4
1.1.2.2	Stereochemie	5
1.2	Enantiomerentrennung mit Kapillarelektrophorese	6
1.2.1	Grundlagen der Kapillarelektrophorese	6
1.2.2	Enantiomerentrennung.....	9
1.3	Lignane als Antioxidantien	10
1.3.1	Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Radikalen....	10
1.3.2	Polyphenole als Radikalfänger.....	11
1.3.3	In vitro-Tests zur Bestimmung antioxidativer Aktivität.....	12
1.4	Lignane als Phytoestrogene.....	14
1.4.1	Estrogenrezeptoren und ihre Liganden	15
1.4.2	Phytoestrogene	17
1.4.3	Bioassays zum Nachweis estrogener Aktivität.....	19
1.5	Fragestellung	20
2	Materialien und Methoden	22
2.1	Materialien	22
2.1.1	Pflanzenmaterial	22
2.1.2	Rekombinanter Hefestamm	22
2.1.3	Verbrauchsmaterialien	22
2.2	Chemikalien und Enzyme	23
2.2.1	Chemikalien	23
	Lignane.....	23
2.2.2	Enzyme	24
2.3	Geräte	24
2.4	Methoden	25
2.4.1	Chromatographische Methoden.....	25
2.4.1.1	Dünnschichtchromatographie (DC)	25
2.4.1.2	Säulenchromatographie mit Kieselgel	25
2.4.1.3	Festphasenextraktion (SPE).....	25
2.4.1.4	Analytische Hochleistungsflüssigchromatographie mit Diodenarraydetektor (HPLC-DAD)	26
2.4.1.5	Hochleistungsflüssigchromatographie mit Massenspektrometer (HPLC-MS)	26
2.4.1.6	Präparative HPLC.....	27
2.4.1.7	Gaschromatographie mit Massenspektrometer (GC-MS).....	27
2.4.2	Kapillarelektrophorese (CE)	28
2.4.3	Hydrolyse und Aufreinigung von Matairesinol	29
2.4.3.1	Extraktion	29
2.4.3.2	Basische Hydrolyse	30
2.4.3.3	Saure Hydrolyse	31
2.4.3.4	Enzymatische Hydrolyse mit Glucuronidase/Sulfatase.....	31

2.4.4	Bestimmung antioxidativer Eigenschaften von Pflanzenextrakten und Lignan-Standards.....	31
2.4.4.1	Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes von Pflanzenextrakten nach Folin-Ciocalteu.....	31
2.4.4.2	Bestimmung von Radikalfängereigenschaften mit dem DPPH-Test.....	32
2.4.4.3	Bestimmung des Eisenreduktionspotentials mit dem FRAP-Test... ..	33
2.4.4.4	Bestimmung der Fähigkeit zum Inaktivieren des Superoxid-Radikals mit dem XOD-Test.....	34
2.4.4.5	Xanthinoxidase-Hemmtest	35
2.4.5	YES-Assay.....	35
2.4.5.1	Anzucht der Hefe-Kulturen und Nährmedien.....	35
2.4.5.2	Durchführung des YES-Assays	37
2.4.5.3	β -Galaktosidase-Hemmtest	39
3	Ergebnisse und Diskussion.....	41
3.1	Stereochemische Untersuchungen von Matairesinol aus <i>Carthamus tinctorius</i>	41
3.1.1	Isolierung von Matairesinol aus Kraut und Früchten von <i>Carthamus tinctorius</i> (Akzession CT014JE03)	41
3.1.1.1	Hydrolysemethode.....	41
3.1.1.2	Isolierung von Matairesinol aus Früchten von <i>Carthamus tinctorius</i>	43
3.1.1.3	Isolierung von Matairesinol aus getrockneten Stängeln von <i>Carthamus tinctorius</i>	46
3.1.2	Entwicklung einer Methode zur chiralen Trennung von Matairesinol mit CE	53
3.1.2.1	Auswahl eines geeigneten chiralen Selektors	53
3.1.2.2	Optimierung von pH-Wert und Puffer-Konzentration	54
3.1.2.3	Einfluss von CMB-Konzentration und Temperatur auf die Enantiomerentrennung	56
3.1.2.4	Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Trennmethode	56
3.1.2.5	Validierung der Trennmethode	59
3.1.2.6	Anpassung der Methode an methanolhaltige Proben.....	60
3.1.3	Chirale CE-Untersuchungen mit aufgereinigten Extrakten aus den Früchten und Stängeln von <i>Carthamus tinctorius</i>	61
3.1.3.1	Absolute Konfiguration von Matairesinol in den Früchten von <i>Carthamus tinctorius</i>	61
3.1.3.2	Gehaltsbestimmung von Matairesinol im aufgereinigten Extrakt aus den Früchten von <i>Carthamus tinctorius</i> mit CE	63
3.1.3.3	Absolute Konfiguration von Matairesinol in den getrockneten Stängeln von <i>Carthamus tinctorius</i>	63
3.1.4	Diskussion.....	64
3.1.4.1	Aufarbeitung	64
3.1.4.2	Methodenentwicklung zur chiralen Trennung von Matairesinol	67
3.1.4.3	Chirale Untersuchung von Matairesinol aus Früchten und getrockneten Stängeln von <i>Carthamus tinctorius</i>	70
3.2	Antioxidative Aktivität von Lignan- und Asteraceenextrakten	72
3.2.1	Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes in den Asteraceenextrakten	72
3.2.2	Nachweis von Radikalfängereigenschaften mit dem DPPH-Test.....	74
3.2.2.1	Lignanstandards im DPPH-Test	74

3.2.2.2	Asteraceenextrakte im DPPH-Test.....	75
3.2.3	Nachweis der Fähigkeit zur Eisenreduktion mit dem FRAP-Test.....	78
3.2.3.1	Lignanstandards im FRAP-Test.....	78
3.2.3.2	Asteraceenextrakte im FRAP-Test	79
3.2.4	Korrelation von Gesamtpolyphenolgehalt, EC ₅₀ - und EC _{2*10⁻⁵M Fe} -Werten	81
3.2.5	Nachweis der Fähigkeit zur Inaktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies mit dem XOD-Test.....	82
3.2.6	Bestimmung der Xanthinoxidase-Inhibition	83
3.2.6.1	Xanthinoxidase-Inhibition durch Standardsubstanzen.....	83
3.2.6.2	Xanthinoxidase-Inhibition durch Asteraceenextrakte	83
3.2.7	Nachweis von Lignan in Asteraceenextrakten mit DC und HPLC	84
3.2.8	Diskussion.....	88
3.2.8.1	Antioxidative Aktivität von Lignan	88
3.2.8.2	Antioxidative Aktivität von Asteraceen-Extrakten.....	91
3.2.8.3	Korrelation verschiedener Antioxidativtests und Reaktionsmechanismen	94
3.3	Estrogene und antiestrogene Aktivität von Lignan in im Yeast Estrogen Screen Assay (YES-Assay)	96
3.3.1	Test auf estrogene Aktivität.....	97
3.3.2	Hemmung der Estradiolwirkung durch Testsubstanzen.....	101
3.3.3	Einfluss der Testsubstanzen auf das Hefenwachstums und auf die Aktivität der β -Galaktosidase	103
3.3.4	Extrakte aus Asteraceenfrüchten im YES-Assay	107
3.3.5	Diskussion.....	108
4	Zusammenfassung und Ausblick	118
5	Literatur.....	121
6	Anhang	135
6.1	Gesamtphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu; Einzelwerte bei unterschiedlichen Konzentrationen	135
6.2	Bestimmung von Radikalfängereigenschaften mit dem DPPH-Test, Absorptionswerte	137
6.3	Bestimmung des Eisenreduktionspotentials mit dem FRAP-Test, Absorptionswerte	141
6.4	Prozentuale Inhibition im XOD-Test – Einzelwerte	146
6.5	Prozentuale Inhibition im XOD-Test – Einzelwerte	146
6.6	Prozentuale Aktivität der Lignanstandards im YES-Assay - Einzelwerte	147
6.7	Prozentuale Estradiol-Aktivität von Estradiol im YES-Assay unter Zugabe der Lignanstandards - Einzelwerte.....	148

Abkürzungsverzeichnis

CE	Kapillarelektrophorese
CMB	Carboxymethy- β -cyclodextrin
CPRG	Chlorphenolrot- β -Galaktosid
CUPRAC	(Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPH	Diphenylpicrylhydrazyl
E ₂	17- β -Estradiol
EOF	Elektroosmotischer Fluss
ER	Estrogenrezeptor
ERE	Estrogenresponsives Element
FRAP	Ferric Reducing Ability of Plasma
HAT	H-Atom-Transfer
HPLC	Hochleistungsflüssigchromatographie
IGF	Insulin like Growth Factor
MCF-7	Humane Brustkrebszelllinie
NBT	Nitroblautetrazoliumchlorid
ORAC	Oxygen Radical Absorbance Capacity
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SERM	Selektive Estrogenrezeptormodulatoren
SET	Single-Electron-Transfer
SHGB	Sexualhormon bindenes Globulin
SPE	Festphasenextraktion
TEA	Triethylamin
TEAC	Trolox Equivalent Antioxidant Capacity
TIC	Total Ion Current
TPTZ	2,3,6-Tripyridyl-s-triazin
TRAP	Total Radical Trapping Antioxidant Parameter
Vk	Variationskoeffizient
XOD	Xanthinoxidase
YES	Yeast Estrogen Screen

1 Einleitung

1.1 Lignane

1.1.1 Nomenklatur, Vorkommen und Bedeutung von Lignan

Die Nachfrage nach Arzneimitteln und Nahrungsergänzungsmitteln aus natürlichen Quellen nimmt in den letzten Jahren stetig zu. Im Bereich Nahrungsergänzungsmittel sind dabei auch phenolische Stoffe von Interesse (Prior et al., 2005; Brzezinski und Debi, 1999; Lampe, 1999)

Lignane sind phenolische Sekundärmetabolite mit Vorläufern aus dem Zimtsäurestoffwechsel. Die Grundstruktur der Lignane besteht aus zwei Phenylpropan-Untereinheiten, welche am C8 und C8' miteinander verknüpft sind (Abbildung 1).

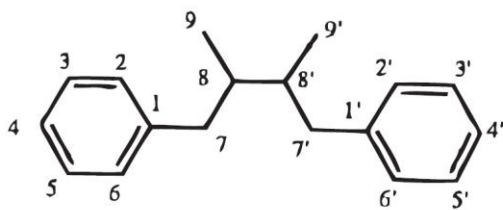


Abbildung 1

Ausgangsstruktur Lignane, zwei Phenylpropaneinheiten, welche 8,8'-verknüpft sind. (Abbildung aus Moss 2000)

Phenylpropanerivate, die über ein anderes C-Atom miteinander verknüpft sind, bzw. die durch ein zusätzliches Ether-Sauerstoffatom miteinander verbunden sind, werden als Neolignane bezeichnet. Bei Verbindungen mit mehr als zwei Phenylpropanuntereinheiten unterscheidet man Sesqueneolignane (drei Einheiten), Dineolignane (vier Einheiten) und Sesterneolignane (fünf Einheiten) (IUPAC, Moss, 2000). Einige Autoren beziehen auch die Neolignane sowie Verbindungen mit mehr als zwei Phenylpropanuntereinheiten in die Gruppe der Lignane mit ein (Davies und Lewis, 2003).

Cyclisierung und weitere Umbaureaktionen am Diphenylpropankörper führen zu unterschiedlichen Strukturtypen von Lignan. Man unterscheidet dabei

- Tetrahydrofurofurane (z. B. Pinoresinol)
- Tetrahydrofurane (z. B. Lariciresinol)
- Dibenzylbutane (z. B. Secoisolariciresinol)
- Dibenzylbutyrolactone (z. B. Matairesinol)

- Aryltetraline (z. B. Podophyllotoxin)
- Arylnaphthalene (z. B. Dehydropodophyllotoxin)
- Dibenzocyclooctadiene (z. B. Gomesin A) und
- Dibenzylbutyrolactole (z. B. Cubebin)

(Umezawa, 2003). Die aufgeführten Strukturbeispiele sind in Abbildung 2 dargestellt.

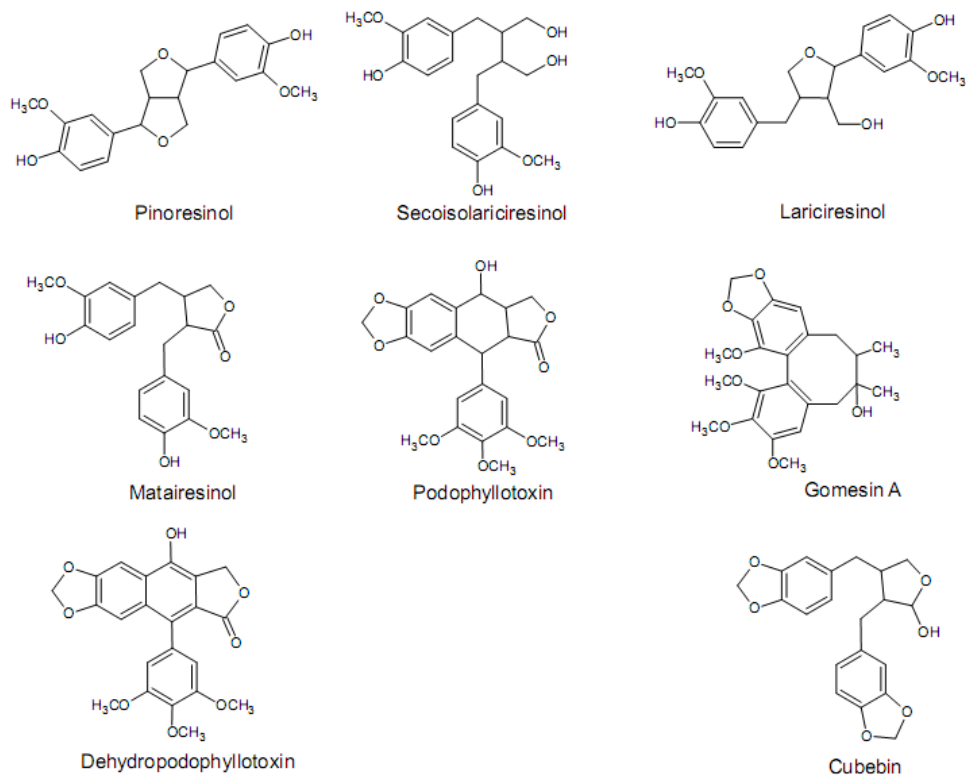


Abbildung 2 Beispiele für Lignan-Grundstrukturen

Lignane sind weit verbreitet im Pflanzenreich, man hat sie bisher in über 70 Pflanzenfamilien nachgewiesen (Saleem et al., 2005). Neben ihrer Verbreitung in Samenpflanzen findet man sie auch in Farnen wie *Blechnum spicant* (Davin und Lewis, 2003; Davin et al. 2003).

Pflanzliche Nahrungsmittel mit hohem Lignangehalt sind Leinsamen, die große Mengen an Secoisolariciresinol enthalten, Sesam, sowie verschiedene Beeren. Auch Getreidekörner enthalten Lignane, wobei Roggen die höchsten Gehalte aufweist (Hallmans et al., 2003). So sind Vollkornprodukte eine wichtige Lignanquelle für die Bevölkerung im westlichen Kulturkreis (Adlercreutz, 1999).

Die Früchte von *Arctium lappa* sind schon lange als reichhaltige Quelle für Dibenzylbutyrolactonlignane, vor allem Arctiin, bekannt (Hänsel et al. 1964; Yamanouchi et al. 1976).

Die pflanzlichen Lignane werden nach ihrer Aufnahme mit der Nahrung durch die im Dickdarm vorhandene Mikroflora metabolisiert. Dabei erfolgt zunächst, sofern die Lignane als Glykoside vorliegen, eine Deglykosidierung und danach ein Umbau zu den beiden Enterolignanen Enterodiol und Enterolacton (Saarinen et al., 2002; Jin et al., 2007). Diese werden auch, angelehnt an den englischen Begriff „mammalian lignans“, als Säugerlignane bezeichnet. Ein Großteil der aufgenommenen Lignane wird in dieser Form aus dem Dickdarm resorbiert. Für viele pflanzliche Lignane ist aber auch die Resorption des unveränderten Lignanaglykons nachgewiesen worden (Saarinen et al., 2002; Bannwart et al., 1989; Hutchins et al., 2000; Nose et al., 1993). In welchem Umfang der Umbau zu den Enterolignanen erfolgt, hängt von der individuellen Mikroflora sowie von den weiteren zugeführten Nahrungsbestandteilen ab (Adlercreutz, 2003).

Die pharmazeutisch am bedeutsamsten Lignane sind derzeit die Podophyllotoxine. Sie haben eine zytostatische Wirkung und dienen als Vorstufen für die Herstellung semisynthetischer Zytostatika, wie z. B. Etoposid. Etoposid wird unter anderem zur Behandlung des kleinzelligen Bronchialkarzinoms, von Morbus Hodgkin und von bestimmten Leukämieformen eingesetzt (Sandoz Pharmaceuticals, Fachinformation von Etoposid Sandoz®)

Daneben ist für einige Lignane eine antiinflammatorische und auch eine antimikrobielle Wirkung nachgewiesen worden (Saleem et al., 2005).

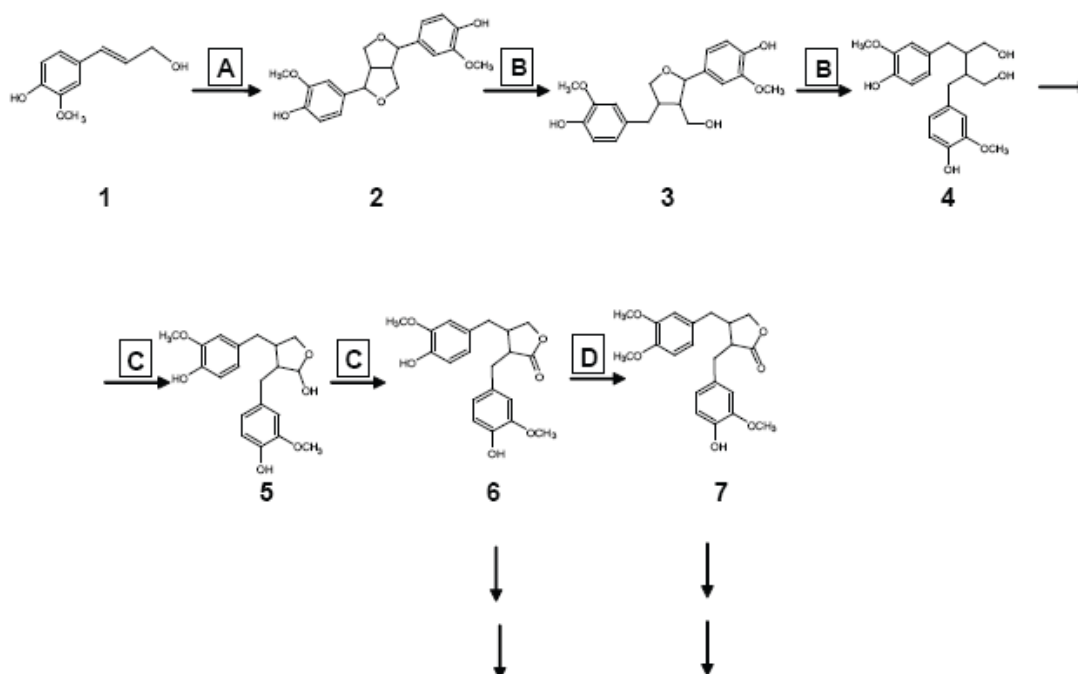
Lignane als Nahrungsbestandteile scheinen aber auch eine präventive Wirkung gegen bestimmte Krebserkrankungen zu besitzen. Dies konnte in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden, welche die Inzidenz bestimmter Krebsarten mit der Aufnahme von Lignanen bzw. der Ausscheidung von Enterolignanen korrelierten (Cornwell et al., 2004; Adlercreutz, 1999). Gleichzeitig besitzen Lignane auch teilweise estrogen- und antiestrogen- sowie antioxidative Wirkungen (siehe Kapitel 1.3 und 1.4) Es wird vermutet, dass diese Eigenschaften zumindest teilweise verantwortlich sind für die krebsschutzende Wirkung von Lignan-Verbindungen (Saleem et al., 2005; Adlercreutz, 2007).

1.1.2 Biosynthese mit stereochemischen Aspekten

1.1.2.1 Grundzüge der Biosynthese

Die Biosynthese der Lignane ist noch nicht vollständig erforscht. Ausgehend von Coniferylalkohol bis hin zu Arctigenin sind jedoch die einzelnen Schritte mit den entsprechenden Enzymen aus *Forsythia intermedia*, *Carthamus tinctorius* und sowie aus einigen weiteren Pflanzen bekannt. Die weiterführenden Biosyntheseschritte zu den pharmazeutisch relevanten Podophyllotoxinen – ausgehend von Matairesinol oder Arctigenin - sind bisher nur teilweise erforscht (Davin und Lewis, 2003; Suzuki und Umezawa, 2007). Die einzelnen Schritte sind in Abbildung 3 dargestellt.

Die Kopplung von zwei Molekülen Coniferylalkohol zu Pinoresinol erfolgt durch eine Laccase. Die beiden folgenden Schritte, nämlich die Bildung von Lariciresinol und Secoisolariciresinol werden durch ein bifunktionales Enzym, die Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase (PLR), katalysiert. Die darauffolgende Lactonisierung erfolgt in zwei Schritten über die Zwischenstufe eines Lactols. Beide Schritte werden von der ebenfalls bifunktionalen Secoisolariciresinoldehydrogenase (SIRD) katalysiert. Die Methylierung von Matairesinol zu Arctigenin erfolgt über eine O-Methyltransferase.



Podophyllotoxin und seine Derivate

Abbildung 3

Biosyntheseschritte von Lignanene ausgehend von Coniferylalkohol (1) bis zu Arctigenin (7) über Pinoresinol (2), Lariciresinol (3), Secoisolariciresinol (4), eine Lactol-Zwischenstufe (5) und Matairesinol, beteiligte Enzyme: Pinoresinolsynthase, eine Laccase (A), Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase (B), Secoisolariciresinoldehydrogenase (C), eine O-Methyltransferase (D)

1.1.2.2 Stereochemie

Die Biosynthese von Lignanen verläuft in Teilen stereospezifisch. Bei der initialen Kopplung zweier Moleküle Coniferylalkohol ist neben der Pinoresinolsynthase ein Protein an der Reaktion beteiligt, welches selbst keine katalytische Aktivität besitzt. Davin et al. (1997) wiesen dieses Protein erstmals in *F. intermedia* nach und konnten zeigen, dass es für den stereospezifischen Ablauf der Reaktion verantwortlich war: Bei Anwesenheit des Proteins entstand vorwiegend (+)-Pinoresinol, während bei Abwesenheit racemisches Pinoresinol entstand. Aufgrund seiner Funktion wurde das Protein als „Dirigent Protein“ bezeichnet.

Die Umsetzung von Pinoresinol durch die Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase erfolgt stereoselektiv. Welche Enantiomere hierbei bevorzugt gebildet werden, ist abhängig von der jeweiligen Spezies. Aus *Forsythia intermedia* und *Linum album* konnte jeweils eine PLR kloniert werden, welche nur (+)-Pinoresinol zu (+)-Lariciresinol und dann zu (-)-Secoisolariciresinol umsetzt, während die in *Linum usitatissimum* nachgewiesene PLR die Umsetzung von (-)-Pinoresinol zu (-)-Lariciresinol und (+)-Secoisolariciresinol katalysiert (von Heimendahl et al., 2005; Dinkova-Kostova et al., 1996). In *Thuja plicata* konnte man zwei Isoformen des Enzyms nachweisen, hier werden beide Pinoresinol-Enantiomere zu ihren jeweiligen korrespondierenden Metaboliten umgesetzt (Fujita et al., 1999)

Die SIRD, ist ebenso ein stereoselektives Enzym. Es ist insofern von besonderem Interesse, als dass das Produkt Matairesinol in Pflanzen bisher immer enantiomerenrein (>99%) nachgewiesen worden ist. Dabei hängt es von der jeweiligen Spezies ab, welches Enantiomer vorliegt. In *Forsythia ssp.*, *A. lappa*, *Chamaecyparis obtusa* und *Thuja okzidentalis* hat man jeweils die linksdrehend Form nachgewiesen, in *Daphne ssp.* und *Wikstroemia sikokiana* hingegen jeweils die rechtsdrehende Form (Umezawa, 2003).

Im Gegensatz dazu konnten Pinoresinol und Lariciresinol bisher immer nur als Enantiomerengemische nachgewiesen werden, wenn auch mit einer jeweils bevorzugt gebildeten Form. Bei Secoisolariciresinol hängt es von der jeweiligen Spezies ab, ob es enantiomerenrein oder als Gemisch vorliegt. Welches Enantiomer dabei vorherrscht, ist wiederum von der jeweiligen Spezies abhängig (Suzuki und Umezawa, 2007; Umezawa, 2003).

Interessanterweise ist es jedoch auch möglich, dass es innerhalb einer Spezies die Art des vorherrschenden Enantiomers vom jeweiligen Gewebetyp abhängig ist.

Suzuki et al. (2002) konnten nachweisen, dass in den Früchten von *A. lappa* (-)-Secoisolariciresinol im Überschuss (65%) vorliegt, während in den Blattstielen die rechtsdrehende Form vorherrscht (81 % Überschuss). Die Konfiguration des in den Früchten nachgewiesenen Matairesinols und Arctigenins entsprach der des in diesem Gewebe überwiegend vorhandenen (-)-Secoisolariciresinols. Die Stereochemie dieser beiden Lignane in den Blattstängeln wurde nicht untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit sollte in der mit *A. lappa* nah verwandten Art *Carthamus tinctorius* untersucht werden, ob in den Früchten und den Stängeln der Pflanze unterschiedliche Matairesinolenantimere gebildet werden. Matairesinol ist in den Früchten von *C. tinctorius* das mengenmäßig am stärksten vertretene Lignan. Als Methode für die Enantiomerentrennung wurde die Kapillarelektrophorese gewählt.

1.2 Enantiomerentrennung mit Kapillarelektrophorese

1.2.1 Grundlagen der Kapillarelektrophorese

Die Kapillarelektrophorese (CE) ist eine Form der Elektrophorese, die in unbeschichteten oder beschichteten Quarzglas kapillaren durchgeführt wird.

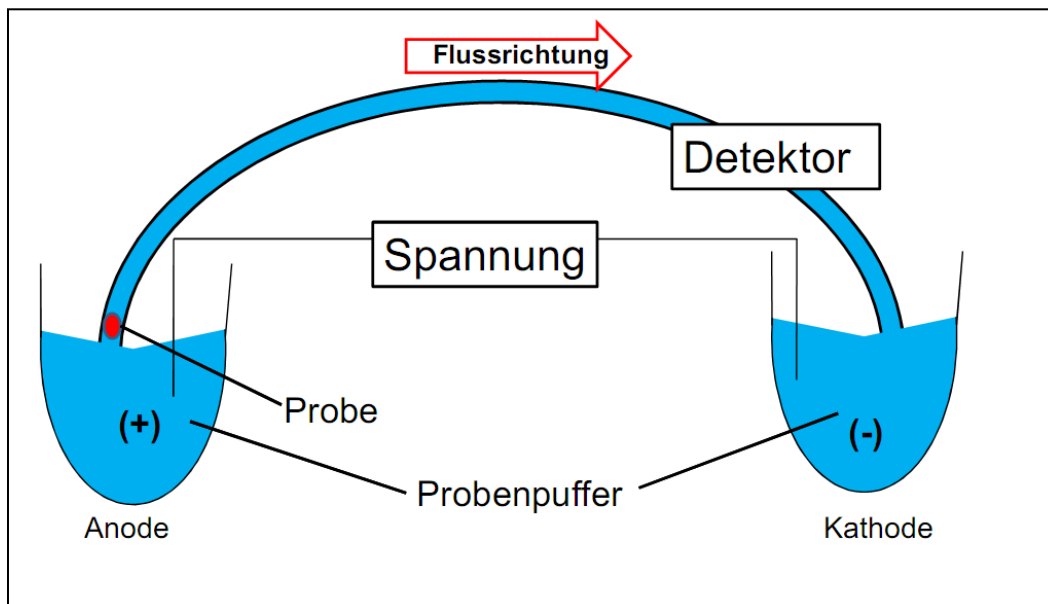


Abbildung 4 Schematischer Aufbau einer CE-Apparatur

Die elektrophoretische Auftrennung erfolgt aufgrund der unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit von geladenen Teilchen im elektrischen Feld. Im Normalmodus wandert die aufzutrennende Probe vom anodischen Ende der

Kapillare zum kathodischen Ende und durchläuft dabei den Detektor, meist einen UV-Vis-Detektor (Abbildung 4).

Die Wanderungsgeschwindigkeit (v) der Teilchen hängt dabei von der elektrischen Feldstärke (E), Ladung (q) und Größe (Radius r) der Teilchen ab sowie von der Viskosität des Puffers (η) und berechnet sich nach Gleichung 1.

$$v = \frac{q \cdot E}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$$

Gleichung 1

Aus der Feldstärke und der Wanderungsgeschwindigkeit ergibt sich die elektrophoretische Mobilität (μ) eines Teilchens (Gleichung 2).

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{q}{6 \cdot \pi \cdot r \cdot \eta}$$

Gleichung 2

Die Geschwindigkeit definiert sich hierbei als benötigte Zeit bis zum Erreichen des Detektors (L_d/t) und die Feldstärke als angelegte Spannung an der Gesamtlänge der Kapillare (U/L_g). Somit kann aus der Länge der Kapillare, der angelegten Spannung (U) und der Migrationszeit (t_m) die elektrophoretische Mobilität eines Analyten berechnet werden (Gleichung 3).

$$\mu = \frac{L_d \cdot L_g}{U \cdot t_m}$$

Gleichung 3

Die Wanderungsgeschwindigkeit eines Analyten wird aber bei der Verwendung von unbeschichteten Quarzglas kapillaren noch von einem weiteren Faktor bestimmt, dem elektroosmotischen Fluss (EOF). Dieser entsteht durch die leicht sauer reagierenden Silanolgruppen auf der Oberfläche der Kapillare. Durch Deprotonierung dieser Gruppen entsteht eine negative Ladung an der Oberfläche der Kapillare, welche durch Anlagerung einer Schicht von Kationen ausgeglichen wird (Abbildung 5). Bei Anlegung einer Spannung beginnt diese Schicht in Richtung Kathode zu wandern. Die Wassermoleküle, welche die Kationen solvatisieren, wandern ebenfalls in Richtung Kathode. Somit erzeugen sie einen Strom, welcher den gesamten Inhalt der Kapillare in Richtung Kathode zieht, den elektroosmotischen Fluss.

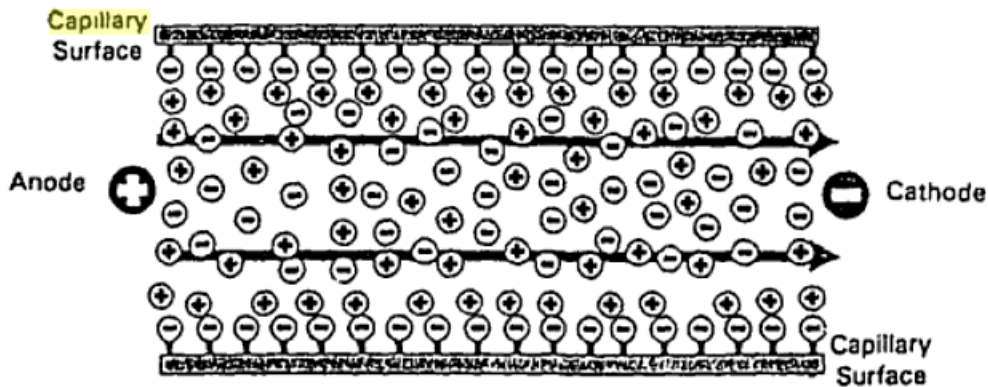


Abbildung 5 Entstehung des elektroosmotischen Fluss in der Kapillare; Abb. aus „Capillary electrophoresis Guidebook, Principles, Operation and Application“ von Kevin Altria, Humana Press, 1996

Der EOF ist u. A. abhängig von der angelegten Spannung und dem pH-Wert des Puffers. Bei geringerem pH-Wert wird er aufgrund der geringeren Deprotonierung der Silanolgruppen abgeschwächt, unterhalb von pH 4 ist er nur noch geringfügig vorhanden.

Entsprechend ihrer Ladung erreichen bei vorhandenem EOF zuerst die positiv geladenen, dann die neutralen und zum Schluss die negativ geladenen Teilchen den Detektor (Abbildung 6).

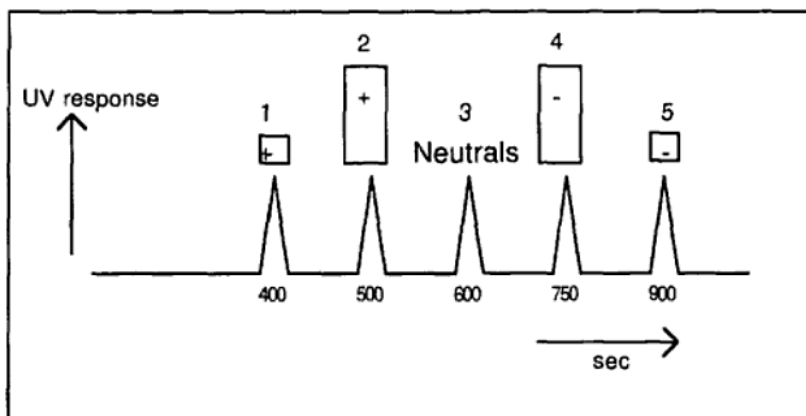


Abbildung 6 Migrationsreihenfolge in der CE im Normalmodus; Abb. aus „Capillary electrophoresis Guidebook, Principles, Operation and Application“ von Kevin Altria, Humana Press, 1996

Die Migrationszeit von elektrisch neutralen Teilchen ist ein Maß für den EOF, sie können als EOF-Marker eingesetzt werden. Ein in der CE vielfach eingesetzter EOF-Marker ist Dimethylsulfoxid (DMSO).

Da der EOF teilweise schwer zu kontrollieren ist, kann es bei den Analyten zu schwankenden Migrationszeiten kommen. Deshalb wird zur Charakterisierung eines

Teilchens oftmals die effektive Mobilität (μ_{eff}) herangezogen. Sie berechnet sich unter Einbeziehung der Migrationszeit des EOF-Markers (t_{EOF}) und dessen Mobilität (μ_{EOF}) (Gleichung 4 und Gleichung 5).

$$\mu_{\text{EOF}} = \frac{L_d * L_g}{U * t_{\text{EOF}}}$$

Gleichung 4

$$\mu_{\text{eff}} = \mu - \mu_{\text{EOF}} = \frac{L_d * L_g}{U} * \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{\text{EOF}}} \right)$$

Gleichung 5

1.2.2 Enantiomerentrennung

Die CE ist für die Enantiomerentrennung eine interessante Alternative zur chiralen HPLC. Gründe hierfür sind die hohe Trenneffizienz, kurze Analysenzeiten und die Möglichkeit zur schnellen Methodenanpassung, da bei wechselnder Pufferzusammensetzung kein zeitaufwändiges Umspülen erforderlich ist, wie bei der HPLC. Auch fallen nur sehr geringe bis gar keine Mengen an organischem Lösungsmittel an.

Cyclodextrine (CDs) werden in der CE vielfach als chirale Selektoren eingesetzt, da sie leicht wasserlöslich sind und eine geringe UV-Absorption aufweisen (van Eeckhaut und Michotte, 2006). Hierbei wird der Analyt in die relativ hydrophobe Kavität des Cyclodextrins eingeschlossen. Die Hydroxygruppen auf der Außenseite des Cyclodextrinmoleküls sorgen dabei für die Löslichkeit des Komplexes. Der Einschluss des Analyten in das CD-Molekül führt je nach Ladung zu einer verzögerten oder beschleunigten Migration in Richtung des Detektors. Unterscheidet sich die Affinität zweier Enantiomere zum eingesetzten CD, so kommt es zu einer Enantiomerentrennung.

Analyte, die im verwendeten Laufpuffer elektrisch neutral sind, besitzen keine eigene elektrophoretische Mobilität, was den Einsatz geladener CDs, wie Carboxymethyl- β -cyclodextrin (CMB) erforderlich macht. Nach seiner erstmaligen Verwendung in der CE durch Terabe et al. (1985) ist CMB vielfach für die chirale Trennung neutraler, saurer und basischer Analyte eingesetzt worden (de Boer et al., 2000).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene CDs und unterschiedliche Analysenbedingungen für die Trennung von racemischem Matairesinol getestet. Die

optimierte Methode wurde kalibriert und auf Linearität, Reproduzierbarkeit und Nachweisgrenze hin getestet.

Die so etablierte Methode wurde angewendet für die Bestimmung der absoluten Konfiguration von Matairesinol in den Früchten und Stängeln von *C. tinctorius*.

1.3 Lignane als Antioxidantien

1.3.1 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von Radikalen

Radikale besitzen im menschlichen Organismus eine wichtige Funktion als Signalüberträger. So spielt Stickstoffmonoxid ($\bullet\text{NO}$) zusammen mit Peroxynitrit (NO_3^-) eine wichtige Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus, während eine Aufgabe des Superoxidradikals ($\bullet\text{O}_2^-$) möglicherweise die Oxidation von $\bullet\text{NO}$ zu NO_3^- ist. Radikale werden auch von verschiedenen Zellen des Immunsystems zur Abtötung von Krankheitserregern gebildet. Da Radikale hochreaktiv sind, sind sie bereits in geringen Konzentrationen wirksam (Daiber und Ullrich, 2002).

Neben den endogen gebildeten Radikalen ist der Körper auch exogenen reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) ausgesetzt – über die Nahrung und über die schadstoffbelastete Luft. Auch atmosphärisches Ozon übt in dieser Hinsicht einen schädigenden Einfluss aus.

Um die Anzahl an Radikalen nicht über ein bestimmtes Ausmaß hinauswachsen zu lassen, verfügt der Körper über ein antioxidatives System. Es besteht aus Enzymen wie der Superoxiddismutase, welche Radikale inaktivieren und aus niedermolekularen Antioxidantien wie Glutathion, Harnsäure und Bilirubin.

Erst wenn es aufgrund der Bildungsgeschwindigkeit und der Konzentration der vorhandenen Radikale zu einem Ungleichgewicht zwischen ROS und körpereigenem Schutzsystem kommt, entsteht oxidativer Stress (Diplock et al., 1998; Daiber und Ullrich, 2002).

ROS können dabei biologische Makromoleküle wie DNA, Proteine und Lipide chemisch modifizieren und somit pathobiochemische Veränderungen bewirken. Es gibt verschiedene Krankheitszustände, die als Folge solcher Veränderungen angesehen werden. Beispiele hierfür sind die Arteriosklerose mit ihren Folgeerkrankungen, einige Krebsarten, Katarakt, Rheumatoide Arthritis sowie neurodegenerative Erkrankungen wie Morbus Alzheimer (Diplock et al., 1998).

1.3.2 Polyphenole als Radikalfänger

Epidemiologische Studien belegen, dass eine Ernährung, welche reich an frischem Obst und Gemüse ist, vor vielen chronischen Erkrankungen, wie kardiovaskulären Erkrankungen und bestimmten Krebsarten schützt (Lampe, 1999; Steinmetz und Potter, 1996). Man geht davon aus, dass zumindest ein Teil dieses protektiven Effekts im Gehalt dieser Nahrungsmittel an Antioxidantien begründet liegt. Dies sind zum einen Vitamine, vor allem Ascorbinsäure, Tocopherole und Vitamin A (Retinol) (Ames et al., 1993; Bub et al., 2000) und Spurenelemente wie Zn, Cu und Mn, welche Bestandteile von Superoxiddismutasen sind. Ein weitere Gruppe von Antioxidantien, die oft in großen Mengen in pflanzlichen Nahrungsmitteln enthaltene sind, sind phenolische Sekundärstoffe wie Flavonoide, Hydroxyzimtsäurederivate und Lignane (Hertog et al., 1993; Arts und Hollman, 2005). Einige Beispiele für die genannten Antioxidantiengruppen sind in Abbildung 7 dargestellt.

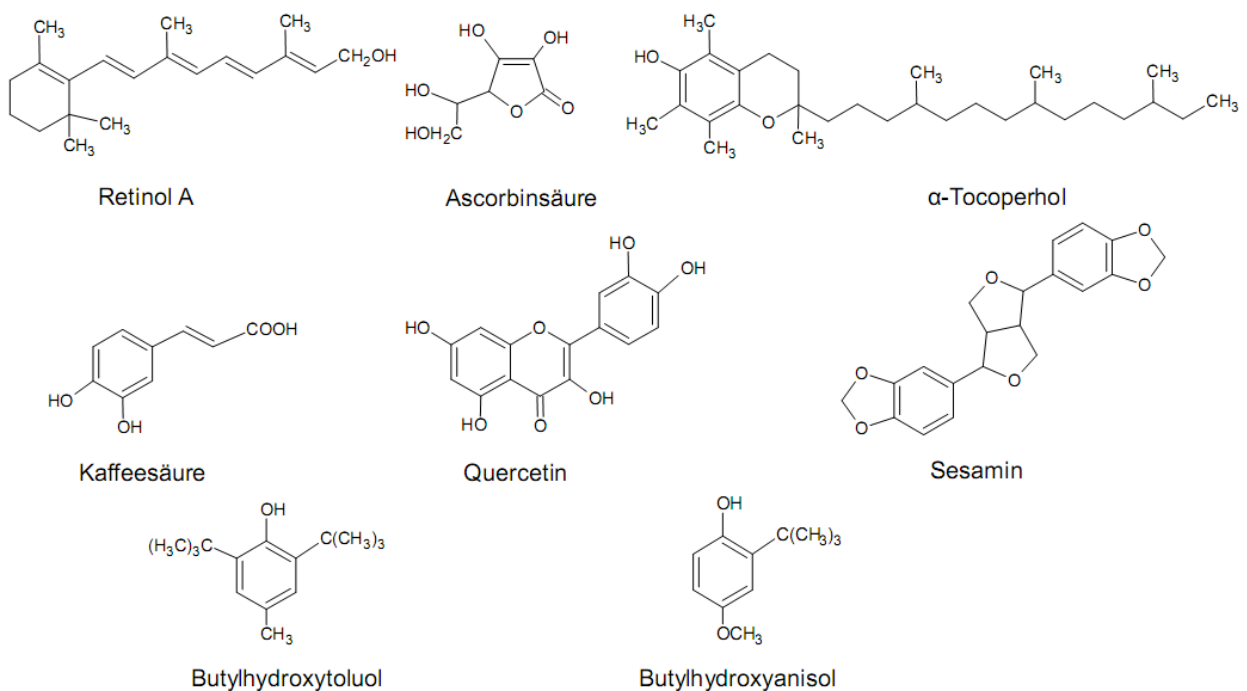


Abbildung 7 Natürlich vorkommende und synthetische Antioxidantien

Neben den gesundheitsfördernden Eigenschaften von natürlichen Antioxidantien ist auch ein möglicher Einsatz in der Lebensmittelindustrie von Interesse. Pflanzliche Antioxidantien könnten eine sinnvolle Alternative zu den häufig eingesetzten synthetischen Stoffen Butylhydroxytoluol (BHT) und Butylhydroxyanisol (BHA) (Abbildung 7) sein, nicht zuletzt weil Verbraucher vermehrt Bedenken haben gegen den Verzehr synthetischer Zusatzstoffe (Eklund et al., 2005). Mit

Nordihydroguajaretsäure kam bis in die 1970 Jahre hinein ein Lignan als Lebensmittel-Konservierungsmittel zum Einsatz. Allerdings wurde es später aufgrund seiner nieren- und lebertoxischen Eigenschaften zurückgezogen (Billinsky et al., 2007; Goodman et al., 1970)

Lignane werden u. a. auch dafür verantwortlich gemacht, dass Sesamöl, welches einen hohen Gehalt an Lignan besitzt, außergewöhnlich resistent gegen das Ranzigwerden ist. Das in Sesamöl enthaltene Lignan Sesamin hat schon mehrfach in *in vitro*-Tests antioxidative Aktivität gezeigt. In einem Test erwies es sich dabei als aktiver als das industriell eingesetzte Konservierungsmittel BHT (Suja et al., 2005).

Auch verschiedene andere Lignane wie Secoisolariciresinol, Matairesinol und Lariciresinol haben *in vitro* antioxidative Aktivitäten gezeigt (Eklund et al., 2005; Tiwari et al., 2001; Kuo et al., 2002)

1.3.3 In vitro-Tests zur Bestimmung antioxidativer Aktivität

Ein Antioxidans ist eine Substanz, die, verglichen mit dem oxidierbaren Substrat, in niedrigen Konzentrationen vorhanden ist und die Oxidation dieses Substrats signifikant verzögert oder inhibiert (Gutteridge, 1994).

Die Testung eines Antioxidans auf seine Wirksamkeit sollte in dem System erfolgen, welches vor Oxidation geschützt werden soll. Bei Antioxidantien mit potentiell gesundheitsfördernder Wirkung erfolgt dies im Idealfall durch eine humane Interventionsstudie mit harten klinischen Endpunkten wie dem Auftreten bestimmter Erkrankungen, zumindest aber mit Surrogatparametern wie dem Nachweis von Oxidationsprodukten physiologischer Moleküle. Soll ein Antioxidans im Lebensmittelbereich verwendet werden, sind Haltbarkeitsstudien erforderlich. Die Durchführung solcher Studien ist zeitaufwändig und kostenintensiv und erfordert zudem den Nachweis der Unbedenklichkeit der eingesetzten Substanzen.

Für gezielte Vortests einzelner Substanzen auf ihr antioxidatives Potential bedient man sich daher *in vitro*-Antioxidativtests. Keiner dieser Tests kann biologische Gegebenheiten vollständig nachstellen. Führt man aber mehrere Tests mit unterschiedlichen Mechanismen durch, erhält man zumindest in Annäherung eine Aussage bezüglich der antioxidativen Aktivität.

Die wichtigsten antioxidativen Mechanismen sind im Folgenden aufgeführt:

- Entfernung von Sauerstoff oder Senkung der lokalen Sauerstoffkonzentration
- Entfernung katalytischer Metallionen
- Entfernung reaktiver Sauerstoffspezies wie H₂O₂

- Abfangen von Radikalen wie OH•, RO•
- Kettenabbruch einer initiierten Sequenz und
- Abfangen von Singulett-Sauerstoff (Gutteridge, 1994)

Antioxidantien können durch mehrere Mechanismen gleichzeitig agieren oder aber mit einem jeweils unterschiedlichen Mechanismus, abhängig von den Reaktionsbedingungen (Prior et al., 2005).

Aus diesem Grund wird kein einzelnes Testsystem in der Lage sein, das gesamte antioxidative Potential einer Substanz nachzuweisen; Schlesier et al. (2002) empfehlen die Verwendung von mindestens zwei verschiedenen Testsystemen.

Die gängigsten Testsysteme lassen sich mechanistisch in drei Gruppen einteilen bei denen folgende Reaktionen ablaufen:

- Inaktivierung einer reaktiven Sauerstoffspezies,
- Übertragung eines Wasserstoffatoms (HAT – H-Atom-Transfer) oder
- Übertragung eines Elektrons (SET – Single Electron Transfer) durch das Antioxidans (Mac Donalds Wicks, et al. 2006; Prior et al., 2005).

Bei den Reaktionen der ersten Gruppe werden zunächst Sauerstoffradikale erzeugt. Dies kann je nach Radikalspezies enzymatisch, chemisch oder mittels Puls-Radiolyse erfolgen. Bei der Detektion von Reaktionsprodukten mit dem reaktiven Sauerstoff kommen verschiedene Verfahren zum Einsatz wie Absorptionsmessung nach einer Farbreaktion, Lumineszenzmessung oder GC-MS. Ein Beispiel für einen solchen Test ist der Xanthinoxidase-Test (XOD-Test).

Gängige Tests, denen ein HAT-Mechanismus zugrunde liegt, sind der ORAC-Test (Oxygen Radical Absorbance Capacity) und der TRAP-Test (Total Radical Trapping Antioxidant Parameter). Hierbei wird jeweils ein Peroxylradikal mittels eines Radikalstarters generiert, welches mit einem fluoreszierenden Agens wie Fluorescein zu einem nichtfluoreszierenden Produkt reagiert. Zugewetzte Antioxidantien verzögern die Reaktion. Der Reaktionsverlauf kann fluorimetrisch verfolgt werden. Tests, die auf einem SET-Mechanismus beruhen, werden vielfach eingesetzt, weil sie schnell sind und keiner speziellen Laborausstattung bedürfen.

Beispiele für reine SET-Reaktionen sind der FRAP (Ferric Reduction Ability of Plasma) und der CUPRAC (Cupric Ion Reducing Antioxidant Capacity), in denen jeweils ein Metall-Ion durch das Antioxidans reduziert wird.

SET und HAT-Reaktionen ereignen sich meistens gleichzeitig, der jeweilige Anteil der Mechanismen ist dabei abhängig von der anwesenden antioxidativen Struktur und dem pH-Wert.

So gibt es Tests wie den DPPH (Diphenylpicrylhydrazyl)-Test oder den TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity), bei denen beide Mechanismen eine Rolle spielen. Die beteiligten Radikale können sowohl durch Reduktion als auch durch H-Atomtransfer reduziert werden (Prior et al., 2005).

Ideal für die Beurteilung der antioxidativen Aktivität ist es, Testsysteme mit unterschiedlichen Mechanismen zu verwenden. Allerdings erfordern einige Systeme eine spezielle Laborausstattung, so dass die Verwendung komplementärer Testsysteme nicht immer gewährleistet werden kann.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Tests waren der DPPH-, FRAP- und XOD-Test.

1.4 Lignane als Phytoestrogene

Als Phytoestrogene bezeichnet man estrogen wirksame, nichtsteroidale Stoffe pflanzlicher Herkunft (Adlercreutz, 1998). Man teilt sie ein in die Hauptgruppen der Isoflavonoide (z. B. Genistein), Lignane (z. B. Enterolacton), Coumestane (z. B. Coumestrol) und Stilbene (z. B. Resveratrol) (Abbildung 8).

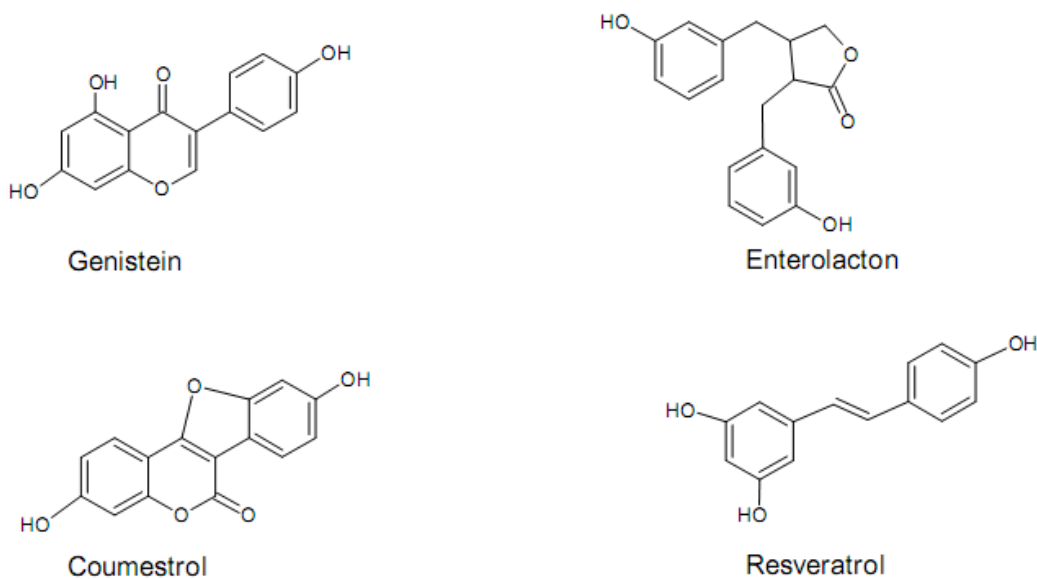


Abbildung 8 Beispiele für die wichtigsten Phytoestrogengruppen

Das Interesse an Phytoestrogenen hat in den letzten Jahren in Forschung und Industrie zugenommen, da sie vielfach als mögliche Alternative zur Hormonersatztherapie (HRT) bei klimakterischen Beschwerden gesehen werden. Eine Behebung des in der Menopause auftretenden Estrogenmangels ist von Interesse, da Estrogene eine Vielzahl an physiologischen Vorgängen beeinflussen. Bei der HRT wird dieser Mangel durch die Verabreichung von Estrogenen, teilweise in Kombination mit Gestagenen, ausgeglichen. Die Therapie ist jedoch in den letzten Jahren wegen ihrer Nebenwirkungen in die Kritik geraten. Insbesondere eine Studie der Womens Health Initiative (WHI), welche wegen eines erhöhten Auftretens von Brustkrebs, koronaren Herzerkrankungen und Schlaganfällen vorzeitig abgebrochen worden ist (Rossouw et al., 2002), führte zu einer vermehrt kritischen Betrachtung der Hormonsupplementierung im Klimakterium. Von den Phytoestrogenen erhofft man sich eine nebenwirkungsarme Therapie zur Linderung von Wechseljahrsbeschwerden.

1.4.1 Estrogenrezeptoren und ihre Liganden

Das wirksamste und auch mengenmäßig bedeutsamste physiologische Estrogen ist das Estradiol¹ (E₂). Daneben gibt es im Säugetierorganismus die beiden weniger aktiven Derivate Estron und Estriol, welche in der Leber durch Dehydrierung bzw. Hydroxylierung von E₂ gebildet werden (Abbildung 9).

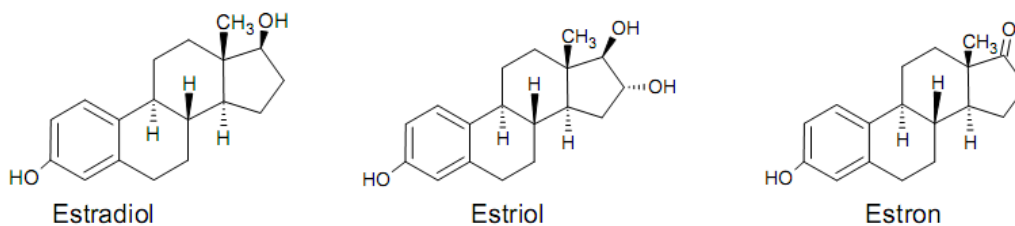


Abbildung 9 Physiologische Estrogene

E₂ fördert Wachstum, Differenzierung und Funktion der weiblichen und männlichen Geschlechtsmerkmale.

Daneben senkt es den peripheren Gefäßwiderstand und beeinflusst den Leber- und den Knochenstoffwechsel. Somit spielt E₂ eine wichtige Rolle bei der Erhaltung der Knochenmasse und besitzt eine Schutzwirkung vor kardiovaskulären Erkrankungen (Mutschler, 2001; Kuiper et al., 1997). Außerdem vermutet man, dass Estrogene eine

¹ „Estradiol“ bezieht sich im Text durchgängig auf 17-β-Estradiol

prophylaktische Wirkung hinsichtlich der Entwicklung von Alzheimer und von Hyperlipidämie haben (Usui, 2006)

Die Wirkung von E_2 wird über den Estrogenrezeptor (ER) vermittelt. Er gehört zur Gruppe der Steroidrezeptoren und ist im Zellkern lokalisiert.

Der ER besteht aus einer ligandenbindenden Domäne am C-terminalen Ende, einer DNA-bindenden Domäne im mittleren Teil und einer transaktivierenden Domäne am N-terminalen Ende. Bindet ein Ligand an den ER, so diffundieren zunächst die für eine korrekte Faltung assoziierten Hitzeschockproteine ab. Es erfolgt die Dimerisierung mit einem weiteren Rezeptor und Bindung an ein Estrogenresponsives Element (ERE) über eine Zinkfingersequenz (Mutschler, 2001). Inwieweit es zu einer Aktivierung des ERE kommt, hängt neben einem passenden Liganden auch von der Anwesenheit von sogenannten Koaktivatoren bzw. Korepressoren ab. Es handelt sich dabei um Proteine, die sowohl ligandenabhängig als auch ligandenunabhängig an bestimmte Domänen des ERs binden und somit eine Bindung an das ERE begünstigen oder verhindern (Rice und Whitehead, 2006). Die Anwesenheit dieser Co-Regulatoren ist teilweise gewebsspezifisch (Müller et al., 2004).

Es gibt zwei verschiedene ERs, $ER\alpha$ und $ER\beta$. Nachdem man zunächst von der Existenz von nur einem ER ausgegangen war ($ER\alpha$), wurde $ER\beta$ erstmals 1996 von Mosselman et al. nachgewiesen.

Beide Rezeptoren können in einer Zelle lokalisiert sein, sie unterscheiden sich jedoch teilweise in ihrer Funktion und Gewebsverteilung. Bei der folliculären Entwicklung, in vaskulären Endothelzellen, Myokardzellen und im Brustgewebe sind beide Rezeptoren involviert, während für die Knochenerhaltung bei der Frau $ER\beta$ von Bedeutung ist (Cornwell et al., 2004).

Bei einer Brustkrebserkrankung vergrößert sich das Verhältnis von $ER\alpha$ zu $ER\beta$, und eine vermehrte Expression von $ER\beta$ wurde mit einer geringeren Aggressivität von Brustkrebs assoziiert. Eine Theorie hinter der offensichtlich schützenden Funktion von $ER\beta$ ist, dass $ER\beta$ mit $ER\alpha$ dimerisiert und damit die aktivierende Funktion von $ER\alpha$ aufhebt (Rice und Whitehead, 2006).

E_2 bindet an beide Rezeptoren gleich stark. Auch Tamoxifen, ein sogenannter selektiver Estrogenrezeptormodulator (SERM), hat eine ähnliche Affinität zu beiden Rezeptoren (Kuiper et al. 1997). SERMs besitzen jedoch die Fähigkeit, gewebespezifisch als Agonisten bzw. als Antagonisten an den Estrogenrezeptoren zu agieren. Die Art ihrer Aktivität hängt unter anderem von der Konzentration an

Koaktivatoren bzw. Korepressoren in der jeweiligen Zelle ab (Riggs und Hartmann, 2003).

SERMs werden therapeutisch eingesetzt zur Behandlung des estrogenabhängigen Mammakarzinoms sowie zur Behandlung und Prophylaxe von klimakterisch bedingter Osteoporose. Es besteht Interesse an ihrer Anwendung bei klimakterischen Beschwerden, da sie selektiv die positiven Effekte einer HRT hervorrufen.

Phytoestrogene wie Isoflavonoide und Lignane werden von einigen Autoren auch als potentielle SERMs angesehen. Sie zeigen estrogene und auch antiestrogene Wirkung, abhängig von der anwesenden Konzentration an endogenen Estrogenen (Brzezinski und Debi, 1999).

1.4.2 Phytoestrogene

Die estrogene Wirkung von pflanzlichen Inhaltsstoffen trat erstmals in den neunzehnhundertvierziger Jahren zutage, als Schafe beim Weiden auf Wiesen mit einem hohen Rotklee-Anteil an Fruchtbarkeitsstörungen litten (Cornwell et al., 2004). Heute weiß man, dass die im Rotklee enthaltenen Isoflavone wie Biochanin A und Formononetin für diese Hormonwirkung verantwortlich waren.

Inzwischen haben epidemiologische Studien auf verschiedene mögliche positive Effekte von Phytoestrogenen aufmerksam gemacht. So ist die Inzidenz von klimakterischen Beschwerden, besonders von Hitzewallungen, in Japan signifikant niedriger als in westlichen Ländern. Auch Erkrankungen wie Osteoporose, kardiovaskuläre Erkrankungen sowie verschiedene Krebsarten treten in asiatischen Ländern in geringerem Ausmaß auf als in westlichen Ländern. Dies wird vielfach auf den in asiatischen Ländern hohen Verzehr von Phytoestrogenen, insbesondere von Isoflavonen aus Sojaprodukten, zurückgeführt (Brzezinski und Debi, 1999; Cornwell et al. 2004; Adlercreutz 1999).

In verschiedenen Studien, die in asiatischen Ländern sowie in westlichen Ländern durchgeführt worden sind, konnte eine inverse Korrelation zwischen der Phytoestrogen-Ausscheidung im Urin (sowohl von Isoflavonen als auch von Lignanen) und dem Brustkrebsrisiko nachgewiesen werden. In anderen Studien konnte jedoch kein Zusammenhang belegt werden (Cornwell et al., 2004). Es gibt Hinweise darauf, dass eine protektive Wirkung von Phytoestrogenen nur zum Tragen kommt, wenn sie in der Pubertät, also schon bei der Ausbildung verschiedener

Strukturen des Brustgewebes, aufgenommen werden (Adlercreutz, 2007). Für einen endgültigen Beleg sind jedoch weitere Untersuchungen erforderlich.

Ein Großteil der Untersuchungen zu den estrogenen Wirkungen von Lignan bezieht sich auf die Enterolignane Enterolacton und Enterodiol, welche das metabolische Umwandlungsprodukt der meisten Lignane darstellen. Da aber auch pflanzliche Lignane resorbiert werden (Saarinen et al., 2002; Smeds und Hakala, 2003; Adlercreutz, 2007), ist deren estrogen Aktivität gleichermaßen von Bedeutung wie die der Enterolignane.

Für den Wirkmechanismus von Phytoestrogenen im Säugetierorganismus gibt es – neben der direkten Interaktion mit dem Estrogenrezeptor - verschiedene Erklärungsmodelle.

Eine vermehrte Aufnahme von Phytoestrogenen führt zu einer erhöhten Konzentration an Sexhormonbindendem Globulin (SHBG) im Serum. Dies hat wiederum zur Folge, dass ein geringerer Teil an E_2 in freier Form zur Verfügung steht. Dies könnte eine Verringerung der Entstehung bzw. des Wachstums hormonabhängiger Tumoren bewirken (Rice und Whitehead, 2006; Brzezinsky und Debi, 1999).

Ein weiteres Protein, dessen Serumkonzentration durch Phytoestrogene gesenkt wird, ist das Somatomedin (engl. Insulin-like Growth Factor, IGF). Es wird in der Leber synthetisiert und hat eine große Bedeutung für die Entwicklung der terminalen Endknospen (engl. Terminal End Buds, TEB) der Milchgänge, einem hochteilungsfähigen Gewebe. Ein besonders hoher Plasmaspiegel an IGF geht jedoch mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko einher (Wang, 2002; Adlercreutz, 2003). Eine Senkung des IGF-Spiegels könnte also eine Minderung des Brustkrebsrisikos bewirken.

Bei postmenopausalen Frauen wird ein Großteil des zur Verfügung stehenden E_2 in extragonadalem Gewebe, u. A. im Brustgewebe, aus relativ inaktiven Steroiden gebildet. An dieser Umwandlung sind verschiedene Enzyme beteiligt, welche mögliche Angriffspunkte für Phytoestrogene darstellen. Ein Schlüsselenzym für die Umwandlung von Androgen zu Estrogenen stellt die Aromatase dar. Sie wird in einem Großteil des Brusttumorgewebes stärker exprimiert als in gesundem Gewebe. Weitere Enzyme, welche an der Bildung von Estrogenen aus Vorstufen beteiligt sind, sind die 17β -Hydroxysteroiddehydrogenase und Steroidsulfatasen. Für die

genannten Enzyme existieren. Nachweise einer Enzymhemmung durch Phytoestrogene (Rice und Whitehead, 2006).

Als weiterer möglicher Angriffspunkt für Phytoestrogene werden die im Zellkern lokalisierten sogenannten Typ-II-Bindungsstellen postuliert. Es wurde schon lange vermutet, dass diese Bindungsstellen in die Regulation der Zellproliferation involviert sind. Shoulars et al. (2002) fanden schließlich heraus, dass es sich dabei um das Histon H4 handelt. Mit der Nahrung aufgenommene Liganden dieser Bindungsstellen beeinflussen also möglicherweise die Histonfunktion und darauffolgend die Gen-Transkription (Shoulars et al., 2002). Typ-II-Bindungsstellen sind keine echten Rezeptoren, da sie eine vergleichsweise niedrige Affinität zu E₂ besitzen. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass sie die Antikrebswirkung von Lignanen vermitteln (Adlercreutz, 2007).

Eine nicht unerhebliche Rolle für die Antikrebswirkung der Phytoestrogene spielt möglicherweise deren durch ihre phenolische Struktur bedingte antioxidative Wirkung (Adlercreutz, 1999; Wang, 2002).

Einige Autoren schließen bei der Bewertung von Studien, die einen Zusammenhang zwischen Phytoestrogenaufnahme und Gesundheit herstellen nicht aus, dass es sich bei diesen Stoffen um Biomarker handelt, welche auf einen insgesamt gesunden Lebensstil zurückschließen lassen (Adlercreutz, 2007; Rice und Whitehead, 2006).

1.4.3 Bioassays zum Nachweis estrogener Aktivität

Für den Nachweis einer estrogenen Aktivität stehen verschiedene *in vitro*- und *in vivo*-Methoden zur Verfügung. Die gebräuchlichsten sind Ligandenbindungsassays, Two-Hybridassays, Analyse der Gen- und Proteinexpression, E-screens (Messung der konzentrationsabhängigen Proliferation estrogenresponsiver Zellen) und Transaktivierungsassays (Mueller, 2002).

Um die reine Bindungsaffinität von Rezeptor und Ligand zu testen, bietet sich ein Ligandenbindungsassay an. Allerdings ermöglicht dieser keine Aussage über die intrinsische Aktivität des Liganden. Two-Hybridassays werden verwendet, um die ligandenabhängige Rekrutierung von Transkriptionsfaktoren durch den Rezeptor zu messen. Das Verfahren ist gut geeignet, um die Interaktion von Rezeptor und Koaktivator zu studieren, jedoch ist es aufwändig und birgt viele Fehlerquellen. Ein Nachweis der ER-Aktivierung ist auch durch eine Analyse der Gen- und Proteinexpression möglich. Dieses Verfahren ist besonders geeignet, um

gewebsspezifische Effekte von Estrogenen nachzuweisen. Durch den hohen Zeitaufwand ist es jedoch auch nicht für einen hohen Probendurchsatz geeignet.

Für einen E-screen wird die Proliferation estrogenabhängiger Zelllinien gemessen. Hierbei wird oft die humane Brustkrebszelllinie MCF-7 verwendet. Der Test ermöglicht eine konzentrationsabhängige Erfassung von estrogenen und antiestrogenen Effekten. Allerdings erfordert das Arbeiten mit humanen Zelllinien eine spezielle Laborausstattung.

Bei Transaktivierungsassays werden Zellen (Säugetierzellen oder Hefezellen) mit der cDNA eines ERs sowie mit der eines Reportergens mit einem ERE transfiziert. Die Zugabe einer estrogenen Substanz bewirkt konzentrationsabhängig die Expression des Reportergens zum entsprechenden Protein, z. B. Luciferase oder β -Galaktosidase. Mit dem Verfahren können sowohl estrogene als auch antiestrogene Effekte nachgewiesen werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein Transaktivierungsassay verwendet, der Yeast Estrogen Screen Assay (YES-Assay). Er besteht aus einem rekombinanten Hefestamm mit dem Gen für den ER α , welches stabil ins Hauptgenom integriert ist. Die Verwendung von Hefezellen ermöglichte das Arbeiten mit einer Standard-Laborausstattung. Zudem gelten Hefen als robust und wenig anfällig für zytotoxische Einflüsse (Bovee et al., 2004).

1.5 Fragestellung

Lignane sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe mit einer Vielzahl an biologischen Wirkungen.

Die Asteraceae sind eine Pflanzenfamilie mit vielen einheimischen Arten, für die teilweise hohe Lignanvorkommen beschrieben sind. Besonders häufig finden dabei Arten aus der Unterfamilie der Carduoideae, wie *A. lappa* (Hänsel et al., 1964), *C. tinctorius* (Palter und Lundin, 1970) und in *Centaurea*-Arten (Ferguson et al. 2003, Marco et al., 1992) Erwähnung.

Ein Ziel dieser Arbeit war es, Extrakte aus den Samen verschiedener Arten aus der Unterfamilie der Carduoideae herzustellen und auf ihre antioxidative Aktivität hin zu testen. Solche Extrakte könnten Ausgangsmaterial z. B. für die Entwicklung von Nahrungsergänzungsmitteln oder für die Herstellung von Antioxidantien zur Verwendung in der Lebensmittelindustrie darstellen. Für den Test auf antioxidative Aktivität wurden drei verschiedene *in vitro*-Tests im Labor etabliert und auf ihre

Anwendbarkeit auf die Extrakte getestet. Zwei der Methoden erwiesen sich als verwendbar und kamen für die Testung der Extrakte zum Einsatz.

Des Weiteren sollte die estrogenen Aktivität verschiedener Lignane mit Hilfe des YES-Assays nachgewiesen werden. Anschließend sollte getestet werden, ob das Testsystem auch für den Nachweis von estrogenen Lignanen in einem Rohextrakt aus Asteraceenfrüchten geeignet ist.

Für die Testung auf estrogenen Aktivität kam ein rekombinanter Hefestamm zum Einsatz, welcher den humanen ER α exprimiert.

Da die absolute Konfiguration eines Moleküls oft ein wichtiger Aspekt bei der biologischen Aktivität von Naturstoffen ist, waren für die vorliegende Arbeit auch stereochemische Aspekte in der Biosynthese von Lignanen von Interesse. Am Beispiel von Matairesinol wurden Untersuchungen zur absoluten Konfiguration von Lignanen in unterschiedlichen Pflanzengeweben vorgenommen.

Dafür war es erforderlich, ausreichende Mengen beider Stereoisomere aus Pflanzenmaterial zu isolieren und eine Analysemethode zu entwickeln, mit welcher beide Enantiomere qualitativ und quantitativ erfasst werden konnten.

Die Isolierung der Enantiomere aus dem Pflanzenmaterial erfolgte mit klassischer Säulenchromatographie. Für die Enantiomerentrennung wurde eine Trennmethode mittels Kapillarelektrophorese (CE) entwickelt.

Es sollten also verschiedene Aspekte der Analytik und der biologischen Aktivität von Lignanen und von lignanhaltigen Extrakten aus einheimischen Asteraceenarten beleuchtet werden.

2 Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Pflanzenmaterial

- Asteraceenfrüchte - Herkunft: Gert Horn, Exsemine GmbH, Zappendorf:
 - *Arctium lappa* L. (Große Klette)
 - *Arctium nemorosum* Lej. (Hain-Klette)
 - *Arctium tomentosum* Mill. (Filzige Klette)
 - *Arctium minus* (Hill) Bernh. s.l. (Kleine Klette)
 - *Carthamus tinctorius* L. (Saflor)
 - Sorte "Sabina"; für die Tests auf antioxidative Aktivität
 - Akzession CT 014 J E03; für die Isolierung von Matairesinol
 - *Echinops sphaerocephalus* L. (Drüsenblättrige Kugeldistel)
 - *Cnicus benedictus* L. (Benediktenkraut)
 - *Onopordum acanthium* L. (Gewöhnliche Eselsdistel)
- Asteraceenfrüchte - Herkunft: Rieger-Hofmann GmbH, Blaufelden-Raboldshausen
 - *Centaurea stoebe* L. s.l. (Rispen-Flockenblume)
 - *Centaurea jacea* L. s.l. (Wiesen-Flockenblume)
- Oberirdische Teile von *Carthamus tinctorius* (Akzession CT 014 J E03) - Herkunft: Gert Horn, Exsemine GmbH, Zappendorf

2.1.2 Rekombinanter Hefestamm

Der Hefestamm wurde von der Firma Glaxo entwickelt. Er exprimiert den humanen Estrogenrezeptor und enthält ein Expressionsplasmid mit einem estrogenresponsiven Element und dem Reporter-gen *LacZ*. Der Stamm wurde erstmals von Routledge und Sumpter (1996) verwendet. Die Hefezellen wurden bezogen über die Arbeitsgruppe von Dr. Christoph Schäfers, Fraunhoferinstitut für Molekularbiologie und angewandte Ökologie in Schmallenberg-Grafschaft.

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Mikrotiterplatten	Diagonal, Münster
DC-Platten Kieselgel F ₂₅₄	Merck, Darmstadt

Kieselgel	Kieselgel 60, 0,063 – 0,100 mm, Merck, Darmstadt
Kartuschen für SPE	Adsorbex, Polyspher RP-18, 100 mg
Sterilfilter	Whatman, Schleicher&Schell, Celluloseacetat, 0,2 µm

2.2 Chemikalien und Enzyme

2.2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden, sofern nicht anders angegeben, von den Firmen Roth, Sigma-Aldrich und Merck bezogen.

Für die HPLC- und CE-Analyse sowie für die Kulturmedien des YES-Assay wurde doppelt destilliertes Wasser verwendet, für alle übrigen Versuche einfach destilliertes Wasser.

Lignane

- (±)-Matairesinol Prof. Medarde, Universät Salamanca;
freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Frau
Prof. Petersen, Universität Marburg
- Arctiin, (-)-Arctigenin Biosolutions, Halle (Saale)
- (-)-Matairesinol Sigma-Aldrich und Arbonova (Turku, Finland)
- (-)-Secoisolariciresinol
- (-)-Isolariciresinol Arbonova (Turku, Finland)
- (+)-Lariciresinol
- (+)-Pinoresinol
- (-)-Trachelogenin
- (-)-Hydroxymatairesinol
- (-)-Enterolacton, (-)-Enteodiol
- Semisynthetische Lignane 1 – 6 Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof.
Willför, Åbo Akademi University, Turku, Finland

2.2.2 Enzyme

Glucuronidase/Sulfatase	aus <i>Helix pomatia</i> , wässrige Lösung
Xanthinoxidase	aus Kuhmilch, „Grade I“, Ammoniumsulfat-Suspension
Galaktosidase	aus <i>E. coli</i> , wässrige Glycerolsuspension

Alle genannten Enzyme stammten von Sigma Aldrich.

2.3 Geräte

Ultraschallbad	Bandelin
HPLC mit DAD	VWR-Hitachi Elite LaChrome; Säule: Merck LiChroCART 125-4, 100 RP-18, 5 µm
HPLC-MS	Surveyor Plus micro-HPLC mit Finnigan MAT TSQ Quantum Ultra AM mit ESI; Säule: Ultrasep ES RP18E (5 µm, 1x100 mm, SepServ)
HPLC präparativ	Agilent 1100 Series; Säule: Merck Hibar 250-25, 100 RP-18, 5µm
Ultraturax	IKA-Labortechnik
CE	Hewlett-Packard G1600A ^{3D} CE System mit DAD
CE-Kapillaren	unbeschichtete Quarz-Kapillare und polyacrylamid-beschichtete Kapillare (beide von CS-Chromatographie Service GmbH, Langerwehe), jeweils 64 cm Gesamtlänge, 55,5 cm bis zum Detektor, 50 µm Durchmesser
Zentrifugen	Sigma 3K18 Heraeus Biofuge Tischzentrifuge
GC-MS	Thermo Finnigan Trace GC mit Polaris Qe Ion Trap, Säule: DB-5MS capillary column (Agilent), 30 m x 0.250 mm x 0.25 µm.
Mikrotiterplattenleser	Multiscan-Ascent, Thermo Scientific, Langenselbold
Gefriertrocknungsanlage	Christ Gamma 1-20
Vakuumkonzentrator	Christ RVC 2-25
Inkubatoren	Heraeus Tischinkubator Edison Innova 4230 Schüttelinkubator
Zweistrahlsphotometer	SHIMADZU UV-VIS Recording Spectrophotometer UV-160 A
pH-Meter	WTW inoLab pH Level 1

Unterdruckkammer SPE BAKER spe 12G

2.4 Methoden

2.4.1 Chromatographische Methoden

2.4.1.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Das Fließmittel bestand aus einer Mischung von Methanol und Chloroform im Verhältnis 1:10, entwickelt wurde bei Kammerfüllung.

Die Auswertung erfolgte zunächst durch Betrachtung der Fluoreszenzlösung unter UV-Licht.

Dann wurde mit FeCl_3 -Lsg (100g/l in 2mM HCl) besprüht und für zwei Minuten mit einem Föhn erhitzt. Arctigenin, Matairesinol und Secoisolariciresinol färbten sich dunkelblau, Arctiin rosafarben.

2.4.1.2 Säulenchromatographie mit Kieselgel

Für den Extrakt aus den Früchten von *C. tinctorius* wurde eine Säule mit einem Durchmesser von 1,4 cm bis auf eine Füllhöhe von 18 cm mit in Fließmittel suspendiertem Kieselgel gefüllt. Als Fließmittel wurde ein Gemisch von Methanol/Chloroform (1:10) verwendet. Nach einer Vorlaufphase von 25 ml wurden Fraktionen zu je 10 ml gesammelt.

Für den Extrakt aus den getrockneten Stängeln von *C. tinctorius* wurde eine Säule mit einem Durchmesser von 3,5 cm verwendet, die Füllhöhe des Kieselgelbetts betrug 53 cm.

Als Laufmittel diente CH_2Cl_2 mit 5% EtOH und nach Elution von 250 ml Fließmittel mit 8% EtOH. Fraktionen zu je 10 ml wurden nach einer Vorlaufphase von 200 ml gesammelt.

Die Fraktionen wurden mit DC auf das Vorhandensein von Matairesinol geprüft.

2.4.1.3 Festphasenextraktion (SPE)

Abtrennung polarer Verunreinigungen in den Fraktionen aus dem Kraut von C. tinctorius:

Konditionierung: → 2 ml MeOH

→ 2 ml 20 % MeOH in HAc pH 3

Probenaufgabe: → 2,5 ml Probe in 20 % MeOH in HAc

Waschen: → 5 ml 20% MeOH in HAc

Elution: → 5 ml 100 %MeOH

Abtrennung von restlichem Chlorophyll in den Fraktionen aus dem Kraut von C. tinctorius:

Konditionierung: → 2 ml 100% MeOH

→ 2 ml 80%MeOH

Probenaufgabe: → 500 µl Probe in 80 % MeOH

Elution: → 2 ml 80 %MeOH

2.4.1.4 Analytische Hochleistungsflüssigchromatographie mit Diodenarray-detektor (HPLC-DAD)

Die HPLC wurde mit einem Gradienten aus zwei Eluenten (Tabelle 1) und einer Flussrate von 0,8 ml/min betrieben. Das Injektionsvolumen betrug jeweils 10 µl. Die Säule wurde mit einem Säulenofen auf 25°C temperiert. Mit dem Diodenarraydetektor wurde für jeden Lauf das Absorptionsspektrum zwischen 200 und 600 nm aufgezeichnet, die quantitative Auswertung erfolgte bei 280 nm.

Tabelle 1 Gradient HPLC

t (min)	% A	% B
	MeOH	Wasser, 0,1% TEA*, mit H ₃ PO ₄ auf pH3 eingestellt; 15% MeOH
0	30	70
20	80	20
21	30	70
30	30	70

2.4.1.5 Hochleistungsflüssigchromatographie mit Massenspektrometer (HPLC-MS)

Die HPLC wurde mit einem Gradienten aus zwei Eluenten und einer Flussrate von 50µl/min betrieben. Die Ionisierungsart war Elektrosprayionisation. Alle weiteren HPLC-MS-Bedingungen sind in Tabelle 2 aufgelistet.

* Triethylamin

Tabelle 2 Gradient HPLC-MS

HPLC-Bedingungen	Injektionsvolumen	5 µl	
	Gradient		
	t (min)	% A	% B
		H ₂ O, 0,2% HAc	ACN, 0,2% HAc
	0	90	10
	15	10	90
	30	10	90
	31	90	10
	40	90	10
MS-Bedingungen	Schutzgas	Stickstoff	
	Kollisionsgas	Argon	
	Kollisionsdruck	1,5 mTorr	
	Kollisionsenergie	15 eV	
	Verdampfungstemperatur	50°C	
	Kapillartemperatur	250°C	

2.4.1.6 Präparative HPLC

Die präparative HPLC wurde mit einem Gradienten aus zwei Eluenten (Tabelle 3) und einer Flussrate von 30 ml/min betrieben. Das Injektionsvolumen betrug 100 bis 300 µl. Die Detektionswellenlänge betrug 280 nm.

Tabelle 3 Gradient Präparative HPLC

t (min)	% A	% B
	85% MeOH	85% HAc pH3
	15% HAc pH 3	15% MeOH
0	30	70
20	80	20
21	30	70
30	30	70

2.4.1.7 Gaschromatographie mit Massenspektrometer (GC-MS)

Vor der Messung wurden die Proben silyliert. Dafür wurden je 100 µl methanolische Probe im Vakuumkonzentrator getrocknet. Nach Zugabe von 15 µl Pyridin, 20 µl

Hexamethyldisilazan und 5 µl Trimethylchlorsilan wurde die Mischung für 20 Minuten auf 70°C erhitzt. Danach wurden 125 µl Hexan zugegeben und mit der Probe vermischt.

Als Trägergas für die GC wurde Helium verwendet, die Ionisierung erfolgte über Elektronenstoßionisation, alle weiteren GC-Bedingungen sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Tabelle 4 GC/MS-Bedingungen

GC-Bedingungen	Injektionsvolumen	1 µl	
	Temperaturprogramm Injektor (PTV)	Injektionstemperatur 68°C, nach 1 min mit 8°C/s auf 275°C	
	Flussrate	1 ml/min	
	Temperaturprogramm Säule	Zeit (min)	°C
		0	50
	2,5	50	
	9	250	
	34	275	
	42	275	
MS-Bedingungen	Transfer line	275°C	
	Ionenquelle	225°C	
	Ionisierungsenergie	70 eV	
	m/z Full Scan modus	50,0 – 650,0	

2.4.2 Kapillarelektrophorese (CE)

Für die Herstellung aller Puffer wurde doppelt destilliertes Wasser benutzt. Alle Puffer wurden im Kühlschrank aufbewahrt und spätestens nach 2 Wochen erneuert. Die Zugabe der verschiedenen Cyclodextrine (alle bezogen von Sigma Aldrich) erfolgte nach Einstellung des pH, jeweils kurz vor der Messung.

Eine neue Quarzglas Kapillare wurde vor der ersten Anwendung 20 min mit 1 N NaOH und 5 min mit Wasser gespült. Ein Detektorfenster wurde zuvor durch Wegbrennen der Polyimidschicht freigelegt. Vor jeder Messung wurde die Kapillare 1 min mit Wasser, 5 min mit 1 M NaOH, 2 min mit Wasser und 3 min mit Messpuffer gespült.

Bei einer neuen polyacrylamid-beschichtete Kapillare erfolgte das Freilegen des Detektorfensters durch Einwirken von konzentrierter H₂SO₄ über Nacht. Dafür wurde

die Kapillare durch ein Eppendorfgefäß geführt und dieses mit H₂SO₄ gefüllt. Vor der ersten Verwendung wurde die Kapillare 10 min mit Messpuffer ohne Cyclodextrin gespült. Vor jeder Messung wurde 4 min mit Messpuffer ohne Cyclodextrin und 3 min mit cyclodextrinhaltigem Messpuffer gespült.

Die Injektion erfolgte jeweils bei 50 mbar für 5 s, die Messtemperatur betrug 25°C.

Die angelegte Spannung betrug 25 kV für die Quarzkapillare und -25 kV für die polyacrylamid-beschichtete Kapillare.

Proben und Standards wurden zunächst in Wasser gelöst. Bei der an die Anwendung angepassten Methode erfolgte die Lösung der Probe in einem Teil MeOH, dann wurden 9 Teile Wasser zugegeben. Das Wasser enthielt 0,9 µg/ml DMSO als EOF-Marker und 84 µg/ml Cefotaxim als internen Standard.

Berechnung der Auflösung:

$$R_s = 1,18 * \frac{(t_{R2} - t_{R1})}{w_{h1/2}1 - w_{h1/2}2}$$

R_s = Auflösung

t_{R1} und t_{R2} = Migrationszeiten Analyt 1 und 2

$w_{h1/2}1$ und $w_{h1/2}2$ = Peakhöhe auf halber Breite von Analyt 1 und 2

Berechnung der effektiven Mobilität μ_e :

$$\mu_{eff} = \frac{L_d * L_g}{U} * \left(\frac{1}{t_m} - \frac{1}{t_{EOF}} \right)$$

L_g = Gesamtlänge der Kapillare

L_d = Kapillarlänge bis Detektor

U = Spannung

t_m = Migrationszeit Analyt

t_{EOF} = Migrationszeit EOF-Marker

2.4.3 Hydrolyse und Aufreinigung von Matairesinol

2.4.3.1 Extraktion

Extrakte zur Testung auf antioxidative Aktivität

Es wurden 5 g der getrockneten Früchte von jeder Asteraceenart mit einer Kaffeemühle pulverisiert. Das so erhaltene Pulver wurde mit je 50 ml 80% Methanol für eine halbe Stunde im Ultraschallbad extrahiert. Nach Zentrifugation und Abtrennen des Überstands wurde der Rückstand noch zweimal mit je 25 ml Methanol gewaschen.

Der Extrakt wurde auf 100,0 ml ergänzt. 20,0 ml dieses Vollextrakts wurden abgenommen, am Rotationsverdampfer zur Trockene eingedampft und für die Durchführung der Tests in 10,0 ml 100 % Methanol aufgenommen. Der so erhaltene Extrakt wird im Folgenden als Vollextrakt bezeichnet.

Die verbleibenden 80,0 ml Extrakt wurden am Rotationsverdampfer bis zum alleinigen Verbleib der wässrigen Phase eingeeengt. Diese wurde nacheinander mit je 3 x 20 ml Diethylether, Chloroform, Ethylacetat und Butanol ausgeschüttelt.

Die vier Lösungsmittelfractionen sowie die verbleibende Wasserfraktion wurden am Rotationsverdampfer getrocknet und in je 10,0 ml 100%Methanol aufgenommen.

*Extrakte aus Früchten und getrockneten Stängeln von *Carthamus tinctorius* zur Isolierung von Matairesinol*

Je ein Teil getrocknetes und pulverisiertes Pflanzenmaterial wurde mit 3 x 10 Teilen 80 % Methanol für je eine halbe Stunde im Ultraschallbad extrahiert. Vor dem ersten Extraktionsschritt wurde das Pflanzenmaterial mit dem Lösungsmittel im Ultraturax homogenisiert.

Der Methanolanteil der vereinigten Extrakte wurde am Rotationsverdampfer entfernt und der Extrakt dann weiterverarbeitet.

Der aus Stängeln gewonnene Extrakt wurde zunächst zur Entfernung von Chlorophyll mit Chloroform extrahiert und der wässrige Rest hydrolysiert und weiterverarbeitet. Beim zweiten Versuch wurde der Rohextrakt mit Ethylacetat/n-Hexan (1:1) extrahiert, um im Rohextrakt vorhandenes Matairesinol-Aglykon zu gewinnen. Danach wurden sowohl die wässrige als auch die organische Phase weiterverarbeitet.

2.4.3.2 Basische Hydrolyse

Ein Teil pulverisiertes Pflanzenmaterial wurde mit 10 Teilen 80% Methanol, welcher 0,3 N NaOH enthielt, im Ultraturax homogenisiert, eine halbe Stunde im Ultraschallbad extrahiert und dann für eine Stunde bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Nach Zentrifugation wurde das Pellet 2 x mit 10 Teilen 80% Methanol für eine halbe Stunde im Ultraschallbad extrahiert.

Die vereinigten Extrakte wurden neutralisiert und dann der Methanolanteil am Rotationsverdampfer entfernt.

2.4.3.3 Saure Hydrolyse

Für die saure Hydrolyse wurde durch Zugabe von Methanol und konzentrierter Salzsäure eine Gesamtkonzentration von 1 N HCl in 50% Methanol eingestellt. Als Antioxidans wurde 0,1% Ascorbinsäure zugegeben (Aehle et al., 2004).

Die Hydrolyse erfolgte eine Stunde lang im Wasserbad unter Rückfluss. Danach wurde der Methanol-Anteil entfernt.

5 ml wässrige Probe wurden mit 3 x 1 ml Ethylacetat/Hexan (1:1) ausgeschüttelt.

2.4.3.4 Enzymatische Hydrolyse mit Glucuronidase/Sulfatase

Das Methanol wurde zunächst vollständig aus dem Extrakt entfernt. Der pH-Wert des wässrigen Extrakts wurde mit HAc 1N auf 5 – 6 eingestellt. Das Enzym wurde in 50 mM Acetatpuffer pH 5 zugegeben bis zu einer Enzymkonzentration von 500 U/ml (c1) bzw. 1000 U/ml (c2). Die Inkubationsdauer betrug 16 bzw. 24 h (t2).

Nach erfolgter Hydrolyse wurden je 2 ml Probe mit 3 x 1 ml Ethylacetat/Hexan (1:1) ausgeschüttelt und das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer entfernt.

2.4.4 Bestimmung antioxidativer Eigenschaften von Pflanzenextrakten und Lignan-Standards

Alle Tests wurden in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt, die Messungen erfolgten im Mikrotiterplattenleser. Einzige Ausnahme bildete der XOD-Hemmtest. Dieser wurde in Quarzküvetten durchgeführt, die Messung erfolgte im Zweistrahlphotometer.

2.4.4.1 Bestimmung des Gesamtphenolgehaltes von Pflanzenextrakten nach Folin-Ciocalteu

Das Folin-Reagenz wurde nach der Vorschrift zur Herstellung von Molybdat-Wolframat-Reagenz R aus dem Europäischen Arzneibuch (6. Ausgabe) hergestellt. Vor der Anwendung wurde das Reagenz 1:6 mit Wasser verdünnt.

Da der jeweilige Phenolgehalt in Catechinäquivalenten angegeben wurde, wurde an jedem Testtag eine Eichreihe mit Catechin gemessen. Die wässrige Catechin-Lösung wurde in 8 Verdünnungsstufen von 0,005 mg/ml bis 0,1 mg/ml eingesetzt.

Alle methanolische Extrakte wurden 1:10 mit Wasser verdünnt, um Ausfällungen durch einen zu hohen Methanolanteil zu verhindern.

Von jeder Probe wurden drei Verdünnungsstufen hergestellt. Die Konzentration der Verdünnungen hing davon ab, wie stark die im Vorversuch ermittelte Absorption war.

Es wurden jeweils 40 µl Probe und 210 µl Na₂CO₃-Lösung in ein Well pipettiert und für 10 min bei 38° C inkubiert. Nach Zugabe von 50 µl Folin-Reagenz wurde noch einmal 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Absorption bei 690 nm gemessen.

Zur Ermittlung des Blindwertes wurde jeweils eine Reihe von Wells mit Wasser statt mit Probe versehen.

Berechnung des Gesamtphenolgehaltes:

Mit den Messwerten für die Catechinlösung wurde eine Kalibrierkurve erstellt.

Mit den Messreihen für die Extrakte wurde ebenfalls eine lineare Regression durchgeführt und der Schnittpunkt mit der Abszisse bestimmt. Der so ermittelte Wert entspricht der Grundabsorption des Extrakts und wurde von den einzelnen Messwerten abgezogen. Die korrigierten Werte wurden in die Kalibrierkurve für Catechin eingesetzt und so der theoretische Gehalt an Polyphenolen für die drei Extraktkonzentrationen ermittelt. Die Gehalte wurden auf eine Extraktkonzentration umgerechnet und der Mittelwert daraus gebildet.

2.4.4.2 Bestimmung von Radikalfängereigenschaften mit dem DPPH*-Test

Der Test wurde in Anlehnung an Aehle et al. (2004) durchgeführt und an den Mikrotiterplattenmaßstab angepasst.

Eine Stammlösung von 0,6 mM DPPH in MeOH wurde mindestens alle 4 Wochen frisch hergestellt und bei 4°C gelagert.

Für den Test wurde die Stammlösung 1:10 mit MeOH verdünnt.

Von jedem zu testenden Extrakt bzw. Lignanstandard wurden jeweils 8 Verdünnungsstufen in Methanol hergestellt.

Je 20 µl Probe wurden in ein Well pipettiert. Zur Ermittlung des Blindwertes wurde pro Platte je eine Reihe mit reinem Methanol versehen. Nachdem das Lösungsmittel MeOH verdunstet war, wurden je 300 µl DPPH-Lösung zugegeben.

Die so bestückte Mikrotiterplatte wurde zugedeckt und unter Lichtausschluss für 180 min inkubiert.

Nach Ablauf der 180 Minuten wurde die Absorption der Lösungen in den Wells bei 492 nm gemessen.

*2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl-Radikal

Berechnung der EC_{50} :

Für jede Probe wurden drei Einzelmessungen durchgeführt. Der Variationskoeffizient der Einzelwerte war dabei jeweils kleiner als 5%.

Aus dem Mittelwert der Absorptionen jeder Probe wurde die Effektivität E für die jeweilige Verdünnungsstufe berechnet:

$$E = \left[1 - \left(\frac{A_{t180}}{A_{0t180}} \right) \right] * 100$$

A_{t180} = Messwert Probe nach 180 min

A_{0t180} = Messwert Blindprobe nach 180 min

Die so berechnete Effektivität wurde gegen die jeweilige Konzentration aufgetragen. Mit Hilfe des Programms Sigma Plot wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt. Für das Fitting wurde eine Sättigungskurve (Exponential rise to maximum) verwendet. Aus der Kurve wurde die halbeffektive Konzentration EC_{50} berechnet.

2.4.4.3 Bestimmung des Eisenreduktionspotentials mit dem FRAP*-Test

Das FRAP-Reagenz wurde für jede Messung frisch hergestellt. Hierzu wurden je 25 ml Acetat-Puffer (300 mM, pH 3,6), 2,5 ml TPTZ(2,3,6-Tripyridyl-s-triazin)-Lsg. (10 mM in 40 mM HCl) und 2,5 ml $FeCl_3$ -Lsg (20 mM in Wasser) gemischt. Von dieser Mischung wurden je 265 μ l pro Well vorgelegt und die Platte für 5 Minuten bei 37°C inkubiert. Danach wurde jeweils 35 μ l der methanolischen Probe in 8 Verdünnungsstufen zugegeben. Nach weiteren 5 Minuten Inkubation bei 37°C wurde die Absorption bei 620 nm gemessen.

Als Referenz für die Bestimmung des molaren Fe(III)-Umsatzes diente eine Fe(II)-Lösung, die in 8 Verdünnungsstufen vorlag. Die Konzentration im Reaktionsgemisch betrug $5,8 \cdot 10^{-7}$ M – $4,7 \cdot 10^{-5}$ M. Die Verdünnungen wurden an jedem Messtag getestet.

Mit den Messwerten aus dieser Fe(II)-Verdünnungsreihe wurde eine Eichkurve erstellt. Als Berechnungsgrundlage für die Effektive Konzentration der getesteten Extrakt und Standards diente die Absorption, die aus einer Fe(II)-Konzentration von

* Ferric Reducing Ability of Plasma

$2 \cdot 10^{-5} \text{ M}$ resultierte. Diese Konzentration wurde gewählt, weil sie einer Absorption entsprach, die auch von wenig aktiven Extrakten erreicht wurde.

Für die lineare Regression zur Berechnung der $\text{EC}_{2 \cdot 10^{-5} \text{ M Fe}}$ der Lignanstandards und der Extrakte wurden jeweils Mittelwerte aus drei Einzelbestimmungen verwendet. Der Variationskoeffizient der Einzelwerte war jeweils kleiner als 5%.

2.4.4.4 Bestimmung der Fähigkeit zum Inaktivieren des Superoxid-Radikals mit dem XOD*-Test

Für jede Messung wurde die Reagenzien-Vormischung frisch hergestellt. Hierzu wurden 19,4 ml Na-Phosphatpuffer (50 mM, pH 7,8), 1,0 ml EDTA-Lsg (3 mM in Phosphatpuffer), 1,0 ml NBT-Lsg (0,6mM in Phosphatpuffer) und 3,3 ml Xanthin-Lsg (0,9 mM in 50 mM NaOH) gemischt.

Alle Proben wurden in DMSO gelöst und verdünnt.

Pro Well wurden je 20 μl Probe vorgelegt und 240 μl der Reagenzienvormischung zugegeben. Zur Bestimmung des Blindwerts wurde eine Reihe mit reinem DMSO versehen.

Die Absorption der Lösungen in den Wells wurde bei 540 nm gemessen (A_1).

Danach wurden je 20 μl XOD(Xanthinoxidase)-Lösung (0,16 U/ml Phosphatpuffer) dazupipettiert. Die Platten wurden für 15 Minuten bei 30°C inkubiert. Danach wurde noch einmal die Absorption gemessen (A_2).

Als Kontrolle wurde eine Messung mit Catechinlösung in 8 Verdünnungsstufen ($2,4 \cdot 10^{-6} - 5,9 \cdot 10^{-5} \text{ M}$) durchgeführt.

Aus der Absorption jeder Probe (Mittelwert aus drei Messwerten) wurde die Effektivität E für die jeweilige Verdünnungsstufe berechnet:

$$E(\%) = 100 - \left[\frac{A_2 - A_1}{A_{02} - A_{01}} \right] * 100$$

A_1 und A_2 : Messwerte vor bzw. nach Zugabe des Enzyms

A_{01} und A_{02} : Messwert der Blindprobe vor bzw. nach Zugabe des Enzyms

Mit Hilfe des Programms Sigma Plot wurde eine Regression durchgeführt (Sättigungskurve, Exponential rise to maximum) und die halbeffektive Konzentration berechnet.

* Xanthinoxidase

2.4.4.5 Xanthinoxidase-Hemmtest

Die Lösungen von Xanthin und EDTA sowie des Na-Phosphatpuffers wurden in denselben Konzentrationen eingesetzt, wie im XOD-Test. Die Xanthinoxidase-Lösung wurde mit Na-Phosphatpuffer auf 0,76 U/ml verdünnt.

Der Test wurde in Quarzküvetten durchgeführt und die Absorptionsänderung mit einem Zweistrahlphotometer gemessen.

Zu 48 µl Probe wurden je 470 µl Na-Phosphatpuffer, 25 µl EDTA-Lösung und 148 µl Xanthinlösung gegeben und gemischt. Nach Zugabe von 12 µl XOD-Lösung wurde erneut gemischt und die Absorptionsänderung dA bei 293 nm (Wellenlänge entspricht einem Absorptionmaximum von Harnsäure) für 90 s gemessen.

Berechnung der Hemmung:

$$I(\%) = \frac{(1 - dA)}{dA_0}$$

dA : Absorptionsänderung mit Inhibitor

dA_0 : Absorptionsänderung ohne Inhibitor

2.4.5 YES-Assay

2.4.5.1 Anzucht der Hefe-Kulturen und Nährmedien

- *Minimalmedium, pH 7,1*

Zur Herstellung von Minimalmedium wurden folgende Bestandteile in 1,0 l Wasser gelöst:

○ 13,61 g	KH ₂ PO ₄	○ 20 mg	L-Arginin-HCl
○ 1,98 g	(NH ₄)SO ₄	○ 20 mg	L-Methionin
○ 4,2 g	KOH	○ 30 mg	L-Tyrosin
○ 0,2 g	MgSO ₄	○ 30 mg	L-Isoleucin
○ 1,0 ml	Fe ₂ (SO ₄) ₃ -Lösung	○ 30 mg	Lysin-HCl
○ (40 mg/50 ml H ₂ O)		○ 25 mg	L-Phenylalanin
○ 50 mg	Leucin	○ 100 mg	L-Glutaminsäure
○ 50 mg	L-Histidin	○ 150 mg	L-Valin
○ 50 mg	Adenin	○ 375 mg	L-Serin

Das Minimalmedium wurde in Portionen á 45 ml in 100-ml Erlenmeyer-Kolben abgefüllt und autoklaviert (121°C, 10 min).

- *Zusätzliche Lösungen für die Herstellung des Versuchsmedium*
 - D-(+)-Glucoselösung , 200 g/l
 - L-Asparaginsäure-Lösung , 4 g/l
 - L-Threonin-Lösung, 24 g/l

} Die Lösungen wurden in Portionen á 20 ml, bzw. für Threoninlösung á 10 ml, abgefüllt und autoklaviert.

 - Kupfer(II)Sulfat-Lösung, 3,2 g/l
 - Vitamin-Lösung aus
 - 8 mg Thiamin
 - 8 mg Pyridoxin
 - 8 mg Pantothensäure
 - 40 mg Inositol
 - 20 ml Biotin-Lösung, 20 mg/l
 - 180 ml Aqua bidest
 - CPRG^{*}-Lösung, 5 g/l → Die Lösung wurde in sterilisiertem Wasser hergestellt und in Portionen á 1 ml abgefüllt.

Das Minimalmedium wurde bei Raumtemperatur gelagert. Von allen anderen Lösungen wurde je eine Portion im Kühlschrank bei 4°, ein Vorrat bei -20° C gelagert. 1 ml CPRG-Lösung wurde an jedem Versuchstag frisch aufgetaut.

- *Wachstumsmedium*

Für das Wachstumsmedium wurden zu 45 ml Minimalmedium im sterilen Erlenmeyer-Kolben folgende Lösungen zugegeben:

- 5 ml Glucose-Lösung
- 1,25 ml L-Asparaginsäure-Lösung
- 0,5 ml Vitamin-Lösung
- 0,4 ml L-Threonin-Lösung
- 125 µl Kupfersulfat-Lösung

* Chlorphenolrot-β-Galaktosid

- *Vorkultur*

Das Wachstumsmedium wurde mit 250 µl einer frisch aufgetauten Hefekultur angeimpft und im Schüttelinkubator bei 28°C und einer Geschwindigkeit von 250 rpm für 24 – 48 h bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 1 inkubiert.

- *Hefekulturen*

Ein Vorrat an Hefekulturen wurde bei -80°C gelagert. Für die Herstellung wurde eine Vorkultur mit einer optischen Dichte von 1 für 10 min bei 4°C und 2000 g zentrifugiert.

Das Pellet wurde in Minimalmedium mit 8% Glycerol resuspendiert und zu je 1 ml portioniert. Vor dem Einfrieren wurden die Kulturen mit flüssigem Stickstoff schockgefroren.

- *Versuchsmedium*

Eine Portion frisches Wachstumsmedium wurde mit 2 ml Vorkultur inokuliert und mit 1 ml CPRG-Lösung versetzt.

2.4.5.2 Durchführung des YES-Assays

Mit den zu testenden Substanzen wurden Verdünnungsreihen mit je 11 Verdünnungsstufen und einer Blindlösung aus reinem Methanol hergestellt.

Pro Well wurden 10 µl Verdünnung in eine 96-Well-Platte pipettiert. Die Platten wurden im sterilen Luftstrom der Laminar-Flow-Box getrocknet.

Danach wurde in jedes Well 200 µl Versuchsmedium gegeben.

Die Platten wurden mit autoklavierter Alufolie abgedeckt und mit Parafilm versiegelt.

Anschließend wurden sie im Mikrotiterplattenleser für 5 min auf höchster Stufe geschüttelt.

Die Platten wurden 3 Tage bei 32°C inkubiert und jeden Tag einmal für 5 min geschüttelt.

Am dritten Tag wurde nach dem Schütteln zur besseren Vermengung das Medium in jedem Well 3 x mit der 8-Kanal-Pipette aufgezogen und wieder abgelassen.

Dann wurde die Absorption bei 540 und die optische Dichte bei 620 nm gemessen.

Die verwendeten Konzentration an E₂ im Reaktionsgemisch betragen $1,7 \cdot 10^{-9}$ - $1,1 \cdot 10^{-12}$ M.

Für die Ermittlung des Blindwertes wurde an jedem Messtag eine Reihe Wells ohne Testsubstanz gemessen.

Für die Messung der inhibitorischen Aktivität von Phytoestrogenen wurde zu jeder zu messenden Verdünnung zusätzlich E_2 entsprechend einer Konzentration von $2,2 \cdot 10^{-10}$ mM im Reaktionsgemisch zugegeben. Die Messung wurde wie beim Test auf estrogenen Aktivität durchgeführt.

Berechnung der estrogenen Aktivität

Für die Berechnung wurde zunächst für jeden Messwert die Differenz aus der Absorption bei 540 nm und der optischen Dichte bei 620 nm gebildet. Von diesem Wert wurde der Blindwert abgezogen. Die so ermittelten Werte wurden halblogarithmisch gegen die jeweils verwendeten Konzentrationen der Testsubstanzen aufgetragen, wobei eine sigmoide Kurve entstand. Die gemessene Gesamtaktivität zwischen den Messtagen wies eine gewisse Schwankung auf. Deshalb wurde für die Berechnung der Aktivitäten Verdünnung Nr. 2 der Estradiol-Verdünnungsreihe als fester Referenzpunkt gewählt. Diese Verdünnung entsprach einer Konzentration von $2,2 \cdot 10^{-10}$ M Estradiol im Reaktionsgemisch und zeigte die jeweils höchste Aktivität von allen Estradiol-Verdünnungen (Abbildung 10).

Eine Probe mit dieser Estradiol-Konzentration wurde an jedem Messtag als Referenz gemessen und die entsprechende Absorption als 100% gesetzt. Alle weiteren Messwerte wurden entsprechend in % Aktivität umgerechnet.

Mit Hilfe des Programms Sigma Plot wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt (Regression: Ligand Binding, 4 Parameter Logistic).

Die estrogenen Aktivität wurde als EC_{50} ausgedrückt, d.h. als Konzentration, die erforderlich ist für Erreichung einer estrogenen Aktivität von 50 %, bezogen auf den Referenzpunkt. Die EC_{50} -Werte für die Standardsubstanzen wurden jeweils aus mehreren Messreihe (mindestens 4) ermittelt und daraus ein Mittelwert gebildet.

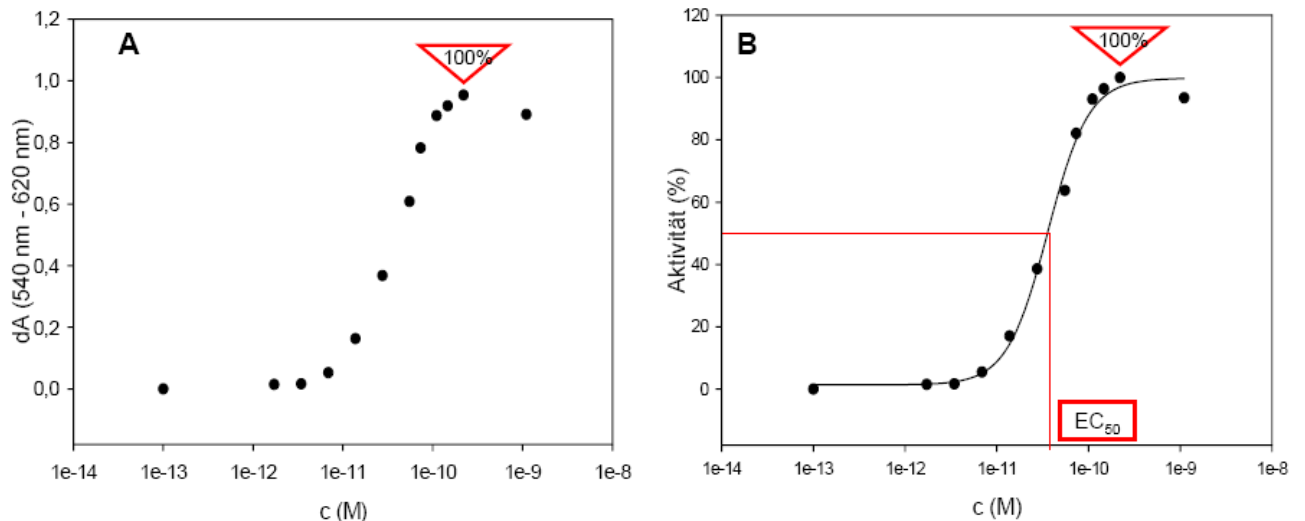


Abbildung 10 A Halblogarithmische Auftragung der Absorptiondifferenz dA gegen c Estradiol, die dA bei $c=2,2 \cdot 10^{-10}$ M wird als 100% Aktivität definiert B halblogarithmische Auftragung der estrogenen Aktivität in % gegen c Estradiol und Berechnung der EC_{50}

Berechnung der inhibitorischen Aktivität

Für die Berechnung der inhibitorischen Aktivität von Substanzen mit einem hemmenden Effekt auf das Testsystem wurde ebenfalls die estrogenen Aktivität halblogarithmisch gegen die getestete Konzentration aufgetragen.

Mit dem Programm Sigma Plot wurde eine Regressionsanalyse durchgeführt (Ligand Binding one site competition) und die IC_{50} berechnet, d.h. die Konzentration, die die estrogenen Aktivität der zugesetzten Estradiolkonzentration auf 50% reduziert.

Einfluss der Testsubstanzen auf das Hefewachstum

Zu jedem Versuch wurde ein Parallelansatz ohne das chromogene Substrat CPRG getestet. Die Messung erfolgte in diesen Fällen nur bei einer Wellenlänge von 620 nm.

2.4.5.3 β -Galaktosidase-Hemmtest

Der Test wurde in 96-Well-Mikrotiterplatten durchgeführt

Die Testsubstanzen waren in Methanol gelöst. In jedes Well wurden 10 μ l Lösung pipettiert. Nachdem der Methanol verdunstet war, wurden je 200 μ l Na-Phosphatpuffer, 100 mM, pH 7,3, zugegeben.

Um die Testsubstanzen zu lösen, wurde 1 h bei 37°C im Mikrotiterplattenleser inkubiert und alle 5 min für 2 min bei höchster Stufe geschüttelt.

Dann wurde zu jedem Well 80 μ l der in Tab.1 aufgeführten Enzym-Vormischung zugegeben. Für die Messung des Blindwerts wurde die Vormischung ohne Enzymzugabe hergestellt.

Tabelle 5 Vormischungen für β -Galaktosidase-Hemmtest und Konzentrationen im Reaktionsgemisch

Reagenz	μl in Vormischung	μl in Vormischung Blindwert	Konzentration Reaktionsgemisch
Na-Phosphatpuffer 100 mM, pH 7,3	3300	1320	~ 100 mM
MgCl ₂ -Lsg. 30 mM	660	220	1,0 mM
Mercaptoethanol-Lsg. 3,4 M	660	220	113,3 mM
β -Galaktosidase in Na-Phosphatpuffer, 0,8 U/ml	660	-	0,027U/ml → 450 picocat
ONP- β -D-Galaktosid- Lösung 34 mM	-	-	2,3 mM

Nach Zugabe der Vormischung zu den Wells wurde die Platte für 4 min bei 37°C vorinkubiert, dann wurden 20 μl 34 mM o-Nitrophenyl- β -D-Galaktosid-Lösung zugegeben.

Die Messung erfolgte jede Minute bei 37°C und einer Wellenlänge von 414 nm über 20 min.

Berechnung der Hemmung

Vor der Berechnung wurden alle Messwerte um den Blindwert, d. h. Messung ohne Enzymzugabe, korrigiert.

Als Berechnungsgrundlage dienten die Mittelwerte der Absorptionsänderungen zwischen $t=15$ min und $t=20$ min, weil der Kurvenverlauf der Absorption in diesem Bereich linear war.

$$A(\%) = \frac{dA_{t15\text{min}-t20\text{min}}}{dA_{0t15\text{min}-t20\text{min}}} * 100$$

$A(\%) = \% \text{ Aktivität}$

$dA_{t15\text{min} - t20\text{min}}$ = durchschnittliche Absorptionsänderung zwischen der 15. und 20. Minute

$dA_{0t15\text{min} - t20\text{min}}$ = durchschnittliche Absorptionsänderung der Kontrolle ohne Hemmstoff zwischen der 15. und 20. Minute.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Stereochemische Untersuchungen von Matairesinol aus *Carthamus tinctorius*

Ziel der Untersuchungen war es, die absolute Konfiguration von Matairesinol aus dem Kraut und aus den Früchten von *C. tinctorius* zu vergleichen. Dazu mussten zunächst ausreichende Mengen an Matairesinol aus beiden Geweben isoliert und dann eine Methode zur Enantiomertrennung entwickelt werden.

3.1.1 Isolierung von Matairesinol aus Kraut und Früchten von *Carthamus tinctorius* (Akzession CT014JE03)

3.1.1.1 Hydrolysemethode

Aufgrund des geringen Matairesinolgehalts im Kraut und zur Maximierung der Ausbeute an Matairesinol aus den Früchten von *C. tinctorius* stellte sich zunächst die Frage, wie das Aglykon möglichst quantitativ aus dem Glykosid freigesetzt werden konnte. Hierfür wurden Untersuchungen zu verschiedenen Hydrolysebedingungen durchgeführt. Da nur eine begrenzte Menge an getrockneten, pulverisierten Stängeln für die Aufarbeitung zur Verfügung stand, wurden diese Tests ausschließlich mit den getrockneten Früchten durchgeführt.

Neben einer sauren Hydrolyse mit 1 M HCl sollte eine enzymatische Hydrolysemethode getestet werden. Milder et al. (2004) hatten vier verschiedene Enzyme auf ihre Fähigkeit zur Hydrolyse von Lignanglykosiden untersucht. Dabei wurde die höchste Ausbeute mit einer Glucuronidase/Sulfatase aus *Helix pomatia* erzielt. Dieses Enzym wurde auch im hier beschriebenen Experiment verwendet und die Bedingungen aus der Arbeit von Milder et al. übernommen. Zusätzlich wurde der Einfluss einer höheren Enzymkonzentration sowie einer Verlängerung der Inkubationszeit untersucht.

Des Weiteren wurde der Einfluss einer basischen Hydrolyse mit NaOH vor der enzymatischen bzw. sauren Hydrolyse untersucht. In der Arbeit von Milder et al. war die basischen Hydrolyse primär für Freisetzung von Secoisolariciresinoldiglycosid eingesetzt worden, welches in Leinsamen in oligomerer Form, gebunden an 3-Hydroxy-3-methylglutarsäure, vorliegt. Dabei hatte sich herausgestellt, dass sich

diese Vorbehandlung, abhängig von Art und Gewebe, auch positiv auf die Freisetzung anderer Lignane auswirkte.

Die Hydrolyseversuche wurden entsprechend dem Schema in Abbildung 11 durchgeführt. Ein Teil des Extrakts wurde vor der Hydrolyse abgenommen, um auch nicht glycosidiertes Matairesinol zu erfassen. Alle Proben wurden danach mit HPLC auf ihren Matairesinolgehalt hin untersucht.

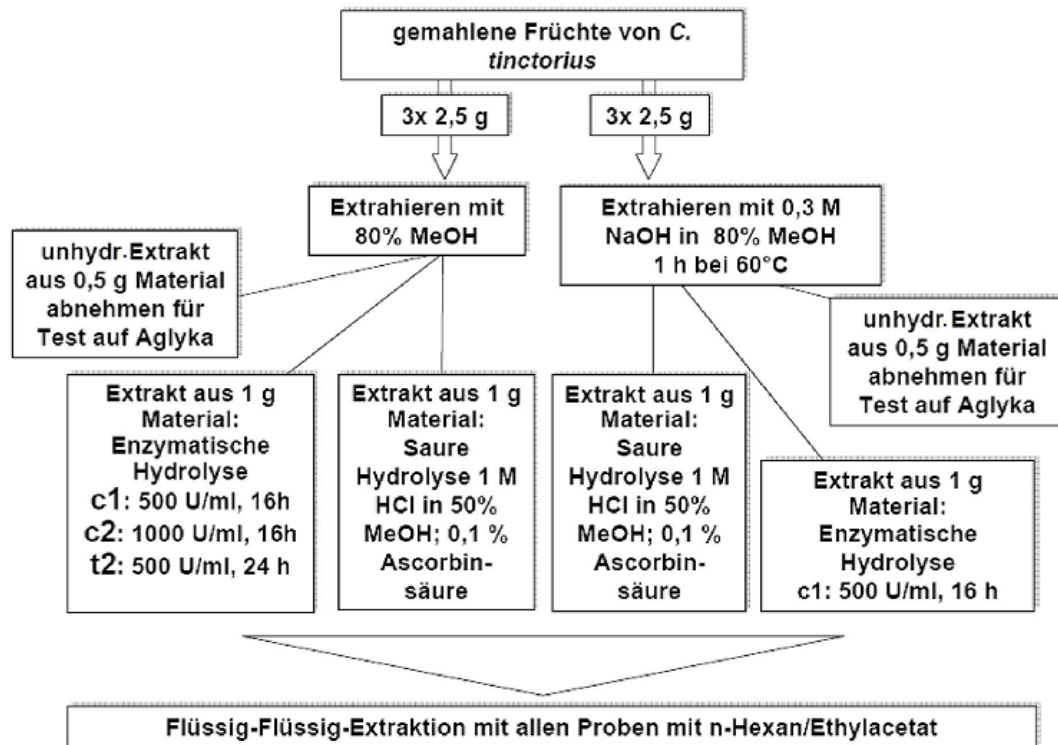


Abbildung 11

Schematische Darstellung der Hydrolyseexperimente für eine maximale Matairesinolausbeute

Wie aus Abbildung 12 ersichtlich ist, wirkte sich die Vorbehandlung mit NaOH in allen getesteten Fällen negativ auf die Ausbeute aus. Auch ein Zusatz von 0,1 % Ascorbinsäure zur Verhinderung von oxidativem Abbau des Matairesinols brachte keine Verbesserung.

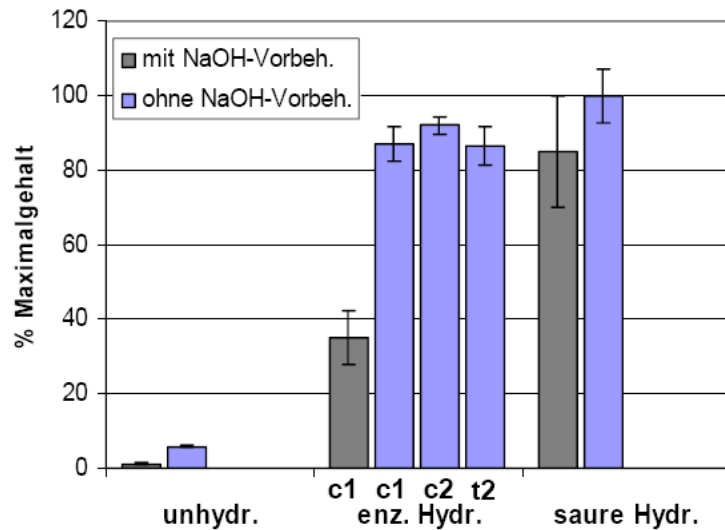


Abbildung 12

Matairesinolausbeuten aus Extrakt aus den Früchten von *C. tinctorius* bei verschiedenen Hydrolysebedingungen, Angabe in % von maximal erzielter Ausbeute

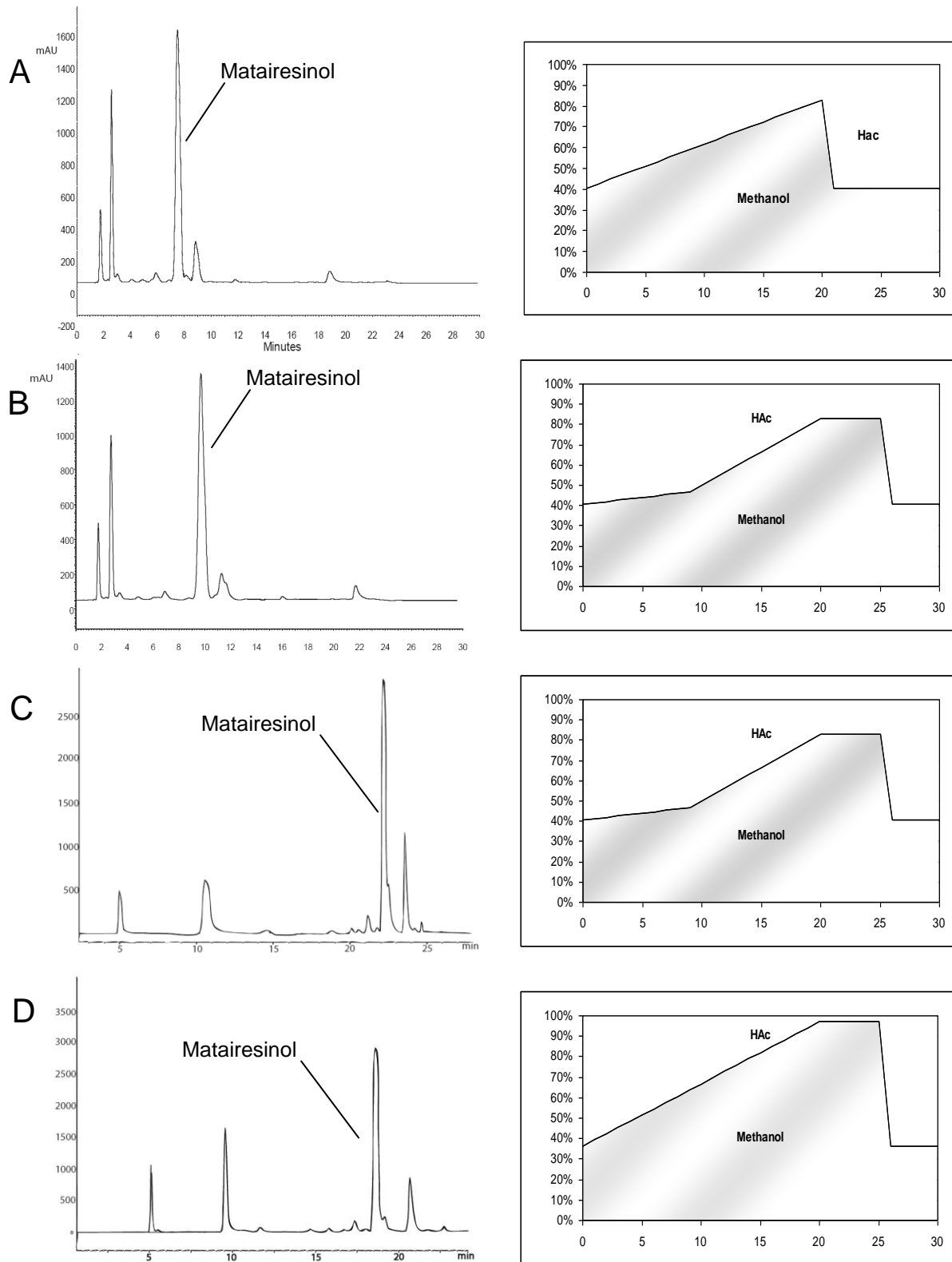
Die enzymatische Hydrolyse führte zu einer etwas geringeren Ausbeute als die saure Hydrolyse. Eine Verdoppelung der Enzymkonzentration (c2) und eine Verlängerung der Inkubationszeit von 16 auf 24 h (t2) brachten keine signifikante Verbesserung. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden alle Extrakte im Folgenden sauer hydrolysiert.

3.1.1.2 Isolierung von Matairesinol aus Früchten von *Carthamus tinctorius*

Der Extrakt aus 25 g Früchten von *C. tinctorius* wurde hydrolysiert und über eine Kieselgelsäule fraktioniert. Bei einem Gehalt von 0,21% Matairesinol nach Hydrolyse, dies entspricht 53 mg, wurden nach der Aufreinigung auf der Kieselgelsäule 29 mg Matairesinol wieder gefunden.

Für eine weitere Aufreinigung wurde der Extrakt mit der präparativen HPLC gereinigt. Dafür wurde zunächst die bisher verwendete HPLC-Methode auf der analytischen HPLC modifiziert, um eine möglichst vollständige Abtrennung des Matairesinols von Verunreinigungen zu erzielen. Diese Methode musste nach einem ersten Testlauf auf der präparativen HPLC weiter angepasst werden (Abbildung 13).

Die Fraktionen wurden gepoolt und der Gehalt per HPLC und CE bestimmt (s. Kapitel 3.1.3.2)

**Abbildung 13**

Optimierung des HPLC-Gradienten für die präparative HPLC, A analytische Methode auf analytischer HPLC; B modifizierte Methode zur kompletten Isolierung des Matairesinolpeaks auf analytischer HPLC; C Anwendung von Methode B auf Präparativer HPLC; D weiter optimierte Methode auf präparativer HPLC

Die Identität von Matairesinol wurde mit GC/MS bestätigt (Abbildung 14). Das Chromatogramm wies nur einen geringen Anteil an Verunreinigungen auf. Die Retentionszeit stimmte mit der des Standards überein. Das Massenspektrum des Hauptpeaks zeigte die für Matairesinol charakteristischen Fragmente bei 179, 209 und 502, die sowohl mit der Fragmentierung des Standards als auch mit den Angaben in der Literatur (Sicilia et al., 2003) übereinstimmten.

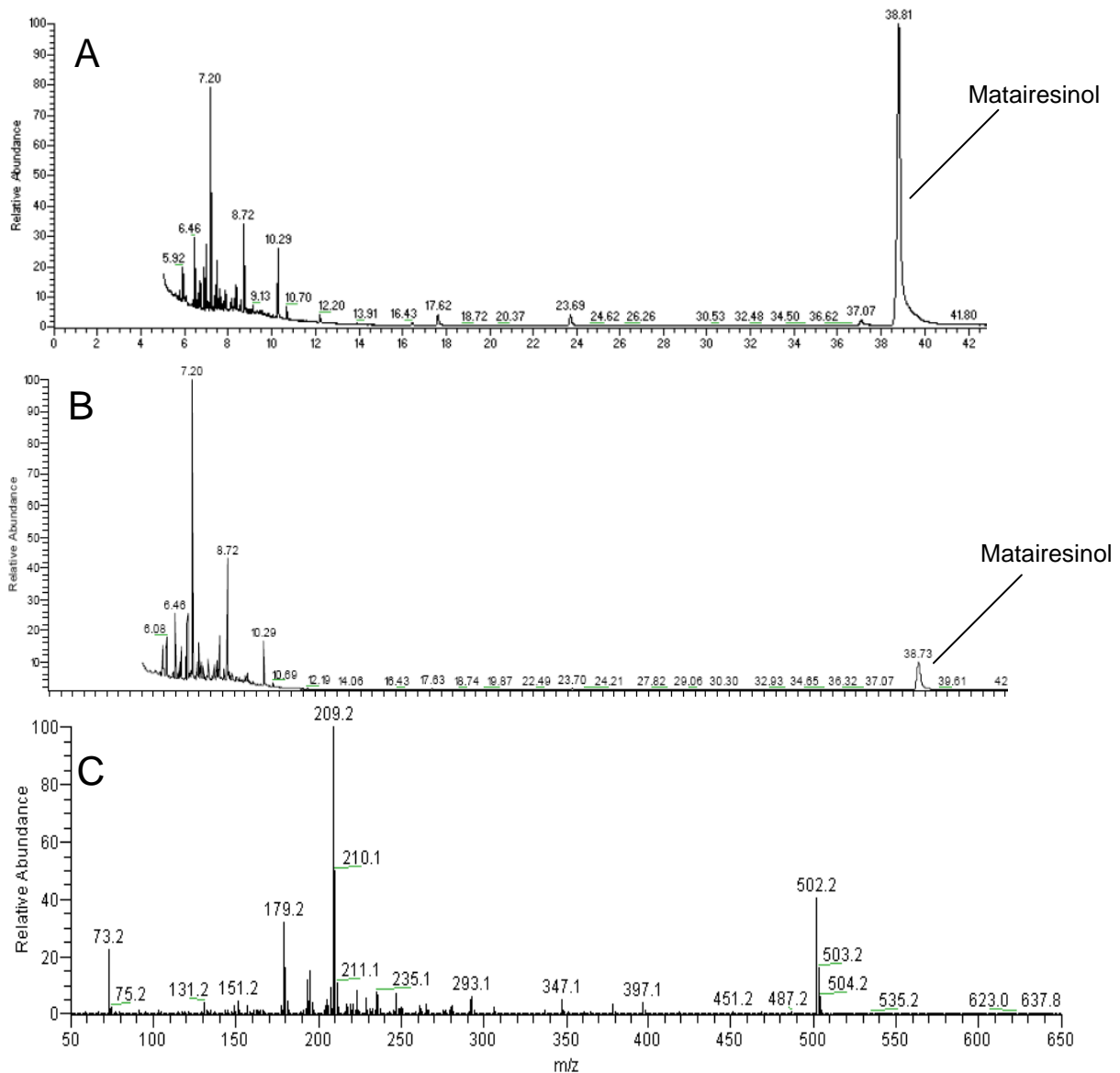


Abbildung 14

GC-Chromatogramme (TIC) von isoliertem Matairesinol aus den Früchten von *C. tinctorius* (A) und Matairesinol-Standard (B), Massenspektrum von isoliertem Matairesinol (C)

3.1.1.3 Isolierung von Matairesinol aus getrockneten Stängeln von *Carthamus tinctorius*

Für die Isolierung von Matairesinol aus den getrockneten Stängeln von *C. tinctorius* wurde zunächst 100 g pulverisiertes Pflanzenmaterial (entspricht 500 g Frischmasse) extrahiert. Nach Entfernung von Chlorophyll durch Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Chloroform wurde der verbleibende wässrige Rest sauer hydrolysiert.

Das Hydrolysat wurde über eine Kieselgelsäule aufgereinigt. Die Fraktionen wurden, wie bei der Aufreinigung des Hydrolysats aus Früchten, mit DC auf Matairesinol überprüft. Aufgrund des geringen Gehaltes war es hier jedoch nicht möglich, Matairesinol durch DC nachzuweisen. Die Vorauswahl der relevanten Fraktionen erfolgte deshalb aufgrund von Begleitstoffen mit einer ähnlichen Polarität und somit einem ähnlichen R_f-Wert wie Matairesinol (Abbildung 15). Eine Bestätigung erfolgte über HPLC.



Abbildung 15 DC mit Fraktionen 1 – 14 der Kieselgel-Aufreinigung; eingekreist Fraktionen mit ähnlicher Polarität wie Matairesinol, auf Pos. 15 Matairesinolstandard

Größere in der Fraktion vorhandene Anteile an polaren Verunreinigungen wurden mit SPE abgetrennt (Abbildung 16). Die Proben wurden dafür in methanolischer Essigsäure auf RP18-Material aufgebracht, die Elution erfolgte mit reinem Methanol. Aus dem Chromatogramm ist ersichtlich, dass der Matairesinolanteil sehr gering war. Die über HPLC errechnete Gesamtausbeute lag bei ca. 0,5 mg unter der

Voraussetzung des Vorliegens eines reinen Matairesinolpeaks. Massenspektrometrisch konnte Matairesinol im aufgereinigten Extrakt identifiziert werden. Allerdings war der Gehalt so gering, dass von weiteren Untersuchungen abgesehen wurde.

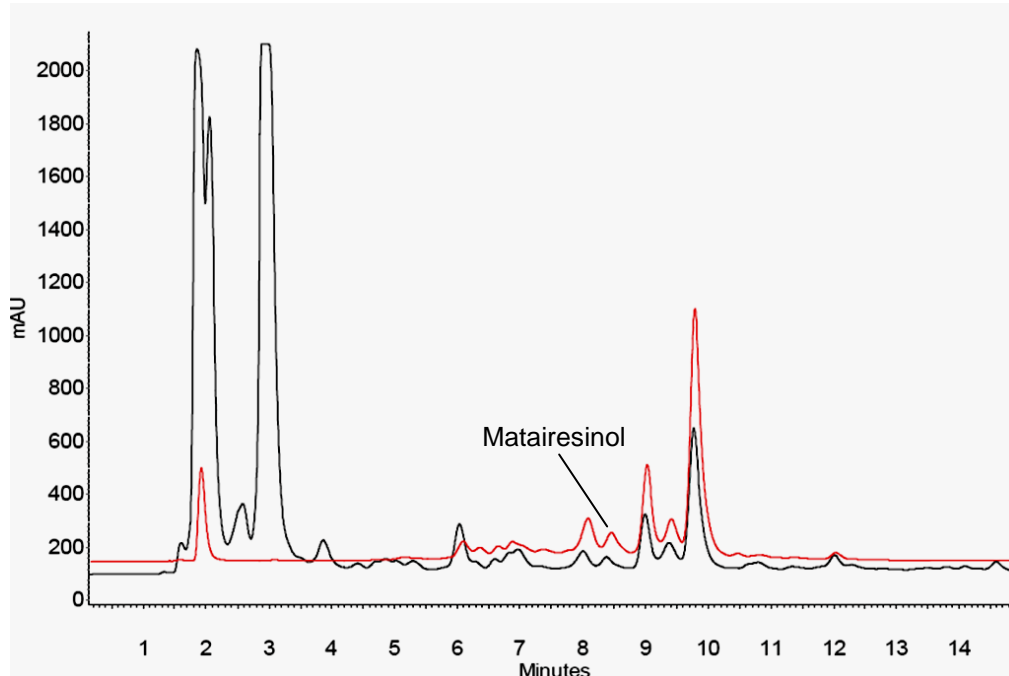


Abbildung 16 Übereinandergelegte HPLC-Chromatogramme von matairesinolhaltiger Fraktion nach Aufreinigung über Kieselgelsäule (schwarz) und nach weiterer Aufreinigung über SPE (rot)

Um einen Verlust von nicht-glycosidiertem Matairesinol durch das Ausschütteln mit Chloroform zu vermeiden, wurde in einem weiteren Aufreinigungsversuch die Abtrennung von Chlorophyll auf eine andere Weise vorgenommen.

Zunächst wurde ein Extrakt aus 200 g getrockneten Stängeln hergestellt (entspricht 1 kg Frischmasse). Dieser Extrakt wurde sowohl vor als auch nach Hydrolyse mit n-Hexan/Ethylacetat 1:1 extrahiert, um auch bereits als Aglykon vorliegendes Matairesinol mitzuerfassen. Beim Extrahieren des Rohextrakts mit organischem Lösungsmittel ging auch ein Großteil des im Extrakt vorhandenen Chlorophylls in die organische Phase über. Um eine Abtrennung des Chlorophylls von Matairesinol auf der Kieselgelsäule zu erreichen, wurden in einem Vorversuch verschiedene Fließmittel getestet.

Bisherige Aufreinigungen auf Kieselgel waren mit Methanol/Chloroform 1:10 durchgeführt worden. Willför et al. (2005) verwendeten für die Aufreinigung von Lignanen auf einer Kieselgelsäule Dichlormethan mit einem ansteigenden Anteil von Ethanol.

Ein chlorophyllhaltiger Testextrakt aus dem Kraut von *C. tinctorius* wurde zusammen mit Matairesinol auf DC-Platten aufgetragen und mit 4 verschiedenen Laufmitteln entwickelt (Abbildung 17).

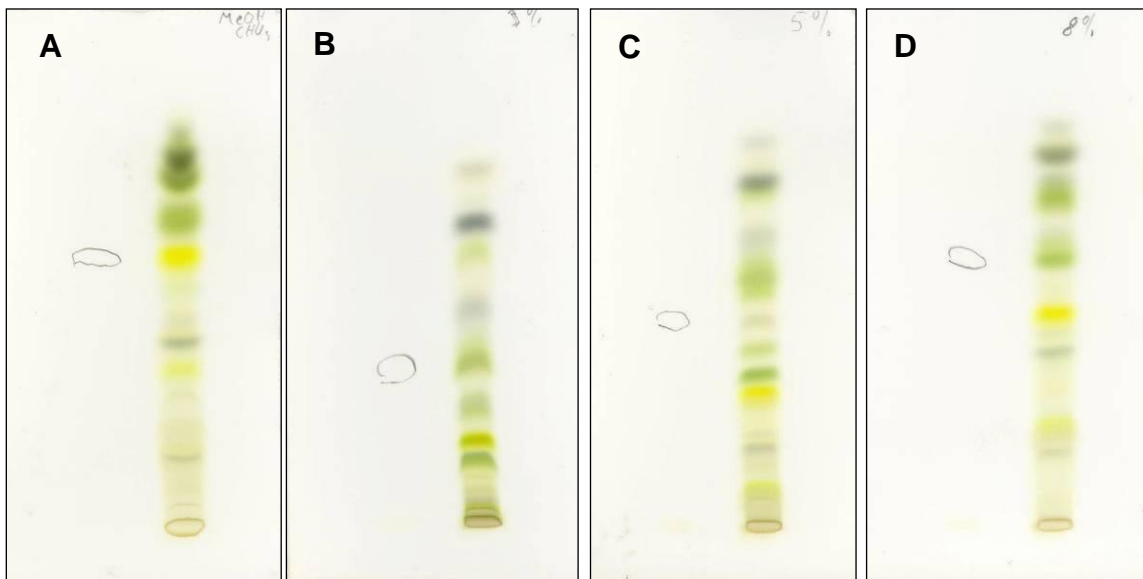


Abbildung 17 DC Matairesinol (jeweils links) und chlorophyllhaltigem Testextrakt aus *C. tinctorius*, entwickelt mit Methanol/Chloroform 1:10 (A), Dichlormethan mit 3% EtOH (B), 5% EtOH (C) und 8% EtOH (D)

Die DC-Ergebnisse ließen auf ein gutes Trennergebnis schließen bei Verwendung von Dichlormethan mit 5% Ethanol zu Beginn der Säulenchromatographie für eine Abtrennung des Chlorophylls und danach 8% Ethanol für eine schnelle Elution des Matairesinols. Diese Mischungen wurden im Folgenden für die Säulenchromatographie verwendet.

Der hydrolysierte und der unhydrolysierte Extrakt wurden über eine Kieselgelsäule fraktioniert. Die Fraktionen wurden mit DC und HPLC auf das Vorhandensein von Matairesinol überprüft.

Einige der relevanten Fraktionen aus dem unhydrolysierten Extrakt enthielten nach der Säulenchromatographie noch Reste von Chlorophyll. Um eine Kontamination der HPLC-Säule zu vermeiden, wurde das Chlorophyll mit SPE abgetrennt. Die Fraktionen wurden hierfür in 80% Methanol gelöst, über eine Festphasen-Kartusche mit RP18-Material gegeben und mit 80% Methanol eluiert. Matairesinol bindet unter diesen Bedingungen nicht an das Material, Chlorophyll bleibt auf der Kartusche zurück.

Im hydrolysierten Extrakt konnte mit HPLC kein Matairesinol nachgewiesen werden. Im unhydrolysierten Extrakt eluierte eine Substanz, die hinsichtlich ihres UV-Spektrums und Retentionszeit dem Matairesinol entsprach (Abbildung 18).

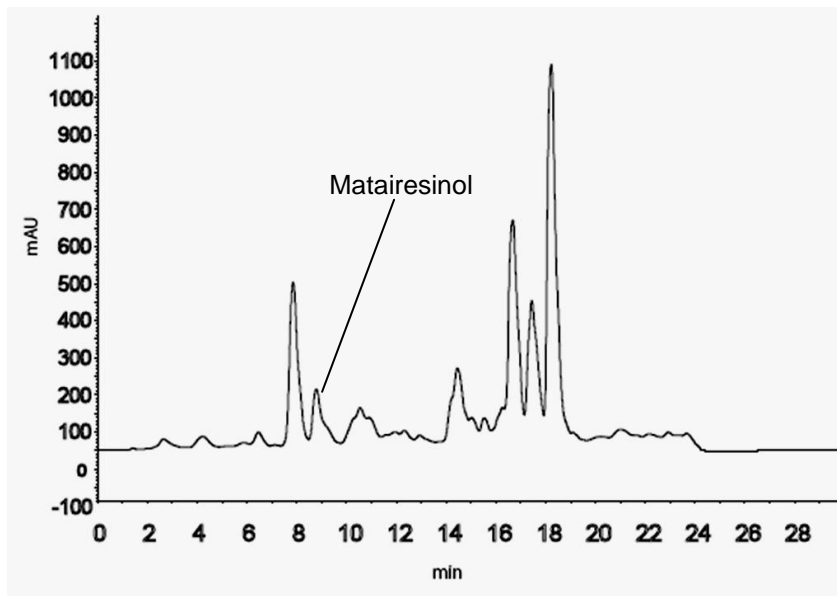


Abbildung 18 Matairesinolhaltige Fraktion unhydrolysierten Extrakt aus *C. tinctorius* nach Aufreinigung über Kieselgelsäule

Zur weiteren Aufreinigung wurden die relevanten Fraktionen gepoolt und mit präparativer HPLC gereinigt. Die matairesinolhaltigen Fraktionen wurden gesammelt und erneut mit der analytischen HPLC analysiert (Abbildung 19).

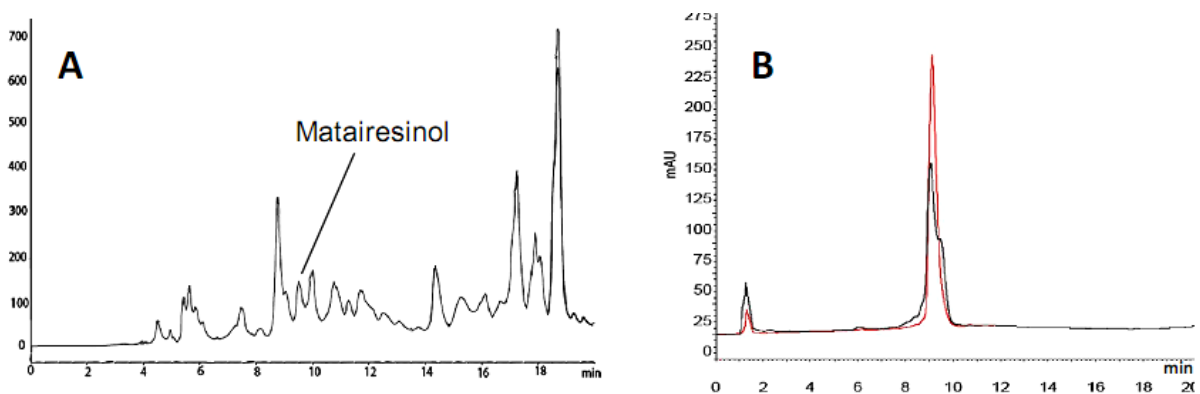


Abbildung 19 Präparative HPLC mit matairesinolhaltiger Fraktion (A) und Chromatogramm aus analytischer HPLC mit den gesammelten Fraktionen (B) einmal unter Zugabe von Matairesinol (rot)

Es zeigte sich, dass die Abtrennung des nachfolgenden Peaks zum großen Teil, aber nicht vollständig gelungen war. Bei Zugabe von Matairesinol zu der Probe vergrößerte sich der Peak. Unter der Annahme, dass es sich um einen reinen

Matairesinol-Peak handelte, betrug die theoretische Gesamtausbeute aus 200 g getrocknetem Material ca. 0,3 mg.

Zur Bestätigung der Identität von Matairesinol wurde ein Teil der mit präparativer HPLC gereinigten Fraktion mit GC-MS untersucht.

Das GC-Chromatogramm zeigte einen großen und einen kleinen Peak, wobei der kleinere Peak hinsichtlich seiner Retentionszeit und Massenspektrum dem Matairesinol entsprach (Abbildung 20).

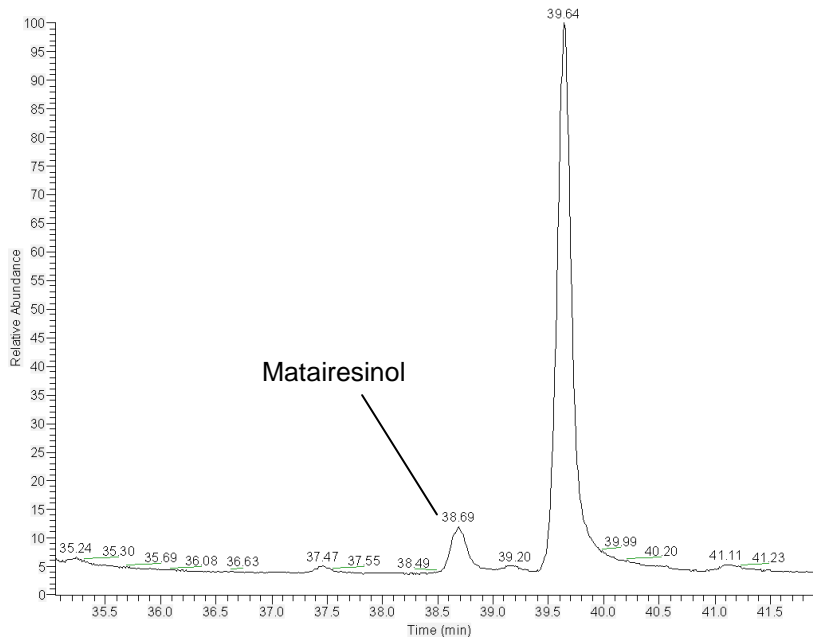


Abbildung 20 Gas-Chromatogramm von aufgereinigtem Extrakt aus dem Kraut von *C. tinctorius*

Der Hauptpeak im Chromatogramm bei 39,6 min konnte keiner bekannten Substanz zugeordnet werden. Aufgrund des Fragmentierungsmuster sind zwei Strukturen (Abbildung 21) denkbar mit einem Massenpeak von 557,2 ($M-H$)⁺ und dem entsprechenden demethylierten Fragment von 543,1 ($M-Me$)⁺. Dies müsste aber durch weitere Untersuchungen belegt werden.

Zur weiteren Absicherung der Identität von Matairesinol wurde der aufgereinigte Extrakt zusätzlich mit HPLC-MS/MS geprüft. Matairesinol konnte zunächst aufgrund seiner Retentionszeit und dem Massenpeak bei 359 ($M+H$)⁺ identifiziert werden (Abbildung 22).

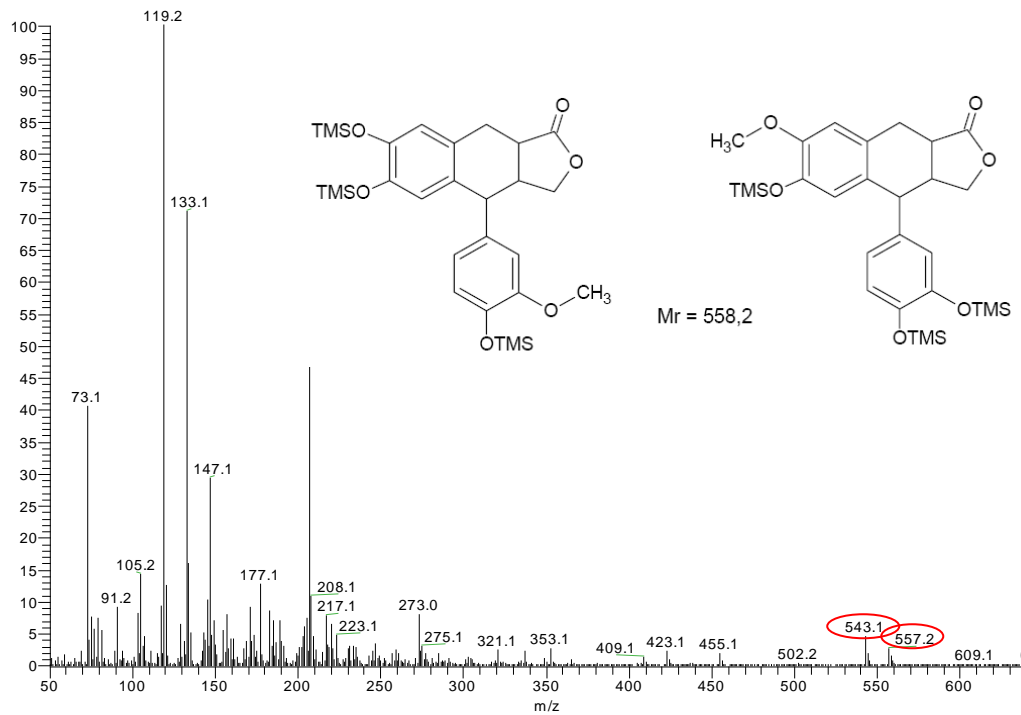


Abbildung 21 MS-Spektrum von unbekannter Substanz bei $R_t=39,6$ min in GC-MS von aufgereinigtem Extrakt aus den Stängeln von *C. tinctorius* und mögliche Strukturen

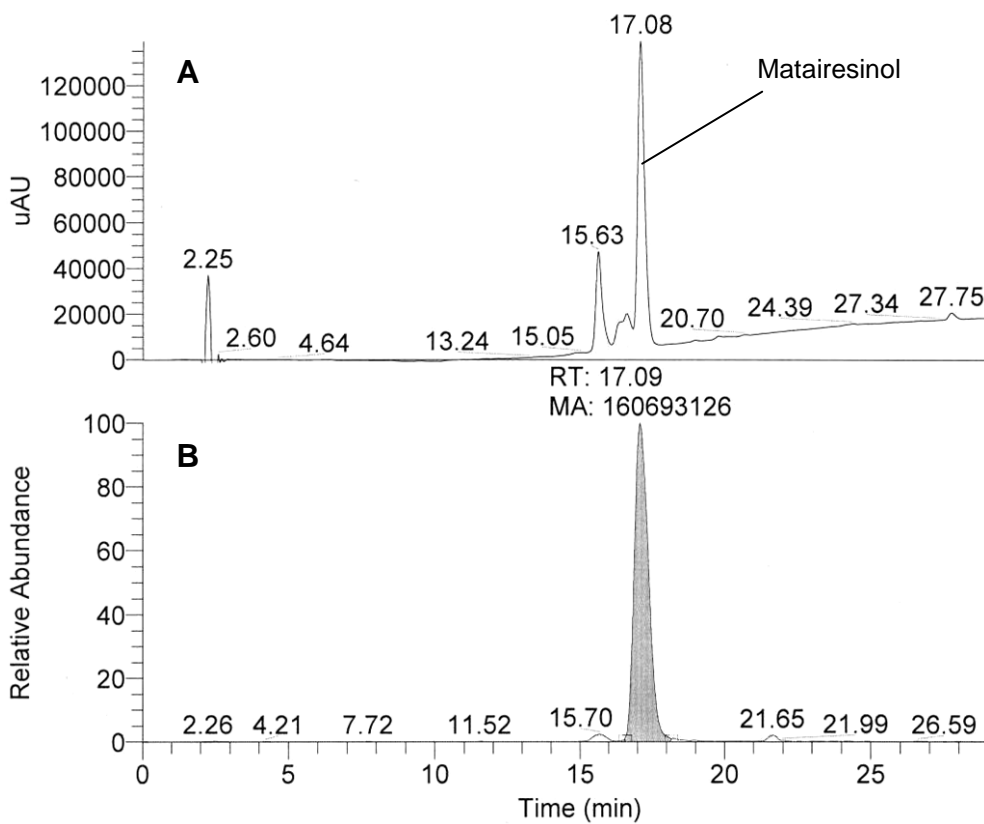


Abbildung 22 HPLC-MS-Chromatogramm von aufgereinigtem Extrakt aus den Stängeln von *C. tinctorius*; A DAD-Detektion, B Massenspektrometrische Detektion bei $m/z=359$

Eine weitere Fragmentierung des Massenpeaks ergab ein Spektrum, welches sowohl mit dem untersuchten Matairesinol-Standard übereinstimmte als auch mit dem von Schmidt et al. (2006) beschriebenen Fragmentmuster für Matairesinol (Abbildung 23).

Weitere Substanzen konnten nicht identifiziert werden. Die im GC-MS detektierte unbekannte Substanz konnte mit dieser Methode nicht wiedergefunden werden. Weitere Messungen waren aufgrund der geringen vorhandenen Extraktmenge nicht möglich.

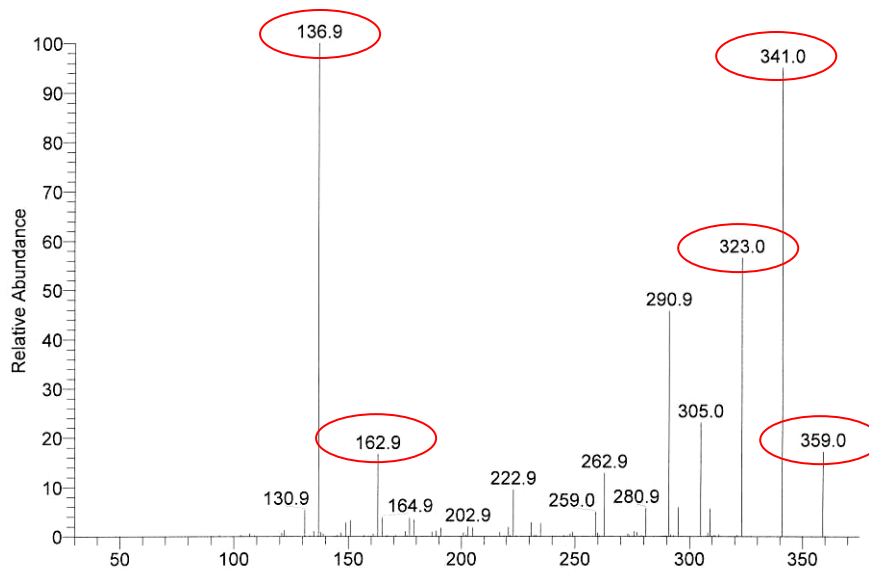


Abbildung 23 Kollisionsinduziertes Dissoziations-Massenspektrum (ESI-CID) von Matairesinol ($m/z=359$) aus LC-MS von aufgereinigten Extrakt aus den Stängeln von *C. tinctorius*, Fragmente entspr. Matairesinol aus Schmidt et al. 2006, Chromatogramm siehe Abbildung 22

3.1.2 Entwicklung einer Methode zur chiralen Trennung von Matairesinol mit CE

3.1.2.1 Auswahl eines geeigneten chiralen Selektors

Für die chirale Trennung mit Hilfe der CE ist die Zugabe eines chiralen Selektors erforderlich. Dieser bewirkt aufgrund seiner unterschiedlichen Affinität zu den beiden Enantiomeren deren Auftrennung. In der CE häufig eingesetzte chirale Selektoren sind Cyclodextrine und deren Derivate. Um einen für das vorliegende Trennproblem geeigneten Selektor zu ermitteln, wurden nacheinander Messungen mit (\pm)-Matairesinol unter Zugabe von 6 verschiedenen Cyclodextrinen zum Messpuffer durchgeführt, nämlich mit α -Cyclodextrin, β -Cyclodextrin, γ -Cyclodextrin, 2,6-Di-O-methyl- β -cyclodextrin, (2-Hydroxyethyl)- β -cyclodextrin und Carboxymethyl- β -cyclodextrin (CMB)

Die CD-Konzentration betrug 5 mM in 100 mM Puffer bei einem pH-Wert von 10. Der basische pH-Wert wurde gewählt, um Matairesinol durch Deprotonierung eine Ladung zu verleihen. Matairesinol besitzt einen pka-Wert von 9,9 und liegt somit bei neutralem bis saurem pH-Wert weitestgehend ungeladen vor. Da es somit keine eigene elektrophoretische Mobilität besitzt, wurde für die Untersuchungen zunächst ein basischer pH-Wert gewählt.

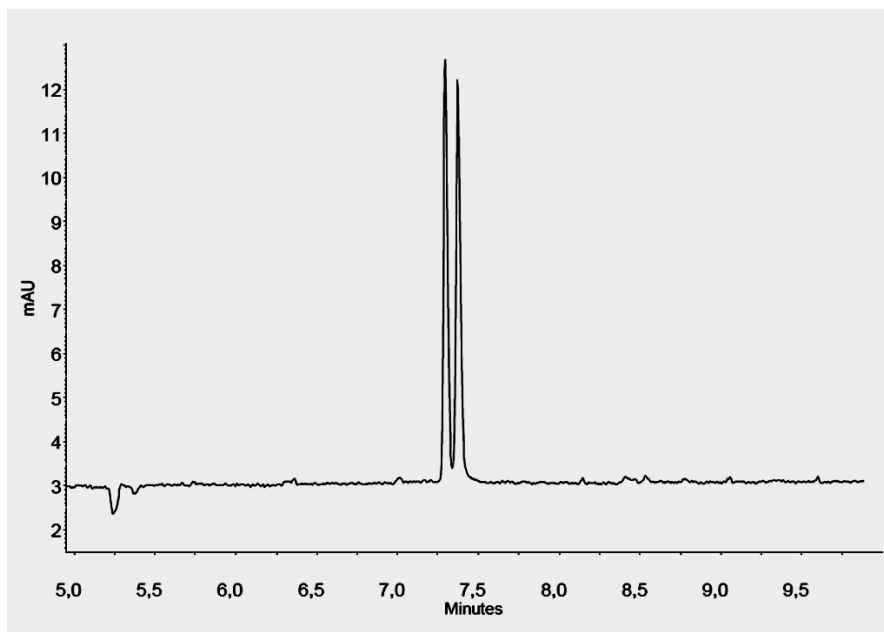


Abbildung 24 Elektropherogramm von (\pm)-Matairesinol; Messbedingungen: Quarzkapillare 64 cm (55,5 cm effektive Länge) * 50 μ m; Spannung 25 kV; Temperatur 25°C; Messpuffer: 100 mM Boratpuffer, pH 10, 5 mM CMB

Das einzige Cyclodextrin, welches unter diesen Bedingungen zu einer Antrennung von (\pm)-Matairesinol führte, war CMB (Abbildung 24). Es konnte jedoch bei diesem pH-Wert keine Basislinientrennung erreicht werden.

3.1.2.2 Optimierung von pH-Wert und Puffer-Konzentration

Um eine Basislinientrennung zu erreichen, wurde zunächst der pH-Wert für die Trennung optimiert. Dafür wurde die Messung bei pH 5, 7,2, 10 und 11 durchgeführt unter Beibehaltung aller übrigen Messparameter. Die Art der verwendeten Puffer richtete sich nach der optimalen pH-Pufferkapazität. Die Messung bei saurem pH-Wert wurde dadurch möglich, dass CMB selbst eine negative Ladung besitzt und somit eine eigene elektrophoretische Mobilität des Analyten nicht mehr erforderlich war.

Ein niedriger pH-Wert erwies sich als vorteilhaft für die Trennung, während bei pH 11 keine Auflösung mehr erreicht wurde. (Abbildung 25)

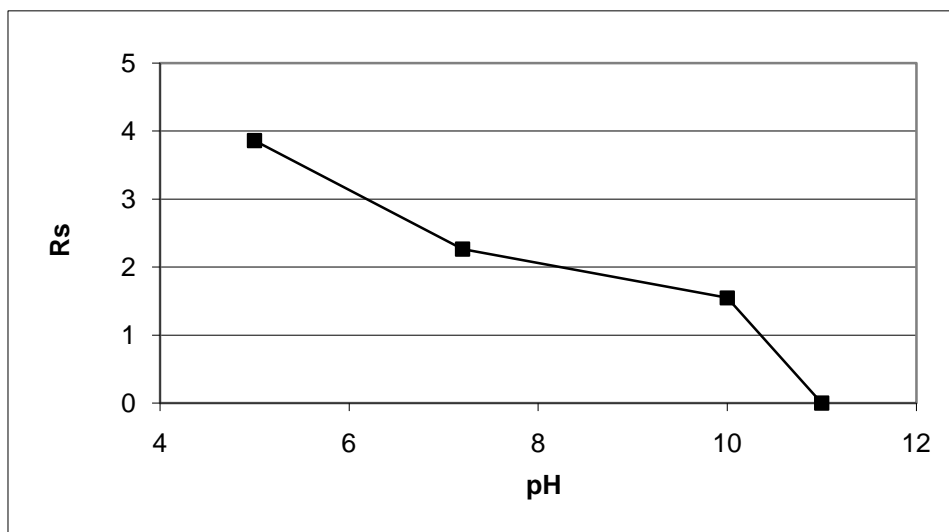


Abbildung 25 Einfluss des pH auf die Auflösung (R_s) von (\pm)-Matairesinol mit CE; Messbedingungen: Quarzkapillare 64 cm (55,5 cm effektive Länge) * 50 μ m; Spannung 25 kV, Temperatur 25°C; Messpuffer: pH 5 Citrat-Puffer, pH 7,2 Phosphat-Puffer, pH 10 und 11 Borat-Puffer; alle 100 mM, 5 mM CMB

Bei pH 5 wurde eine vollständige Basislinientrennung erreicht. Allerdings waren bei diesem pH-Wert die Migrationszeiten lang, die Peaks breit und die Stromstärke mit ca. 280 mA sehr hoch. Zur weiteren Optimierung wurde deshalb die Pufferkonzentration angepasst. Dafür wurde Citrat-Puffer bei pH 5 in 4 verschiedenen Konzentrationen eingesetzt. Die Differenz zwischen den Migrationszeiten der beiden Matairesinolenantiomere vergrößerte sich mit

zunehmender Pufferkonzentration, was jedoch gleichzeitig mit einer Peakverbreiterung einherging. Die beste Auflösung wurde bei einer Konzentration von 50 mM erreicht. Mit der verbesserten Trennung war auch eine Zunahme der Migrationszeiten verbunden, (Abbildung 26). Bei einer Pufferkonzentration von 20 mM konnte mit einer kurzen Analysenzeit von unter 10 Minuten Basislinientrennung erreicht werden.

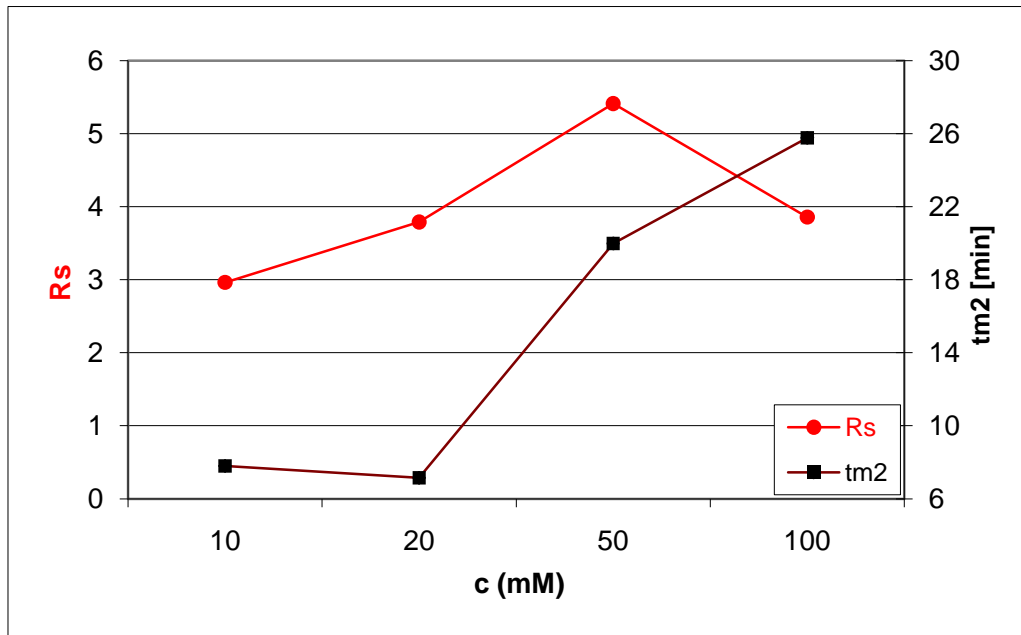


Abbildung 26 Abhängigkeit der Auflösung (R_s) und der Analysenzeit (hier Migrationszeit von (+)-Matairesinol, welches an zweiter Stelle migriert = t_{m2}) bei der CE von der Pufferkonzentration, Messbedingungen: Quarzkapillare 64 cm (55,5 cm effektive Länge) * 50 μm ; Spannung 25 kV, Temperatur 25°C Messpuffer: Citrat-Puffer 10 – 100 mM, pH 5, 5 mM CMB

Mit dieser Pufferkonzentration wurden weitere Untersuchungen im pH-Bereich zwischen 4,5 und 7 vorgenommen (Abbildung 27). Es zeigte sich jedoch, dass für eine Basislinientrennung ein pH von 5 nicht überschritten werden konnte. Erniedrigung auf pH 4,5 führte zwar zu einer weiteren Verbesserung der Trennung jedoch auch zu einer Verlängerung der Analysenzeit.

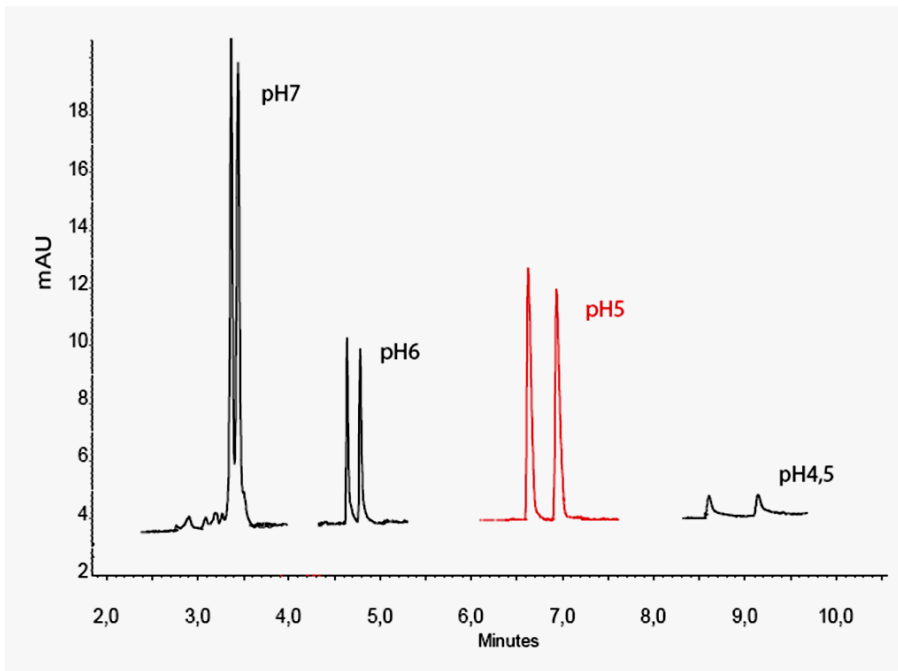


Abbildung 27 pH-Abhängigkeit der Trennung von (±)-Matairesinol mit CE; Messbedingungen: Quarzkapillare 64 cm (55,5 cm effektive Länge) * 50 µm; Spannung 25 kV, Temperatur 25°C Messpuffer: pH 4,5 und 5 Citrat-Puffer, pH 6 und 7 Phosphat-Puffer, alle 20 mM, 5 mM CMB

3.1.2.3 Einfluss von CMB-Konzentration und Temperatur auf die Enantiomerentrennung

Eine Erhöhung der CMB-Konzentration führte zu einem ähnlichen Ergebnis, wie eine weitere Absenkung des pH: Die Auflösung verbesserte sich bei gleichzeitiger Verlängerung der Migrationszeiten.

Untersuchungen zur Temperaturabhängigkeit der Trennung zeigten, dass ein Temperaturanstieg zu einer Verschlechterung der Trennung führte, während eine Absenkung auf unter 25 °C ohne Einfluss auf die Auflösung blieb.

Die weiteren Untersuchungen wurden deshalb in 20 mM Citratpuffer bei pH5, einer CMB-Konzentration von 5 mM und einer Temperatur von 25 °C durchgeführt.

3.1.2.4 Verbesserung der Reproduzierbarkeit der Trennmethode

Die optimierte Trennmethode brachte trotz guter Trennleistung keine guten Ergebnisse hinsichtlich der Reproduzierbarkeit der Migrationszeiten.

Diese verschoben sich kontinuierlich nach hinten, um bis zu 2 Minuten innerhalb eines Messtages, entsprechend einem V_k von 7% für die effektive Mobilität. Die üblicherweise zur Reinigung der Kapillarwand eingesetzte Spülung mit 0,1 N oder 1 N NaOH führte eher zu einer Verschlimmerung des Problems (Abbildung 28).

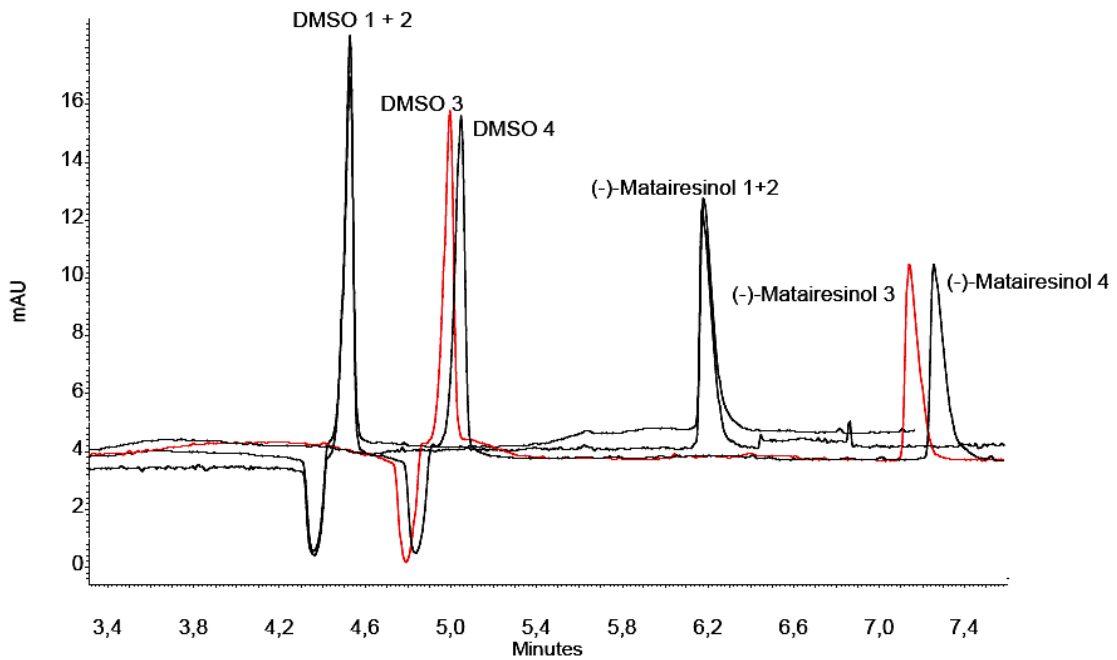


Abbildung 28 Einfluss der Spülung mit 1 N NaOH auf die Migrationszeiten bei CE, vier aufeinander folgende Messungen, nach Messung 2 Spüllauf mit 1 N NaOH, Messbedingungen: Quarzkapillare 64 cm (55,5 cm effektive Länge) * 50 μm ; Spannung 25 kV; Temperatur 25°C; Messpuffer: 20 mM Citratpuffer, pH 5, 5 mM CMB; DMSO als EOF-Marker

Jedoch führten auch Spülen mit 1 N HCl oder mit Puffer nicht zu reproduzierbaren Migrationszeiten. Mit diesem Effekt ging eine Schwankung der Peakflächen einher mit Standardabweichungen von bis zu 20 % an einem Tag. Eine mit der Methode erstellte Kalibriergerade mit sechs Konzentrationen zwischen 17 und 170 $\mu\text{g/ml}$ führte zu einem Korrelationskoeffizient von $R^2=0,94$.

In der Literatur werden mit Polyacrylamid beschichtete Kapillaren vielfach als vorteilhaft für die Reproduzierbarkeit von CE-Messungen beschrieben (Rudaz et al., 1998; Janini et al., 1996). Deshalb wurde die Trennmethode mit einer solchen beschichteten Kapillare getestet. Es wurde mit 5 mM CMB eine gute Trennung der Matairesinolenantimere erreicht (Abbildung 29).

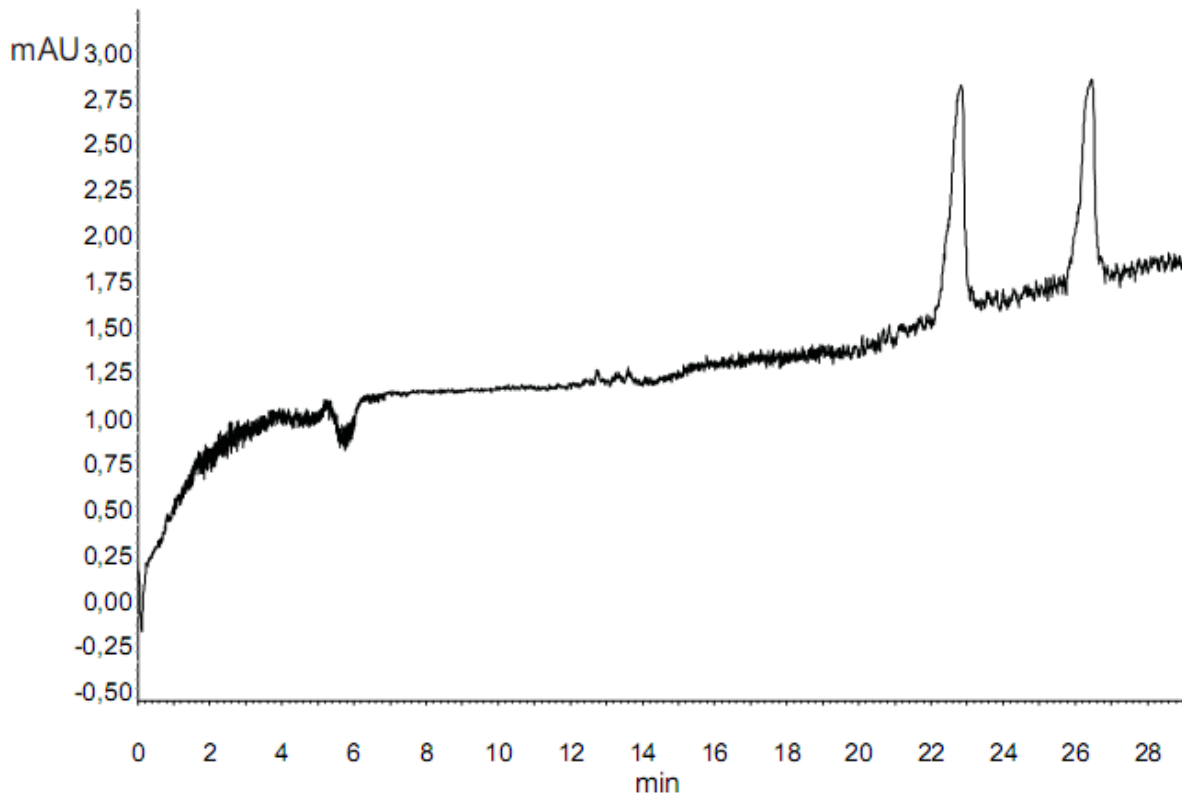


Abbildung 29 Electropherogramm mit (±)-Matairesinol mit polyacrylamidbeschichteter Kapillare; Messbedingungen: Polyacrylamidbeschichtete Kapillare, 64 cm (55,5 cm effektive Länge) * 50 µm; Spannung -25 kV; Temperatur 25°C; Messpuffer: 10 mM Citratpuffer, pH 5, 5 mM CMB

Allerdings verlängerte sich die Analysenzeit auf mehr als 20 Minuten. Dieses Problem hätte überwunden werden können durch eine höhere CMB-Konzentration oder durch Verwendung einer kürzeren Kapillare (Schmitt und Engelhard, 1993). Daneben traten jedoch auch von Lauf zu Lauf eine Verlängerung der Migrationszeiten sowie ein zunehmendes Grundrauschen auf. Der pH-Wert wurde variiert zwischen 4 und 7 und es wurden Pufferkonzentrationen von 10 bis 50 mM eingesetzt. Verschiedene Spülprozeduren mit Wasser und Puffer wurden getestet, doch die Verschiebung der Migrationszeiten sowie das hohe Grundrauschen ließen sich nicht beheben.

Da die Verwendung einer beschichteten Kapillare das Problem der schwankenden Migrationszeiten nicht lösen konnte, wurden die weiteren Versuche mit einer unbeschichteten Quarzkapillare gemacht. Diese besitzt gegenüber der beschichteten Kapillare die Vorteile, dass sie kostengünstiger und einfacher in der Handhabung ist. Da neben pH und Konzentration auch die Art des Puffers einen Einfluss auf die Trennung in der Kapillarelektrophorese haben kann (Klockow et al., 1996), wurde der

Citratpuffer durch Phosphatpuffer ersetzt. Da Phosphatpuffer bei pH 5 nur eine geringe Pufferkapazität besitzt, wurde eine Konzentration von 50 mM statt 20 mM verwendet.

Die Probleme hinsichtlich der sich verschiebenden Migrationszeiten traten zunächst wieder auf. Unter Verwendung des neuen Puffersystems konnte dieses Problem jedoch durch Spülen mit 1 N NaOH vor jedem Lauf behoben werden.

3.1.2.5 Validierung der Trennmethode

Mit der so veränderten Methode wurde weiterhin Basislinientrennung erreicht (Abbildung 30). Für eine verbesserte Reproduzierbarkeit der Peakflächen wurde Cefotaxim als interner Standard zugegeben.

Die Migrationsreihenfolge von der beiden Matairesinolenantiomere wurde durch Zugabe von (-)-Matairesinol zum Racemat bestimmt.

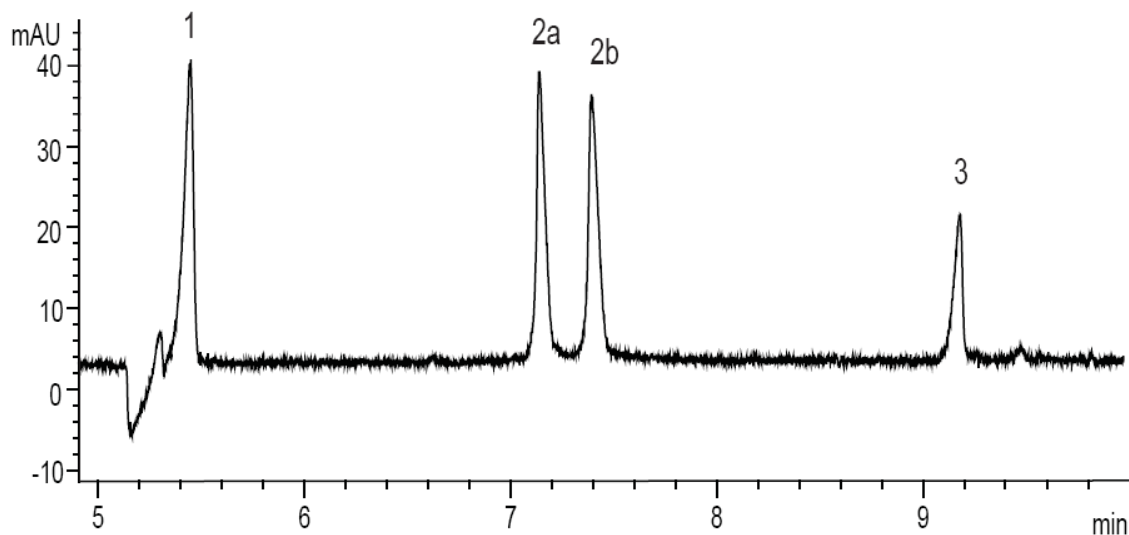


Abbildung 30 Elektropherogramm mit racemischem Matairesinol (2a (-), 2b (+)), DMSO (1) als EOF-Marker und Cefotaxim (3) als internen Standard; Messbedingungen: Quarzkapillare 64 cm (55,5 cm effektive Länge) * 50 μ m; Spannung 25 kV, Temperatur 25°C; Messpuffer: 50 mM Phosphatpuffer, pH 5, 5 mM CMB

Die Methode zeigte bei der Validierung im Vergleich zur Methode unter Verwendung von Citratpuffer eine gute Reproduzierbarkeit hinsichtlich der Migrationszeiten und der Peakflächen (Tabelle 6). Es wurden normalisierte (durch Migrationszeit dividierte) und um den internen Standard korrigierte Peakflächen verwendet (Altria, 1993). Die so berechneten Peakflächen zeigten eine lineare Korrelation mit den Konzentrationen.

Tabelle 6 Validierung Trennmethode für (±)-Matairesinol mit Phosphatpuffer-Methode

Validierung		(-)-Matairesinol	(+)-Matairesinol
Reproduzierbarkeit Vk (n=6)	Migrationszeiten	< 4 %	< 4 %
	effektive Mobilität	< 0,5 %	< 0,5 %
	Peakfläche (normalisiert, korrigiert)		
	83 µg/ml	4,0 %	3,3 %
	16 µg/ml	4,9 %	6,3 %
Linearität R ² (n = 6), 10 – 160 µg/ml		0,997	
Nachweisgrenze		2 µg/ml	

3.1.2.6 Anpassung der Methode an methanolhaltige Proben

Um auch Proben mit einer geringen Wasserlöslichkeit mit der Methode messen zu können, wurde der Einfluss eines Zusatzes von Acetonitril und Methanol zur Probe getestet.

Ein Zusatz von 10 % Acetonitril brachte eine signifikante Verschlechterung der Trennleistung, so dass dieses Lösungsmittel nicht zur Lösungsverbesserung in Betracht kam. Bei einem Methanolzusatz konnte hingegen bis zu einem Anteil von 20 % die Basislinientrennung beibehalten werden.

Für die vollständige Lösung der zu messenden Fraktionen aus den Früchten und dem Kraut von *C. tinctorius* war ein Methanolanteil von 10 % erforderlich (s. Kapitel 3.1.3.2)

Deshalb wurden für die so angepasste Methode weitere Messungen zur Validierung vorgenommen (Tabelle 7). Die effektive Mobilität der Enantiomere verschob sich von $-8,57 \cdot 10^{-5}$ und $-9,52 \cdot 10^{-5}$ cm²/V*s für (-)- und (+)-Matairesinol auf $-9,08 \cdot 10^{-5}$ und $-1,00 \cdot 10^{-4}$ cm²/V*s.

Der Methanolzusatz führte zu keiner wesentlichen Verschlechterung der Reproduzierbarkeit der Methode.

Tabelle 7 Validierung Trennmethode für (±)-Matairesinol mit Phosphatpuffer mit Methanolanteil

Validierung		(-)-Matairesinol	(+)-Matairesinol
Reproduzierbarkeit VK (n=4)	Migrationszeiten	1,3%	1,3%
	effektive Mobilität	< 0,5%	< 0,5%
	Peakfläche (normalisiert, korrigiert) 20 µg/ml	7,4 %	4,0 %
Linearität; n=6, 7 – 344 µg/ml		0,999	
Nachweisgrenze		2 µg/ml	

3.1.3 Chirale CE-Untersuchungen mit aufgereinigten Extrakten aus den Früchten und Stängeln von *Carthamus tinctorius*

3.1.3.1 Absolute Konfiguration von Matairesinol in den Früchten von *Carthamus tinctorius*

Für die Bestimmung der absoluten Konfiguration wurde eine Probe der matairesinolhaltigen Fraktion der präparativen Aufreinigung getrocknet und in Wasser, welches internen Standard und DMSO enthielt, gelöst. Die Messung der Probe zeigte eine Übereinstimmung der effektiven Mobilität des Matairesinol-Peaks mit der von (-)-Matairesinol. Zusätzlich wurde der Probe racemisches Matairesinol zugegeben (Abbildung 31) Im Vergleich zur Messung von racemischem Matairesinol allein vergrößerte sich der Peak von (-)-Matairesinol.

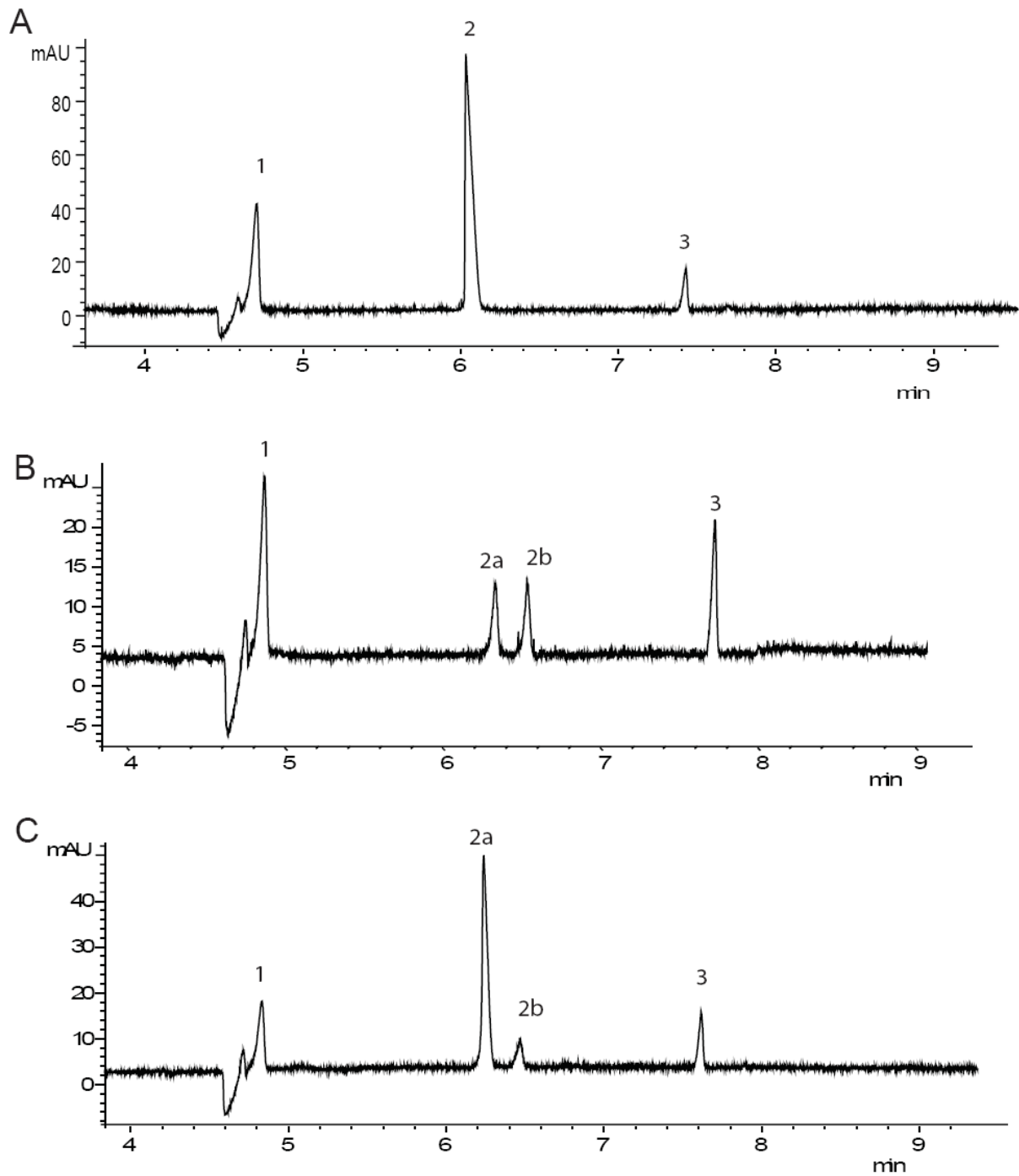


Abbildung 31 Elektropherogramme einer Probe aus Früchten von *C. tinctorius* (A), racemisches Matairesinol (B), Probe unter Zugabe von racemischem Matairesinol; Beschriftung: 1 DMSO, 2 a (-)-Matairesinol, 2b (+)-Matairesinol, 3 Cefotaxim; Messbedingungen: Quarzkapillare 64 cm (55,5 cm effektive Länge) * 50 μ m; Spannung 25 kV, Temperatur 25°C; Messpuffer: 50 mM Phosphatpuffer, pH 5, 10% MeOH, 5 mM CMB

3.1.3.2 Gehaltsbestimmung von Matairesinol im aufgereinigten Extrakt aus den Früchten von *Carthamus tinctorius* mit CE

Für die Gehaltsbestimmung wurden 3 x 2 ml der gesammelten Fraktionen aus der präparativen HPLC getrocknet und zunächst in je 1 ml Wasser mit DMSO und internem Standard gelöst.

Die Proben wurden mit CE gemessen. Bei einem durchschnittlichen Gehalt von 95 µg/ml ergab sich eine relative Standardabweichung von über 50%.

Diese Ergebnisse ließen auf Löslichkeitsprobleme bei der Rücklösung der Probe schließen.

Um die Löslichkeit zu erhöhen wurde den Proben beim nächsten Versuch 10 % Methanol zugegeben. Diese Veränderung in der Probenaufbereitung erforderte eine erneute Validierung der angepassten Trennmethode (siehe Kapitel 0)

Bei erneuter Messung ergab sich ein Gehalt von 288,3 µg/ml, die relative Standardabweichung betrug jetzt 3,4%. Die vergleichende Messung der Proben mit HPLC ergab einen Gehalt von 288,0 µg/ml (1,15% rel. Standardabweichung).

3.1.3.3 Absolute Konfiguration von Matairesinol in den getrockneten Stängeln von *Carthamus tinctorius*

Zur Untersuchung der absoluten Konfiguration des in den Stängeln vorhandenen Matairesinols wurde eine Probe des mit der präparativen HPLC gereinigten Extrakts getrocknet und in Methanol/Wasser 1:10 gelöst und mit CE gemessen. Der theoretische, aus der HPLC (mit UV-Vis-Detektion) berechnete Matairesinolgehalt betrug 0,3 mg/ml. Jedoch hatten die Messungen mit LC-MS und GC-MS ergeben, dass neben dem Matairesinol Begleitstoffe in dem Extrakt vorhanden waren und der tatsächliche Matairesinolgehalt entsprechend geringer war.

Bei der Messung wurden verschiedene unbekannte Substanzen sichtbar, es konnte aber zunächst kein Matairesinol detektiert werden.

Erst bei einer Verdreifachung des Injektionsvolumens zeigte sich ein Peak bei entsprechender Migrationszeit, der sich hinsichtlich seiner Größe nahe am Detektionslimit befand. Die effektive Mobilität entsprach der des (-)-Matairesinols.

Zur Bestätigung wurde der Probe (-)-Matairesinol zugegeben. Der entsprechende Peak vergrößerte sich (Abbildung 32).

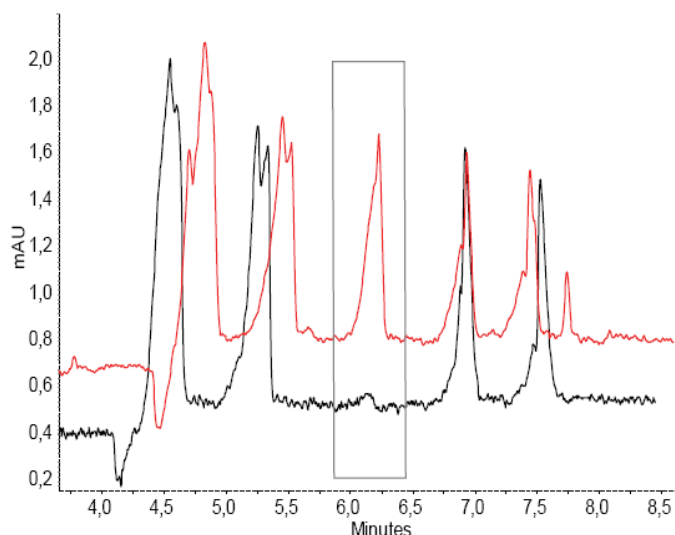


Abbildung 32 Elektropherogramme von gereinigtem Extrakt aus den Stängeln von *C. tinctorius* (schwarz dargestellt) und von Extrakt unter Zugabe von (-)-Matairesinol (rot dargestellt); Messbedingungen: Quarzkapillare 64 cm (55,5 cm effektive Länge) * 50 μm ; Spannung 25 kV, Temperatur 25°C; Messpuffer: 50 mM Phosphatpuffer, pH 5, 10% MeOH, 5 mM CMB

3.1.4 Diskussion

3.1.4.1 Aufarbeitung

Die Enantiomerenzusammensetzung einzelner Lignane variiert zwischen den unterschiedlichen Spezies (Suzuki und Umezawa, 2007). Dass es dabei sogar innerhalb einer Art zu Variationen kommen kann, wenn man die absolute Konfiguration in verschiedenen Geweben testet, zeigt die Arbeit von Suzuki et al. (2002).

Ausgehend von diesen Ergebnissen wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit vergleichende chirale Untersuchungen von Matairesinol aus Extrakten der Früchte und Stängel von *C. tinctorius* vorgenommen.

Die Gewinnung von ausreichenden Mengen an Matairesinol aus den Früchten stellte hierbei kein Problem dar, da der Gehalt der verwendeten *C. tinctorius*-Akzession mit 0,21 % ausreichend hoch war. Allerdings ist aus der nah verwandten Spezies *A. lappa* bekannt, dass der Lignangehalt in den Blättern bzw. den Stängeln nur sehr gering ist (Suzuki et al., 2002; Liu et al., 2005). So war auch in den Stängeln von *C. tinctorius* nur ein sehr geringer Matairesinolgehalt zu erwarten. Um die Ausbeute zu maximieren, wurde zunächst getestet, welche Hydrolysemethode am geeignetsten ist für die Abspaltung von glykosidisch an Matairesinol gebundenen Zucker. Aufgrund der begrenzten Menge an Stängelmateriale wurden die Hydrolyseversuche mit einem

Extrakt aus den Früchten von *C. tinctorius* durchgeführt. Die Hydrolyse von Lignanglykosiden kann sauer oder enzymatisch durchgeführt werden. Die saure Hydrolyse wird gewöhnlich mit HCl im wässrig-methanolischen oder wässrig-ethanolischen durchgeführt. Für die enzymatische Hydrolyse wird in den letzten Jahren wegen ihrer Effizienz und ihres weiten Substratspektrums und dem Fehlen von Lignanspuren im Enzym vielfach Glucuronidase/Sulfatase aus *Helix pomatia* verwendet (Milder et al., 2004; Smeds und Hakala, 2003).

Für die vorliegende Arbeit wurde dieses Enzym vergleichend mit salzsauren Hydrolysebedingungen getestet. Die Bedingungen für die enzymatische Hydrolyse waren an die Arbeit von Milder et al. (2004) angelehnt. Da es bei einer kombinierten wässrigen Extraktion mit enzymatischer Hydrolyse aufgrund mangelnder Ablösung der Lignane von der Matrix zu einer unvollständigen Umsetzung kommen kann (Meagher et al., 1999), wurden die Lignane zuerst methanolisch-wässrig extrahiert und dann nach Abtrennung des Lösungsmittels enzymatisch umgesetzt. Dennoch erwies sich die saure Hydrolyse der enzymatischen als leicht überlegen. Auch eine Erhöhung der Enzymkonzentration bzw. Verlängerung der Inkubationszeit brachten keine Erhöhung des Umsatzes bei der enzymatischen Hydrolyse. Eine mögliche Erklärung für den unvollständigen Umsatz ist, dass neben dem hauptsächlich vorhandenen Matairesinol- β -D-Glucosid (Palter und Lundin, 1970) ein Matairesinol-Diglycosid in Saflor-Früchten beschrieben ist (Nagatsu et al., 1998), welches möglicherweise durch das Enzym nicht spaltbar ist.

Ein Grund für die Verwendung von Enzymzubereitungen bei der Hydrolyse von Lignanglykosiden ist, dass die Durchführung einer sauren Hydrolyse bei bestimmten Lignanen zu Artefaktbildung oder aber zur Zersetzung führt. Aus Secoisolariciresinol bildet sich unter sauren Bedingungen Anhydrosecoisolariciresinol und auch Lariciresinol ist unter diesen Bedingungen instabil (Sicilia et al., 2003; Haworth und Kelly, 1937). Matairesinol wird hingegen als „relativ stabil“ beschrieben, bei fünfstündiger Hydrolyse mit 2 M HCl blieben 80 % der ursprünglich eingesetzten Menge erhalten (Liggins et al., 2000). Aufgrund dieser Untersuchungen sowie der leichten Überlegenheit der sauren Hydrolyse gegenüber der enzymatischen, wurde im Folgenden sauer hydrolysiert.

Zusätzlich wurde der Einfluss einer zusätzlichen basischen Hydrolyse in Verbindung mit der Extraktion untersucht. Eine solche Vorbehandlung hatte bei Milder et al. (2004) abhängig vom Gewebe teilweise zu einer Maximierung der Lignan-

Gesamtausbeute geführt. Diese Methode wurde im Rahmen dieser Arbeit am Extrakt aus Saflorfrüchten getestet. Sie führte jedoch zu keiner Verbesserung sondern zu einer Verschlechterung der Ausbeute, vermutlich aufgrund von Zersetzung des Matairesinols. Die Ergebnisse von Milder et al. (2004) enthielten Hinweise darauf, dass bei der Extraktion von Blattdrogen, nämlich Teeblättern, die alkalische Extraktion eher zu einer Verschlechterung der Ausbeute führte. So wurden keine weiteren Untersuchungen dazu an den pulverisierten Stängeln von *C. tinctorius* vorgenommen.

Bei der ersten Aufarbeitung von Extrakt aus Stängeln von *C. tinctorius* nach Hydrolyse war die Matairesinol-Ausbeute so gering, dass eine Veränderung in der Aufarbeitung notwendig erschien. Da nicht bekannt war, welcher Anteil des Matairesinols als Glykosid vorlag, konnte nicht ausgeschlossen werden, dass beim Ausschütteln mit Chloroform ein Teil des Aglykons verloren ging.

Aus diesem Grund wurde im Folgenden sowohl vor als auch nach Hydrolyse eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit Ethylacetat/n-Hexan 1:1 vorgenommen und beide Extrakte aufgereinigt. Auf die Entfernung des Chlorophylls mit Chloroform wurde verzichtet. Im unhydrolysierten Extrakt fand sich ein dem Matairesinol entsprechender Peak, während im unhydrolysierten Extrakt kein Matairesinol mehr nachgewiesen werden konnte.

Es wurde bereits gezeigt, dass in den Früchten von *C. tinctorius* ein Großteil des Matairesinols glycosidiert vorliegt. Dies ist jedoch nicht zwingend auf die Verhältnisse in den Stängeln übertragbar. In den Früchten von *A. lappa* liegt ein Großteil des Arctigenins an Zucker gebunden vor. Jedoch erhielten Liu et al. (2005) bei der Aufarbeitung von Blättern dieser Art einen gereinigten Extrakt, welcher zu mehr als einem Drittel aus freiem Arctigenin bestand, bezogen auf die Arctiin/Arctigenin-Gesamtausbeute.

Eine weitere mögliche Erklärung für das scheinbare Fehlen eines Matairesinol-Glykosids ist, dass das Aglykon ein Artefakt ist, welches bei der Aufarbeitung unter dem Einfluss endogener β -Glucosidasen entsteht. β -Glucosidasen in Pflanzen dienen neben dem Celluloseabbau auch der Aktivierung von Phytohormonen sowie der Freisetzung von Abwehrstoffen gegen Fraßfeinde und Phytopathogene (Warzecha et al., 1999; Morant et al., 2008). Es gibt β -Glucosidasen mit einer breiten Substratspezifität während andere hochspezifisch sind und nur mit wenigen Aglyka reagieren. So konnte in *Podophyllum peltatum* eine β -Glucosidase mit hoher

Spezifität für das toxische Lignan Podophyllotoxin nachgewiesen werden (Dayan et al., 2003).

Das Vorliegen von β -Glucosidasen im Extrakt aus *C. tinctorius* ist wahrscheinlich. Beim Abrotieren des Methanols, was aufgrund der großen aufzuarbeitenden Mengen bis zu einer Stunde dauern kann und bei 40° C stattfindet, ist der Umsatz von Matairesinolglucosid durch eine solche β -Glucosidase denkbar. Dass die Anwesenheit des organischen Lösungsmittels nicht zu einer völligen Inaktivierung des Enzyms führen muss, zeigen verschiedene Untersuchungen zum Verhalten von β -Glucosidasen in organischen Lösungsmitteln (Tsitsimpikou et al., 1994; Tyagi und Gupta, 1998; Lucas et al., 2000). Lucas et al. (2000) konnten sogar zeigen, dass die Anwesenheit von Ethanol oder Methanol aktivierend auf eine β -Glucosidase aus *Chalara paradoxa* wirken. So betrug bei einem Methanolanteil von 40% die Aktivität der Glucosidase 181 % des Messwertes in reinem Puffer. Selbst wenn eine Abnahme der Enzymaktivität eintritt, ist eine Restaktivität im methanolischen Extrakt denkbar, welche bei der Extraktion von *C. tinctorius* zu einer Artefaktbildung geführt hat.

3.1.4.2 Methodenentwicklung zur chiralen Trennung von Matairesinol

Für die Bestimmung der absoluten Konfiguration des aus den Früchten und den Stängeln von *C. tinctorius* isolierten Matairesinols war die Entwicklung einer Methode zur chiralen Trennung erforderlich. Solche Trennungen von racemischem Matairesinol sind bisher nur mit Normalphasen-HPLC auf Chiracel-OD-Säulen (Umezawa et al., 1991; Sicilia et al., 2003; Takaku et al., 2001) und semi-micro-Säulen (Chiracel OD-H; Okunishi et al., 2004) durchgeführt worden. Mit einem Laserpolarimeter, welches an eine HPLC mit RP18-Säule und UV-Detektor gekoppelt war, gelang es, die Enantiomere von Pinoresinol zu unterscheiden und gleichzeitig zu quantifizieren. Entsprechende Untersuchungen wurden auch mit Matairesinol durchgeführt, allerdings nur mit der enantiomerenreinen linksdrehenden Form.

Die Analyse von racemischem Matairesinol auf chiralen Säulen war verbunden mit langen Analysenzeiten (bis zu 50 min), einem hohen Verbrauch an organischem Lösungsmittel und einer mangelnden Basislinientrennung.

In der vorliegenden Arbeit gelang erstmals die chirale Trennung eines Lignans mit CE. Die Basislinientrennung von racemischem Matairesinol gelang innerhalb eines CE-Laufs von weniger als 8 Minuten, unter Berücksichtigung der vorangegangenen

Spülung dauerte ein Lauf weniger als 20 min. Im Vergleich zu den HPLC-Methoden ist mit der chiralen Trennung auf CE gleichzeitig eine Quantifizierung von Matairesinol möglich. Dies bedeutet in der Praxis eine weitere Kosten- und Zeitersparnis.

Ein in Zusammenhang mit CE-Trennungen vielfach angeführter Kritikpunkt sind die oftmals auftretenden Schwierigkeiten hinsichtlich der Reproduzierbarkeit. Dies wird vor allem im Zusammenhang mit unbeschichteten Kapillaren berichtet (Mellenthin und Galensa, 1999; Simo et al., 2002; Schmitt und Engelhard, 1993; Janini et al., 1996).

Diese Schwierigkeiten traten bei der Methodenentwicklung für die Trennung von (\pm)-Matairesinol ebenfalls zutage. Die Reproduzierbarkeit der Peakflächen und der Effektiven Mobilität entsprachen zunächst 20 bzw. 7%. Da eine kontinuierliche Zunahme der Migrationszeiten zu beobachten war, wurde die Ursache in der Anlagerung von Cyclodextrin an die Kapillarwand vermutet (Belder und Schomburg, 1994; Culha et al., 2000). Nachdem der Einsatz verschiedenen Spülprozeduren zunächst ohne Erfolg blieb, wurde deshalb die Trennung in einer beschichteten Kapillare durchgeführt. Die in der Literatur beschriebene Verbesserung der Reproduzierbarkeit durch die Verwendung einer beschichteten Kapillare (Rudaz et al., 1998; Janini et al. 1996) konnte jedoch durch unsere Studien nicht bestätigt werden. Das Problem der zunehmenden Migrationszeiten blieb bestehen, ferner wurde ein sich mit jedem Lauf verstärkendes Grundrauschen beobachtet. Die beschichtete Kapillare stellte somit keine überzeugende Alternative zur Quarzglaskapillare für unser Trennproblem dar. Dabei ist auch zu berücksichtigen, dass beschichtete Kapillaren vielfach teurer sind als unbeschichtete. Auch sind beschichtete Kapillaren aufwändiger in der Handhabung: Das Detektorfenster kann nicht durch Entfernung der Polyimidschicht durch eine Flamme angebracht werden, sondern erfolgt durch mehrstündige Einwirkung von H_2SO_4 . Zum Spülen der Kapillare dürfen keine stark alkalischen oder sauren Lösungen verwendet werden, da dies die Polyacrylamid-Beschichtung angreifen würde.

Aus diesen Gründen wurden weitere Versuche mit unbeschichteten Kapillaren unternommen. Da die Chemie des Puffers einen starken Einfluss auf die Trennung haben kann, wurde der Phosphatpuffer durch Citratpuffer ersetzt. Diese Maßnahme führte zusammen mit einer verbesserten Spülmethode zu einer erheblichen Verbesserung der Reproduzierbarkeit. Der Variationskoeffizient für die effektive

Mobilität betrug weniger als 0,5 %, konnte also im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen auf mehr als ein Zehntel gesenkt werden. Culha et al. (2000) beschreiben in ihrer Arbeit ebenfalls Probleme mit verlängerten Migrationszeiten aufgrund der Adhäsion eines Cyclodextrinderivats an die Kapillarwand. Die Untersuchungen wurden bei pH 5 in Phosphatpuffer durchgeführt. Der Effekt war wie in den Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit reversibel, wenn eine bestimmte Spülprozedur durchgeführt wurde. Dass ein vermehrtes Spülen der Kapillare bei dem vorher verwendeten Citratpuffer zu keiner Regenerierung der Kapillarwand geführt hatte, legt den Schluss nahe, dass die Adhäsion von Cyclodextrin an die Kapillarwand nicht nur vom pH-Wert sondern auch vom verwendeten Puffersystem abhängig ist.

Nach Anpassung der Methode für die Analyse von Extrakten unter Zugabe von einem Anteil Methanol ergab sich für die Reproduzierbarkeit der Peakflächen bei einer Konzentration von 20 µg/ml (±)-Matairesinol für V_k ein Wert von 7,4 bzw. 4,0 %. Dies stellt im Vergleich zu den Werten, die vor der Optimierung der Methode erzielt worden sind, eine signifikante Verbesserung dar, zumal die Validierung bei relativ geringen Konzentrationen durchgeführt worden ist. Bei den Messungen mit dem Extrakt, in welchem Matairesinol in weitaus höheren Konzentrationen vorhanden war, kam es zu einer Absenkung von V_k auf unter 4 %.

Ein weiterer kritischer Punkt bei der CE ist, aufgrund der schmalen Durchflusszelle, das Detektionslimit. Es lag bei der vorliegenden Methode bei 2 µg/ml, im Vergleich dazu gelang bei der HPLC-Methode mit UV-Vis-Detektion der Nachweis von Matairesinol bis zu einer Konzentration von 100 ng/ml, bei einer Injektion von 10 µl. Für eine HPLC-MS-Methode ist ein Detektionslimit von 2,4 ng/ml Matairesinol (bei 50 µl Injektionsvolumen beschrieben (Milder et al., 2004). Bei der Analyse verschiedener Lignane und Isoflavonoide unter Verwendung einer coulombmetrischen Detektion wurden Detektionslimits von 3,4 – 50 pg (0,34 – 5 ng/ml) erreicht. Bezieht man bei der Berechnung der Nachweisgrenze der vorgestellten CE-Methode das Injektionsvolumen von 6 nl mit ein, so ergibt sich daraus eine Nachweisgrenze von 12 pg. Dieser Wert befindet sich in derselben Größenordnung wie die erreichten Nachweisgrenzen für HPLC. Allerdings ist das Vorliegen einer Mindestkonzentration von 2 µg/ml erforderlich.

3.1.4.3 Chirale Untersuchung von Matairesinol aus Früchten und getrockneten Stängeln von *Carthamus tinctorius*

Somit stand eine Methode zur chiralen Untersuchung des aus Früchten und Stängeln isolierten Matairesinols zur Verfügung.

Für die Analyse von Matairesinol aus Früchten stand dabei ausreichend Material zur Verfügung und die Bestimmung der absoluten Konfiguration konnte anhand mehrerer Proben vorgenommen werden. Das Matairesinol aus Früchten von *C. tinctorius* erwies sich dabei als linksdrehend. Beachtet man die Nachweisgrenze von Matairesinol in dieser Methode, so ist davon auszugehen, dass der Anteil an (-)-Matairesinol mindestens 99,3 % beträgt. Das Vorliegen von reinem (-)-Matairesinol ist wahrscheinlich, da bisher alle Butyrolacton-Lignane enantiomerenrein nachgewiesen worden sind (Suzuki et al., 2002; Umezawa, 2003)

Damit ist erstmals die absolute Konfiguration von Matairesinol aus *C. tinctorius* bestimmt worden. Die nachgewiesene Konfiguration entspricht derjenigen, welche bei Matairesinol und Arctigenin in den Früchten von *A. lappa* nachgewiesen worden ist. Da beide Arten der Asteraceenunterfamilie der Carduoideae angehören, war dieses Ergebnis nicht überraschend. Andererseits ist es möglich, dass man innerhalb derselben Gattung Lignane unterschiedlicher Konfiguration antrifft. So wiesen von Heimendahl et al. (2004) in den Zellkulturen von *Linum usitatissimum* reines (+)-Secoisolariciresinol nach, während in *Linum flavum* 100 % (-)-Secoisolariciresinol vorlag.

Bislang sind beide Matairesinol-Enantiomere in jeweils unterschiedlichen Pflanzenarten nachgewiesen worden (Umezawa, 2003). Die meisten Untersuchungen sind dabei an Stängeln, Blättern oder am Holz durchgeführt worden. Suzuki et al. (2002) untersuchten die absolute Konfiguration von Matairesinol in den Früchten von *A. lappa*, nicht aber in den Stängeln und fanden dabei die (-)-Form. Vergleichende Untersuchungen zur absoluten Konfiguration von Lignan an Früchten und Stängeln wurden hier lediglich für Secoisolariciresinol durchgeführt. Die bei diesem Lignan festgestellte Diskrepanz hinsichtlich der absoluten Konfiguration in den Blattstielen und den Früchten ließ die Frage aufkommen, ob sich dieser Unterschied im weiteren Verlauf der Biosynthese fortsetzt. Man weiß, dass in *L. album* die absolute Konfiguration von Secoisolariciresinol beibehalten wird. Von Heimendahl et al. (2005) isolierten aus Zellsuspensionskulturen dieser Art verschiedene Lignane; Pinoresinol lag hier racemisch vor, während von

Secoisolariciresinol ausschließlich das (-)-Enantiomer vorhanden war. Das Hauptlignan von *L. album*, nämlich Podophyllotoxin, welches im weiteren Verlauf der Biosynthese entsteht, entsprach in seiner absoluten Konfiguration dem Secoisolariciresinol und war ebenfalls linksdrehend. Allerdings ergibt sich dieser Sachverhalt nahezu selbstverständlich, da Secoisolariciresinol in dieser Art enantiomerenrein enthalten ist. Im Gegensatz dazu ließen sich in *A. lappa* Enantiomergemische von Secoisolariciresinol nachweisen, wobei in den Blattstängeln und den Früchten jeweils das gegensätzliche Enantiomer vorherrschte. Die in den Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit gefundene Menge an Matairesinol in den Stängeln erwies sich als äußerst gering, was die Untersuchungen zur absoluten Konfiguration erschwerte. Bereits in den GC-MS- und den HPLC-MS-Untersuchung zeigte sich, dass der in der präparativen HPLC isolierte Peak ein Gemisch aus mehreren Substanzen mit einem nur geringen Matairesinol-Anteil war. Die in der CE nachgewiesene Menge befand sich nur knapp oberhalb der Nachweisgrenze. Die Migrationszeit und die Zugabe von Matairesinol zeigte jedoch eindeutig, dass es sich dabei um (-)-Matairesinol handelte. (+)-Matairesinol wurde nicht nachgewiesen.

Auf der Stufe des Matairesinols konnte also kein Chiralitätsunterschied zwischen Stängeln und Früchten festgestellt werden. Unklar ist, ob es, wie bei *A. lappa*, auf der Stufe des Secoisolariciresinols einen Unterschied in der absoluten Konfiguration gibt. Sollte dies der Fall sein, so würde dies bedeuten, dass ausschließlich (-)-Secoisolariciresinol umgesetzt wird, unabhängig vom Anteil an vorhandenem (+)-Secoisolariciresinol. Dies wäre ein Beleg für die Stereospezifität des Enzyms Secoisolariciresinoldehydrogenase. Möglich ist jedoch auch, dass es keinen Chiralitätsunterschied zwischen Secoisolariciresinol aus Früchten und Stängeln von *C. tinctorius* gibt und in beiden Organen bereits ein Überschuss an (-)-Secoisolariciresinol vorhanden ist. Dies würde die These von Umezawa (2003) stützen, dass die enantiomere Zusammensetzung von Lignan über mehrere biosynthetische Schritte hinweg bestimmt wird. Beteiligt an dieser Selektion sind demnach zunächst das Dirigent Protein bei der Entstehung des Pinoresinols, danach die Pinoresinol-Lariciresinol-Reduktase und zum Schluss die Secoisolariciresinol-Dehydrogenase.

Um den Zeitpunkt der Enantioselektion in der Lignanbiosynthese in *C. tinctorius* näher zu bestimmen, müsste Secoisolariciresinol aus Früchten und Stängeln isoliert und auf seine absolute Konfiguration hin untersucht werden.

3.2 Antioxidative Aktivität von Lignan- und Asteraceenextrakten

Um das antioxidative Potential der zur Verfügung stehenden Asteraceenfrüchte zu bestimmen, sollten die aus ihnen gewonnenen Extrakte mehreren *in vitro*-Antioxidativtests unterzogen werden.

Zusätzlich wurden diese Tests mit verschiedenen Lignanstandards durchgeführt.

Alle Konzentrationsangaben für die Extrakte beziehen sich, sofern nicht anders angegeben, auf Gramm extrahiertes Pflanzenmaterial pro Liter Extraktionsmittel.

3.2.1 Bestimmung des Gesamtpolyphenolgehaltes in den Asteraceenextrakten

Zunächst erfolgte eine Untersuchung der Extrakte auf ihren Gesamtpolyphenolgehalt, um später eine Aussage darüber treffen zu können, inwieweit phenolische Substanzen an der antioxidativen Aktivität beteiligt waren. Dafür wurde mit allen Vollextrakten und Fraktionen der Folin-Ciocalteu-Test durchgeführt. Dieses Verfahren ist ursprünglich für die Tyrosinanalyse entwickelt (Folin und Ciocalteu, 1927) und später von Singleton und Rossi (1965) für den Nachweis von Phenolen optimiert worden. Der Test wird häufig dazu verwendet, den Gesamtpolyphenolgehalt von Extrakten abzuschätzen. Für die Berechnung des Gesamtphenolgehaltes wird eine phenolische Substanz als Bezug gewählt und mit dieser zunächst eine Eichreihe durchgeführt. Neben dem ursprünglich dafür verwendeten Gallussäure werden dafür in der Literatur auch Chlorogensäure, Kaffeesäure (Wang et al., 2003; Maranz et al., 2003) oder wie in der vorliegenden Arbeit Catechin genutzt (Vinson et al., 2001; Kähkönen et al., 2001; Katsube et al., 2003). Im Folgenden werden alle Polyphenolgehalte als % Catechinäquivalente pro Gramm Pflanzenmaterial ausgedrückt.

In den getesteten Asteraceenfrüchten wurden Gesamtpolyphenolgehalte von 0,6% (*C. jacea*) bis 2,4 % (*A. minus*) nachgewiesen (Abbildung 33).

Die höchsten Gehalte fanden sich in den vier *Arctium*-Arten.

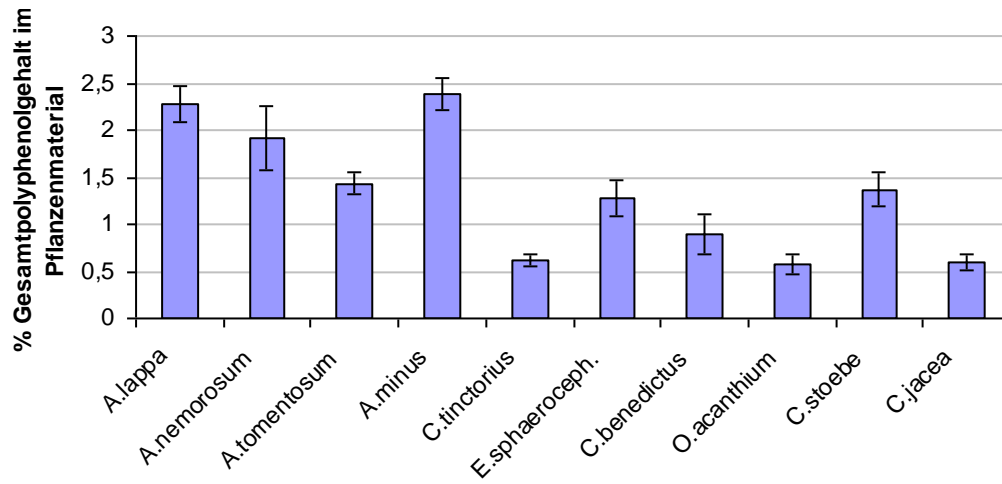


Abbildung 33 Gesamtpolyphenolgehalte, Massenprozent in Pflanzenmaterial bestimmt als Catechinäquivalente; Mittelwerte \pm Standardabweichung aus bei drei verschiedenen Extraktkonzentrationen bestimmten Polyphenolgehalten

Die Verteilung der Polyphenole zwischen den Extraktfraktionen unterschied sich zum Teil erheblich zwischen den Arten (Abbildung 34). Ein ähnliches Verteilungsmuster fand sich in allen *Arctium*-Arten und *C. benedictus*. Hier waren die anteilmäßig höchsten Gehalte jeweils in der Chloroform- und Butanolphase.

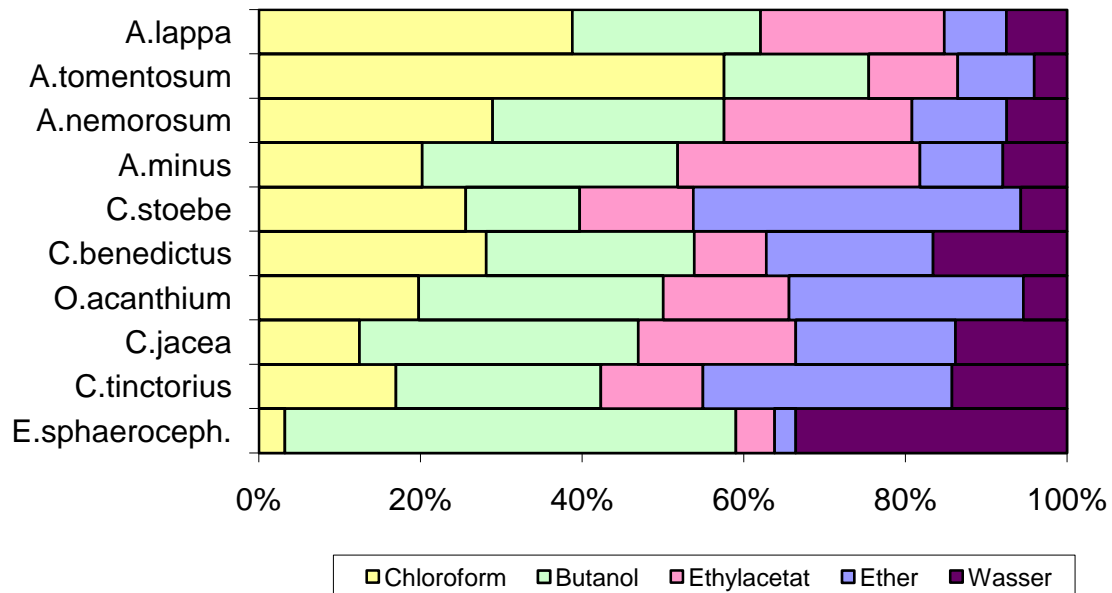


Abbildung 34 Prozentuale Verteilung der Polyphenolgehalte in den einzelnen Phasen nach fraktionierter Extraktion

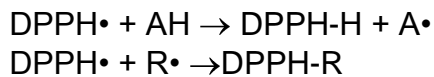
Die meisten Extrakte zeigten einen relativ geringen Polyphenolanteil in der wässrigen Phase.

Ein abweichendes Verteilungsmuster im Vergleich zu allen anderen Extrakten zeigte *E. sphaerocephalus*. Hier waren nur sehr geringe Polyphenolkonzentrationen in der

Ether-, Chloroform- und Ethylacetatphase vorhanden, während die höchsten Anteile in der Butanol- und Wasserphase messbar waren.

3.2.2 Nachweis von Radikalfängereigenschaften mit dem DPPH-Test

Das DPPH-Radikal ist ein stabiles Modellradikal, welches erstmals von Blois (1958) zur Bestimmung antioxidativer Aktivität eingesetzt worden ist. Das farbige Radikal hat ein Absorptionsmaximum bei 515 nm in Methanol und lässt sich so photometrisch erfassen. Dabei ist wichtig, dass nur das Radikal selbst gefärbt ist; die stabilisierte Substanz ist in methanolischer Lösung farblos. Im Verlauf der Stabilisierungsreaktion des Radikals mit einer antioxidativen Substanz (Schema 1) oder mit einem anderen Radikal nimmt somit die Färbung und damit auch die Absorption bei $\lambda=515$ nm ab.



Schema 1 Reaktion des DPPH-Radikals (DPPH \cdot) mit einem Antioxidans (AH) und mit einem Radikal (R \cdot)

Als Maß für die Radikalfängereigenschaften kann die EC₅₀ verwendet werden, d.h. die Konzentration an Extrakt, welche eine Reduktion der Konzentration an DPPH-Molekülen um 50 % bewirkt. Dabei fließen sowohl die Konzentration als auch das Potential der radikalstabilisierenden Substanzen der Extrakte ein.

3.2.2.1 Lignanstandards im DPPH-Test

Der DPPH-Test wurde zunächst mit den Lignanstandards Arctiin, Arctigenin, Matairesinol und Secoisolariciresinol durchgeführt. Arctiin, Arctigenin und Matairesinol sind in großen Mengen in verschiedenen Asteraceenarten enthalten (Palter und Lundin, 1970; Hänsel et al., 1964; Marco et al 1992). Secoisolariciresinol ist weit verbreitet in verschiedenen Nahrungspflanzen, z. B. in bestimmten Beeren und Leinsamen (Mazur et al., 2000; Dixon, 2004) und auch dokumentiert in Asteraceenarten (Suzuki et al., 1998; Milder et al., 2005).

Als zusätzlicher Standard wurde Ascorbinsäure getestet, um den Vergleich zu einer bekannten, *in vitro* und *in vivo* wirksamen antioxidativen Substanz ziehen zu können (Brandwilliams et al., 1995; Prior et al., 2005; Diplock, 1998).

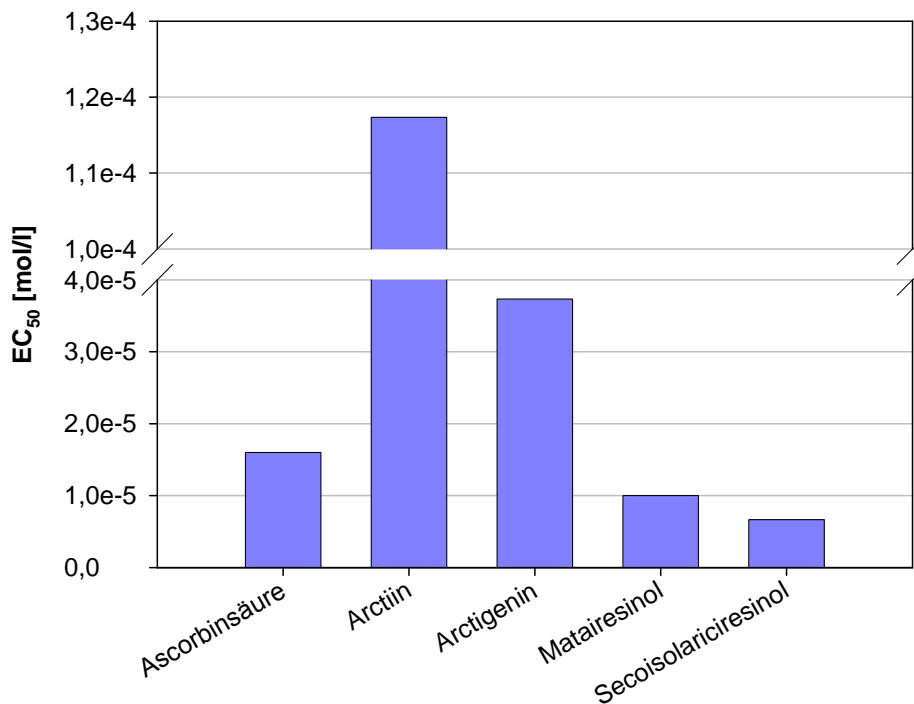


Abbildung 35 Aktivität verschiedener Lignanstandards und Ascorbinsäure im DPPH-Test, Mittelwerte aus n=3 Messungen, V_k < 5 %

Die höchste Aktivität im Test zeigten Secoisolariciresinol und Matairesinol mit einem EC₅₀-Wert von $\leq 10^{-5}$ M im Assayvolumen. Ascorbinsäure war im Vergleich dazu etwas weniger aktiv mit einer EC₅₀ von $1,5 \cdot 10^{-5}$ M (Abbildung 35).

Die nächsthöhere Aktivität zeigte Arctigenin gefolgt von dessen Glykosid Arctiin. Arctiin zeigte mit $1,8 \cdot 10^{-3}$ M nur ca. 1/3 der Aktivität seines Aglykons Arctigenin.

3.2.2.2 Asteraceenextrakte im DPPH-Test

Zunächst wurden die Aktivitäten der Vollextrakte betrachtet.

Die EC₅₀-Werte lagen zwischen und 0,06 und 1g extrahiertem Pflanzenmaterial pro Liter (Abbildung 36). Die Abweichungen der Einzelmessungen im DPPH-Test waren so gering, dass man für die EC₅₀-Werte Variationskoeffizienten von < 5 % erhielt, so dass auf die Angabe von Fehlerbalken verzichtet wurde (Messwerte s. Anhang).

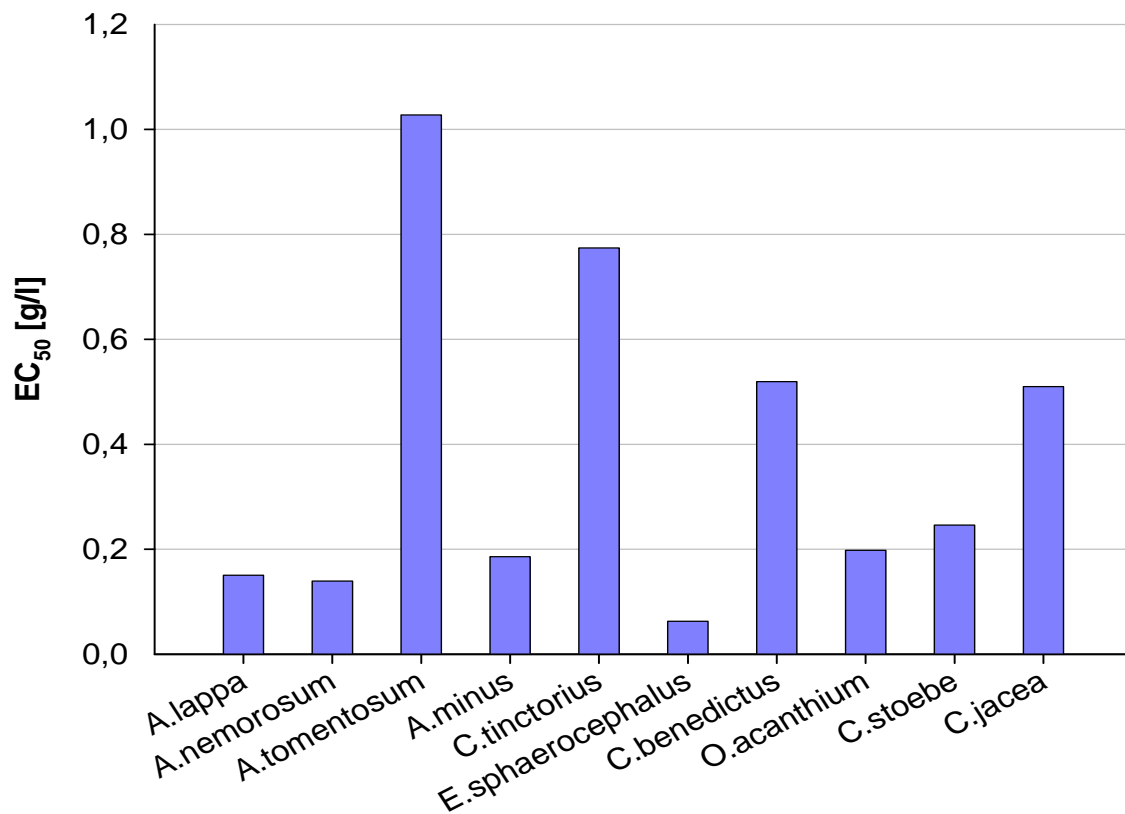


Abbildung 36 Aktivitäten der Vollextrakte im DPPH-Test, Mittelwerte aus n=3 Messungen, V_k < 5 %

Die höchste Aktivität zeigte der Extrakt aus *E. sphaerocephalus*, gefolgt von denen aus *A. nemorosum*, *A. lappa*, *A. minus* und *C. stoebe*.

Die geringste Aktivität wies der Extrakt aus *A. tomentosum* auf.

Für die fünf aktivsten Extrakte ist die jeweilige Verteilung der Aktivitäten zwischen den Fraktionen in Abbildung 37 dargestellt. In den drei genannten *Arctium*-Arten wurde die höchste Aktivität jeweils in der Chloroform- und Butanolphase gemessen, gefolgt von der Ethylacetat- und Wasserphase (Abbildung 37). Die geringste Aktivität wies jeweils die Etherphase auf.

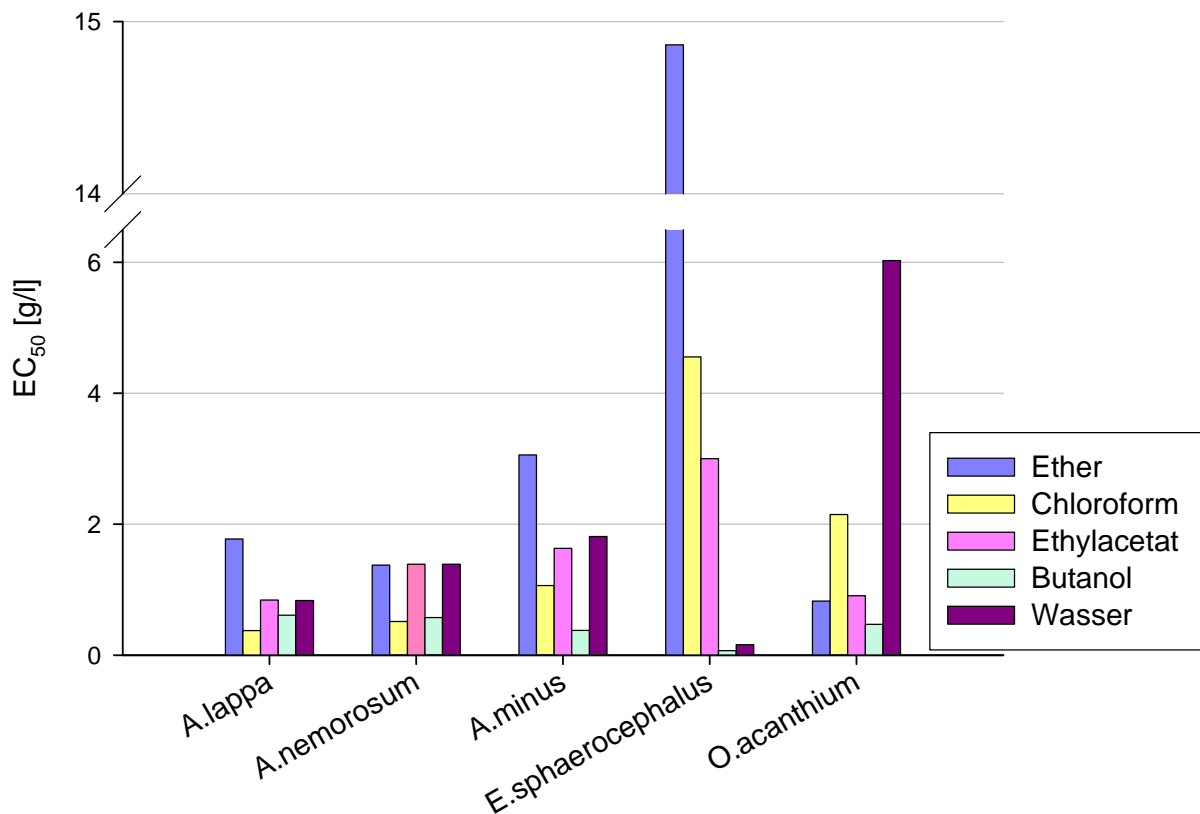


Abbildung 37 Aktivitäten ausgewählter Extraktfraktionen im DPPH-Test, Mittelwerte aus n=3 Messungen, $V_k < 5\%$

Ein völlig anderes Verteilungsmuster zeigten *O. acanthium* und *E. sphaerocephalus*. Beim Extrakt aus *O. acanthium* wies die Butanolphase die höchste Aktivität auf gefolgt von der Ether- und Ethylacetatphase. Die geringste Aktivität fand sich in der wässrigen Phase.

Im Extrakt von *E. sphaerocephalus* gab es auffallend große Unterschiede zwischen den einzelnen Fraktionen. So wiesen die Ethylacetat-, Chloroform- und insbesondere die Etherphase nur sehr geringe Aktivitäten auf während die Butanol- und die Wasserphase die höchsten gemessenen Aktivitäten von allen getesteten Extrakten hatten.

Die Abweichungen zwischen einigen Extrakten in der Verteilung ihrer Aktivität auf die verschiedenen Fraktionen deuten darauf hin, dass unterschiedliche Stoffklassen in den Extrakten für die Radikalfängereigenschaften verantwortlich sein könnten.

3.2.3 Nachweis der Fähigkeit zur Eisenreduktion mit dem FRAP-Test

Der FRAP-Test wurde ursprünglich von Benzie und Strain (1996) entwickelt. Es handelt sich dabei um eine Methode zur Bestimmung der antioxidativen Aktivität von Blutplasma aufgrund seines Eisen-Reduktionspotentials. Dabei wird Eisen(III) zu Eisen(II) reduziert, welches mit TPTZ (2,3,6-Tripyridyl-s-triazin) einen farbigen Komplex bildet. Dieser Komplex hat ein Absorptionsmaximum bei $\lambda=593\text{nm}$ und kann photometrisch erfasst werden.

Die Angabe der Aktivitäten erfolgt in der vorliegenden Arbeit in $\text{EC}_{2 \cdot 10^{-5} \text{M Fe}}$. Dies entspricht der Konzentration an Extrakt, welche erforderlich ist, um $2 \cdot 10^{-5} \text{M Fe(III)}$ zu Fe(II) zu reduzieren. Der Wert wurde so gewählt, dass auch Extrakte mit geringer Aktivität die entsprechende Absorption erreichen konnten.

3.2.3.1 Lignanstandards im FRAP-Test

Der FRAP-Test wurde zunächst mit den im Kapitel 3.2.2.1 verwendeten Standardsubstanzen durchgeführt (Abbildung 38). Die Abweichungen der Einzelmessungen im FRAP-Test waren so gering, dass man für die $\text{EC}_{2 \cdot 10^{-5} \text{M Fe}}$ – Werte Variationskoeffizienten von $< 5\%$ erhielt, so dass auf die Angabe von Fehlerbalken verzichtet wurde (Messwerte s. Anhang).

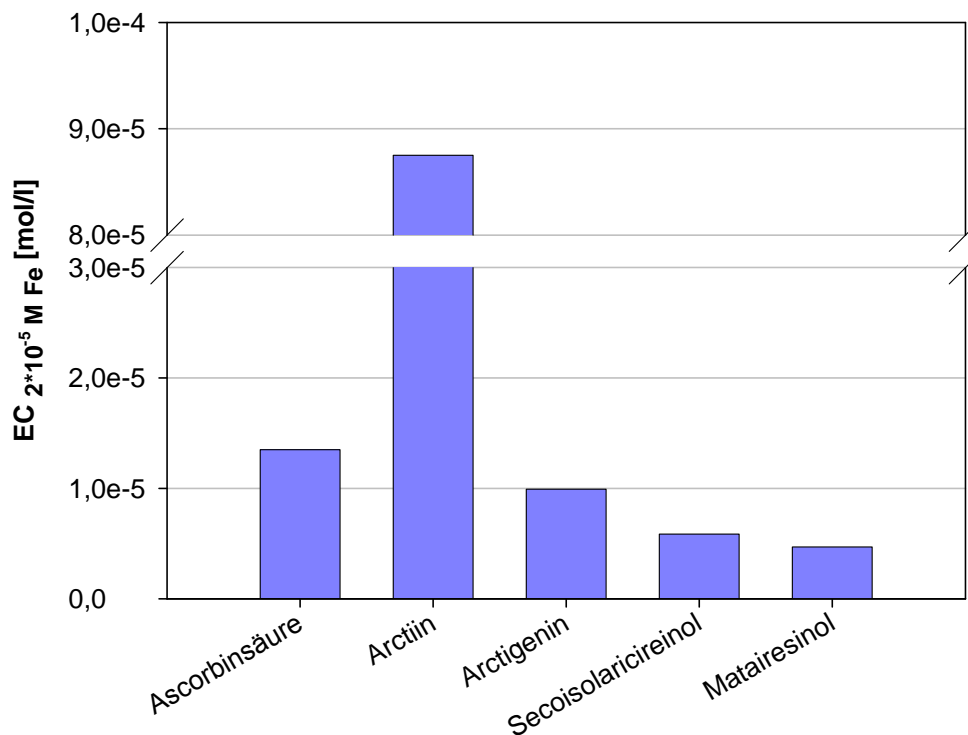


Abbildung 38 Aktivität verschiedener Lignanstandards und Ascorbinsäure im FRAP-Test, Mittelwerte aus $n=3$ Messungen, $\text{V}_k < 5\%$

Die höchsten Aktivitäten zeigten Matairesinol und Secoisolariciresinol, gefolgt von Arctigenin, alle mit einer $EC_{2 \cdot 10^{-5} M Fe}$ von unter $10^{-5} M$. Arctigenin ist ca. 9 mal aktiver als sein Glykosid Arctiin. Ascorbinsäure ist mit $1,4 \cdot 10^{-5} M$ etwas weniger aktiv als die getesteten Lignanaglyka.

3.2.3.2 Asteraceenextrakte im FRAP-Test

Die $EC_{2 \cdot 10^{-5} M Fe}$ -Werte der Extrakte erstreckten sich von 0,06 g/l im Extrakt von *A. lappa* bis zu 0,47 g/l im Extrakt von *C. tinctorius* (Abbildung 39).

Am aktivsten waren die Extrakte aus den drei *Arctium*-Arten *A. lappa*, *A. nemorosum* und *A. minus*, gefolgt von denen aus *E. sphaerocephalus* und *C. stoebe*.

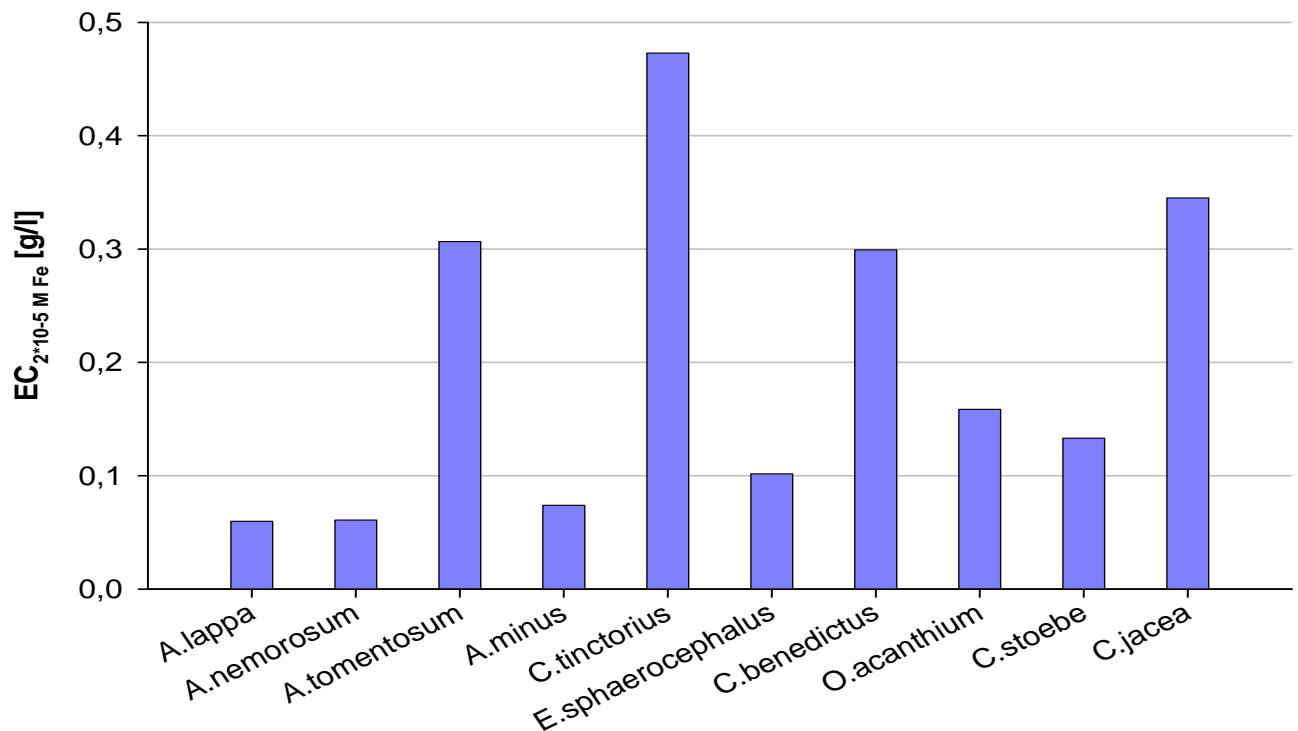


Abbildung 39 Antioxidative Aktivität der Vollextrakte im FRAP-Test, Mittelwerte aus n=3 Messungen, $V_k < 5\%$

Betrachtet man die Aktivitäten der einzelnen Fraktionen aus den genannten Extrakten (Abbildung 40), so zeigt sich für die *Arctium*-Arten ein jeweils ähnliches Verteilungsmuster. Beim Vergleich der Fraktionen aus *A. lappa* und *A. nemorosum* waren die Chloroform- und die Butanolfraktion am aktivsten, in *A. minus* die Butanolfraktion.

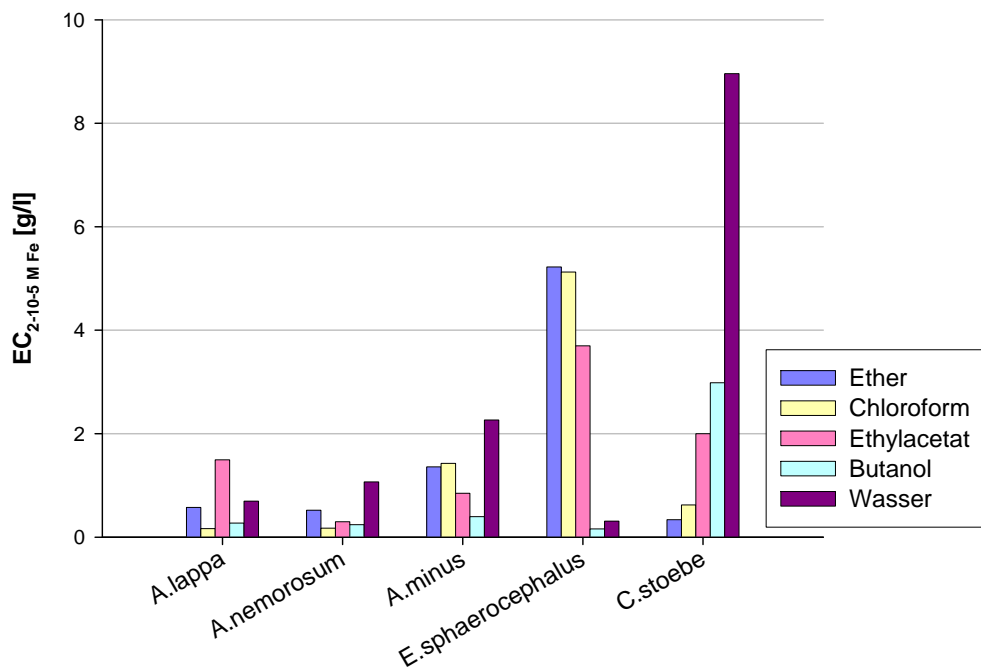


Abbildung 40 Aktivitäten ausgewählter Extraktfraktionen im FRAP-Test, Mittelwerte aus n=3 Messungen, $V_k < 5\%$

Am wenigsten aktiv war jeweils die Wasserfraktion aus *A. minus* und *A. nemorosum* sowie die Ethylacetatfraktion aus *A. lappa*. Insgesamt war das Eisenreduktionspotential der einzelnen Fraktionen aus den drei genannten *Arctium*-Arten in einer vergleichbaren Größenordnung. Die Extrakte aus *E. sphaerocephalus* und *C. stoebe* zeigten hingegen nach der fraktionierten Extraktion größere Abweichungen zwischen den Aktivitäten der einzelnen Fraktionen. Die aktivsten Fraktionen in *E. sphaerocephalus* waren die Butanol- und die Wasserfraktion mit 0,16 bzw. 0,3 g/l. Im Vergleich dazu lagen die $EC_{2 \cdot 10^{-5} M Fe}$ -Werte der am wenigsten aktiven Fraktionen Ether und Chloroform mit jeweils über 5 g/l um das 15- bis 30-fache höher.

Der Extrakt aus *C. stoebe* zeigte, abweichend von allen anderen Extrakten, die höchste Aktivität in der Etherphase mit einer $EC_{2 \cdot 10^{-5} M Fe}$ von 0,3 g/l. Die nächsthöhere Aktivität zeigte sich in der Chloroformphase mit 0,6 g/l effektiver Konzentration. Die wässrige Phase wies im Vergleich dazu mit einer $EC_{2 \cdot 10^{-5} M Fe}$ von 9 g/l eine geringe Aktivität auf.

3.2.4 Korrelation von Gesamtpolyphenolgehalt, EC_{50} - und $EC_{2 \times 10^{-5} M Fe}$ -Werten

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den ermittelten Polyphenolgehalten und den Ergebnissen der Antioxidativtests aufzuzeigen, wurden die Ergebnisse miteinander korreliert. Dafür wurden die berechneten Polyphenolgehalte aus den einzelnen Extraktfraktionen gegen die $1/EC_{50}$ -Werte dieser Fraktionen aus dem DPPH-Test bzw. gegen die $1/EC_{2 \times 10^{-5} M Fe}$ aus dem FRAP-Test aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt (Abbildung 41).

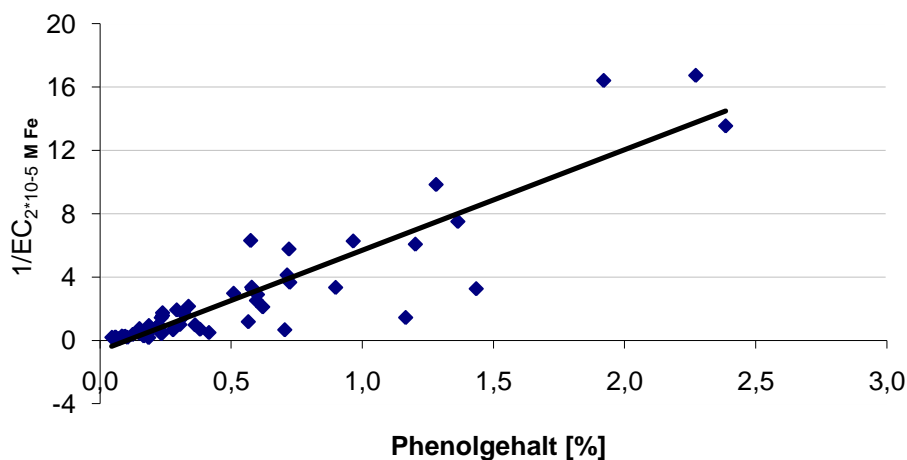


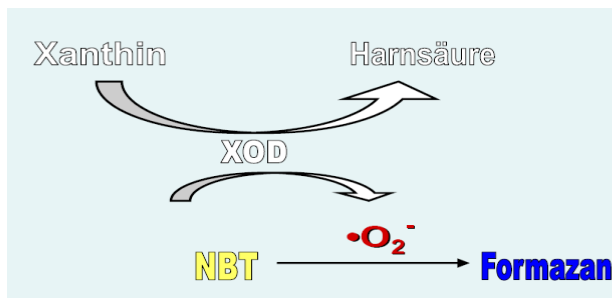
Abbildung 41 Lineare Regression der Polyphenolgehalte und der Aktivitäten im FRAP-Test der Fraktionen und Vollextrakte aus den Asteraceenfrüchten

Bei Auftragen der Polyphenolgehalte gegen die Ergebnisse des FRAP-Tests ergab sich dabei eine relativ gute Korrelation von $R^2=0,82$ (Abbildung 41), phenolische Substanzen scheinen hier also eine große Rolle zu spielen. Sehr schlecht korrelierten hingegen die Ergebnisse von Folin-Ciocalteu-Test und DPPH-Test. Hier betrug R^2 lediglich 0,37. Dies deutet darauf hin dass die im DPPH-Test aktiven Substanzen aus den Asteraceenextrakten nicht ausschließlich phenolischer Natur waren.

Dass sich im FRAP- und im DPPH-Test teilweise unterschiedliche Substanzen aktiv zeigten, wurde auch bei der Korrelation der Ergebnisse beider Tests deutlich. R^2 war mit 0,67 verhältnismäßig gering.

3.2.5 Nachweis der Fähigkeit zur Inaktivierung von reaktiven Sauerstoffspezies mit dem XOD-Test

Bei dem XOD-Test handelt es sich um ein zweistufiges Testsystem (Giannopolitis und Ries, 1977). Im ersten Schritt wird Xanthin durch das Enzym Xanthinoxidase (XOD) zu Harnsäure umgesetzt. Dabei entsteht ein Superoxid-Radikal, welches NBT (Nitroblautetrazoliumchlorid) zu dem blauen Farbstoff Formazan reduziert (Schema 2). Formazan kann photometrisch erfasst werden. Die Anwesenheit einer antioxidativen Substanz verhindert bzw. reduziert die Bildung von Formazan.



Schema 2 Umsatz von NBT zu Formazan durch enzymatisch gebildetes Superoxid

Der XOD-Test wurde mit den zuvor verwendeten Lignanstandards durchgeführt.

Als antioxidative Vergleichssubstanz konnte nicht, wie bei den anderen Tests, Ascorbinsäure eingesetzt werden, da Ascorbinsäure selbst NBT zu Formazan reduziert (Wassileva-Alexandrova und Nejtševa, 1979).

Als Vergleichsstandard wurde deshalb Catechin verwendet, welches sich in verschiedenen *in vitro* Tests (Unno et al., 2000; Nanjo et al., 1996) als potentes Antioxidans erwiesen hatte.

Es zeigte sich, dass die Lignane in diesem Test für eine nachweisbare Aktivität in vergleichsweise hohen Konzentrationen eingesetzt werden mussten. Für Arctigenin konnte aufgrund der geringen Wasserlöslichkeit die erforderliche Konzentration für eine halbmaximale Reduktion der Formazanbildung nicht erreicht werden. Deshalb wird für alle getesteten Komponenten die EC_{30} , also die erforderliche Konzentration für eine 30%ige Reduktion angegeben (Tabelle 8)

Tabelle 8 EC₃₀-Werte für Lignanstandards und für Catechin im XOD-Test; Mittelwerte ± Standardabweichungen, n=6

	EC ₃₀ (M)
Catechin	$8,8 \cdot 10^{-6} \pm 2,3 \cdot 10^{-6}$
Arctigenin	$8,9 \cdot 10^{-4} \pm 4,5 \cdot 10^{-4}$
Matairesinol	$1,1 \cdot 10^{-3} \pm 3,6 \cdot 10^{-4}$
Arctiin	$4,5 \cdot 10^{-3} \pm 7,1 \cdot 10^{-4}$
Secoisolariciresinol	keine Aktivität

Catechin zeigte von allen getesteten Substanzen die höchste Aktivität. Die Aktivitäten der beiden Lignanaglyka Arctigenin und Matairesinol im Test waren miteinander vergleichbar. Im Vergleich zu Catechin waren ihre EC₃₀-Werte aber um mehr als das 100-fache höher. Die EC₃₀ von Arctiin betrug im Vergleich zu dessen Aglykon Arctigenin etwa das Fünffache. Secoisolariciresinol zeigte in diesem Test keine Aktivität.

3.2.6 Bestimmung der Xanthinoxidase-Inhibition

3.2.6.1 Xanthinoxidase-Inhibition durch Standardsubstanzen

Um auszuschließen, dass die inhibitorische Wirkung der Lignane auf einer direkten Hemmung der Xanthinoxidase beruht und nicht auf einer Inaktivierung des Superoxid-Radikals, wurde ein Xanthinoxidase-Hemmtest durchgeführt.

Der Test wurde nach Masuoka und Kubo (2004) durchgeführt. Die Lignane wurden jeweils in einer Konzentration getestet, die zwischen ihrer EC₃₀ und der maximalen im XOD-Test eingesetzten Konzentration lag.

Alle Lignane zeigten in diesen Konzentrationen eine Hemmung von 88 – 95%. Der Test wurde auch mit Catechin in einer entsprechenden Konzentration durchgeführt. Hierbei blieb die Aktivität des Enzyms im Vergleich zum Blindwert unverändert.

Es kann daher davon ausgegangen werden, dass für die getesteten Lignane zumindest ein Großteil der im XOD-Test gezeigten Aktivität, auf eine direkte Hemmung der Xanthinoxidase zurückzuführen ist.

3.2.6.2 Xanthinoxidase-Inhibition durch Asteraceenextrakte

Da die Lignane in den Asteraceenextrakten in vergleichsweise geringer Konzentration vorlagen, wurde getestet, ob der XOD-Test trotz der Hemmwirkung

der Lignane mit den Extrakten durchgeführt werden konnte. Es wurden alle Vollextrakte auf eine Hemmwirkung auf die XOD geprüft.

Es zeigte sich, dass alle Extrakte eine Hemmung der XOD von über 40 % bewirkten (Tabelle 9). Die Extrakte aus *E. sphaerocephalus*, *O. acanthium* und *C. stoebe* führten zu einer vollständigen Inaktivierung des Enzyms.

Tabelle 9 Hemmung der XOD durch Asteraceenextrakte, eingesetzt jeweils Vollextrakte, 10 g/l im Reaktionsgemisch (bezogen auf g extrahiertes Pflanzenmaterial pro l); Mittelwerte \pm Standardabweichung, n=3

Art	Hemmung (%)
<i>A. lappa</i>	82 \pm 12,6
<i>A. nemorosum</i>	70 \pm 13,9
<i>A. tomentosum</i>	44 \pm 4,0
<i>A. minus</i>	88 \pm 4,5
<i>C. tinctorius</i>	77 \pm 29,7
<i>E. sphaerocephalus</i>	100
<i>C. benedictus</i>	47 \pm 9,9
<i>O. acanthium</i>	100
<i>C. stoebe</i>	100
<i>C. jacea</i>	67 \pm 18,5

Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass der XOD-Test nicht für den Nachweis einer antioxidativen Aktivität der aufgeführten Asteraceenextrakte geeignet ist. Von der Durchführung wurde deshalb abgesehen.

3.2.7 Nachweis von Lignan in Asteraceenextrakten mit DC und HPLC

Alle Vollextrakte und Fraktionen aus den Asteraceenfrüchten wurden mit DC auf das Vorhandensein der Lignanaglyka Arctigenin, Matairesinol und Secoisolariciresinol geprüft (Abbildung 42).

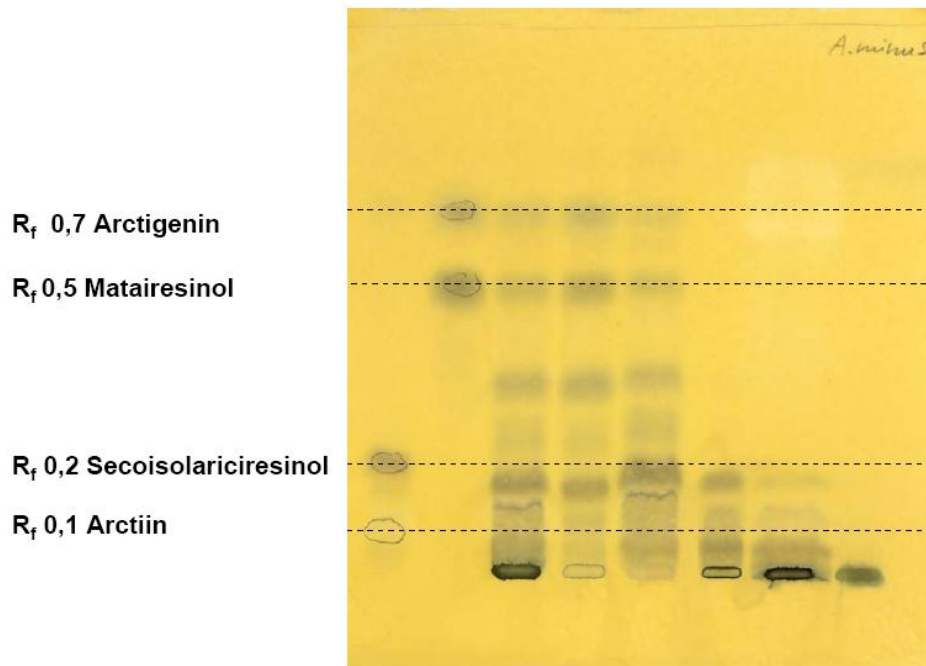


Abbildung 42 Dünnschichtchromatogramm aus unhydrolysiertem Vollextrakt und Fraktionen von *A. minus*; 1 Lignanstandards Secoisolariciresinol (15 µg) und Arctiin (40 µg); 2 Lignanstandards Arctigenin (15 µg) und Matairesinol (15 µg); 3 Vollextrakt aus 2,5 mg extrahiertem Pflanzenmaterial (gemahlene Früchte); Fraktionen aus je 10 mg extrahiertem Pflanzenmaterial : 4 Ether; 5 Chloroform; 6 Ethylacetat; 7 Butanol; 8 Wasser; Laufmittel MeOH/Chloroform 1:10; Sprühreagenz FeCl₃ 100 g/l in 2 mM HCl

Um auch die korrespondierenden Glykoside zu erfassen, wurden die Fraktionen einer sauren Hydrolyse unterzogen und danach mit DC getestet.

Einige besonders aktive Fraktionen wurden sowohl hydrolysiert als auch unhydrolysiert zusätzlich per HPLC geprüft (Beispiel-HPLC siehe Abbildung 43).

Anhand dieser HPLCs wurde im Vergleich mit den DCs die Lignangehalte in allen Fraktionen abgeschätzt. Da viele Fraktionen ausschließlich mit DC getestet worden sind, können bezüglich der Lignangehalte nur jeweils Gehaltsbereiche angegeben werden. Die Gehaltsbereiche sind in Tabelle 10 zusammengefasst.

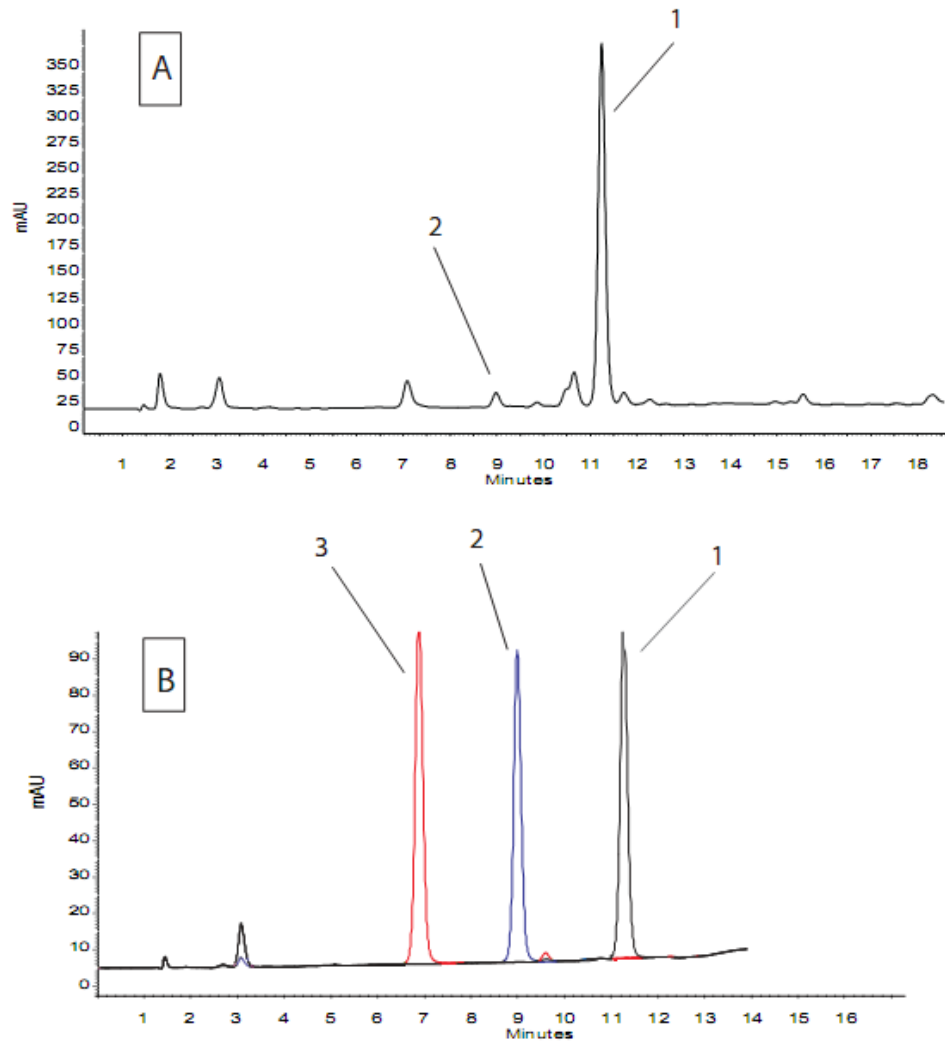


Abbildung 43 Beispiel-HPLC halbquantitative Bestimmung von Lignan in Asteraceenextrakten; A: HPLC von Vollextrakt aus den Früchten von *Arctium lappa*; B: Chromatogramme der Lignanstandards Arctigenin (1), Matairesinol (2) und Secoisolariciresinol (3); Anmerkung: Peak bei 7 min in Chromatogramm A konnte aufgrund seines UV-Vis-Spektrums nicht als Secoisolariciresinol identifiziert werden

Das Lignan Secoisolariciresinol konnte mit den verwendeten Methoden in keinem der Extrakte – weder hydrolysiert noch unhydrolysiert - nachgewiesen werden.

In den unhydrolysierten Extrakten erstreckten sich die Gehalte an Arctigenin und Matairesinol von 0 bis 0,15 %. Die höchsten Gehalte ließen sich in den *Arctium*-Arten nachweisen, gefolgt von *C. jacea* und *C. stoebe*.

Tabelle 10 Gehalte an Arctigenin und Matairesinol in verwendeten Asteraceenfrüchten aus unhydrolysierten und hydrolysierten Extrakten, Angabe in mg/g extrahiertes Pflanzenmaterial

Art	Unhydrolysierte Extrakte		Hydrolysierte Extrakte	
	Arctigenin	Matairesinol	Arctigenin	Matairesinol
<i>A. lappa</i>	1 – 1,5	1 – 1,5	> 30	0,5 - 1,5
<i>A. minus</i>	1 – 1,5	0,5 – 1	20 - 30	0,5 - 1,5
<i>A. tomentosum</i>	1 – 1,5	0,5 – 1	20 - 30	0,5 - 1,5
<i>A. nemorosum</i>	1 – 1,5	0,5 – 1	20 - 30	0,1 - 0,5
<i>C. tinctorius</i>	0,1 – 0,5	0,1 – 0,5	0,1 - 0,5	0,1 - 0,5
<i>E. sphaerocephalus</i>	-	-	-	-
<i>C. benedictus</i>	0,1 – 0,5	0,5 – 1	1-10	0,1 - 0,5
<i>O. acanthium</i>	0,1 – 0,5	< 0,1	0,1 - 0,2	< 0,1
<i>C. stoebe</i>	0,1 – 0,5	0,5 – 1	10 - 20	< 0,1
<i>C. jacea</i>	0,1 – 0,5	1 – 1,5	10 - 20	0,5 - 1,5

Sehr geringe Gehalte waren in *C. tinctorius* sowie in *O. acanthium* vorhanden.

In *E. sphaerocephalus* ließ sich keines der genannten Lignanaglyka nachweisen.

Im Gegensatz zu den unhydrolysierten Extrakten lag nach Hydrolyse in den meisten Extrakten Arctigenin 20- bis 100fach höher konzentriert vor als Matairesinol. Der höchste Gehalt an Arctigenin fand sich in *A. lappa* mit über 30 mg/g Pflanzenmaterial, gefolgt von den übrigen *Arctium*-Arten sowie den beiden *Centaurea*-Arten. In den hydrolysierten Extrakten aus den *Arctium*-Arten fanden sich mit 0,5 – 1,5 mg/g auch die höchsten Gehalte an Matairesinol zusammen mit *C. jacea*.

Nur geringe Gehalte an Arctigenin und Matairesinol fanden sich in den hydrolysierten Extrakten von *O. acanthium* und *C. tinctorius*. In *E. sphaerocephalus* konnten keine der genannten Lignane nachgewiesen werden.

Für die aktivsten Extrakte wurde zusätzlich das Vorhandensein weiterer Lignane getestet, die als Standardsubstanzen verfügbar waren, nämlich Hydroxymatairesinol, Nortrachelogenin, Isolariciresinol, Pinoresinol und Lariciresinol. Sie konnten in den

Extrakten nicht nachgewiesen werden bzw. lagen in so geringer Konzentration vor, dass eine eindeutige Identifizierung nicht möglich war.

Für lignanhaltige Extrakte ist in Tabelle 11 die durchschnittliche Verteilung von Matairesinol und Arctigenin – jeweils in unhydrolysierten und in hydrolysierten Extrakten - dargestellt. Für die unhydrolysierten Extrakte war die Verteilung bei allen getesteten Arten gleich. Der größte Teil fand sich in der Etherfraktion, ein weitaus geringerer Teil in der Chloroformfraktion.

Tabelle 11 Durchschnittliche Verteilung der Lignane zwischen den Fraktionen in %

%	Ether	Chloroform	Ethylacetat	Butanol	Wasser
Arctigenin im unhydr. Extrakt	75	25	-	-	-
Matairesinol im unhydr. Extrakt	75	25	-	-	-
Arctigenin im hydr. Extrakt	0 - 25	0 - 75	0- 75	0 - 75	0 - 50
Matairesinol im hydr. Extrakt	0 - 75	0 - 75	0 - 75	0 - 75	0

Ein uneinheitliches Bild ergab sich jedoch für die beiden Lignane nach Hydrolyse der Fraktionen. In jeder Fraktion wurde zumindest bei einer Art Matairesinol oder Arctigenin nachgewiesen. Am häufigsten war dies jedoch der Fall in den Fraktionen Chloroform, Ethylacetat und Butanol.

3.2.8 Diskussion

3.2.8.1 Antioxidative Aktivität von Lignanen

Lignane gehören zur Substanzklasse der Polyphenole und somit zu einer Gruppe, welche bereits vielfach positiv auf ihre antioxidative Wirkung hin getestet worden ist (Kähkönen et al., 2001; Vinson et al., 2001; Duthie und Crozier, 2000). Auch Lignane selbst wurden hinsichtlich ihrer antioxidativen Eigenschaften in den letzten Jahren vermehrt untersucht (Eklund et al., 2005; Hosseinian et al., 2007; Pietarinen et al., 2006; Shoeb et al., 2005). Dabei wurde für manche Lignane eine antioxidative Aktivität gemessen, welche sich in der gleichen Größenordnung befand wie die der Flavonoide oder sogar erheblich höher war (Shoeb et al., 2005; Pietarinen et al., 2006). Eklund et al. (2005) konnten zeigen, dass einige Lignane im DPPH-Test eine höhere antioxidative Aktivität aufwiesen als die antioxidativ wirksamen Vitamine Tocopherol und Ascorbinsäure und auch aktiver waren als das in der Nahrungsmittelindustrie eingesetzte Antioxidans BHT. Die schwächer wirksamen pflanzlichen Lignane bewegten sich hinsichtlich ihrer EC₅₀-Werte immer noch im

gleichen Konzentrationsbereich, wie die genannten Antioxidantien. Die EC_{50} von Lignanaglyka bewegten sich in diesem Test im Allgemeinen im ein- oder zweistelligen mikromolaren Bereich. Diese Ergebnisse konnten hier bestätigt werden. Auch die in den vorliegenden Tests gefundenen relativen Unterschiede in der Aktivität der Lignane stimmten weitestgehend mit der Literatur überein.

Die EC_{50} - bzw. die $EC_{2 \cdot 10^{-5} MFe}$ -Werte von Matairesinol und Secoisolariciresinol bewegten sich im gleichen Konzentrationsbereich. Beide Substanzen erwiesen sich in beiden Tests als etwas aktiver als Ascorbinsäure. Vergleichbare EC_{50} -Werte für die beiden Lignane im DPPH-Test fanden sich auch bei Eklund et al. (2005).

Arctigenin zeigte sich in den beiden Tests zwei- bis sechsfach weniger aktiv als die beiden erstgenannten Lignane. Die Glykosidierung zu Arctiin führte zu einem erheblichen Aktivitätsabfall.

Ähnliches fanden Shoeb et al. bei ihren Untersuchungen 2005. Bei den vergleichenden Untersuchungen von Matairesinol, Arctigenin und Arctiin mit dem DPPH-Test waren die Unterschiede etwas größer als in der vorliegenden Arbeit, die Relationen der Aktivitäten stimmte aber überein. So war Matairesinol im Vergleich zu Arctigenin um das 10-fache aktiver, die Aktivität von Arctiin war im Vergleich zu Arctigenin wiederum um den Faktor 10 reduziert. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Anzahl der freien OH-Gruppen für die antioxidative Aktivität eine Rolle spielt.

Dies trifft nach bisherigen Forschungsergebnissen in begrenztem Maß zu, ausschlaggebend ist allerdings auch die Position der vorhandenen OH-Gruppen. So zeigte Enterolacton, welches über zwei phenolische OH-Gruppen verfügt, keine messbare antioxidative Aktivität im DPPH-Test (Eklund et al., 2005). Beide OH-Gruppen befinden sich in meta-Position zur Methylengruppe und ermöglichen somit keine Resonanzstabilisierung des Phenoxyradikals in der Benzylstruktur. Für eine antioxidative Aktivität ist es jedoch erforderlich, dass eine vorhandene OH-Gruppe sich in para-Position zur Methylengruppe befindet. Eine zusätzliche freie Hydroxylgruppe in meta-Position verstärkt allerdings die antioxidative Aktivität (Eklund et al., 2005). Eine Struktur, welche diese Eigenschaften besitzt und im DPPH-Test eine starke antioxidative Wirkung gezeigt hat, ist Didemethylmatairesinol (Eklund et al. 2005). Zur Verdeutlichung der genannten Strukturmerkmale sind Enterolacton und Didemethylmatairesinol in Abbildung 44 dargestellt.

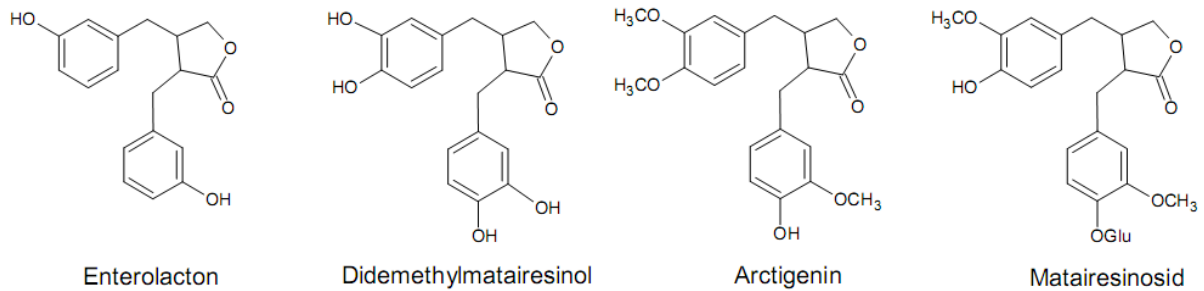


Abbildung 44 Lignanstrukturen: Enterolacton (1), Didemethylmatairesinol (2), Arctigenin (3) und Matairesinosid (4)

In den Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit führte eine Glykosidierung der freien OH-Gruppe von Arctigenin zu Arctiin im DPPH-Test zu einer Verdreifachung der EC_{50} , im FRAP sogar zu mehr als einer Verzehnfachung. Shoeb et al. (2005) stellten eine Versechsfachung der EC_{50} durch Glykosidierung von Arctigenin fest. Diese Arbeitsgruppe untersuchte zusätzlich die antioxidative Aktivität von Matairesinosid, d. h. von monoglucosidiertem Matairesinol. Hier fand im Vergleich zu Matairesinol kaum eine Abschwächung der antioxidativen Aktivität statt. Methyliert man hingegen beide freien OH-Gruppen des Matairesinols zu Dimethylmatairesinol, so lässt sich eine antioxidative Aktivität im DPPH-Test nicht mehr oder nur in sehr hohen Konzentrationen nachweisen (Eklund et al., 2005). Dies ist insofern ein interessanter Sachverhalt, als dass Dimethylmatairesinol in seiner Struktur dem Arctiin ähnelt, es besitzt lediglich statt eines glykosidisch gebundenen Zuckers eine methoxylierte OH-Gruppe. Diese Ergebnisse lassen zu dem Schluss kommen, dass eine Glykosidierung einer freien OH-Gruppe die antioxidative Aktivität in manchen Fällen zwar abschwächt, eine Methoxylierung sich aber erheblich stärker mindernd auf diese Aktivität auswirkt. Eine Glykosidierung der freien OH-Gruppe führt nicht notwendigerweise zum Verlust der antioxidativen Aktivität. Eine mögliche Erklärung dafür könnte sein, dass die Zuckerreste selbst eine antioxidative Aktivität besitzen. Entsprechende Beobachtungen sind bei Hamamelitannin gemacht worden (Masaki et al., 1994)

Matairesinosid, welches wie Arctigenin eine freie phenolische OH-Gruppe trägt, war in den Untersuchungen von Shoeb et al. (2005) 10-mal aktiver als Arctigenin. Es ist bekannt, dass die Art der freien OH-Gruppen, d. h. ihre Position und benachbarte Gruppen, ausschlaggebend sind für die antioxidative Aktivität (Eklund et al. 2005). Im Vergleich zwischen Arctigenin und Matairesinosid liegt der Unterschied in der relativen Lage der Hydroxylgruppe zur Ketogruppe im Lactonring (Abbildung 44).

Möglicherweise spielt hier auch ein Mesomerieeffekt bei der Stabilisierung des Phenoxyradikals eine Rolle.

Die im Vergleich zu Matairesinol etwas stärkere Wirkung von Secoisolariciresinol im DPPH-Test erklärt sich durch die Butandiolstruktur und den somit zusätzlich vorhandenen aliphatischen OH-Gruppen. Eine Methylierung der freien phenolischen OH-Gruppen führte jedoch zu einem Verlust der antioxidativen Aktivität, d. h. die aliphatischen OH-Gruppen besitzen für sich genommen keine antioxidative Aktivität sondern wirken lediglich synergistisch. Als möglicher Mechanismus wurde die Bildung von Lariciresinol aus Secoisolariciresinol unter Abgabe eines Protons und somit eine Regenerierung des phenolischen Systems postuliert (Eklund et al., 2005). Dadurch steht ein weiteres Proton zur Abstraktion zur Verfügung.

3.2.8.2 Antioxidative Aktivität von Asteraceen-Extrakten

Lignane sind in verschiedenen Asteraceenspezies aus der Unterfamilie der Carduoideae nachgewiesen worden, z. B. in *Arctium lappa* und in *Centaurea*-Arten (Yamanouchi et al., 1976; Liu et al., 2005; Ferguson et al., 2003; Shoeb et al. 2004) Pflanzenextrakte sind hinsichtlich ihrer antioxidativen Aktivität oftmals potenter als die einzelnen enthaltenen antioxidativen Komponenten. Man begründet dieses Phänomen mit Synergieeffekten der einzelnen Komponenten untereinander bzw. mit einer verstärkenden Wirkung durch Bestandteile, welche selbst nur eine geringe antioxidative Aktivität besitzen (Rahman et al., 2006; Vinson et al., 2001; Mouré et al., 2000; Packer et al., 1999; Pedrielli und Skibsted, 2002). Ein Beispiel hierfür ist die Regeneration von α -Tocopherol durch Catechin. Aus diesem Grund lag es nahe, Pflanzenextrakte von bekanntermaßen lignanhaltigen Spezies sowie von deren nahen Verwandten auf ihre antioxidative Aktivität zu untersuchen. Um ein möglichst breites Spektrum an antioxidativen Mechanismen in den Extrakten zu erfassen, wurden drei verschiedene Antioxidativtests verwendet: Der FRAP-Test misst das Eisenreduktionspotential, im DPPH-Test wird die Fähigkeit zum Abfangen eines künstlichen Radikals gemessen und im XOD-Test die Fähigkeit zum Abfangen von Superoxid-Radikalen.

Die drei Vollextrakte der *Arctium*-Arten *A. lappa*, *A. minus* u *A. nemorosum* zeigten im FRAP-Test die höchste Aktivität von allen Extrakten, im DPPH-Test wurden sie nur von dem Extrakt aus *E. sphaerocephalus* übertroffen. Weitere Extrakte mit einer hohen Aktivität waren *O. acanthium* und *C. stoebe*.

Betrachtet man die Verteilung der Aktivitäten in den einzelnen Fraktionen, so weisen die drei besonders aktiven *Arctium*-Arten ein jeweils ähnliches Muster in beiden Tests auf. Die Chloroform- und die Butanolfraktion waren – mit der Ausnahme von *A. minus* im FRAP-Test – jeweils die aktivsten Fraktionen. Dies korreliert gut mit den berechneten Anteilen an Polyphenolen, wo bei den genannten Arten 50 – 60% der Gesamtpolyphenole in der Chloroform- und Butanolfraktion zu finden waren, wobei sich auch ein großer Anteil in der Ethylacetatphase fand. Diese Daten deuten darauf hin, dass phenolische Stoffe erwartungsgemäß einen hohen Anteil der antioxidativen Aktivität in den Extrakten ausmachten (Duthie und Crozier, 2000; Kähkönen et al., 2001; Pietta, 2000).

Betrachtet man dazu die chromatographischen Ergebnisse, so fällt auf, dass sich die nachgewiesenen Lignanaglyka nicht in den aktivsten Fraktionen befanden. Der größte Teil von Arctigenin und Matairesinol fand sich jeweils in der Etherphase und etwa 25 % in der Chloroformphase. Allerdings kommt den Lignanaglyka vermutlich eine Schlüsselrolle bei der antioxidativen Aktivität der Etherphase zu. Besonders Matairesinol leistete hier aufgrund seiner hohen Aktivität vermutlich einen großen Beitrag. Geht man von Matairesinol als alleinig wirksame Substanz aus, so würde dies bei einem Matairesinolgehalt von 0,15 % in einer EC_{50} von 2,3 g Pflanzenmaterial/l (EC_{50} von Matairesinol in g/l: $3,6 \cdot 10^{-3}$) resultieren. Tatsächlich ist dies der Konzentrationsbereich, in dem die durchschnittliche EC_{50} der Etherfraktion der *Arctium*-Arten lag. Es ist also davon auszugehen, dass Matairesinol die aktivitätsbestimmende Komponente in der Etherfraktion war.

Die *Arctium*-Arten enthielten von allen untersuchten Arten die größten Mengen an Arctiin. Das Lignanaglykosid war in den Extrakten unterschiedlich verteilt und hauptsächlich in der Chloroform-, Ethylacetat- und Butanolfphase zu finden.

Arctiinreiche Fraktionen wiesen teilweise ein hohes antioxidatives Potential auf. Der Vergleich der EC_{50} -Werte der Extrakte mit der Aktivität von Arctiin spricht aber für das Vorhandensein weiterer antioxidativ wirksamer Substanzen. Geht man von dem gemessenen Arctiingehalt von 2 - 3 % in den *Arctium*-Arten aus, würde dies bei ausschließlicher Anwesenheit von Arctiin als antioxidative Substanz, einer EC_{50} von 2 - 3 g/l entsprechen (EC_{50} Arctiin in g/l: $6,3 \cdot 10^{-2}$). Die EC_{50} -Werte der Extraktfraktionen in welchen sich ein Großteil des Arctiins sammelte, lagen jedoch deutlich unterhalb dieses Werts, d. h. sie enthielten weitere, potentere Antioxidantien.

Es ist also davon auszugehen, dass der Beitrag des Arctiins zum antioxidativen Effekt eher synergistischer Natur war.

Betrachtet man im Vergleich zu den *Arctium*-Arten die Testergebnisse für *E. sphaerocephalus* so fällt auf, dass sich das Verteilungsmuster der Aktivitäten zwischen beiden Gattungen stark unterscheidet und somit jeweils unterschiedliche Stoffe für die Aktivität verantwortlich waren.

In der Ether- und der Chloroformphase war in *E. sphaerocephalus* jeweils nur eine sehr geringe Aktivität messbar. Stoffe mit einer geringen Polarität schienen also für die Aktivität des Extrakts keine Rolle zu spielen. Die in der Butanol- und Wasserphase in beiden Tests nachgewiesene hohe antioxidative Aktivität korrelierte mit einem hohen Polyphenolgehalt. In der Ethylacetatphase zeigte sich hingegen trotz geringen nachgewiesenen Polyphenolgehalts eine starke Aktivität im DPPH-Test. Möglicherweise spielt hier eine andere, nichtphenolische Stoffgruppe eine Rolle für die antioxidative Aktivität (s. weiter unten) oder aber es war eine phenolische Substanz in der Fraktion enthalten, welche schon in geringen Konzentrationen starke Radikalfängereigenschaften besitzt.

Die Lignane Arctigenin, Matairesinol oder Secoisolariciresinol konnten in *E. sphaerocephalus* weder als Glykoside noch als Aglyka nachgewiesen werden. In der Literatur ist jedoch das Vorkommen anderer Lignane in den Wurzeln von zwei Echinopsarten beschrieben (Koike et al., 2002; Tene et al., 2004).

Es gibt eine Vielzahl an pflanzlichen phenolischen und nichtphenolischen Inhaltsstoffen, welche ein antioxidatives Potential besitzen und die als aktivitätsbestimmende Komponenten in den Extrakten in Frage kommen. Einige sind bereits aus den untersuchten Arten bzw. aus nahen Verwandten bekannt. Beispiele hierfür sind Sesqui- und Dilignane sowie Caffeoyle-Chinasäurederivate in *Arctium lappa* (Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe, 2006; Maruta et al., 1995) und Serotonin-Konjugate in bestimmten *Centaurea*-Arten, für die man eine antioxidative Aktivität nachweisen konnte (Kumarasamy et al., 2003).

In vielen Ölfrüchten ist antioxidativ wirksames Tocopherol enthalten, so auch in *Arctium*- und *Echinops*-Arten (Horn et al., 2008; Ivanov und Aitzetmüller, 1998). Allerdings ist das Molekül lipophil und liefert somit keine Erklärung für die antioxidative Aktivität in polareren Fraktionen. Weiterhin ist in verschiedenen *Echinops*-Arten das Vorkommen von Chinolin-, Chinazolin- oder Indolalkaloiden beschrieben (Horn et al., 2008; Shukla, 2003; Shoeb et al., 2005). Für das

Indolalkaloid Schischkiniin aus *Centaurea schischkinii* wurde mit dem DPPH-Test eine antioxidative Aktivität nachgewiesen, welche im Bereich derjenigen von Matairesinol lag (Shoeb et al., 2005). Auch in *Centaurea moschata* ist ein antioxidativ wirksames Indolalkaloid beschrieben (Kumarasamy et al., 2002). Es ist also auch nicht auszuschließen, dass ein Teil der antioxidativen Aktivität in *E. sphaerocephalus* oder in anderen getesteten Arten auf Vertreter dieser Stoffgruppe zurückzuführen ist. Es ist wahrscheinlich eine Vielzahl an möglichen Sekundärstoffen an der antioxidativen Aktivität von Extrakten aus den getesteten Asteraceenarten beteiligt. In einigen Arten, besonders in den *Arctium*-Arten, tragen die Lignane Arctiin, Arctigenin und Matairesinol selbst bzw. durch synergistische Effekte zu dieser Aktivität bei.

3.2.8.3 Korrelation verschiedener Antioxidativtests und Reaktionsmechanismen

Betrachtet man die Korrelation zwischen den beiden Antioxidativtests und dem ermittelten Gesamtpolyphenolgehalt, so ergibt sich eine gute Korrelation zwischen FRAP-Ergebnissen und dem ermittelten Phenolgehalt, eine mäßige Korrelation zwischen DPPH- und FRAP-Test und eine nur geringe Korrelation zwischen DPPH-Test und Polyphenolgehalt. Eine mögliche Erklärung für die gute Korrelation von FRAP-Test und dem Test nach Folin-Ciocalteu ist der ähnliche Reaktionsmechanismus. In beiden Tests wird ein Ein-Elektronen-Transfer (SET – Single Electron Transfer) gemessen (Prior et al., 2005) und somit ein ähnliches Spektrum an Substanzen erfasst.

Im Gegensatz zu den beiden genannten Tests liegt beim DPPH neben einem SET-Mechanismus auch ein HAT-Mechanismus (H-Atom-Transfer) vor (Prior et al. 2005), was die geringe Korrelation zwischen DPPH- und FRAP-Test bzw. die schlechte Korrelation zwischen gemessenem Polyphenolgehalt und dem DPPH-Test erklärt. Das bedeutet, dass es mit diesen beiden Tests möglich ist, teilweise unterschiedliche antioxidative Mechanismen zu erfassen. Da beide Tests jedoch zumindest teilweise auf einem SET-Mechanismus beruhen, wurde für ein aussagekräftiges Ergebnis hinsichtlich der antioxidativen Eigenschaften der Asteraceenextrakte ein weiteres Testsystem mit einem anderen zugrundeliegenden Mechanismus benötigt.

Aufgrund dieser Überlegung wurde der XOD-Test hinzugezogen, welcher die Fähigkeit zur Inaktivierung von Superoxid-Ionen misst. Diese sind nicht besonders reaktiv, aber dennoch physiologisch relevant, da sie in Gegenwart von Metallionen in

hochreaktive Hydroxylradikale umgewandelt werden können (Frankel und Meyer, 2000; Pietta, 2000). Die Superoxid-Ionen werden im XOD-Test enzymatisch durch den Umsatz von Xanthin erzeugt. Die durch das Enzym XOD katalysierte Reaktion läuft auch im menschlichen Organismus ab.

Die Lignane zeigten sich bei diesem Test um mehrere Größeneinheiten weniger aktiv als in den beiden vorangegangenen Tests, Secoisolariciresinol zeigte gar keine Aktivität. Wie sich bei dem XOD-Hemmtest herausstellte, beruhte zumindest ein Großteil der gemessenen Aktivitäten auf einer direkten Hemmung der XOD. Ein Nachweis der Radikalfängereigenschaften bezogen auf das Superoxidanion war mit diesem Test also nicht möglich. Auch die getesteten Asteraceenextrakte übten alle eine Hemmung auf die XOD aus, so dass eine Messung der Radikalfängereigenschaften nicht möglich war. Der Test scheint also nicht geeignet zu sein für die Messung von Rohextrakten.

Allerdings bieten die inhibitorischen Eigenschaften der Lignane und der Asteraceenextrakte auf die XOD mögliche Ausgangspunkte für neue Untersuchungen.

Die XOD spielt im Organismus eine bedeutende Rolle als Radikalbildner. Die dabei neben den Sauerstoffradikalen entstehende Harnsäure erlangt bei ungenügender Ausscheidung eine pathologische Bedeutung; Hyperurikämie ist der Auslöser der Gichtkrankung. Ein Angriff an der XOD könnte somit sowohl eine Verringerung der Konzentration an reaktiven Sauerstoffspezies als auch eine Absenkung des Harnsäurespiegels bewirken (Masuoka und Kubo, 2004; Góngora et al., 2003).

Ob die inhibitorische Wirkung der Lignane auf die XOD therapeutische Relevanz besitzt, muss durch weitergehende Untersuchungen zur Konzentrationsabhängigkeit der Inhibition gezeigt werden. Die bisherigen Untersuchungen haben gezeigt, dass Lignane ein Potential als XOD-Hemmer besitzen.

3.3 Estrogene und antiestrogene Aktivität von Lignanen im Yeast Estrogen Screen Assay (YES-Assay)

Der YES-Assay ist ein Bioassay zum Nachweis estrogener Aktivität. Es handelt sich dabei um einen rekombinanten Hefestamm, in dessen Hauptgenom das Gen für den humanen Estrogenrezeptor α ($ER\alpha$) integriert wurde (Abbildung 45). Der Estrogenrezeptor wird konstitutiv exprimiert. Daneben enthält die Zelle ein Expressionsplasmid, welches hinter dem estrogenresponsiven Element das Reporteragen *Lac-Z* enthält. Gelangt eine estrogene Substanz in die Hefezelle, so bildet sie mit dem Estrogenrezeptor ein Rezeptor-Liganden-Komplex. Dieser diffundiert zum estrogenresponsiven Element des Expressionsplasmids und bewirkt die Expression von β -Galaktosidase. Die β -Galaktosidase wird von der Hefezelle ins Medium sezerniert und bewirkt dort den Umsatz des chromogenen Substrats CPRG zu Chlorphenolrot. Der Farbumschlag von gelb nach rot lässt sich photometrisch erfassen. Dieser Bioassay ist erstmals von Routledge und Sumpter (1996) zum Test von oberflächenaktiven Substanzen (Detergenzien) auf estrogene Aktivität eingesetzt worden.

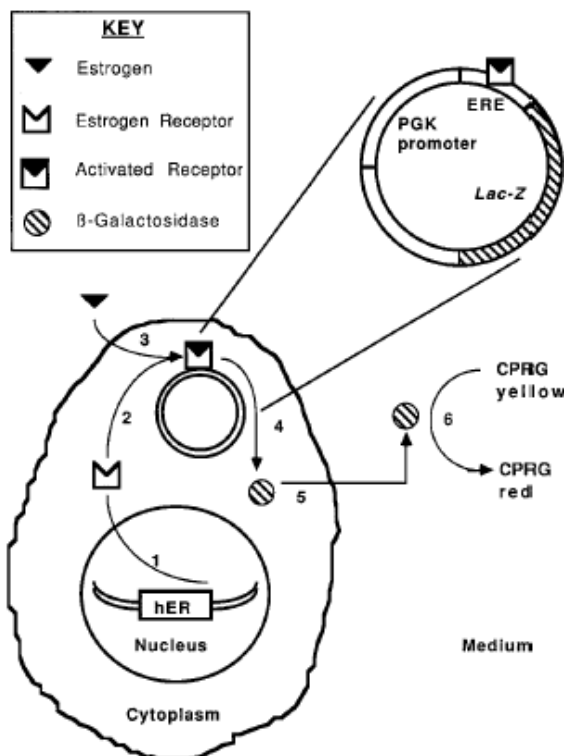


Abbildung 45

Estrogensensitive Hefezelle; Estrogenrezeptor wird exprimiert (1); Bildung eines Rezeptor-Liganden-Komplexes und Bindung an das estrogenresponsive Element auf dem Expressionsplasmid (2, 3); β -Galaktosidase wird exprimiert (4) und ins Medium abgegeben (5); Umsatz von CPRG (=Chlorphenolrot- β -Galaktopyranosid) zu Chlorphenolrot (6)
Abbildung aus Routledge und Sumpter 1996

Für die untersuchten Stoffe werden EC_{50} -Werte angegeben. Das ist die Konzentration, welche zur Auslösung der Hälfte der maximalen Estradiolaktivität erforderlich ist. Die maximale Effektivität im Assay wurde jeweils durch eine Konzentration von $2,2 \cdot 10^{-10}$ M E_2 erreicht.

Für jede einzelne Messreihe wurde eine Kurve erstellt und daraus die EC_{50} berechnet. Die einzelnen EC_{50} -Werte wurden gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

3.3.1 Test auf estrogene Aktivität

Zunächst wurde der Test mit E_2 durchgeführt sowie mit den estrogen wirksamen Isoflavonen Genistein und Daidzein, welche in diesem Testsystem bereits Aktivität gezeigt hatten (Routledge und Sumpter 1996; Breinholt und Larsen, 1998) (Abbildung 46).

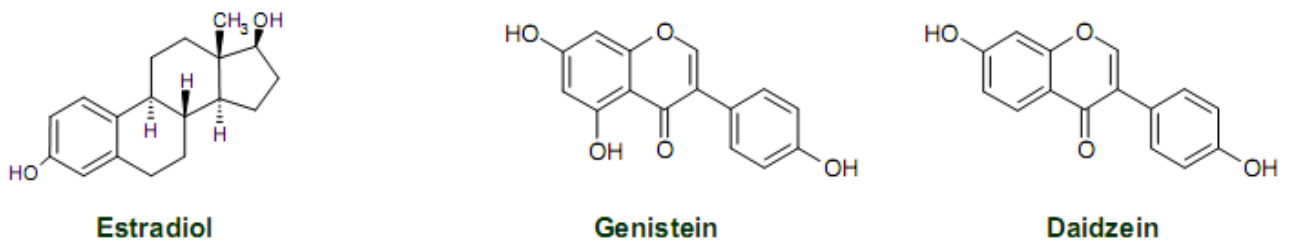


Abbildung 46 Natürlicher Estrogenrezeptor-Ligand Estradiol und estrogen wirksame Isoflavone Genistein und Daidzein

Neben dem sehr aktiven Estradiol ließ sich auch für die beiden Isoflavone im Test estrogene Aktivität nachweisen (EC_{50} -Werte siehe Tabelle 12). Die Kurven zeigten den auch für Estradiol charakteristischen sigmoiden Verlauf (Abbildung 47). Genistein wies eine um etwa 5 Zehnerpotenzen schwächere Aktivität auf als der natürliche Ligand Estradiol. Daidzein zeigte im Vergleich zu Genistein eine um das Zehnfache schwächere Aktivität.

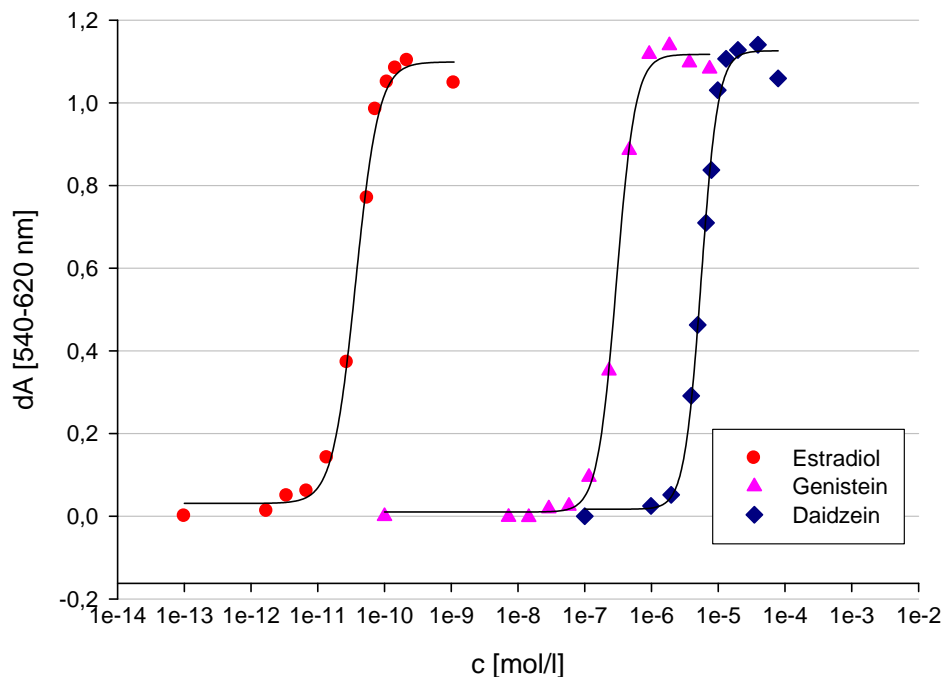


Abbildung 47 Beispielkurven von Estradiol, Genistein und Daidzein im YES-Assay

Die Tests von Lignanene auf estrogene Aktivität wurden mit Enterodiol und Enterolacton (Abbildung 48) begonnen. Dies sind humane Lignanmetabolite (englisch „mammalian lignans“), die durch die mikrobielle Darmflora aus pflanzlichen Lignanene entstehen und so resorbiert werden. Der Einfluss von Enterolacton und Enterodiol auf estrogenabhängige Tumorzellen wurde bereits gezeigt (Chen und Thompson, 2003; Mousavi und Adlercreutz, 1992).

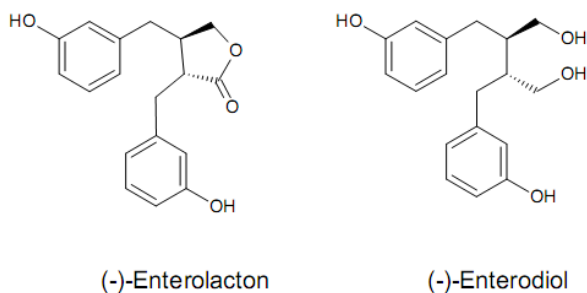


Abbildung 48 humane Lignanmetabolite (-)-Enterodiol (4) und (-)-Enterolacton (5)

Sowohl Enterolacton als auch Enterodiol zeigten einen estrogenen Effekt (Abbildung 49), allerdings war zur Erzielung dieses Effekts im Vergleich zu den getesteten Isoflavonen eine hundert- bis tausendfach höhere Konzentration erforderlich. Für Enterolacton war der Farbumschlag im gemessenen Konzentrationsbereich nur gering und die Wiederholbarkeit war schlecht. Die Kurve folgte keinem sigmoiden

Verlauf, zahlreiche Wiederholungsmessungen ergaben jedoch einen EC_{50} -Bereich von $10^{-3} - 10^{-4}$ M.

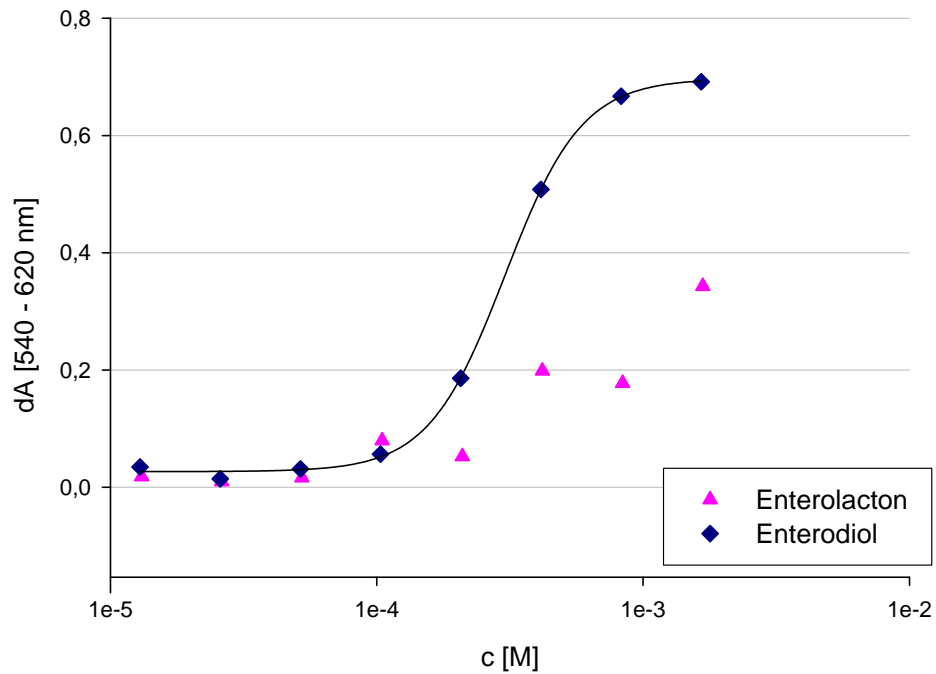


Abbildung 49 Beispielkurven von Enterolacton und Enterodiol im YES-Assay

Anschließend wurden 8 pflanzliche und 6 semisynthetische Lignanaglyka auf estrogenen Aktivität im YES-Assay getestet (Strukturen siehe Abbildung 50 und Abbildung 51).

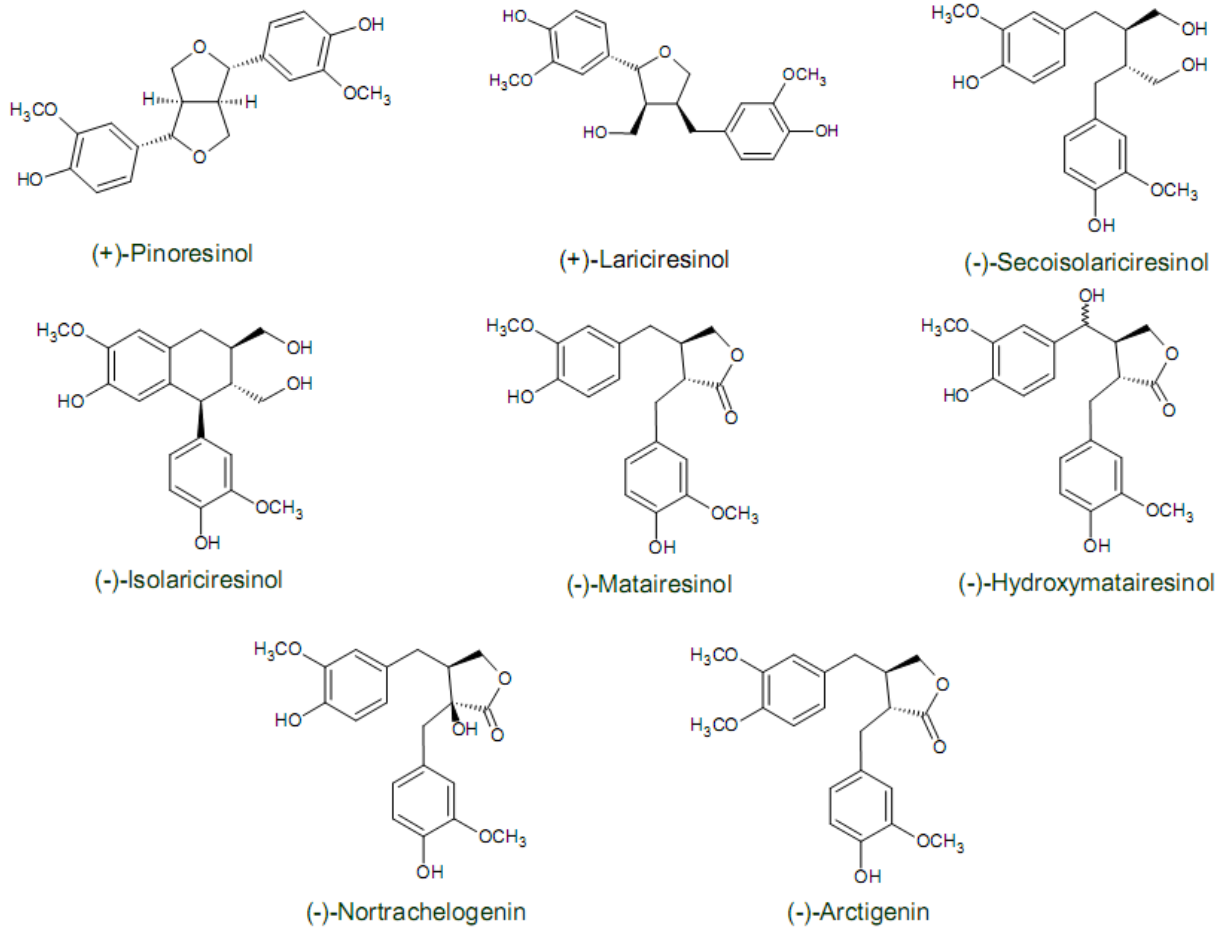


Abbildung 50 Im YES-Assay getestete pflanzliche Lignane

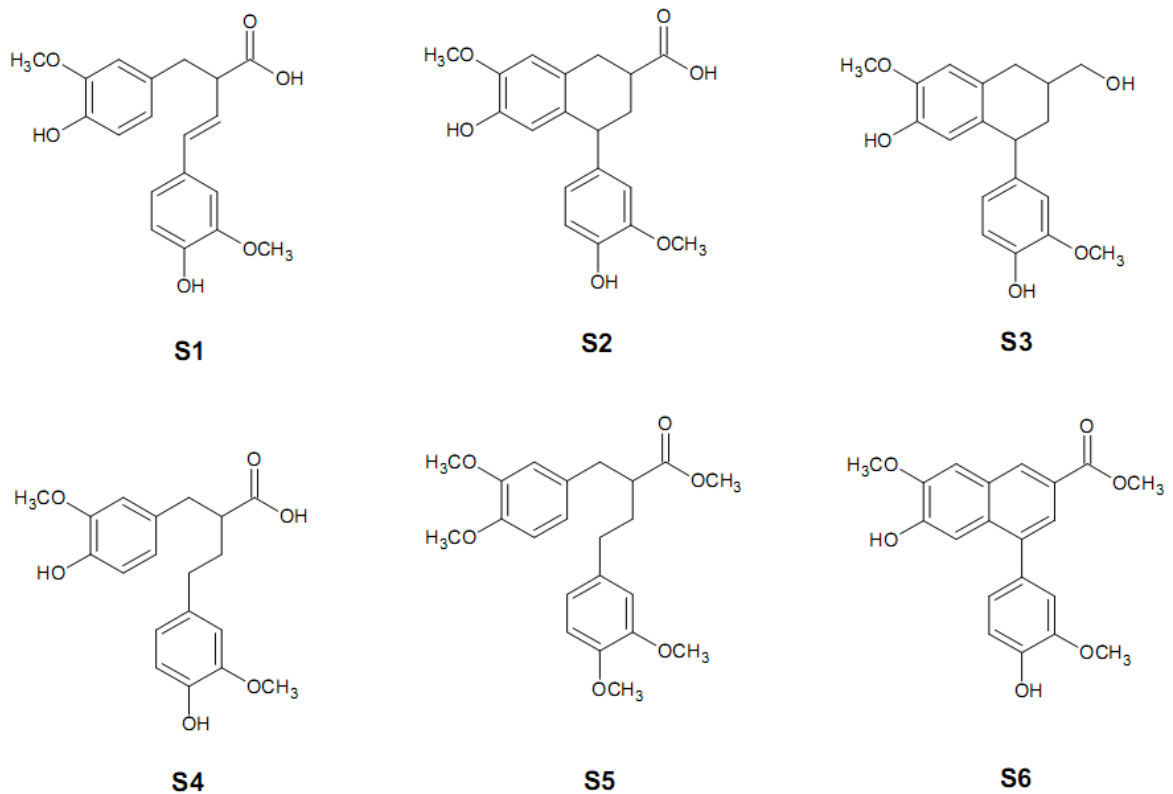


Abbildung 51 Getestete semisynthetische Lignane

Die Aktivitäten aller gemessenen Substanzen sind in Tabelle 12 zusammengefasst. Keines der getesteten semisynthetischen Lignane zeigte im Test estrogene Aktivität. Aus der Reihe der getesteten pflanzlichen Lignanen zeigten nur Hydroxymatairesinol und Arctigenin estrogene Aktivität, wobei die Aktivität von Hydroxymatairesinol zu gering war für die Berechnung einer EC_{50} . Arctigenin zeigte einen sigmoiden Kurvenverlauf (Abbildung 52). Der wirksame Bereich lag um 10^{-5} M, d.h. die Aktivität von Arctigenin war im Vergleich zu derjenigen von Enterodiol zehnfach höher und vergleichbar mit der Aktivität von Daidzein.

Die Aktivität von Arctigenin ließ die Frage nach einer estrogenen Aktivität des Glykosids Arctiin aufkommen. Der Test von Arctiin im YES-Assay ergab jedoch keine Aktivität (höchste getestete Konzentration: $1,4 \cdot 10^{-3}$ M).

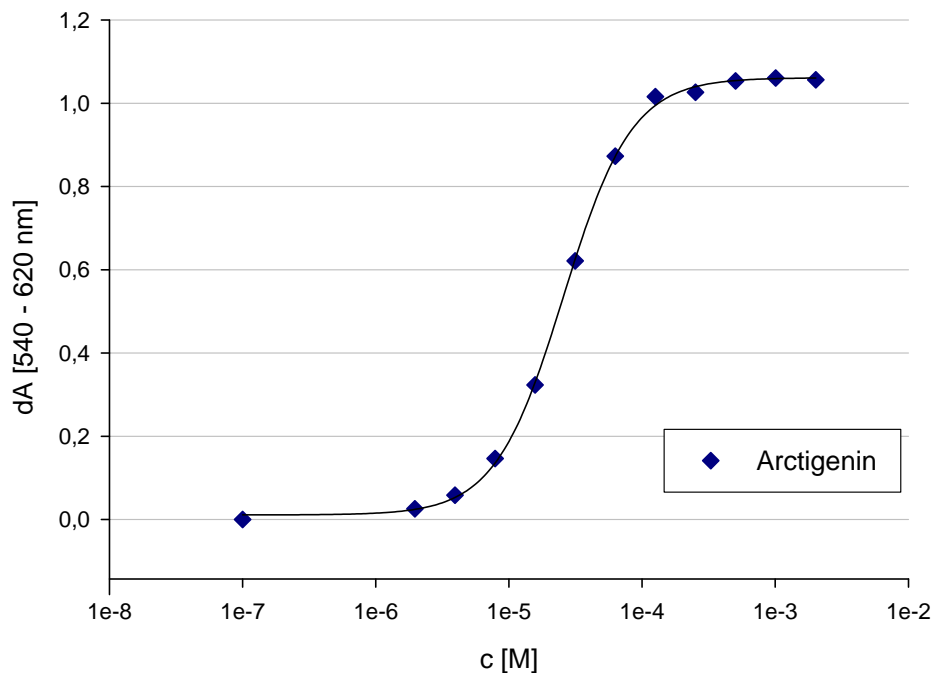


Abbildung 52 Beispielkurve von Arctigenin im YES-Assay

3.3.2 Hemmung der Estradiolwirkung durch Testsubstanzen

Einige im Test inaktiven Lignane wiesen große strukturelle Ähnlichkeiten mit den aktiven Substanzen auf, z.B. Matairesinol mit Hydroxymatairesinol sowie mit Arctigenin.

Dies warf die Frage nach einer möglichen Wechselwirkung der anscheinend unwirksamen Lignane mit dem Estrogenrezeptor ohne intrinsische Aktivität auf (Müller et al., 2004; Pinto et al., 2008).

Zur Klärung der Frage einer möglichen Hemmwirkung wurde jedes Well zusätzlich zur Testsubstanz mit jeweils $2,2 \cdot 10^{-10}$ M Estradiol versetzt. Dies war die im Test ermittelte Mindestkonzentration für eine maximale Reaktion.

Zunächst erfolgte die Testung von Arctiin. Die Anwesenheit von Arctiin im Testgemisch bewirkte tatsächlich eine konzentrationsabhängige Verminderung der Estradiolaktivität (Abbildung 53).

Im Folgenden wurden auch alle anderen Substanzen ebenfalls unter Zugabe von Estradiol getestet.

Als Maß für die Hemmwirkung wurde jeweils die IC_{50} , bezogen auf 100% Estradiolaktivität, berechnet. Für jede Messreihe wurde eine Kurve erstellt, aus dieser die IC_{50} berechnet und die einzelnen IC_{50} -Werte gemittelt (Tabelle 12).

Diejenigen getesteten Substanzen, die im YES-Assay eine estrogenere Aktivität gezeigt hatten, welche stark genug war für die Berechnung einer EC_{50} , verursachten keine messbare Abschwächung der Estradiolaktivität.

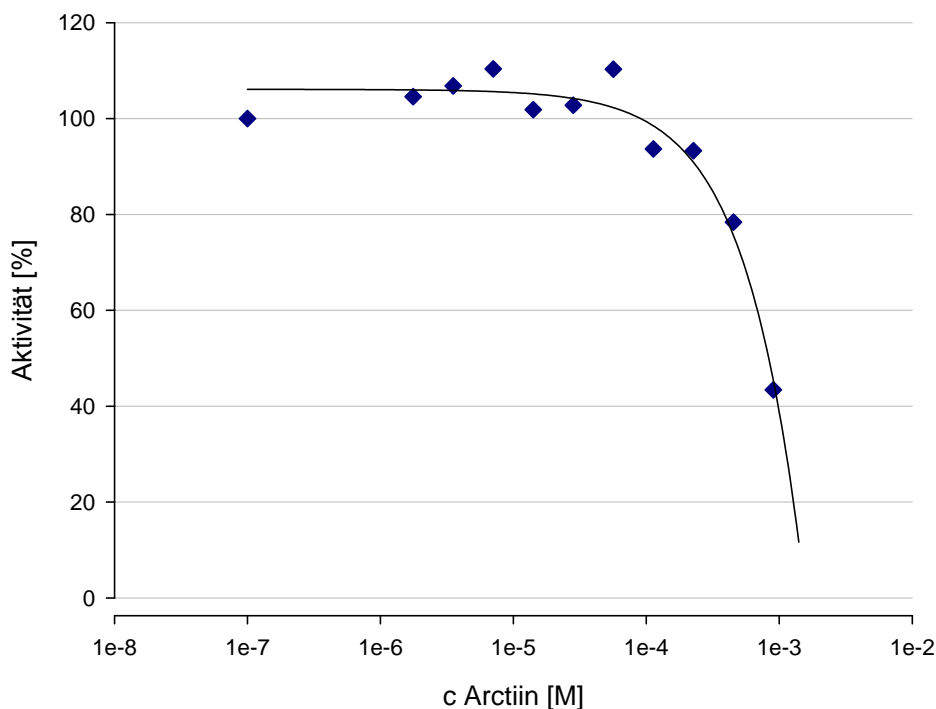


Abbildung 53 YES-Assay mit Arctiin unter Zugabe von $2,2 \cdot 10^{-10}$ M Estradiol zu jeder Verdünnung, Beispielkurve

Enterolacton und OH-Matairesinol, welche im YES-Assay eine schwache estrogenere Aktivität gezeigt hatten, verursachten eine geringfügige Abschwächung der Estradiolaktivität. Eine IC_{50} konnte dabei nicht bestimmt werden.

Einige der im YES-Assay nicht aktiven Lignane, wie Secoisolariciresinol, beeinflussten die Estradiolaktivität nicht.

Für die Mehrzahl der im YES-Assay nicht aktiven Substanzen konnte jedoch eine Verringerung der Estradiolaktivität nachgewiesen und eine IC_{50} berechnet werden.

Die IC_{50} -Werte lagen zwischen $9,9 \cdot 10^{-4}$ M für Pinoresinol und $1,3 \cdot 10^{-4}$ M für das semisynthetische Lignan S6 (Tabelle 12).

3.3.3 Einfluss der Testsubstanzen auf das Hefenwachstums und auf die Aktivität der β -Galaktosidase

Die naheliegendste Erklärung für den inhibitorischen Effekt von einigen Lignanen auf die Estradiolaktivität im YES-Assay ist eine Wechselwirkung mit dem Rezeptor ohne intrinsische Aktivität. Allerdings kommen für die Hemmung noch weitere Ursachen in Betracht, die zusätzlich untersucht worden sind.

Eine davon ist das Enzym β -Galaktosidase, welches das chromogene Substrat CPRG umsetzt.

Um einen möglichen Hemmeffekt auf die β -Galaktosidase nachzuweisen, wurde käufliche β -Galaktosidase aus *E. coli* mit den im YES-Assay getesteten Substanzen inkubiert. Der Test wurde nach Vorschrift des Herstellers der β -Galaktosidase durchgeführt.

Bei Vorversuchen fiel auf, dass trotz des Vorwärmens aller Lösungen und dem kräftigen Schütteln vor der Messung eine Zunahme der Aktivität in den ersten 10 – 15 min zu verzeichnen war (Abbildung 54). Zwischen der 20. und 25. min begann eine Abnahme der Aktivität aufgrund der Abnahme der Substratkonzentration.

Ausgehend von diesen Beobachtungen wurde für die Berechnungen der Enzymaktivität in allen weiteren Versuchen die Absorptionsänderung im Bereich $t = 15 - 20$ min zugrundegelegt.

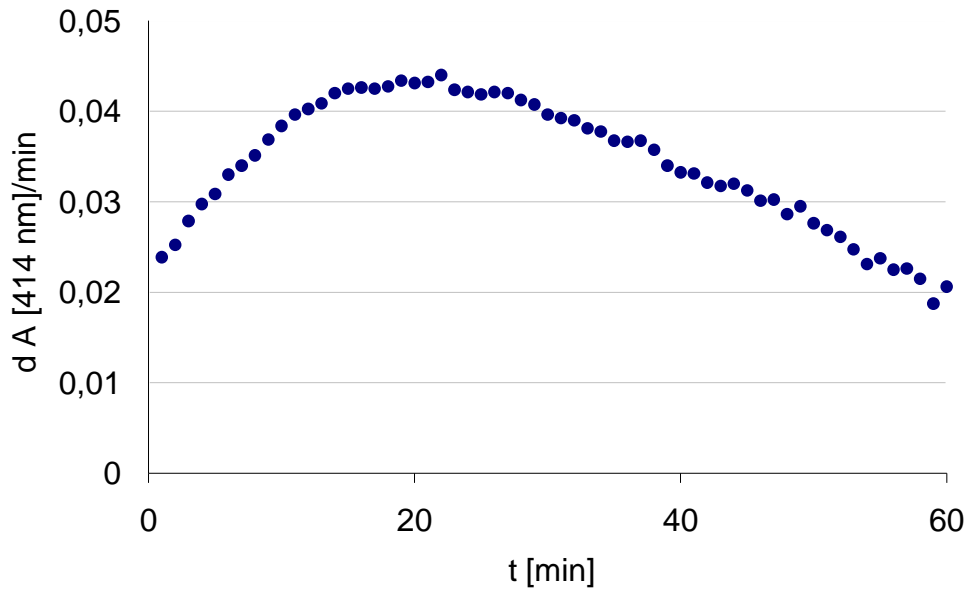


Abbildung 54 Umsatz von ONP- β -Galaktosid durch β -Galaktosidase ohne Zusatz von Hemmstoff

Zunächst wurde das Lignan-Glykosid Arctiin getestet, welches aufgrund seiner glykosidischen Struktur als potentieller Hemmstoff für zuckerabspaltende Enzyme in Betracht kam. Die eingesetzte Arctiin-Konzentration entsprach der im YES-Assay gemessenen IC_{50} von $6,2 \cdot 10^{-4}$ M.

Arctiin zeigte bei den gewählten Bedingungen keine Hemmung des Enzyms. Um die Eignung der verwendeten Substratkonzentration zu überprüfen, wurde eine Substratsättigungskurve angefertigt, einmal mit und einmal ohne Arctiin (Abbildung 55)

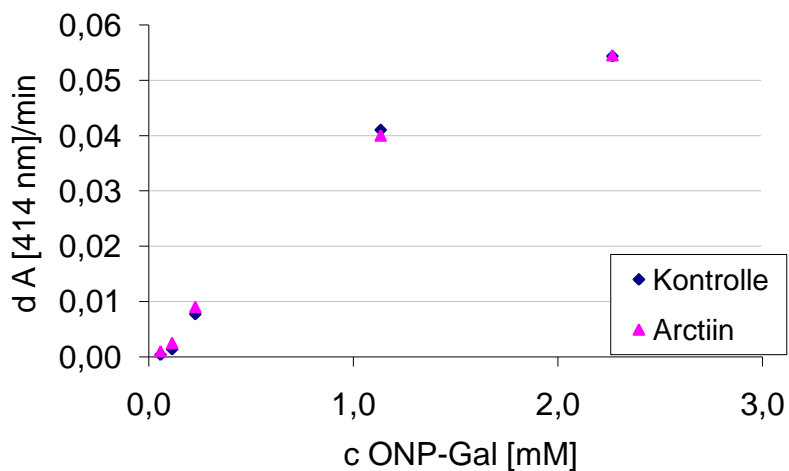


Abbildung 55 Umsatz von verschiedenen Konzentrationen an ONP- β -Galaktosid durch β -Galaktosidase, einmal mit und einmal ohne Arctiin-Zugabe (c Arctiin $6,2 \cdot 10^{-4}$ M)

Es zeigte sich, dass die verwendete ONP-Konzentration von 2,3 mM im Bereich beginnender Substratsättigung und somit im optimalen Bereich lag. Zwischen der Kontrollmessung und der Messung unter Verwendung von Arctiin war kein Unterschied in der Aktivität des Enzyms sichtbar.

Eine Verdünnung der Enzymkonzentration auf 1:10 führte ebenfalls zu keinem Unterschied in der Enzymaktivität zwischen Arctiin- und Kontrollmessung. Es konnte also davon ausgegangen werden, dass die Messbedingungen nicht zu einer Verschleierung einer potentiellen Hemmwirkung geführt hatten.

Für alle weiteren Messungen wurden die ursprünglichen Konzentrationen von 2,3 mM Substrat und 450 pkat Enzym beibehalten.

Die Konzentrationen der Lignane wurden so gewählt, dass sie im Bereich der im YES-Assay gemessenen IC_{50} -Werte lagen. Für Hydroxymatairesinol und Enterolacton, deren Hemmung zur Berechnung einer IC_{50} nicht ausreichte, wurde die jeweils höchste im YES-Assay verwendete Konzentration eingesetzt.

Das Enzym zeigte bei allen getesteten Substanzen eine Restaktivität von über 70% (Tabelle 12).

Am stärksten hemmend wirkte Enterodiol mit einer Restaktivität von 10,7% gefolgt von Enterolacton und S3 mit Restaktivitäten von 73,0 bzw. 86,6%. Alle anderen Substanzen wirkten nur in sehr geringem Maß bzw. gar nicht hemmend auf die β -Galaktosidase. Ein weiterer möglicher Angriffspunkt für eine Verminderung der Estradiolwirkung im YES-Assay ist die Hemmung des Zellwachstums. Dieser Parameter wurde getestet durch Parallelansätze der Testsubstanzen ohne Zugabe von CPRG und der alleinigen Messung der optischen Dichte. Die meisten Substanzen zeigten keine signifikante Beeinträchtigung des Zellwachstums der Hefen. Nur für S6 und Pinoresinol konnte eine Verminderung des Zellwachstums um 15 bzw. 30% beobachtet werden. Dies machte sich auch in einer Verminderung der Estradiolaktivität bemerkbar.

Tabelle 12 Zusammenfassung der Ergebnisse für Lignane, Isoflavone und Estradiol aus dem YES-Assay; **Mittelwerte ± STABW** **A** Estrogene Aktivität (EC_{50}) und **B** Verminderung der Estradiolwirkung (IC_{50}) (A und B jeweils berechnet aus ≥ 4 Einzelkurven); **C** Restaktivität von β -Galaktosidase unter Zugabe von im YES-Assay hemmenden Substanzen (Konzentration Testsubstanzen entspr. IC_{50} bzw. C_{max} bei im YES-Assay nicht hemmenden Substanzen) $n=6 \pm STABW$; + leichte estrogene bzw. inhibitorische Aktivität; - keine Aktivität; **D** verbleibendes Wachstum der Hefen unter Zugabe von im YES-Assay-hemmenden Substanzen bei maximaler eingesetzter Konzentration $n \geq 4$

Substanz	A EC_{50} [M]	B IC_{50} [M]	C Restaktivität β- Galaktosidase [%]	D Hefenwachstum [%]
Estradiol	$3,5 \cdot 10^{-11}$ $\pm 7 \cdot 10^{-12}$		100	95 - 100%
Genistein	$2,6 \cdot 10^{-7} \pm$ $3 \cdot 10^{-8}$	-	100	95 - 100%
Daidzein	$5,1 \cdot 10^{-6} \pm$ $6 \cdot 10^{-7}$	-	100	95 - 100%
Arctigenin	$2,0 \cdot 10^{-5} \pm$ $6 \cdot 10^{-6}$	-	100	95 - 100%
Enterodiol	$4,4 \cdot 10^{-4} \pm$ $3 \cdot 10^{-4}$	-	$10,7 \pm 1,1$	95 - 100%
OH-Matairesinol	+	+	100	95 - 100%
Enterolacton	+	+	$73,0 \pm 9,5$	95 - 100%
Arctiin	-	$6,2 \cdot 10^{-4} \pm$ $3 \cdot 10^{-4}$	100	95 - 100%
Matairesinol	-	$6,7 \cdot 10^{-4} \pm$ $4 \cdot 10^{-4}$	100	95 - 100%
Nortrachelogenin	-	$7,3 \cdot 10^{-4} \pm$ $3 \cdot 10^{-4}$	$94,2 \pm 2,4$	95 - 100%
Isolariciresinol	-	$7,0 \cdot 10^{-4} \pm$ $4 \cdot 10^{-4}$	$94,8 \pm 6,2$	95 - 100%
S3	-	$5,5 \cdot 10^{-4} \pm$ $2 \cdot 10^{-4}$	$86,6 \pm 3,2$	95 - 100%
S5	-	$5,9 \cdot 10^{-4} \pm$ $6 \cdot 10^{-4}$	100	95 - 100%
Pinoresinol	-	$9,9 \cdot 10^{-4} \pm$ $1,3 \cdot 10^{-4}$	$91,2 \pm 1,8$	70%
S6	-	$1,3 \cdot 10^{-4} \pm$ $9 \cdot 10^{-5}$	$94,4 \pm 6,0$	85%
Lariciresinol	-	-	100	95 - 100%
Secoisolariciresinol	-	-	100	95 - 100%
S1	-	-	100	95 - 100%
S4	-	-	100	95 - 100%
S2	-	-	$94,7 \pm 2,3$	95 - 100%

3.3.4 Extrakte aus Asteraceenfrüchten im YES-Assay

Die Extrakte aus den arctigeninhaltigen Klettenarten *A. lappa*, *A. minus* und *A. tomentosum* wurden auf estrogene Aktivität getestet. Von jeder Art wurden zwei Extrakte untersucht – ein unhydrolysiertes Vollextrakt und ein hydrolysiertes Extrakt. Die in den Extrakten enthaltene Arctigenin-Konzentration lag zwischen $4 \cdot 10^{-5}$ M (unhydrolysiert) und $4 \cdot 10^{-4}$ M (hydrolysiert) im Testgemisch. Diese Werte liegen oberhalb der EC_{50} der Reinsubstanz, welche $2 \cdot 10^{-5}$ M beträgt. Der Arctiingehalt in den unhydrolysierten Extrakten lag bei mindestens $4 \cdot 10^{-4}$ M, was im Bereich der IC_{50} der Reinsubstanz von $6 \cdot 10^{-4}$ M liegt. In den hydrolysierten Extrakten ist nur noch ein geringer Teil an Arctiin zu erwarten.

Keiner der Extrakte zeigte estrogene Aktivität, alle Extrakte zeigten jedoch eine Hemmwirkung auf die Estradiolaktivität (Tabelle 13).

Tabelle 13 Verminderung der Estradiolwirkung durch hydrolysierte und unhydrolysierte Extrakte aus Asteraceenfrüchten (Ausgangskonzentration jeweils: 10 g extrahiertes Pflanzenmaterial/Extraktionsmittel); + schwache Hemmung, n=2

Asteraceenart	IC ₅₀ als g extrahiertes Pflanzenmaterial/ Extraktionsmittel	
	unhydrolysiert	hydrolysiert
<i>A. lappa</i>	9,1	+
<i>A. minus</i>	9,8	+
<i>A. tomentosum</i>	7,3	9,8

In den unhydrolysierten Extrakten war dies durch die Anwesenheit von Arctiin zu erwarten. Betrachtet man die IC_{50} der Reinsubstanz, so dürfte Arctiin für den Großteil der Hemmwirkung in den unhydrolysierten Extrakten verantwortlich sein, nicht aber in den hydrolysierten. Hier wurde der estrogene Effekt von Arctigenin offensichtlich von anderen Hemmstoffen überlagert. Die in den Extrakten enthaltene Menge des ebenfalls hemmend wirkenden Matairesinols war mit $2 \cdot 10^{-5}$ M bis $5 \cdot 10^{-5}$ M im Testgemisch relativ geringe. Die IC_{50} der Reinsubstanz ist mit $6,7 \cdot 10^{-4}$ M um etwa das Zehnfache höher, so dass Matairesinol nur für einen geringen Teil der Hemmwirkung in den hydrolysierten Extrakten verantwortlich sein dürfte. Für den Effekt kommt also eine Vielzahl von Extraktbestandteilen in Frage, die hier nicht analysiert worden sind.

Es war weder ein Einfluss auf das Wachstum der Hefe-Zellen noch eine Hemmung der β -Galaktosidase durch die Extrakte zu verzeichnen.

3.3.5 Diskussion

Lignane werden neben den Isoflavonoiden und Coumestanen zu den Phytoestrogenen gezählt und haben somit eine potentielle Bedeutung für die Prävention bestimmter estrogenabhängiger Erkrankungen oder Befindlichkeitsstörungen.

Betrachtet man die derzeitige Forschung für den Bereich der Phytoestrogene, so liegen die meisten Ergebnisse für die Substanzklasse der Isoflavonoide vor. (Cornwell et al., 2004; Kinjo et al., 2004; Usui, 2006). Ihre estrogen Wirkung wird als stärker angesehen als die der Lignane, was in den vorliegenden Untersuchungen bestätigt werden konnte. Mit Blick auf die Entwicklung von isoflavonoidhaltigen Nahrungsergänzungsmitteln sollte jedoch beachtet werden, dass für diese derzeit noch ein mögliches genotoxisches Potential diskutiert wird. Eine solche schädigende Wirkung konnte bislang für die Lignane nicht nachgewiesen werden (Stopper et al., 2005).

Hinsichtlich der estrogenen bzw. antiestrogenen Wirkung von Lignanen bezieht sich ein Großteil der Forschung - sowohl epidemiologischer als auch *in-vitro*-Studien - auf die Aktivität der Enterolignane Enterolacton und Enterodiol.

Für beide Stoffe wurde eine Verstärkung der Proliferation verschiedener estrogenabhängiger Tumorzellen nachgewiesen (Welshons et al., 1987; Cosentino et al., 2007). Für Enterolacton wurde ein bipolarer Effekt auf den estrogenabhängigen Mammakarzinomstamm MCF-7 beobachtet. Eine niedrige Konzentration führte zu einer Aktivierung von Wachstum und DNA-Synthese in den Zellen, eine Konzentration von $> 10^{-5}$ M zu einer Inhibition (Wang und Kurzer, 1997; Mousavi und Adlercreutz, 1992).

Bei zwei estrogenabhängigen Brustkrebszelllinien konnte durch Enterolacton und Enterodiol eine Verminderung der Zelladhäsion und -invasion bewirkt werden (Chen und Thompson, 2003).

In einem Transaktivierungsassay mit MCF-7-Zellen und einem Reportergen, welches für Luciferase codiert, konnte eine estrogen Wirkung für Enterolacton und Enterodiol nachgewiesen werden (Carreau et al., 2008). Für Enterolacton wurde ein ähnlicher

Assay in Endometriumszellen durchgeführt und eine estrogenische Wirkung nachgewiesen (Müller et al., 2004).

Einige Autoren vertreten die Meinung, dass nur die Enterolignane, nicht jedoch die unmetabolisierten Pflanzenlignane ein estrogenes oder antiestrogenes Potential besitzen (Cornwell et al., 2004). Es ist bekannt, dass alle pflanzlichen Lignane zumindest in einem gewissen Umfang ohne vorherige Transformierung zu Enterolignanen resorbiert werden (Saarinen et al., 2002; Bannwart et al., 1989; Hutchins et al., 2000; Nose et al., 1993). Insofern ist die Untersuchung der estrogenen oder antiestrogenen Aktivität von pflanzlichen Lignanen von erheblicher Bedeutung.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit Hilfe des YES-Assays eine mögliche estrogenische oder antiestrogenische Aktivität von verschiedenen pflanzlichen Lignanen sowie für die Enterolignane nachzuweisen. Für das Testsystem war keine spezielle Laborausstattung erforderlich. Es stellte einen guten Kompromiss dar zwischen Kosten- bzw. Zeitaufwand und Empfindlichkeit und ermöglichte den Nachweis von estrogenen und antiestrogenen Effekten. Ein Hefesystem hat außerdem den Vorteil, dass das Vorhandensein endogener Estrogene bzw. verschiedener Estrogenrezeptoren ausgeschlossen werden kann (Nishihara et al., 2000).

Nach Etablierung im Labor wurde der Test auf estrogenische Aktivität zunächst mit Estradiol als Standard und daneben mit den Isoflavonen Genistein und Daidzein durchgeführt. Für beide ist mit demselben Testsystem zuvor bereits eine Aktivität nachgewiesen worden (Routledge und Sumpter, 1996; Breinholt und Larsen, 1998). Sowohl die gemessenen Aktivitäten von Estradiol als auch die von den beiden Isoflavonen stimmten in der Größenordnung gut mit den Ergebnissen von Breinholt und Larsen (1998) überein: Die halbeffektive Konzentration von Estradiol befand sich im Bereich von 10^{-11} M, während die von Genistein und Daidzein im Bereich von 10^{-7} bzw. 10^{-6} M lag. In einem ELISA mit dem humanen Estrogenrezeptor α (Garrett et al., 1999) hatte Genistein in Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen eine 10-mal höhere Affinität zum Estrogenrezeptor gezeigt als Daidzein.

Die getesteten Enterolignane Enterodiol und Enterolacton zeigten beide in einem Konzentrationsbereich von 10^{-4} M eine estrogenische Aktivität, allerdings erreichte Enterolacton im Gegensatz zu Enterodiol auch bei einer höheren Konzentration nur eine geringe Effektivität. Übereinstimmungen mit diesen Daten zum unterschiedlichen Verhalten beider Stoffe ergeben sich aus der Arbeit von Carreau et

al. (2008). Bei Untersuchungen an MCF-7-Zellen stimulierte Enterodiol das Wachstum der Brustkrebszellen, während Enterolacton diese Aktivität nicht besaß. Eine inhibitorische Wirkung auf die Proliferation konnte bis zu der maximal eingesetzten Konzentration von jeweils 10^{-5} M weder für Enterodiol noch für Enterolacton nachgewiesen werden. Teilweise im Widerspruch dazu stehende Aussagen ergeben sich allerdings in einer Veröffentlichung von Mousavi und Adlercreutz (1992). In dieser Arbeit konnte wie bei Carreau et al. eine stimulierende Wirkung von Enterolacton auf das Wachstum von MCF-7-Zellen nachgewiesen werden - Enterodiol wurde in dieser Arbeit nicht getestet. Zusätzlich wurde aber auch eine Inhibition von E_2 -induziertem Zellwachstum durch Enterolacton gezeigt. Dies steht in Einklang mit den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit, wo ab einer Konzentration von ca. 10^{-5} M Enterolacton eine Hemmung der E_2 -Wirkung nachgewiesen werden konnte.

In den Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden für beide Stoffe Maximalkonzentrationen von $1,7 \cdot 10^{-3}$ M verwendet. Enterodiol zeigte auch in der höchsten Konzentration keine Hemmwirkung auf die Estradiolaktivität. Für Enterolacton hingegen konnte ab einer Konzentration von ca. 10^{-5} M eine Hemmung nachgewiesen werden, was auf eine partiell antagonistische Wirkung von Enterolacton auf den ER α hindeutet.

Um eine Beeinflussung des Reportersystems durch eine Hemmung der β -Galaktosidase als Wirkmechanismus für die antagonistische Wirkung auszuschließen, wurde ein entsprechender Hemmtest durchgeführt. Es zeigte sich, dass Enterolacton in seiner höchsten eingesetzten Konzentration die Aktivität des Enzyms um ca. 30% reduzierte. Ein Teil der Hemmwirkung auf die Estradiolaktivität kommt also möglicherweise durch die Hemmung des Reportersystems zustande. Allerdings wird durch die schwache estrogene Wirkung von Enterolacton im Testsystem deutlich, dass zumindest ein Teil der Testsubstanz in die Zelle aufgenommen wird. Dies bedeutet eine Verminderung der Enterolactonkonzentration im Medium und somit eine geringere Hemmwirkung auf die β -Galaktosidase. Es kann somit nicht ausgeschlossen werden, dass zumindest ein Teil der Abschwächung der Estradiolwirkung durch einen partiellen ER-Antagonismus von Enterolacton zustande kommt. Müller et al. (2004) beobachteten in einem Transaktivierungsassay mit ER α und ER β in Ishikawa-Zellen ebenfalls einen solchen partiellen Antagonismus für Enterolacton. Das Lignan selbst zeigte eine schwache estrogene Aktivität während

bei gleichzeitiger Zugabe des Estrogens Diethylstilbestrol dessen Aktivität um 20 – 40 % vermindert wurde. Interessanterweise wies bei den Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit Enterodiol eine stärkere Hemmung auf die Galaktosidase auf als Enterolacton. Die gemessene Restaktivität des Enzyms betrug lediglich 10 %, gemessen im Bereich der maximal eingesetzten Konzentration. Im YES-Assay zeigte Enterodiol jedoch keine hemmende Wirkung. Diese Beobachtung lässt darauf schließen, dass es zu einer nahezu vollständigen Resorption von Enterodiol aus dem Medium durch die Hefezellen kommt, so dass die hemmende Wirkung auf das Enzym nicht mehr zum Tragen kommt. Dies zeigt, dass sich eine Hemmung der β -Galaktosidase nicht zwangsweise störend auf das Testsystem auswirkt.

Die gezeigten Daten bestätigen die bisher veröffentlichten Ergebnisse, die darauf schließen lassen, dass beide Enterolignane eine Wechselwirkung mit dem Estrogenrezeptor eingehen können. Inwieweit dies zu einer estrogenen oder antiestrogenen Aktivität führt, hängt von der eingesetzten Konzentration und dem Messsystem, bzw. *in vivo* vom Gewebetyp ab (Wang, 2002).

Zur estrogenen Aktivität von pflanzlichen Lignanene gibt es bisher weit weniger Untersuchungen als zu der der Enterolignane. Mesa-Siverio et al. (2008) testeten verschiedene Lignane vom Dibenzylbutantyp aus *Iryanthera lancifolia* auf proliferative Wirkung auf MCF-7-Zellen. Einige der getesteten Lignane zeigten sich aktiv, wobei die Aktivität verglichen mit der von E_2 etwa 10000-fach geringer war. Die meisten aktiven Lignane besaßen eine phenolische OH-Gruppe an einem oder an beiden Aromaten. Cosentino et al. (2007) konnten für Hydroxymatairesinol ebenfalls eine vermehrte Proliferation von MCF-7-Zellen nachweisen. Für Matairesinol ließ sich eine Aktivierung der MAP(Mitogen Activated Protein)-Kinase in Osteoblasten nachweisen, welche durch Tamoxifen und ICI 182780 antagonisierbar war (Park et al., 2002). Yoo et al. (2006) konnten zeigen, dass Trachelosid aus *Carthamus tinctorius* die Aktivität der alkalischen Phosphatase in Ishikawa-Zellen in einer vergleichbaren Konzentration verringerte wie Tamoxifen. Fujimoto et al. (2004) wiesen in einem Transaktivierungsassay für Nordihydroguajaretsäure eine agonistische Aktivität am $ER\alpha$ und eine partiell agonistisch/antagonistische Aktivität am $ER\beta$ nach.

Untersuchungen zu rein pflanzlichen Lignanene mit dem YES-Assay waren bisher nur von Pullela et al. (2005) durchgeführt worden. Es wurden Lariciresinol und Isolariciresinol sowie die jeweiligen 9-Acetoxy-Derivate der beiden Lignane aus

Ephedra viridis isoliert und untersucht, wobei keines der untersuchten Lignane Aktivität gezeigt hatte. Untersuchungen zu einer möglichen antiestrogenen Aktivität wurden in dieser Arbeit nicht durchgeführt.

Nach bisherigen Erkenntnissen zur Struktur-Wirkungsbeziehung von Phytoestrogenen wirkt sich eine phenolische OH-Gruppe begünstigend auf die Wechselwirkung mit dem ER aus (Klopman und Chakravati, 2003; Mesa-Siverio et al., 2008; Agatonovic-Kustrin et al., 2008). Den Idealfall stellt nach Klopman und Chakravati (2003) eine phenolische OH-Gruppe dar, welche auf einer Seite ein unsubstituiertes C-Atom und auf der anderen Seite zwei unsubstituierte C-Atome als benachbarte Gruppen zur Verfügung hat (Abbildung 56).

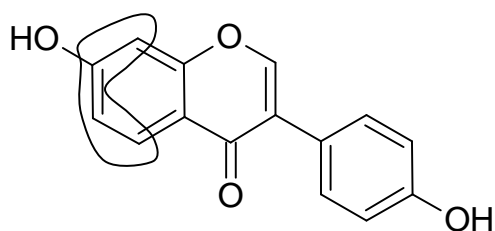


Abbildung 56 Für ER-Aktivierung begünstigendes Strukturmerkmal nach Klopman und Chakravati (2003) am Beispiel von Daidzein

Von den im Rahmen dieser Arbeit als aktiv getesteten Substanzen besitzt lediglich das Isoflavon Daidzein dieses Strukturmerkmal. Genistein hingegen, welches in dem Test eine zehnfach höhere Aktivität zeigte als Daidzein, besitzt auf beiden Seiten jeweils nur ein freies C-Atom. Arctigenin, welches im Vergleich mit den anderen Lignanen die höchste Aktivität aufwies, besitzt nur auf einer Seite der phenolischen OH-Gruppe ein unsubstituiertes C-Atom. Bei Enterolacton und Enterodiol sind jeweils benachbart zur OH-Gruppe eines und drei C-Atome unsubstituiert.

Ein Strukturmerkmal, welches sich nach Klopman und Chakravati (2003) negativ auf das estrogene Potential einer phenolischen Substanz auswirkt, ist eine zu der OH-Gruppe benachbarte Methoxygruppe - aufgrund sterischer Behinderung der Bindung. Auch diese Vorhersage trifft im Falle der hier besprochenen Lignane nicht uneingeschränkt zu. Die beiden aktiven pflanzlichen Lignane Arctigenin und Matairesinol besitzen jeweils eine Methoxygruppe benachbart zu ihrer phenolischen OH-Gruppe. Arctigenin zeigte dennoch estrogene, Matairesinol antiestrogene Aktivität, es liegt also in beiden Fällen eine Bindung an den Rezeptor vor. Die beiden Enterolignane sind trotz des Fehlens eines solchen Substituenten weniger aktiv als Arctigenin. Interessant sind vor diesem Hintergrund auch die Ergebnisse von Elsby et al. (2000), wonach nach Abspaltung einer bzw. beider OH-Gruppen von Estradiol zu

Bidesoxyestradiol im Bioassay immer noch eine Aktivität vorhanden war. Die Anwesenheit von OH-Gruppen führte zwar zu einer Steigerung der estrogenen Aktivität, war aber nicht essentiell, wie bisher angenommen.

In Übereinstimmung mit Elsby et al. (2000) kann geschlossen werden, dass mit den bisherigen errechneten Modellen für eine Struktur-Wirkungsbeziehung nicht für alle Substanzen eine Aussage hinsichtlich ihrer estrogenen Aktivität gemacht werden kann. Als ein Grund für den „promiskuitiven Charakter“ des ER wird dessen stellenweise sehr geräumige Ligandenbindungsdomäne gesehen (Brzozowski et al., 1997; Elsby et al., 2000; Pike et al., 2000). Eine Simulation der Liganden-Rezeptor-Interaktion mit potentiell estrogenen Substanzen am Computermodell kann hier hilfreich sein.

Brzozowski et al. (1997) war es gelungen, die Röntgenkristallstruktur des ER α mit Estradiol sowie mit einem Antagonisten darzustellen. Der phenolische A-Ring von E₂ bindet nach diesem Modell in einer polaren Tasche der Ligandenbindungsdomäne des Rezeptors, welche aus drei Wasserstoffbrückenbildnern, nämlich Glu353, Arg394 und einem konservierten Wassermolekül besteht. Beschränkt wird der Zugang zu dieser Bindungstasche durch eine scherenförmige Anordnung der Seitenketten von Leu387 und Phe404 (Abbildung 57 A). Diese Gesamtanordnung bietet ideale Voraussetzungen für die Bindung eines planaren Rings mit einer phenolischen OH-Gruppe. Eine weitere Wasserstoffbrücke existiert zwischen der am D-Ring befindlichen OH-Gruppe und dem Histidin 524 am anderen Ende des Rezeptors (Brzozowski et al., 1997). Die entsprechende Anordnung von Wasserstoffbrücken fand sich auch bei der Kokristallisation des partiellen Agonisten Genistein mit dem ER α (Manas et al. 2004). Ein aufgrund dieser Daten (PDB-Code 1X7R) erstelltes Modell ist in Abbildung 57 (B) dargestellt.

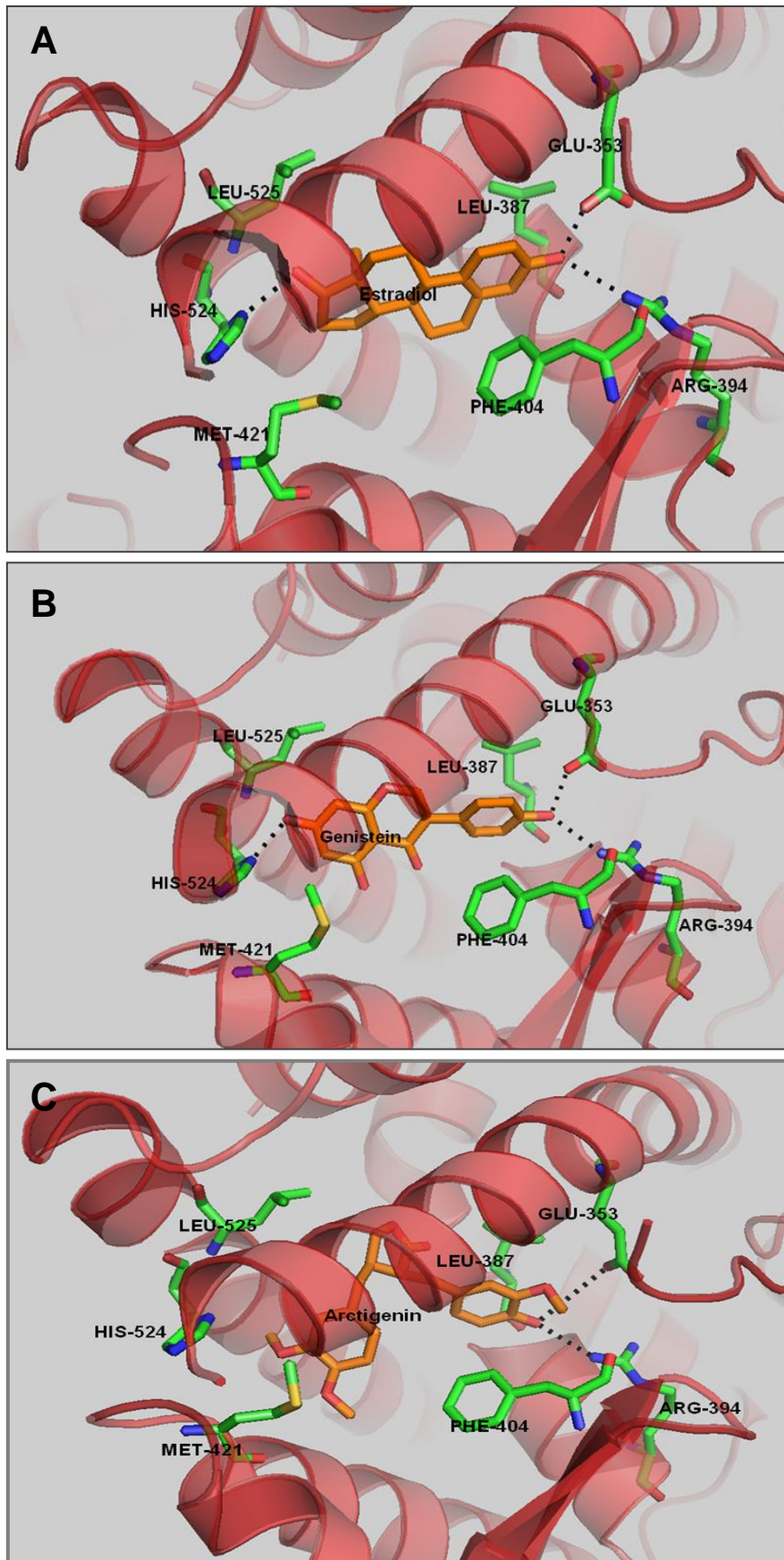


Abbildung 57 Ligandenbindungsdomäne von ER α mit E₂ (A), Genistein (B) und Arctigenin (C); Kokristallisationsdaten für A und B aus der RCSB Protein Data Bank (PDB-Code 1ERE und 1X7R), Ligandendocking mit Arctigenin durchgeführt von Prof. Dr. W. Sippl am Institut für Pharmazie, Halle (Saale); Abbildungen erstellt mit Grafikprogramm PyMOL (DeLano Scientific LLC)

Mit Hilfe der Kokristallisationsdaten aus der RCSB Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>) von ER α mit Estradiol, Genistein und 4-Hydroxytamoxifen (Brzozowski et al. 1997; Manas et al., 2004; Shiau et al., 1998) wurden Dockingstudien mit den im YES-Assay getesteten Substanzen durchgeführt. Die agonistische Aktivität des pflanzlichen Lignans Arctigenin im YES-Assay konnte bei diesen Studien bestätigt werden ebenso wie die des Isoflavones Daidzein (Aehle et al., 2009, Paper in Vorbereitung). Beide Liganden bildeten wie Genistein Wasserstoffbrücken mit Glu 353 und Arg 394. Der Dimethoxyphenylring von Arctigenin bildete zusätzliche begünstigende hydrophobe Wechselwirkungen mit Phe404, Met421 und Leu525 (Abbildung 57 C). Die Wasserstoffbrücke mit His 524 bildete allerdings nur Genistein aus. Dies steht jedoch in Einklang mit der geringeren Aktivität von Arctigenin im Vergleich zu den Isoflavonen.

Viele Lignane zeigten im YES-Assay eine offensichtliche antagonistische Wirkung. So wirkten z. B. Isolariciresinol und Lariciresinol wie bei den Untersuchungen von Pullela et al. (2005) nicht agonistisch am Rezeptor, führten aber zu einer signifikanten Verminderung der Estradiolaktivität. Allerdings zeigte Isolariciresinol auch eine inhibitorische Wirkung auf die β -Galaktosidase so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass ein Teil der abgeschwächten Estrogenwirkung durch diese Hemmung verursacht worden ist. Betrachtet man die verbleibenden pflanzlichen Lignane, so hatten neben Isolariciresinol auch Nortrachelogenin und Pinoresinol eine Hemmwirkung auf das Reportersystem. Für die semisynthetischen Lignane traf dies auf S3, S6 und S2 zu. Diese Hemmung fand jedoch jeweils bei Lignankonzentrationen statt, die der IC₅₀ im YES-Assay entsprachen. Vor diesem Hintergrund erscheint eine Hemmung von jeweils weniger als 10, bzw. bei S3 weniger als 15 % verhältnismäßig gering und lässt den Schluss zu, dass die verminderte Estrogenaktivität im YES-Assay zumindest teilweise auf eine antagonistische Wirkung auf den Rezeptor zurückzuführen ist. Diese These wird bestätigt durch eine computergestützte Ligandendockingstudie (Aehle et al. 2009, Paper in Vorbereitung). Für alle Lignanaglyka, welche eine rein inhibitorische Wirkung auf die Estradiolaktivität im YES-Assay gehabt hatten, wurde durch diese Studien eine mögliche antiestrogene Aktivität bestätigt. Die Moleküle ließen sich in die jeweils inaktive Form des Rezeptors docken, nicht aber in die aktive.

Das einzige getestete Lignanaglykosid Arctiin bildete hier eine Ausnahme unter den rein inhibitorisch wirksamen Lignanen. Der im YES-Assay beobachtete

offensichtliche antiestrogene Effekt konnte durch die Dockingergebnisse nicht bestätigt werden; das Molekül passte aufgrund seines sperrigen Zuckerrestes weder in die aktive, noch in die inaktive Form des ER. Der deutlich messbare negative Einfluss auf die Aktivität von Estradiol im Bioassay lässt sich demnach vermutlich nicht auf eine direkte Inhibition am ER zurückführen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass durch Arctiin an einer auf die Ligandenbindung folgenden Stelle eine Hemmung der Transkriptionsmaschinerie von β -Galaktosidase bewirkt wird. Ebenfalls nicht auszuschließen ist die Möglichkeit einer Bindung von Arctiin an eine andere Stelle des Estrogenrezeptors.

Nur teilweise konnte das Verhalten von Enterolacton und Hydroxymatairesinol im YES-Assay durch die Dockingstudie erklärt werden: Beide hatten im YES-Assay eine leichte estrogene und auch eine leichte inhibitorische Aktivität gezeigt. Im Computermodell ließ sich Enterolacton zwar in die aktive und in die inaktive Form docken, die inaktive Form erwies sich allerdings als energetisch ungünstig. Hydroxymatairesinol ließ sich in diesem Modell ausschließlich in die inaktive Form docken.

Es muss dabei bedacht werden, dass die Kristallstrukturen, welche den Computermodellen zur Ligandenbindung zugrundeliegenden, nur einen Moment der Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Ligand abbilden. Den Übergang mehrerer Konformationen ineinander, der in der Realität vermutlich stattfinden, wird in einem solchen Modell nicht berücksichtigen (Lambrinidis et al., 2006). Berechnungen aufgrund von Strukturwirkungsbeziehungen und Computermodelle anhand von Röntgenstrukturanalysen können Bioassays beim Nachweis estrogener Aktivität nach wie vor nicht ersetzen, wohl aber ergänzen.

Bioassays hingegen sind jeweils nur Modelle der physiologischen Gegebenheiten und jeder beinhaltet gewisse Unwägbarkeiten. So kommt die hemmende Wirkung von Enterolacton auf die Estradiolwirkung im YES-Assay möglicherweise durch eine Hemmung der β -Galaktosidase zustande. Weiterhin gibt es im Falle eines Bioassay mit Hefezellen die Möglichkeit, dass Stoffe aufgrund der vorhandenen Zellwand nicht resorbiert werden, oder aber dass sie aufgrund eines Resistenzmechanismus aktiv ausgeschleust werden (Sa-Correia und Tenreiro, 2002; Zysk et al., 1995). So hat man nachgewiesen, dass beispielsweise Estriol die Zellwand schlechter durchdringt als Estradiol und Estron. Bestimmte synthetische Estradiol-Derivate passierten die Zellwand erst nach Erhöhung der Permeabilität mit Nystatin (Zysk et al., 1995; Lyttle

et al., 1992). Ein solcher Mechanismus erklärt möglicherweise auch die Unwirksamkeit von Secoisolariciresinol im YES-Assay. Es hatte weder eine agonistische noch eine antagonistische Aktivität gezeigt, während sich das Molekül im Computermodell in die Ligandenbindungsdomäne der aktiven Form des ER docken ließ.

Mit dem YES-Assay ist es möglich, ohne Spezialausstattung in verhältnismäßig kurzer Zeit Substanzen auf ihre estrogenen und antiestrogenen Aktivität zu screenen. Dies ist in der vorliegenden Arbeit für verschiedene pflanzliche und halbsynthetische Lignane sowie für zwei Enterolignane gelungen. Für pflanzliche Extrakte hat sich der Test als nicht geeignet erwiesen, da hier neben möglichen estrogen wirksamen Komponenten vermutlich auch antiestrogenen Substanzen vorlagen und sich beide Effekte überlagerten. Für Einzelsubstanzen ist es sinnvoll, den Test auf β -Galaktosidasehemmung mitzuführen, um eine mögliche Störung des Reportersystems zu erfassen.

Wie bei jedem *in vitro*-Testsystem müssen die Ergebnisse durch alternative Testsysteme abgesichert werden.

4 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur estrogenen und antioxidativen Aktivität von Lignan- und Pflanzenextrakten mit teilweise hohem Lignangehalt durchgeführt. Des Weiteren wurde ein stereochemischer Aspekt in der Lignanbiosynthese beleuchtet.

Es konnte für das Lignan Matairesinol gezeigt werden, dass in *C. tinctorius* sowohl in den Früchten als auch in den Stängeln die linksdrehende Form vorhanden ist. Dafür ist eine kapillarelektrophoretische Methode zur Enantiomerentrennung entwickelt worden. Die Methode ist im Vergleich zu HPLC-Methoden zur Enantiomerentrennung schneller und erlaubt die gleichzeitige Quantifizierung des Lignans. In weiteren Untersuchungen könnte die Methode für die Enantiomerentrennung von weiteren Lignan-arten angepasst werden. Biosynthetisch interessant wäre hierbei die absolute Konfiguration von Secoisolariciresinol in *C. tinctorius*. Wenn diese Vorstufe von Matairesinol in ausreichender Menge isoliert werden könnte, wäre es möglich, näher zu bestimmen, an welchem Punkt der Lignanbiosynthese bei dieser Art die Stereoselektion erfolgt.

Ein weiterer interessanter Aspekt für zukünftige Arbeiten ist der potentielle Unterschied in der Bioaktivität verschiedener Enantiomere eines Lignans. Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Untersuchungen zur estrogenen Aktivität von Matairesinol wurden ausschließlich mit der linksdrehenden Form des Lignans durchgeführt. Da (+)-Matairesinol derzeit nicht kommerziell erhältlich ist, würde sich die Isolierung aus entsprechenden Spezies und anschließende Testung im YES-Assay anbieten. Arten, in denen das Vorkommen von (+)-Matairesinol bekannt ist, sind z. B. *Daphne ssp.* und *Wikstroemia sikokiana*.

Die Lignane Arctigenin, Matairesinol und Secoisolariciresinol zeigten in den Antioxidativtests ein antioxidatives Potential, was teilweise stärker war als das von Ascorbinsäure. Aus den getesteten Pflanzenextrakten zeigten diejenigen aus *Arctium lappa*, *Arctium minus* und *Arctium nemorosum* sowie aus Echinops

sphaerocephalus eine besonders hohe antioxidative Aktivität. Die Lignane Arctigenin und Matairesinol und deren Glykoside, welche in den Früchten der *Arctium*-Arten in großen Mengen vorhanden waren, schienen hierbei nicht die aktivitätsbestimmenden Komponenten zu sein. Sie leisten offensichtlich einen Beitrag zur antioxidativen Aktivität und wirken möglicherweise wirkungsverstärkend für andere Stoffe. In *Echinops sphaerocephalus* konnte keines dieser Lignane nachgewiesen werden. Ein Ansatzpunkt für weitergehende Untersuchungen wäre die weitere Anreicherung bzw. Isolierung und Identifizierung der aktivitätsbestimmenden Komponenten für Extrakte, die sich als besonders aktiv erwiesen haben. Sollten sich die antioxidativen Komponenten als nicht zytotoxisch erweisen, stünden damit möglicherweise natürliche Antioxidantien für die Lebensmittelindustrie bzw. für die Herstellung von Nahrungsergänzungsmitteln zur Verfügung.

Die estrogenen Aktivität von Lignanen wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals mit einem Hefesystem, dem YES-Assay nachgewiesen. Das pflanzliche Lignan Arctigenin zeigte dabei überraschenderweise eine starke agonistische Wirkung im System. Matairesinol, Nortrachelogenin, Pinoresinol und Isolariciresinol sowie drei der getesteten semisynthetischen Lignane antagonisierten die Estradiolwirkung. Diese Ergebnisse werden bestätigt durch eine computergestützte Ligandendockingstudie. Enterolacton, Enterodiol und Hydroxymatairesinol zeigten im Hefesystem eine partiell agonistische/antagonistische Wirkung. Mit den vorliegenden Daten ist ein weiterer Beleg dafür erbracht, dass sowohl Enterolignane als auch pflanzliche Lignane eine Wechselwirkung mit dem ER α eingehen können. Für das Lignan Arctigenin wurde dies in den Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit erstmals nachgewiesen. Dies ist insofern von Belang, als dass pflanzliche Lignane teilweise unverändert aus dem menschlichen Darm resorbiert werden und nicht vollständig zu den Enterolignanen umgesetzt werden.

In weiteren Untersuchungen wäre zu klären, inwieweit widersprüchliche Ergebnisse zwischen den Ergebnissen des YES-Assays und dem Ligandendocking im Testsystem begründet liegen. So wäre von Interesse, ob

Secoisolariciresinol schlechter als andere Lignane in die Hefezelle aufgenommen wird, was die nicht vorhandene Aktivität im Assay erklären würde.

Für pflanzliche Lignane, welche in den vorliegenden Untersuchungen eine agonistische oder antagonistische Aktivität gezeigt haben, wären zur Ergänzung Untersuchungen mit einem weiteren Testsystem, beispielsweise unter Verwendung von MCF-7-Zellen sinnvoll. Dieser Test ist aufwändig in der Etablierung und Durchführung, hat aber aufgrund der Verwendung humaner Brustkrebszellen eine hohe biologische Relevanz.

Weiterhin wäre es interessant, die Interaktion aller getesteten Lignane mit dem ER β zu untersuchen. Es ist bekannt, dass die Isoflavone Genistein und Daidzein eine höhere Affinität zu ER β haben als zu ER α (Bovee et al. (2004), Mueller et al. (2002)). Vergleichende Untersuchungen an Lignanen könnten mit einem Transaktivierungsassay in Hefezellen unternommen werden, welche den humanen ER β exprimieren. Entsprechende Systeme sind bei Bovee et al. (2004) und Liang et al. (2008) beschrieben.

5 Literatur

- Adlercreutz, H. (1998)** Human Health and Phytoestrogens *Kenneth S. Korach: Reproductive and Developmental Toxicology Marcel Dekker, Inc.*,
- Adlercreutz, H. (1999)** Phytoestrogens. State of the art *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 7, 201-207
- Adlercreutz, H. (2003)** Phytoestrogens and breast cancer *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 83, 113-118
- Adlercreutz, H. (2007)** Lignans and human health *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 44, 483-525
- Aehle, E., Raynaud-Le Grandic, S., Ralainirina, R., Baltora-Rosset, S., Mesnard, F., Prouillet, C., Maziere, J. C., Fliniaux, M. A. (2004)** Development and evaluation of an enriched natural antioxidant preparation obtained from aqueous spinach (*Spinacia oleracea*) extracts by an adsorption procedure *Food Chemistry*, 86, 579-585
- Agatonovic-Kustrin, S., Turner, J. V., Glass, B. D. (2008)** Molecular structural characteristics as determinants of estrogen receptor selectivity *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48, 369-375
- Altria, K. D. (1993)** Essential Peak Area Normalization for Quantitative Impurity Content Determination by Capillary Electrophoresis *Chromatographia*, 35, 177-182
- Ames, B. N., Shigenaga, M. K., Hagen, T. M. (1993)** Oxidants, Antioxidants, and the Degenerative Diseases of Aging *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90, 7915-7922
- Arts, I. C. W., Hollman, P. C. H. (2005)** Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies *American Journal of Clinical Nutrition*, 81, 317S-325S
- Bannwart, C., Adlercreutz, H., Wahala, K., Brunow, G., Hase, T. (1989)** Detection and Identification of the Plant Lignans Lariciresinol, Isolariciresinol and Secoisolariciresinol in Human-Urine *Clinica Chimica Acta*, 180, 293-301
- Belder, D., Schomburg, G. (1994)** Chiral Separations of Basic and Acidic Compounds in Modified Capillaries Using Cyclodextrin-Modified Capillary Zone Electrophoresis *Journal of Chromatography A*, 666, 351-365
- Benzie, I. F. F., Strain, J. J. (1996)** The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": The FRAP assay *Analytical Biochemistry*, 239, 70-76
- Billinsky, J. L., Marcoux, M. R., Krol, E. S. (2007)** Oxidation of the lignan nordihydroguaiaretic acid *Chemical Research in Toxicology*, 20, 1352-1358

- Blois, M. S. (1958)** Antioxidant Determinations by the Use of A Stable Free Radical
Nature, 181, 1199-1200
- Bovee, T. F. H., Helsdingen, R. J. R., Rietjens, I. M. C. M., Keijer, J., Hoogenboom, R. L. A. P. (2004)** Rapid yeast estrogen bioassays stably expressing human estrogen receptors alpha and beta, and green fluorescent protein: a comparison of different compounds with both receptor types *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 91, 99-109
- Brandwilliams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C. (1995)** Use of A Free-Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity *Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*, 28, 25-30
- Breinholt, V., Larsen, J. C. (1998)** Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF7 cell proliferation assay *Chemical Research in Toxicology*, 11, 622-629
- Brzezinski, A., Debi, A. (1999)** Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *European Journal of Obstetrics Gynecology and Reproductive Biology*, 85, 47-51
- Brzozowski, A. M., Pike, A. C. W., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J. A., Carlquist, M. (1997)** Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor *Nature*, 389, 753-758
- Bub, A., Watzl, B., Abrahamse, L., Delincee, H., Adam, S., Wever, J., Muller, H., Rechkemmer, G. (2000)** Moderate intervention with carotenoid-rich vegetable products reduces lipid peroxidation in men *Journal of Nutrition*, 130, 2200-2206
- Carreau, C., Flouriot, G., Bennetau-Pelissero, C., Potier, M. (2008)** Enterodiol and enterolactone, two major diet-derived polyphenol metabolites have different impact on ER alpha transcriptional activation in human breast cancer cells *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 110, 176-185
- Chen, J. M., Thompson, L. U. (2003)** Lignans and tamoxifen, alone or in combination, reduce human breast cancer cell adhesion, invasion and migration in vitro *Breast Cancer Research and Treatment*, 80, 163-170
- Cornwell, T., Cohick, W., Raskin, I. (2004)** Dietary phytoestrogens and health *Phytochemistry*, 65, 995-1016
- Cosentino, M., Marino, F., Ferrari, M., Rasini, E., Bombelli, R., Luini, A., Legnaro, M., Delle Canne, M. G., Luzzani, M., Crema, F., Paracchini, S., Lecchini, S. (2007)** Estrogenic activity of 7-hydroxymatairesinol potassium acetate (HMR/lignan (TM)) from Norway spruce (*Picea abies*) knots and of its active metabolite enterolactone in MCF-7 cells *Pharmacological Research*, 56, 140-147
- Culha, M., Fox, S., Sepaniak, M. (2000)** Selectivity in capillary electrochromatography using native and single isomer anionic cyclodextrin reagents *Analytical Chemistry*, 72, 88-95

- Daiber, A., Ullrich, V. (2002)** Radical chemistry in the organism - Nitrogen monoxide, superoxide and peroxyxynitrite *Chemie in Unserer Zeit*, 36, 366-375
- Davin, L. B., Wang, H. B., Crowell, A. L., Bedgar, D. L., Martin, D. M., Sarkanen, S., Lewis, N. G. (1997)** Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by an auxiliary (dirigent) protein without an active center *Science*, 275, 362-366
- Davin, L. B., Wang, C. Z., Helms, G. L., Lewis, N. G. (2003)** [C-13]-Specific labeling of 8-2' linked (-)-cis-blechnic, (-)-trans-blechnic and (-)-brainic acids in the fern *Blechnum spicant* *Phytochemistry*, 62, 501-511
- Davin, L. B., Lewis, N. G. (2003)** An historical perspective on lignan biosynthesis: monolignol, allylphenol and hydroxycinnamic acid coupling and downstream metabolism *Phytochemistry Reviews*, 2, 257-288
- Dayan, F. E., Kuhajek, J. M., Canel, C., Watson, S. B., Moraes, R. M. (2003)** Podophyllum peltatum possesses a beta-glucosidase with high substrate specificity for the aryltetralin lignan podophyllotoxin *Biochimica et Biophysica Acta-Proteins and Proteomics*, 1646, 157-163
- de Boer, T., de Zeeuw, R. A., de Jong, G. J., Ensing, K. (2000)** Recent innovations in the use of charged cyclodextrins in capillary electrophoresis for chiral separations in pharmaceutical analysis *Electrophoresis*, 21, 3220-3239
- Dinkova-Kostova, A. T., Gang, D. R., Davin, L. B., Bedgar, D. L., Chu, A., Lewis, N. G. (1996)** (+)-Pinoresinol/(+)-lariciresinol reductase from Forsythia intermedia - Protein purification, cDNA cloning, heterologous expression and comparison to isoflavone reductase *Journal of Biological Chemistry*, 271, 29473-29482
- Diplock, A. T., Charleux, J. L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Vina-Ribes, J. (1998)** Functional food science and defence against reactive oxidative species *British Journal of Nutrition*, 80, S77-S112
- Dixon, R. A. (2004)** Phytoestrogens *Annual Review of Plant Biology*, 55, 225-261
- Duthie, G., Crozier, A. (2000)** Plant-derived phenolic antioxidants *Current Opinion in Lipidology*, 11, 43-47
- Eklund, P. C., Langvik, O. K., Warna, J. P., Salmi, T. O., Willfor, S. M., Sjolholm, R. E. (2005)** Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3, 3336-3347
- Elsby, R., Ashby, J., Sumpter, J. P., Brooks, A. N., Pennie, W. D., Maggs, J. L., Lefevre, P. A., Odum, J., Beresford, N., Paton, D., Park, B. K. (2000)** Obstacles to the prediction of estrogenicity from chemical structure: Assay-mediated metabolic transformation and the apparent promiscuous nature of the estrogen receptor *Biochemical Pharmacology*, 60, 1519-1530

- Ferguson, C. A., Nahar, L., Finnie, D., Kumarasamy, Y., Reid, R., Mir-Babayev, N. F., Sarker, S. D. (2003)** Centaurea scabiosa: a source of dibenzylbutyrolactone lignans *Biochemical Systematics and Ecology*, 31, 303-305
- Folin, Ciocalteu (1927)** Tyrosine and tryptophan determinations proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 73, 627-5
- Frankel, E. N., Meyer, A. S. (2000)** The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 1925-1941
- Fujimoto, N., Kohta, R., Kitamura, S., Honda, H. (2004)** Estrogenic activity of an antioxidant, nordihydroguaiaretic acid (NDGA) *Life Sciences*, 74, 1417-1425
- Fujita, M., Gang, D. R., Davin, L. B., Lewis, N. G. (1999)** Recombinant pinoresinol-lariciresinol reductases from western red cedar (*Thuja plicata*) catalyze opposite enantiospecific conversions *Journal of Biological Chemistry*, 274, 618-627
- Fuss, E. (2003)** Lignans in plant cell and organ cultures: An overview *Phytochemistry Reviews*, 2, 307-320
- Garrett, S. D., Lee, H. A., Morgan, M. R. A. (1999)** A nonisotopic estrogen receptor-based assay to detect estrogenic compounds *Nature Biotechnology*, 17, 1219-1222
- Giannopolitis, G. N., Ries, S. K. (1977)** In vitro Production of Superoxide Radical from Paraquat and Its Interactions with Monuron and Diuron *Weed Science*, 25, 298-303
- Gongora, L., Menez, S., Giner, R. M., Recio, M. D., Schinella, G., Rios, J. L. (2003)** Inhibition of xanthine oxidase by phenolic conjugates of methylated quinic acid *Planta Medica*, 69, 396-401
- Goodman, T., Grice, H. C., Becking, G. C., Salem, F. A. (1970)** *Laboratory Investigation*, 23, 93-107
- Gutteridge, J. M. C. (1994)** Biological Origin of Free-Radicals, and Mechanisms of Antioxidant Protection *Chemico-Biological Interactions*, 91, 133-140
- Hager (2006)** Handbuch der Drogen und Arzneistoffe,
- Hallmans, G., Zhang, J. X., Lundin, E., Stattin, P., Johansson, A., Johansson, I., Hulten, K., Winkvist, A., Lenner, P., Aman, P., Adlercreutz, H. (2003)** Rye, lignans and human health *Proceedings of the Nutrition Society*, 62, 193-199
- Hansel, R., Schulz, H., Leuckert, C. (1964)** Das Lignanglykosid Arctiin Als Chemotaxonomisches Merkmal in der Familie der Compositae *Zeitschrift für Naturforschung Part B-Chemie Biochemie Biophysik Biologie und Verwandten Gebiete*, B 19, 727-&

- Haworth, R. D., Kelly, W. (1937)** The Constituents of Natural Phenolic Resins. Part VIII. Lariciresinol, Cubebin, and Some Stereochemical Relationships. *Journal of Chemical Society*,
- Hertog, M. G. L., Feskens, E. J. M., Hollman, P. C. H., Katan, M. B., Kromhout, D. (1993)** Dietary Antioxidant Flavonoids and Risk of Coronary Heart-Disease - the Zutphen Elderly Study *Lancet*, 342, 1007-1011
- Horn, G., Kupfer, A., Kalbitz, J., Gerdelbracht, H. J., Kluge, H., Eder, K., Drager, B. (2008)** Great globe thistle fruit (*Echinops sphaerocephalus* L.), a potential new oil crop *European Journal of Lipid Science and Technology*, 110, 662-667
- Hosseinian, F. S., Muir, A. D., Westcott, N. D., Krol, E. S. (2007)** AAPH-mediated antioxidant reactions of secoisolariciresinol and SDG *Organic & Biomolecular Chemistry*, 5, 644-654
- Hutchins, A. M., Martini, M. C., Olson, B. A., Thomas, W., Slavin, J. L. (2000)** Flaxseed influences urinary lignan excretion in a dose-dependent manner in postmenopausal women *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 9, 1113-1118
- Ivanov, S. A., Aitzetmuller, K. (1998)** Tocopherol and tocotrienol composition of the seed lipids of a number of species representing the Bulgarian flora *Fett-Lipid*, 100, 348-352
- Janini, G. M., Muschik, G. M., Issaq, H. J. (1996)** Electrokinetic chromatography in suppressed electroosmotic flow environment: Use of a charged cyclodextrin for the separation of enantiomers and geometric isomers *Electrophoresis*, 17, 1575-1583
- Jin, J. S., Zhao, Y. F., Nakamura, N., Akao, T., Kakiuchi, N., Hattori, M. (2007)** Isolation and characterization of a human intestinal bacterium, *Eubacterium* sp ARC-2, capable of demethylating arctigenin, in the essential metabolic process to enterolactone *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 30, 904-911
- Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Heinonen, M. (2001)** Berry phenolics and their antioxidant activity *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4076-4082
- Katsube, N., Iwashita, K., Tsushida, T., Yamaki, K., Kobori, M. (2003)** Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 68-75
- Kinjo, J., Tsuchihashi, R., Morito, K., Hirose, T., Aomori, T., Nagao, T., Okabe, H., Nohara, T., Masamune, Y. (2004)** Interactions of phytoestrogens with estrogen receptors alpha and beta (III). Estrogenic activities of soy isoflavone aglycones and their metabolites isolated from human urine *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 27, 185-188
- Klockow, A., Amado, R., Widmer, H. M., Paulus, A. (1996)** The influence of buffer composition on separation efficiency and resolution in capillary electrophoresis of

- 8-aminonaphthalene-1,3,6-trisulfonic acid labeled monosaccharides and complex carbohydrates *Electrophoresis*, 17, 110-119
- Klopman, G., Chakravarti, S. K. (2003)** Structure-activity relationship study of a diverse set of estrogen receptor ligands (I) using MultiCASE expert system *Chemosphere*, 51, 445-459
- Koike, K., Jia, Z., Guo, H., Nikoido, T., Liu, Y., Zhao, Y., Guo, D. (2002)** A new neolignan glycoside from the roots of *Echinops grijissii* *Natural Medicines (Tokyo, Japan)*, 56, 255-257
- Kuiper, G. G. J. M., Gustafsson, J. A. (1997)** The novel estrogen receptor-beta subtype: Potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens *Febs Letters*, 410, 87-90
- Kuiper, G. G. J. M., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., Gustafsson, J. A. (1997)** Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta *Endocrinology*, 138, 863-870
- Kumarasamy, Y., Middleton, M., Reid, R. G., Nahar, L., Sarker, S. D. (2003)** Biological activity of serotonin conjugates from the seeds of *Centaurea nigra* *Fitoterapia*, 74, 609-612
- Kuo, C. C., Chiang, W. C., Liu, G. P., Chien, Y. L., Chang, J. Y., Lee, C. K., Lo, J. M., Huang, S. L., Shih, M. C., Kuo, Y. H. (2002)** 2,2'-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical-scavenging active components from adlay (*Coix lachryma-jobi* L. var. *ma-yuen* Stapf) hulls *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 5850-5855
- Lambrinidis, G., Halabalaki, M., Katsanou, E. S., Skaltsounis, A. L., Alexis, M. N., Mikros, E. (2006)** The estrogen receptor and polyphenols: molecular simulation studies of their interactions, a review *Environmental Chemistry Letters*, 4, 159-174
- Lampe, J. W. (1999)** Health effects of vegetables and fruit: assessing mechanisms of action in human experimental studies *American Journal of Clinical Nutrition*, 70, 475S-490S
- Liang, K. W., Yang, L. Q., Xiao, Z. M., Huang, J. (2009)** A Bipartite Recombinant Yeast System for the Identification of Subtype-Selective Estrogen Receptor Ligands *Molecular Biotechnology*, 41, 53-62
- Liggins, J., Grimwood, R., Bingham, S. A. (2000)** Extraction and quantification of lignan phytoestrogens in food and human samples *Analytical Biochemistry*, 287, 102-109
- Liu, S. M., Chen, K. S., Schliemann, W., Strack, D. (2005)** Isolation and identification of arctiin and arctigenin in leaves of burdock (*Arctium lappula* L.) by polyamide column chromatography in combination with HPLC-ESI/MS *Phytochemical Analysis*, 16, 86-89

- Lucas, R., Robles, A., de Cienfuegos, G. A., Galvez, A. (2000)** beta-glucosidase from *Chalara paradoxa* CH32: Purification and properties *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3698-3703
- Lyttle, C. R., Damianmatsumura, P., Juul, H., Butt, T. R. (1992)** Human Estrogen-Receptor Regulation in A Yeast Model System and Studies on Receptor Agonists and Antagonists *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 42, 677-685
- MacDonald-Wicks, L. K., Wood, L. G., Garg, M. L. (2006)** Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2046-2056
- Manas, E. S., Xu, Z. B., Unwalla, R. J., Somers, W. S. (2004)** Understanding the selectivity of genistein for human estrogen receptor-beta using X-ray crystallography and computational methods *Structure*, 12, 2197-2207
- Maranz, S., Wiesman, Z., Garti, N. (2003)** Phenolic constituents of shea (*Vitellaria paradoxa*) kernels *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 6268-6273
- Marco, J. A., Sanz, J. F., Sancenon, F., Susanna, A., Rustaiyan, A., Saberi, M. (1992)** Sesquiterpene Lactones and Lignans from *Centaurea* Species *Phytochemistry*, 31, 3527-3530
- Maruta, Y., Kawabata, J., Niki, R. (1995)** Antioxidative Caffeoylquinic Acid-Derivatives in the Roots of Burdock (*Arctium-Lappa* L) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 2592-2595
- Masaki, H., Atsumi, T., Sakurai, H. (1994)** Hamamelitannin As A New Potent Active Oxygen Scavenger *Phytochemistry*, 37, 337-343
- Masuoka, N., Kubo, I. (2004)** Characterization of xanthine oxidase inhibition by anacardic acids *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease*, 1688, 245-249
- Mazur, W. M., Uehara, M., Wahala, K., Adlercreutz, H. (2000)** Phyto-oestrogen content of berries, and plasma concentrations and urinary excretion of enterolactone after a single strawberry-meal in human subjects *British Journal of Nutrition*, 83, 381-387
- Meagher, L. P., Beecher, G. R., Flanagan, V. P., Li, B. W. (1999)** Isolation and characterization of the lignans, isolariciresinol and pinoresinol, in flaxseed meal *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 3173-3180
- Mellenthin, O., Galensa, R. (1999)** Analysis of polyphenols using capillary zone electrophoresis and HPLC: Detection of soy, lupin, and pea protein in meat products *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 594-602
- Mesa-Siverio, D., Machin, R. P., Estevez-Braun, A., Ravelo, A. G., Lock, O. (2008)** Structure and estrogenic activity of new lignans from *Iranthera lancifolia* *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 3387-3394

- Milder, I. E. J., Arts, L. C. W., Venema, D. P., Lasaroms, J. J. P., Wahala, K., Hollman, P. C. H. (2004)** Optimization of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of the plant lignans secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, and pinoresinol in foods *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 4643-4651
- Milder, I. E. J., Arts, I. C. W., van de Putte, B., Venema, D. P., Hollman, P. C. H. (2005)** Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol *British Journal of Nutrition*, 93, 393-402
- Morant, A. V., Jorgensen, K., Jorgensen, C., Paquette, S. M., Sanchez-Perez, R., Moller, B. L., Bak, S. (2008)** beta-glucosidases as detonators of plant chemical defense *Phytochemistry*, 69, 1795-1813
- Moss, G. P. (2000)** Nomenclature of lignans and neolignans (IUPAC Recommendations 2000) *Pure and Applied Chemistry*, 72, 1493-1523
- Mosselman, S., Polman, J., Dijkema, R. (1996)** ER beta: Identification and characterization of a novel human estrogen receptor *Febs Letters*, 392, 49-53
- Moure, A., Franco, D., Sineiro, J., Dominguez, H., Nunez, M. J., Lema, J. M. (2000)** Evaluation of extracts from Gevuina avellana hulls as antioxidants *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 3890-3897
- Mousavi, Y., Adlercreutz, H. (1992)** Enterolactone and Estradiol Inhibit Each Others Proliferative Effect on Mcf-7 Breast-Cancer Cells in Culture *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 41, 615-619
- Mueller, S. O. (2002)** Overview of in vitro tools to assess the estrogenic and antiestrogenic activity of phytoestrogens *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 777, 155-165
- Mueller, S. O., Simon, S., Chae, K., Metzler, M., Korach, K. S. (2004)** Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor alpha (ER alpha) and ER beta in human cells *Toxicological Sciences*, 80, 14-25
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer H.K., Schäfer-Korting, M. (2001)** Mutschler Arzneimittelwirkungen; Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie *Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart*,
- Nagatsu, A., Zhang, H. L., Watanabe, T., Taniguchi, N., Hatano, K., Mizukami, H., Sakakibara, J. (1998)** New steroid and matairesinol glycosides from safflower (*Carthamus tinctorius* L.) oil cake *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, 46, 1044-1047
- Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, M., Sakai, M., Hara, Y. (1996)** Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical *Free Radical Biology and Medicine*, 21, 895-902

- Nishihara, T., Nishikawa, J., Kanayama, T., Dakeyama, F., Saito, K., Imagawa, M., Takatori, S., Kitagawa, Y., Hori, S., Utsumi, H. (2000)** Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay *Journal of Health Science*, 46, 282-298
- Noguchi, A., Fukui, Y., Iuchi-Okada, A., Kakutani, S., Satake, H., Iwashita, T., Nakao, M., Umezawa, T., Ono, E. (2008)** Sequential glucosylation of a furofuran lignan, (+)-sesarinol, by *Sesamum indicum* UGT71A9 and UGT94D1 glucosyltransferases *Plant Journal*, 54, 415-427
- Nose, M., Fujimoto, T., Nishibe, S., Ogihara, Y. (1993)** Structural Transformation of Lignan Compounds in Rat Gastrointestinal-Tract .2. Serum Concentration of Lignans and Their Metabolites *Planta Medica*, 59, 131-134
- Okunishi, T., Umezawa, T., Shimada, M. (2000)** Enantiomeric compositions and biosynthesis of *Wikstroemia sikokiana* lignans *Journal of Wood Science*, 46, 234-242
- Okunishi, T., Sakakibara, N., Suzuki, S., Umezawa, T., Shimada, M. (2004)** Stereochemistry of matairesinol formation by *Daphne secoisolariciresinol* dehydrogenase *Journal of Wood Science*, 50, 77-81
- Okunishi, T., Umezawa, T., Shimada, M. (2004)** Semi-micro chiral HPLC analysis of lignans *Journal of Wood Science*, 50, 93-96
- Packer, L., Rimbach, G., Virgili, F. (1999)** Antioxidant activity and biologic properties of a procyanidin-rich extract from pine (*Pinus maritima*) bark, pycnogenol *Free Radical Biology and Medicine*, 27, 704-724
- Palter, R., Lundin, R. E. (1970)** A Bitter Principle of Safflower - Matairesinol Monoglucoside *Phytochemistry*, 9, 2407-2409
- Park, Y. H., Park, H. K., Lee, H. J., Park, S. M., Lee, W. J. (2002)** Phytoestrogen-induced phosphorylation of MAP kinase in osteoblasts is mediated by membrane estrogen receptor *Korean Journal of Physiology & Pharmacology*, 6, 165-169
- Pedrielli, P., Skibsted, L. H. (2002)** Antioxidant synergy and regeneration effect of quercetin, (-)-epicatechin, and (+)-catechin on alpha-tocopherol in homogeneous solutions of peroxidating methyl linoleate *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 7138-7144
- Pietarinen, S. P., Willfor, S. M., Ahotupa, M. O., Hemming, J. E., Holmbom, B. R. (2006)** Knotwood and bark extracts: strong antioxidants from waste materials *Journal of Wood Science*, 52, 436-444
- Pietta, P. G. (2000)** Flavonoids as antioxidants *Journal of Natural Products*, 63, 1035-1042
- Pike, A. C. W., Brzozowski, A. M., Walton, J., Hubbard, R. E., Bonn, T., Gustafsson, J. A., Carlquist, M. (2000)** Structural aspects of agonism and antagonism in the oestrogen receptor *Biochemical Society Transactions*, 28, 396-400

- Pinto, B., Bertoli, A., Noccioli, C., Garritano, S., Reali, D., Piqelli, L. (2008)** Estradiol-antagonistic activity of phenolic compounds from leguminous plants *Phytotherapy Research*, 22, 362-366
- Prior, R. L., Wu, X. L., Schaich, K. (2005)** Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302
- Pullela, S. V., Takamatsu, S., Khan, S. I., Khan, I. A. (2005)** Isolation of lignans and biological activity studies of Ephedra viridis *Planta Medica*, 71, 789-791
- Rahman, M. M., Ichiyanagi, T., Komiyama, T., Hatano, Y., Konishi, T. (2006)** Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism *Free Radical Research*, 40, 993-1002
- Rice, S., Whitehead, S. A. (2006)** Phytoestrogens and breast cancer - promoters or protectors? *Endocrine-Related Cancer*, 13, 995-1015
- Riggs, B. L., Hartmann, L. C. (2003)** Drug therapy: Selective estrogen-receptor modulators - Mechanisms of action and application to clinical practice *New England Journal of Medicine*, 348, 618-629
- Rossouw, J. E., Anderson, G. L., Prentice, R. L., LaCroix, A. Z., Kooperberg, C., Stefanick, M. L., Jackson, R. D., Beresford, S. A. A., Howard, B. V., Johnson, K. C., Kotchen, M., Ockene, J. (2002)** Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women - Principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial *Jama-Journal of the American Medical Association*, 288, 321-333
- Routledge, E. J., Sumpter, J. P. (1996)** Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15, 241-248
- Rudaz, S., Veuthey, J. L., Desiderio, C., Fanali, S. (1998)** Use of cyclodextrins in capillary electrophoresis: Resolution of tramadol enantiomers *Electrophoresis*, 19, 2883-2889
- Sa-Correia, I., Tenreiro, S. (2002)** The multidrug resistance transporters of the major facilitator superfamily, 6 years after disclosure of *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence *Journal of Biotechnology*, 98, 215-226
- Saarinen, N. M., Smeds, A., Makela, S. I., Ammala, J., Hakala, K., Pihlava, J. M., Ryhanen, E. L., Sjöholm, R., Santti, R. (2002)** Structural determinants of plant lignans for the formation of enterolactone in vivo *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 777, 311-319
- Saleem, M., Kim, H. J., Ali, M. S., Lee, Y. S. (2005)** An update on bioactive plant lignans *Natural Product Reports*, 22, 696-716

- Schlesier, K., Harwat, M., Bohm, V., Bitsch, R. (2002)** Assessment of antioxidant activity by using different in vitro methods *Free Radical Research*, 36, 177-187
- Schmidt, T. J., Hemmati, S., Fuss, E., Alfermann, A. W. (2006)** A combined HPLC-UV and HPLC-MS method for the identification of lignans and its application to the lignans of *Linum usitatissimum* L. and *L-bienne* Mill *Phytochem. Anal.*, 17, 299-311
- Schmitt, T., Engelhardt, H. (1993)** Charged and Uncharged Cyclodextrins As Chiral Selectors in Capillary Electrophoresis *Chromatographia*, 37, 475-481
- Shiau, A. K., Barstad, D., Loria, P. M., Cheng, L., Kushner, P. J., Agard, D. A., Greene, G. L. (1998)** The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen *Cell*, 95, 927-937
- Shoeb, M., Jaspars, M., MacManus, S. M., Majinda, R. R. T., Sarker, S. D. (2004)** Epoxy lignans from the seeds of *Centaurea cyanus* (Asteraceae) *Biochemical Systematics and Ecology*, 32, 1201-1204
- Shoeb, M., Celik, S., Jaspars, M., Kumarasamy, Y., MacManus, S. M., Nahar, L., Paul, K. T. L. D., Sarker, S. D. (2005)** Isolation, structure elucidation and bioactivity of schischkiniin, a unique indole alkaloid from the seeds of *Centaurea schischkinii* *Tetrahedron*, 61, 9001-9006
- Shoulars, K., Brown, T., Alejandro, M. A., Crowley, J., Markaverich, B. M. (2002)** Identification of nuclear type II[H-3]estradiol binding sites as histone H4 *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296, 1083-1090
- Shukla, Y. N. (2003)** Chemical, botanical and pharmacological studies on the genus *Echinops*: a review,
- Sicilia, T., Niemeyer, H. B., Honig, D. M., Metzler, M. (2003)** Identification and stereochemical characterization of lignans in flaxseed and pumpkin seeds *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 1181-1188
- Simo, C., Gallardo, A., Roman, J. S., Barbas, C., Cifuentes, A. (2002)** Fast and sensitive capillary electrophoresis method to quantitatively monitor ibuprofen enantiomers released from polymeric drug delivery systems *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 767, 35-43
- Singleton, V. L., Rossi, J. A. (1965)** A Comparison of Carrier Gases Upon Chromatograms When Using A Flame Ionization Detector with Sub-Ambient Temperature Programming *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158
- Smeds, A., Hakala, K. (2003)** Liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for the plant lignan 7-hydroxymatairesinol and its potential metabolites in

- human plasma *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 793, 297-308
- Steinmetz, K. A., Potter, J. D. (1996)** Vegetables, fruit, and cancer prevention: A review *Journal of the American Dietetic Association*, 96, 1027-1039
- Stopper, H., Schmitt, E., Kobras, K. (2005)** Genotoxicity of phytoestrogens *Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 574, 139-155
- Suja, K. P., Jayalekshmy, A., Arumughan, C. (2005)** In vitro studies on antioxidant activity of lignans isolated from sesame cake extract *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85, 1779-1783
- Suzuki, S., Umezawa, T., Shimada, M. (1998)** Stereochemical difference in secoisolariciresinol formation between cell-free extracts from petioles and from ripening seeds of *Arctium lappa* L *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 62, 1468-1470
- Suzuki, S., Umezawa, T., Shimada, M. (2002)** Stereochemical diversity in lignan biosynthesis of *Arctium lappa* L *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 66, 1262-1269
- Suzuki, S., Umezawa, T. (2007)** Biosynthesis of lignans and norlignans *Journal of Wood Science*, 53, 273-284
- Takaku, N., Choi, D. H., Mikame, K., Okunishi, T., Suzuki, S., Ohashi, H., Umezawa, T., Shimada, M. (2001)** Lignans of *Chamaecyparis obtusa* *Journal of Wood Science*, 47, 476-482
- Tene, M., Tane, P., Sondengam, B. L., Connolly, J. D. (2004)** Lignans from the roots of *Echinops giganteus* *Phytochemistry*, 65, 2101-2105
- Terabe, S., Ozaki, H., Otsuka, K., Ando, T. (1985)** Electrokinetic Chromatography with "2-O-Carboxymethyl-Beta-Cyclodextrin As A Moving Stationary Phase *Journal of Chromatography*, 332, 211-217
- Tiwari, A. K., Srinivas, P. V., Kumar, S. P., Rao, J. M. (2001)** Free radical scavenging active components from *Cedrus deodara* *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4642-4645
- Tsitsimpikou, C., Voutou, D., Christakopoulos, P., Kekos, D., Macris, B. J., Kolisis, F. N. (1994)** Studies of the Effect of Organic-Solvents on the Stability of Beta-Glucosidase from *Fusarium-Oxysporum* *Biotechnology Letters*, 16, 57-62
- Tyagi, R., Gupta, M. N. (1998)** Stability of enzymes in water/organic co-solvent mixtures *Biotechnology Techniques*, 12, 569-570

- Umezawa, T., Davin, L. B., Lewis, N. G. (1991)** Formation of Lignans (-)-Secoisolariciresinol and (-)-Matairesinol with Forsythia-Intermedia Cell-Free-Extracts *Journal of Biological Chemistry*, 266, 10210-10217
- Umezawa, T. (2003)** Diversity in lignan biosynthesis *Phytochemistry Reviews*, 2, 371-390
- Unno, T., Sugimoto, A., Kakuda, T. (2000)** Scavenging effect of tea catechins and their epimers on superoxide anion radicals generated by a hypoxanthine anal xanthine oxidase system *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80, 601-606
- Usui, T. (2006)** Pharmaceutical prospects of phytoestrogens *Endocrine Journal*, 53, 7-20
- Van Eeckhaut, A., Michotte, Y. (2006)** Chiral separations by capillary electrophoresis: Recent developments and applications *Electrophoresis*, 27, 2880-2895
- Vinson, J. A., Su, X. H., Zubik, L., Bose, P. (2001)** Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 5315-5321
- von Heimendahl, C. B. I., Schafer, K. M., Eklund, P., Sjöholm, R., Schmidt, T. J., Fuss, E. (2005)** Pinoresinol-lariciresinol reductases with different stereospecificity from *Linum album* and *Linum usitatissimum* *Phytochemistry*, 66, 1254-1263
- Wang, C. F., Kurzer, M. S. (1997)** Phytoestrogen concentration determines effects on DNA synthesis in human breast cancer cells *Nutrition and Cancer-An International Journal*, 28, 236-247
- Wang, L. Q. (2002)** Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 777, 289-309
- Wang, M. F., Simon, J. E., Aviles, I. F., He, K., Zheng, Q. Y., Tadmor, Y. (2003)** Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.) *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 601-608
- Warzecha, H., Obitz, P., Stockigt, J. (1999)** Purification, partial amino acid sequence and structure of the product of raucaffricine-O-beta-D-glucosidase from plant cell cultures of *Rauwolfia serpentina* *Phytochemistry*, 50, 1099-1109
- Wassileva-Alexandrova, P., Nejtshewa, A. (1979)** Spektrophotometrische Bestimmung von L-Ascorbinsäure mit 2,2',5,5'-Tetra-(4-nitrophenyl)-3,3'-(3,3'-dimethoxy-4,4"-biphenyl)-ditetrazoliumchlorid (TNBT) *Microchimica Acta*, II, 337-342
- Welshons, W. V., Murphy, C. S., Koch, R., Calaf, G., Jordan, V. C. (1987)** Stimulation of Breast-Cancer Cells-Invitro by the Environmental Estrogen Enterolactone and the Phytoestrogen Equol *Breast Cancer Research and Treatment*, 10, 169-175

-
- Willfor, S., Eklund, P., Sjöholm, R., Reunanen, M., Sillanpää, R., von Schoultz, S., Hemming, J., Nisula, L., Holmbom, B. (2005)** Bioactive phenolic substances in industrially important tree species. Part 4: Identification of two new 7-hydroxy divanillyl butyrolactol lignans in some spruce, fir, and pine species
Holzforschung, 59, 413-417
- Yamanouchi, S., Takido, M., Sankawa, U., Shibata, S. (1976)** Constituents of Fruit of *Arctium-Lappa* *Yakugaku Zasshi-Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, 96, 1492-1493
- Yoo, H. H., Park, J. H., Kwon, S. W. (2006)** An anti-estrogenic lignan glycoside, tracheloside, from seeds of *Carthamus tinctorius* *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 70, 2783-2785
- Zysk, J. R., Johnson, B., Ozenberger, B. A., Bingham, B., Gorski, J. (1995)** Selective Uptake of Estrogenic Compounds by *Saccharomyces-Cerevisiae* - A Mechanism for Antiestrogen Resistance in Yeast Expressing the Mammalian Estrogen-Receptor *Endocrinology*, 136, 1323-1326

6 Anhang

6.1 Gesamtphenolgehalte nach Folin-Ciocalteu; Einzelwerte bei unterschiedlichen Konzentrationen

CÄ Catechinäquivalente; Catechinäquivalente (%)
bezogen auf Pflanzenmaterial

A. lappa

c (g/l)	Vollextrakt		Chloroform		Ethylacetat		Butanol		c (g/l)	Ether		Wasser	
	CÄ (g/l)	CÄ (%)	CÄ (g/l)	CÄ (%)	CÄ (g/l)	CÄ (%)	CÄ (g/l)	CÄ (%)		CÄ (g/l)	CÄ (%)	CÄ (g/l)	CÄ (%)
4	0,084	2,107	0,037	0,924	0,024	0,607	0,025	0,627	10	0,024	0,238	0,022	0,222
2	0,051	2,533	0,021	1,034	0,014	0,682	0,014	0,709	8	0,020	0,244	0,019	0,238
1	0,023	2,300	0,011	1,103	0,008	0,822	0,008	0,835	6	0,014	0,233	0,014	0,240

A. minus

c (g/l)	Ether		Chloroform		Ethylacetat		Butanol		c (g/l)	Vollextrakt	
	CÄ (g/l)	CÄ (%)	CÄ (g/l)	CÄ (%)	CÄ (g/l)	CÄ (%)	CÄ (g/l)	CÄ (%)		CÄ (g/l)	CÄ (%)
10	0,017	0,165	0,037	0,368	0,052	0,521	0,055	0,549	5	0,110	2,201
5	0,007	0,145	0,018	0,367	0,027	0,541	0,031	0,616	2,5	0,058	2,330
2,5	0,007	0,268	0,010	0,407	0,016	0,631	0,016	0,622	1,25	0,030	2,425

c (g/l)	Wasser	
	CÄ (g/l)	CÄ (%)
20	0,028	0,141
10	0,015	0,155
5	0,009	0,180

A. nemorosum

c (g/l)	Vollextrakt		c (g/l)	Ether		Ethylacetat		Butanol		Wasser	
	CÄ (g/l)	CÄ (%)		CÄ (g/l)	CÄ (%)	CÄ (g/l)	CÄ (%)	CÄ (g/l)	CÄ (%)	CÄ (g/l)	CÄ (%)
4	0,073	1,823	10	0,017	0,165	0,049	0,487	0,061	0,613	0,017	0,169
2	0,033	1,634	8	0,013	0,165	0,039	0,483	0,045	0,558	0,012	0,151
1	0,023	2,303	6	0,011	0,186	0,031	0,509	0,039	0,645	0,009	0,158

c (g/l)	Chloroform	
	CÄ (g/l)	CÄ (%)
6	0,046	0,770
4	0,030	0,753
2	0,017	0,828

A. tomentosum

c (g/l)	Vollextrakt		c (g/l)	Ether		Chloroform		Ethylacetat	
	CÄ (g/l)	CÄ (%)		CÄ (g/l)	CÄ (%)	CÄ (g/l)	CÄ (%)	CÄ (g/l)	CÄ (%)
5	0,065	1,291	10	0,018	0,176	0,110	1,104	0,017	0,172
2,5	0,038	1,517	5	0,010	0,193	0,058	1,168	0,010	0,203
1,25	0,019	1,494	2,5	0,005	0,207	0,031	1,222	0,007	0,295

E.
sphaerocephalus

c (g/l)	Vollextrakt		Butanol		Wasser		c (g/l)	Ether		Chloroform		Ethylacetat	
	CÄ (g/l)	CÄ (%)	CÄ (g/l)	CÄ (%)	CÄ (g/l)	CÄ (%)		CÄ (g/l)	CÄ (%)	CÄ (g/l)	CÄ (%)	CÄ (g/l)	CÄ (%)
10			0,087	0,867	0,049	0,494	40	0,013	0,032	0,017	0,043	0,023	0,057
5	0,055	1,100	0,044	0,886	0,028	0,562	20	0,009	0,043	0,011	0,054	0,014	0,070
2,5	0,028	1,130	0,024	0,974	0,016	0,644	10	0,006	0,061	0,007	0,071	0,009	0,088
1,25	0,018	1,420											

O. acanthium

c (g/l)	Vollextrakt		Ether		Chloroform		c (g/l)	Ethylacetat		Butanol		Wasser	
	CÄ (g/l)	CÄ (%)	CÄ (g/l)	CÄ (%)	CÄ (g/l)	CÄ (%)		CÄ (g/l)	CÄ (%)	CÄ (g/l)	CÄ (%)	CÄ (g/l)	CÄ (%)
10			0,028	0,276	0,017	0,173	20	0,034	0,169	0,067	0,334	0,012	0,062
5	0,024	0,481	0,016	0,315	0,011	0,216	10	0,018	0,180	0,037	0,370	0,006	0,059
2,5	0,014	0,566	0,009	0,378	0,007	0,271	5	0,009	0,171	0,015	0,306	0,003	0,057
1,25	0,008	0,675											

6.2 Bestimmung von Radikalfängereigenschaften mit dem DPPH-Test, Absorptionswerte

A. lappa

A0	c (g/l)	Vollextrakt			Chloroform			Ethylacetat		
0,422	0,67	0,079	0,079	0,079	0,145	0,15	0,134	0,16	0,151	0,14
	0,53	0,084	0,082	0,08	0,157	0,167	0,167	0,2	0,185	0,191
	0,40	0,096	0,083	0,11	0,215	0,206	0,203	0,24	0,23	0,23
	0,27	0,142	0,148	0,143	0,253	0,255	0,249	0,28	0,28	0,291
	0,13	0,225	0,23	0,229	0,328	0,32	0,322	0,36	0,366	0,355
	0,07	0,303	0,297	0,305	0,36	0,358	0,355	0,43	0,41	0,416
	0,03	0,354	0,356	0,356	0,387	0,388	0,398	0,44	0,446	0,443
	0,02	0,387	0,396	0,39	0,407	0,407	0,407	0,46	0,458	0,456

A0	c (g/l)	Ether			Wasser			A0	c (g/l)	Butanol		
0,441	2,67	0,171	0,173	0,161	0,083	0,084	0,085	0,471	1,33	0,083	0,083	0,088
	2,13	0,205	0,203	0,199	0,084	0,083	0,086		1,07	0,142	0,124	0,127
	1,60	0,247	0,242	0,239	0,092	0,093	0,096		0,80	0,212	0,187	0,197
	1,07	0,279	0,286	0,285	0,21	0,204	0,2		0,53	0,259	0,266	0,257
	0,53	0,357	0,352	0,355	0,315	0,328	0,323		0,27	0,327	0,33	0,333
	0,27	0,419	0,417	0,428	0,382	0,384	0,389		0,13	0,379	0,375	0,377
	0,13	0,448	0,445	0,45	0,422	0,425	0,427		0,07	0,419	0,417	0,417
	0,07	0,459	0,46	0,472	0,447	0,447	0,446		0,03	0,433	0,443	0,44

A. minus

A0	c (g/l)	Vollextrakt		
0,479	0,67	0,089	0,088	0,089
	0,53	0,095	0,094	0,092
	0,40	0,119	0,123	0,115
	0,27	0,186	0,179	0,185
	0,13	0,297	0,307	0,295
	0,07	0,362	0,358	0,362
	0,03	0,405	0,41	0,422
	0,02	0,44	0,446	0,442

A0	c (g/l)	Ether			Ethylacetat			Wasser		
0,457	26,67	0,091	0,09	0,09	0,086	0,083	0,085	0,1	0,096	0,094
	21,33	0,09	0,085	0,089	0,084	0,084	0,084	0,1	0,094	0,093
	16,00	0,094	0,09	0,097	0,085	0,086	0,085	0,09	0,094	0,093
	10,67	0,111	0,11	0,111	0,087	0,087	0,089	0,09	0,091	0,093
	5,33	0,17	0,158	0,166	0,101	0,104	0,102	0,09	0,09	0,09
	2,67	0,241	0,247	0,243	0,161	0,163	0,164	0,18	0,168	0,171
	1,33	0,328	0,287	0,332	0,254	0,262	0,247	0,31	0,328	0,293
	0,67	0,379	0,386	0,395	0,352	0,342	0,351	0,41	0,397	0,392

A0	c (g/l)	Chloroform			Butanol		
0,480	2,67	0,136	0,124	0,131	0,082	0,105	0,083
	2,13	0,148	0,151	0,156	0,08	0,082	0,082
	1,60	0,18	0,18	0,184	0,081	0,081	0,082
	1,07	0,23	0,225	0,229	0,093	0,084	0,083
	0,53	0,313	0,318	0,325	0,197	0,194	0,174
	0,27	0,386	0,388	0,383	0,312	0,306	0,301
	0,13	0,43	0,432	0,435	0,383	0,373	0,379
	0,07	0,461	0,459	0,46	0,424	0,422	0,424

A. nemorosum

A0	c (g/l)	Vollextrakt			Chloroform			A0	c (g/l)	Butanol			Ethylacetat		
0,473	0,67	0,087	0,086	0,09	0,199	0,196	0,2	0,445	0,67	0,211	0,191	0,21	0,270	0,267	0,275
	0,53	0,089	0,086	0,092	0,243	0,226	0,234		0,53	0,254	0,252	0,248	0,308	0,301	0,307
	0,40	0,101	0,096	0,092	0,275	0,271	0,269		0,40	0,297	0,284	0,296	0,329	0,337	0,332
	0,27	0,158	0,161	0,128	0,33	0,325	0,323		0,27	0,334	0,281	0,346	0,374	0,375	0,371
	0,13	0,248	0,256	0,244	0,39	0,391	0,376		0,13	0,389	0,389	0,403	0,419	0,419	0,421
	0,07	0,333	0,335	0,313	0,426	0,421	0,426		0,07	0,431	0,433	0,437	0,441	0,446	0,443
	0,03	0,395	0,396	0,4	0,448	0,448	0,45		0,03	0,452	0,451	0,463	0,459	0,46	0,459
	0,02	0,433	0,434	0,434	0,465	0,465	0,468		0,02	0,461	0,462	0,475	0,464	0,469	0,468

A0	c (g/l)	Ether			Wasser		
0,472	2,67	0,165	0,167	0,168	0,092	0,098	0,088
	2,13	0,184	0,187	0,193	0,091	0,089	0,088
	1,60	0,216	0,216	0,215	0,089	0,089	0,094
	1,07	0,267	0,277	0,266	0,087	0,089	0,089
	0,53	0,35	0,345	0,345	0,086	0,1	0,088
	0,27	0,401	0,407	0,399	0,102	0,097	0,098
	0,13	0,44	0,437	0,439	0,271	0,272	0,27
	0,07	0,459	0,454	0,455	0,378	0,37	0,373

A. tomentosum

A0	c (g/l)	Vollextrakt			A0	c (g/l)	Ether			Chloroform			Ethylacetat		
0,470	0,67	0,104	0,102	0,101	0,467	26,67	0,091	0,09	0,089	0,095	0,084	0,085	0,09	0,082	0,082
	0,53	0,136	0,13	0,132		21,33	0,097	0,1	0,101	0,083	0,082	0,086	0,09	0,09	0,085
	0,40	0,183	0,165	0,171		16,00	0,107	0,11	0,112	0,086	0,089	0,089	0,09	0,085	0,088
	0,27	0,239	0,218	0,227		10,67	0,138	0,14	0,144	0,103	0,098	0,096	0,1	0,093	0,09
	0,13	0,323	0,319	0,325		5,33	0,201	0,21	0,209	0,127	0,132	0,112	0,11	0,116	0,103
	0,07	0,39	0,384	0,388		2,67	0,288	0,29	0,293	0,197	0,198	0,202	0,19	0,207	0,206
	0,03	0,441	0,426	0,427		1,33	0,362	0,37	0,378	0,295	0,282	0,292	0,3	0,304	0,306
	0,02	0,451	0,449	0,448		0,67	0,424	0,42	0,419	0,378	0,368	0,37	0,4	0,38	0,382

A0	c (g/l)	Ethylacetat			Butanol			Wasser		
0,490	26,67	0,085	0,082	0,082	0,082	0,088	0,138	0,09	0,089	0,087
	21,33	0,087	0,09	0,085	0,087	0,084	0,202	0,09	0,088	0,092
	16,00	0,085	0,085	0,088	0,086	0,104	0,122	0,09	0,099	0,101
	10,67	0,1	0,093	0,09	0,091	0,096	0,113	0,18	0,21	0,189
	5,33	0,105	0,116	0,103	0,101	0,099	0,123	0,31	0,329	0,306
	2,67	0,19	0,207	0,206	0,204	0,166	0,182	0,39	0,389	0,389
	1,33	0,296	0,304	0,306	0,298	0,289	0,285	0,44	0,436	0,439
	0,67	0,396	0,38	0,382	0,383	0,375	0,375	0,46	0,454	0,457

C. benedictus

A0	c (g/l)	Volleextrakt			Ethylacetat			Butanol			A0	c (g/l)	Wasser		
0,446	0,67	0,191	0,195	0,202	0,092	0,105	0,108	0,09	0,09	0,111	0,448	0,67	0,099	0,106	0,108
	0,53	0,171	0,246	0,229	0,115	0,124	0,122	0,1	0,227	0,084		0,53	0,099	0,103	0,107
	0,40	0,261	0,255	0,258	0,145	0,144	0,147	0,08	0,091	0,085		0,40	0,109	0,1	0,098
	0,27	0,296	0,305	0,297	0,2	0,193	0,179	0,09	0,094	0,109		0,27	0,095	0,096	0,097
	0,13	0,362	0,363	0,369	0,261	0,26	0,267	0,11	0,087	0,087		0,13	0,093	0,096	0,094
	0,07	0,403	0,393	0,41	0,325	0,33	0,332	0,18	0,118	0,207		0,07	0,164	0,154	0,158
	0,03	0,421	0,425	0,432	0,367	0,383	0,388	0,26	0,263	0,291		0,03	0,323	0,318	0,322
	0,02	0,427	0,438	0,445	0,411	0,414	0,409	0,35	0,349	0,345		0,02	0,381	0,375	0,388

A0	c (g/l)	Ether			Chloroform		
0,448	26,67	0,088	0,087	0,084	0,098	0,087	0,084
	21,33	0,085	0,077	0,08	0,097	0,087	0,082
	16,00	0,091	0,084	0,084	0,103	0,092	0,084
	10,67	0,101	0,09	0,102	0,113	0,098	0,091
	5,33	0,137	0,128	0,133	0,138	0,134	0,116
	2,67	0,199	0,184	0,209	0,195	0,189	0,183
	1,33	0,278	0,259	0,264	0,267	0,259	0,243
	0,67	0,343	0,326	0,324	0,347	0,328	0,331

C. jacea

A0	c (g/l)	Volleextrakt			A0	c (g/l)	Butanol			Wasser		
0,436	6,67	0,082	0,083	0,081	0,426	26,67	0,080	0,08	0,079	0,03	0,077	0,088
	5,33	0,082	0,084	0,081		21,33	0,086	0,07	0,094	0,028	0,072	0,085
	4,00	0,081	0,077	0,081		16,00	0,093	0,08	0,1	0,028	0,067	0,085
	2,67	0,081	0,079	0,082		10,67	0,087	0,09	0,087	0,026	0,06	0,087
	1,33	0,086	0,087	0,085		5,33	0,109	0,11	0,099	0,053	0,074	0,099
	0,67	0,195	0,211	0,205		2,67	0,226	0,22	0,219	0,207	0,229	0,259
	0,33	0,284	0,21	0,293		1,33	0,308	0,32	0,302	0,289	0,311	0,335
	0,17	0,341	0,351	0,347		0,67	0,346	0,35	0,339	0,328	0,354	0,387

A0	c (g/l)	Ether			Chloroform			Ethylacetat		
0,426	26,67	0,086	0,144	0,094	0,097	0,094	0,117	0,1	0,081	0,047
	21,33	0,085	0,142	0,098	0,099	0,096	0,116	0,1	0,086	0,047
	16,00	0,083	0,139	0,102	0,093	0,094	0,115	0,1	0,091	0,048
	10,67	0,082	0,132	0,104	0,093	0,09	0,115	0,1	0,101	0,049
	5,33	0,082	0,131	0,103	0,099	0,093	0,123	0,15	0,149	0,097
	2,67	0,085	0,139	0,109	0,184	0,177	0,213	0,25	0,294	0,214
	1,33	0,15	0,174	0,203	0,281	0,273	0,29	0,34	0,366	0,295
	0,67	0,266	0,323	0,289	0,353	0,338	0,362	0,38	0,414	0,354

C. stoebe

A0	c (g/l)	Volleextrakt			Ether			Chloroform		
0,454	1,33	0,086	0,088	0,086	0,082	0,082	0,081	0,08	0,083	0,087
	1,07	0,086	0,089	0,086	0,083	0,083	0,084	0,09	0,086	0,089
	0,80	0,086	0,089	0,09	0,085	0,086	0,086	0,09	0,09	0,094
	0,53	0,094	0,109	0,11	0,087	0,088	0,087	0,1	0,1	0,108
	0,27	0,209	0,22	0,229	0,121	0,115	0,115	0,2	0,211	0,213
	0,13	0,319	0,323	0,336	0,241	0,246	0,231	0,3	0,298	0,301
	0,07	0,368	0,385	0,394	0,343	0,34	0,336	0,38	0,383	0,38
	0,03	0,395	0,415	0,434	0,403	0,397	0,399	0,43	0,426	0,427

A0	c (g/l)	Ethylacetat			Butanol			Wasser		
0,480	26,67	0,085	0,093	0,078	0,086	0,085	0,097	0,1	0,091	0,073
	21,33	0,089	0,092	0,078	0,088	0,083	0,079	0,11	0,125	0,108
	16,00	0,086	0,09	0,08	0,096	0,092	0,089	0,22	0,201	0,178
	10,67	0,087	0,09	0,082	0,128	0,111	0,116	0,29	0,274	0,26
	5,33	0,098	0,096	0,096	0,251	0,225	0,244	0,38	0,368	0,351
	2,67	0,236	0,229	0,236	0,335	0,332	0,322	0,44	0,425	0,41
	1,33	0,33	0,335	0,337	0,394	0,383	0,395	0,46	0,445	0,438
	0,67	0,387	0,401	0,397	0,429	0,413	0,426	0,48	0,455	0,459

C. tinctorius

A0	c (g/l)	Volleextrakt			A0	c (g/l)	Butanol			Wasser		
0,456	6,67	0,091	0,093	0,091	0,460	5,33	0,082	0,08	0,081	0,151	0,162	0,17
	5,33	0,092	0,092	0,092		4,27	0,085	0,08	0,085	0,205	0,203	0,207
	4,00	0,093	0,091	0,093		3,20	0,114	0,1	0,104	0,283	0,262	0,264
	2,67	0,091	0,091	0,091		2,13	0,193	0,19	0,192	0,334	0,325	0,321
	1,33	0,128	0,121	0,119		1,07	0,315	0,33	0,322	0,386	0,387	0,391
	0,67	0,27	0,267	0,279		0,53	0,396	0,39	0,391	0,43	0,427	0,41
	0,33	0,369	0,355	0,362		0,27	0,435	0,43	0,439	0,45	0,449	0,447
	0,17	0,416	0,413	0,409		0,13	0,456	0,45	0,455	0,463	0,462	0,462

A0	c (g/l)	Ether			Chloroform			Ethylacetat		
0,435	26,67	0,084	0,083	0,084	0,085	0,086	0,084	0,09	0,087	0,089
	21,33	0,084	0,086	0,083	0,085	0,084	0,085	0,09	0,088	0,088
	16,00	0,09	0,089	0,087	0,089	0,088	0,088	0,1	0,09	0,095
	10,67	0,088	0,088	0,087	0,089	0,084	0,089	0,16	0,16	0,136
	5,33	0,095	0,088	0,087	0,184	0,176	0,193	0,29	0,29	0,282
	2,67	0,208	0,218	0,204	0,335	0,33	0,335	0,38	0,384	0,387
	1,33	0,336	0,336	0,336	0,41	0,406	0,413	0,44	0,441	0,434
	0,67	0,407	0,404	0,414	0,456	0,445	0,445	0,47	0,474	0,467

E. sphaerocephalus

A0	c (g/l)	Volleextrakt			A0	c (g/l)	Chloroform			Ethylacetat		
0,398	0,67	0,071	0,074	0,074	0,421	5,33	0,169	0,17	0,19	0,091	0,126	0,089
	0,53	0,072	0,071	0,072		4,27	0,217	0,21	0,203	0,132	0,108	0,113
	0,40	0,073	0,074	0,072		3,20	0,268	0,25	0,23	0,186	0,18	0,193
	0,27	0,077	0,073	0,072		2,13	0,301	0,3	0,267	0,256	0,251	0,249
	0,13	0,079	0,08	0,077		1,07	0,349	0,35	0,347	0,318	0,318	0,316
	0,07	0,198	0,202	0,19		0,53	0,369	0,38	0,377	0,362	0,362	0,357
	0,03	0,315	0,307	0,31		0,27	0,387	0,39	0,402	0,379	0,379	0,384
	0,02	0,351	0,349	0,348		0,13	0,387	0,39	0,4	0,387	0,392	0,39

A0	c (g/l)	Ether			A0	c (g/l)	Butanol			Wasser		
0,421	26,67	0,087	0,09	0,092	0,482	1,33	0,082	0,08	0,081	0,089	0,089	0,089
	21,33	0,118	0,129	0,131		1,07	0,085	0,08	0,081	0,089	0,089	0,088
	16,00	0,179	0,215	0,199		0,80	0,083	0,09	0,083	0,09	0,089	0,09
	10,67	0,246	0,263	0,269		0,53	0,085	0,08	0,084	0,088	0,091	0,09
	5,33	0,327	0,344	0,343		0,27	0,085	0,09	0,085	0,129	0,152	0,152
	2,67	0,375	0,394	0,392		0,13	0,1	0,11	0,121	0,271	0,275	0,278
	1,33	0,392	0,409	0,421		0,07	0,267	0,27	0,258	0,378	0,363	0,372
	0,67	0,4	0,421	0,425		0,03	0,364	0,36	0,371	0,424	0,422	0,417

O. acanthium

A0	c (g/l)	Volleextrakt			A0	c (g/l)	Ether			Butanol		
0,459	0,67	0,098	0,092	0,094	0,459	1,33	0,117	0,11	0,109	0,088	0,089	0,087
	0,53	0,096	0,094	0,096		1,07	0,176	0,16	0,177	0,089	0,088	0,089
	0,40	0,096	0,094	0,096		0,80	0,235	0,23	0,232	0,143	0,118	0,105
	0,27	0,183	0,173	0,169		0,53	0,309	0,31	0,314	0,239	0,222	0,229
	0,13	0,317	0,313	0,304		0,27	0,381	0,38	0,39	0,321	0,339	0,329
	0,07	0,388	0,386	0,385		0,13	0,415	0,41	0,421	0,381	0,381	0,379
	0,03	0,426	0,429	0,429		0,07	0,45	0,44	0,435	0,434	0,426	0,425
	0,02	0,451	0,45	0,452		0,03	0,462	0,47	0,461	0,452	0,45	0,452

A0	c (g/l)	Chloroform			Ethylacetat			Wasser		
0,448	26,67	0,11	0,115	0,111	0,105	0,102	0,099	0,1	0,104	0,105
	21,33	0,113	0,111	0,112	0,104	0,109	0,092	0,11	0,104	0,103
	16,00	0,111	0,114	0,118	0,104	0,104	0,095	0,12	0,126	0,098
	10,67	0,117	0,118	0,122	0,099	0,094	0,1	0,1	0,101	0,109
	5,33	0,111	0,116	0,118	0,095	0,093	0,106	0,24	0,24	0,222
	2,67	0,188	0,198	0,185	0,098	0,097	0,117	0,39	0,394	0,386
	1,33	0,306	0,32	0,298	0,126	0,175	0,181	0,45	0,446	0,449
	0,67	0,378	0,392	0,395	0,235	0,307	0,317	0,42	0,455	0,449

6.3 Bestimmung des Eisenreduktionspotentials mit dem FRAP-Test, Absorptionswerte

A. lappa

A 0,02 M Fe: 0,32

c (g/l)	Volleextrakt			c (g/l)	Chloroform			Butanol		
0,145	0,865	0,861	0,891	5,83E-01	1,149	1,131	1,157	0,779	0,679	0,731
0,109	0,56	0,473	0,512	4,37E-01	0,92	0,97	0,951	0,634	0,634	0,64
0,073	0,271	0,275	0,277	2,92E-01	0,656	0,648	0,67	0,451	0,446	0,453
0,036	0,178	0,177	0,197	1,46E-01	0,424	0,431	0,429	0,269	0,284	0,283
0,015	0,137	0,132	0,139	5,83E-02	0,228	0,223	0,224	0,154	0,158	0,184
0,007	0,106	0,112	0,115	2,92E-02	0,16	0,161	0,159	0,122	0,126	0,149
0,004	0,093	0,099	0,115	1,46E-02	0,124	0,14	0,133	0,105	0,11	0,11
0,002	0,087	0,086	0,099	7,29E-03	0,118	0,103	0,115	0,096	0,096	0,1

<i>c</i> (g/l)	Ethylacetat			Ether			Wasser		
1,167	1,108	1,114	1,099	0,743	0,7	0,757	0,621	0,621	0,636
0,875	0,802	0,846	0,892	0,475	0,439	0,473	0,456	0,507	0,501
0,584	0,649	0,673	0,671	0,226	0,229	0,23	0,355	0,365	0,371
0,292	0,4	0,398	0,406	0,157	0,169	0,158	0,24	0,246	0,245
0,117	0,231	0,219	0,219	0,123	0,128	0,125	0,153	0,149	0,153
0,058	0,161	0,157	0,156	0,106	0,105	0,103	0,113	0,119	0,141
0,029	0,127	0,148	0,129	0,093	0,1	0,101	0,101	0,101	0,105
0,015	0,111	0,104	0,119	0,088	0,088	0,111	0,095	0,094	0,098

A minus

A 0,02 M Fe:0,4

<i>c</i> (g/l)	Vollextrakt			<i>c</i> (g/l)	Ether			Chloroform		
0,145	0,706	0,687	0,656	1,17E+00	0,447	0,461	0,454	0,417	0,434	0,415
0,109	0,581	0,553	0,589	8,75E-01	0,296	0,365	0,366	0,348	0,344	0,348
0,073	0,417	0,424	0,428	5,84E-01	0,26	0,267	0,252	0,261	0,266	0,265
0,036	0,263	0,279	0,275	2,92E-01	0,175	0,183	0,185	0,174	0,179	0,175
0,015	0,163	0,164	0,165	1,17E-01	0,122	0,123	0,117	0,116	0,115	0,118
0,007	0,138	0,13	0,132	5,84E-02	0,102	0,098	0,098	0,097	0,101	0,116
0,004	0,114	0,114	0,114	2,92E-02	0,089	0,098	0,088	0,091	0,093	0,087
0,002	0,108	0,103	0,106	1,46E-02	0,082	0,083	0,089	0,087	0,09	0,087

<i>c</i> (g/l)	Ethylacetat			Butanol			<i>c</i> (g/l)	Wasser		
0,583	0,355	0,366	0,38	0,704	0,694	0,716	2,33E+00	0,525	0,518	0,51
0,437	0,293	0,315	0,307	0,53	0,547	0,569	1,75E+00	0,39	0,413	0,409
0,292	0,219	0,218	0,233	0,392	0,373	0,349	1,17E+00	0,296	0,268	0,296
0,146	0,16	0,154	0,155	0,255	0,24	0,239	5,83E-01	0,2	0,205	0,198
0,058	0,116	0,105	0,106	0,139	0,144	0,145	2,33E-01	0,116	0,119	0,119
0,029	0,098	0,095	0,099	0,116	0,115	0,115	1,17E-01	0,1	0,101	0,098
0,015	0,089	0,086	0,086	0,094	0,089	0,094	5,83E-02	0,088	0,091	0,093
0,007	0,087	0,08	0,082	0,087	0,098	0,093	2,92E-02	0,082	0,083	0,083

A. nemorosum

A 0,02M Fe: 0,42

<i>c</i> (g/l)	Vollextrakt			<i>c</i> (g/l)	Butanol			Chloroform		
0,145	0,811	0,826	0,856	5,83E-01	0,83	0,842	0,844	1,073	1,105	1,105
0,109	0,651	0,647	0,641	4,37E-01	0,679	0,666	0,675	0,849	0,869	0,878
0,073	0,479	0,504	0,46	2,92E-01	0,483	0,491	0,488	0,638	0,619	0,634
0,036	0,314	0,304	0,309	1,46E-01	0,305	0,303	0,297	0,362	0,399	0,412
0,015	0,18	0,179	0,18	5,83E-02	0,165	0,168	0,184	0,206	0,211	0,22
0,007	0,134	0,138	0,134	2,92E-02	0,132	0,133	0,131	0,154	0,158	0,159
0,004	0,134	0,111	0,134	1,46E-02	0,113	0,117	0,111	0,128	0,133	0,131
0,002	0,099	0,112	0,105	7,29E-03	0,101	0,106	0,102	0,122	0,115	0,112

<i>c</i> (g/l)	Ethylacetat			Ether			Wasser		
1,167	1,233	1,19	1,212	0,773	0,783	0,785	0,427	0,434	0,43
0,875	0,969	1,003	0,993	0,628	0,621	0,617	0,34	0,359	0,349
0,584	0,669	0,712	0,717	0,454	0,463	0,458	0,26	0,266	0,267
0,292	0,445	0,519	0,409	0,332	0,283	0,274	0,191	0,184	0,191
0,117	0,228	0,232	0,228	0,17	0,172	0,185	0,122	0,122	0,125
0,058	0,164	0,164	0,163	0,131	0,134	0,131	0,106	0,11	0,108
0,029	0,129	0,14	0,145	0,111	0,115	0,112	0,101	0,1	0,106
0,015	0,12	0,124	0,115	0,108	0,103	0,119	0,099	0,094	0,096

A. tomentosum**A 0,02M Fe: 0,42**

c (g/l)	Vollextrakt			c (g/l)	Chloroform		
0,583	0,663	0,676	0,724	5,83E-01	0,36	0,38	0,358
0,437	0,541	0,547	0,589	4,37E-01	0,29	0,288	0,304
0,292	0,373	0,398	0,402	2,92E-01	0,256	0,223	0,23
0,146	0,262	0,274	0,267	1,46E-01	0,176	0,171	0,169
0,058	0,155	0,157	0,157	5,83E-02	0,12	0,125	0,132
0,029	0,127	0,121	0,127	2,92E-02	0,117	0,116	0,107
0,015	0,118	0,107	0,107	1,46E-02	0,108	0,107	0,105
0,007	0,103	0,102	0,115	7,29E-03	0,1	0,112	0,105

c (g/l)	Ether			Ethylacetat			Butanol			c (g/l)	Wasser		
1,167	0,381	0,382	0,39	0,449	0,457	0,448	0,473	0,459	0,441	2,33E+00	0,244	0,265	0,256
0,875	0,32	0,32	0,311	0,377	0,378	0,348	0,381	0,368	0,331	1,75E+00	0,236	0,217	0,232
0,584	0,252	0,247	0,275	0,299	0,285	0,287	0,276	0,274	0,28	1,17E+00	0,173	0,179	0,182
0,292	0,176	0,179	0,173	0,19	0,199	0,19	0,192	0,196	0,18	5,83E-01	0,139	0,142	0,15
0,117	0,122	0,126	0,136	0,145	0,141	0,131	0,129	0,138	0,145	2,33E-01	0,123	0,134	0,112
0,058	0,112	0,107	0,115	0,119	0,114	0,116	0,113	0,113	0,111	1,17E-01	0,109	0,106	0,104
0,029	0,102	0,107	0,112	0,11	0,106	0,104	0,101	0,109	0,103	5,83E-02	0,1	0,107	0,106
0,015	0,113	0,106	0,103	0,1	0,103	0,113	0,1	0,103	0,116	2,92E-02	0,103	0,097	0,101

C. benedictus**A 0,02M Fe: 0,42**

c (g/l)	Vollextrakt			c (g/l)	Ether			Chloroform			Butanol		
0,145	0,281	0,28	0,296	1,17E+00	0,506	0,518	0,542	0,574	0,557	0,558	0,414	0,41	0,405
0,109	0,222	0,231	0,246	8,75E-01	0,413	0,406	0,403	0,449	0,464	0,458	0,325	0,328	0,338
0,073	0,183	0,187	0,183	5,84E-01	0,323	0,319	0,312	0,325	0,34	0,339	0,231	0,225	0,234
0,036	0,137	0,136	0,14	2,92E-01	0,204	0,203	0,207	0,218	0,222	0,222	0,157	0,167	0,154
0,015	0,096	0,099	0,102	1,17E-01	0,119	0,144	0,145	0,131	0,139	0,128	0,102	0,101	0,109
0,007	0,089	0,088	0,09	5,84E-02	0,103	0,1	0,105	0,12	0,106	0,107	0,106	0,104	0,091
0,004	0,086	0,084	0,084	2,92E-02	0,089	0,094	0,095	0,101	0,093	0,112	0,08	0,078	0,078
0,002	0,086	0,082	0,082	1,46E-02	0,079	0,087	0,093	0,12	0,08	0,086	0,074	0,08	0,074

c (g/l)	Wasser			c (g/l)	Ethylacetat		
2,333	0,459	0,467	0,46	4,67E+00	0,561	0,548	0,577
1,750	0,385	0,376	0,378	3,50E+00	0,465	0,475	0,478
1,167	0,247	0,263	0,265	2,33E+00	0,306	0,339	0,328
0,583	0,157	0,177	0,179	1,17E+00	0,212	0,221	0,238
0,233	0,105	0,108	0,121	4,67E-01	0,123	0,122	0,12
0,117	0,09	0,101	0,1	2,33E-01	0,098	0,105	0,099
0,058	0,085	0,087	0,079	1,17E-01	0,104	0,091	0,082
0,029	0,081	0,074	0,078	5,83E-02	0,079	0,081	0,073

C. jacea**A 0,02M Fe: 0,42**

c (g/l)	Vollextrakt			c (g/l)	Ether			Ethylacetat			Butanol		
0,145	0,267	0,256	0,256	1,17E+00	0,787	0,807	0,81	0,286	0,282	0,294	0,329	0,321	0,328
0,109	0,224	0,229	0,212	8,75E-01	0,653	0,671	0,694	0,233	0,236	0,231	0,264	0,266	0,267
0,073	0,163	0,173	0,168	5,84E-01	0,496	0,495	0,495	0,193	0,182	0,196	0,207	0,199	0,201
0,036	0,123	0,125	0,125	2,92E-01	0,315	0,306	0,305	0,134	0,135	0,14	0,149	0,15	0,141
0,015	0,105	0,104	0,096	1,17E-01	0,161	0,166	0,163	0,1	0,098	0,097	0,106	0,107	0,109
0,007	0,089	0,109	0,094	5,84E-02	0,125	0,124	0,122	0,086	0,088	0,092	0,1	0,103	0,101
0,004	0,083	0,086	0,104	2,92E-02	0,101	0,102	0,102	0,085	0,085	0,085	0,086	0,095	0,097
0,002	0,079	0,08	0,08	1,46E-02	0,09	0,1	0,091	0,082	0,086	0,081	0,083	0,083	0,083

<i>c</i> (g/l)	Chloroform			Wasser		
2,333	0,771	0,818	0,803	0,355	0,353	0,372
1,750	0,664	0,602	0,648	0,297	0,284	0,288
1,167	0,477	0,301	0,48	0,202	0,211	0,226
0,583	0,295	0,293	0,303	0,151	0,15	0,155
0,233	0,155	0,158	0,169	0,109	0,109	0,109
0,117	0,126	0,122	0,131	0,098	0,094	0,105
0,058	0,100	0,103	0,101	0,087	0,086	0,086
0,029	0,094	0,093	0,093	0,085	0,092	0,083

C. stoebe

A 0,02M Fe: 0,42

<i>c</i> (g/l)	Vollextrakt			<i>c</i> (g/l)	Ether			<i>c</i> (g/l)	Chloroform		
0,145	0,534	0,529	0,529	5,83E-01	0,772	0,806	0,806	1,17E+00	0,829	0,837	0,797
0,109	0,44	0,44	0,459	4,37E-01	0,62	0,611	0,63	8,75E-01	0,682	0,66	0,772
0,073	0,321	0,286	0,301	2,92E-01	0,454	0,438	0,453	5,84E-01	0,474	0,491	0,491
0,036	0,22	0,207	0,226	1,46E-01	0,3	0,304	0,284	2,92E-01	0,297	0,307	0,317
0,015	0,13	0,133	0,125	5,83E-02	0,174	0,171	0,177	1,17E-01	0,182	0,18	0,165
0,007	0,102	0,108	0,116	2,92E-02	0,13	0,121	0,129	5,84E-02	0,125	0,136	0,135
0,004	0,1	0,102	0,088	1,46E-02	0,111	0,111	0,114	2,92E-02	0,102	0,103	0,105
0,002	0,085	0,086	0,088	7,29E-03	0,094	0,093	0,094	1,46E-02	0,091	0,092	0,093

<i>c</i> (g/l)	Ethylacetat			Butanol			<i>c</i> (g/l)	Wasser		
2,333	0,544	0,553	0,559	0,407	0,424	0,406	4,67E+00	0,298	0,296	0,286
1,750	0,457	0,456	0,474	0,333	0,325	0,329	3,50E+00	0,252	0,257	0,261
1,167	0,342	0,337	0,364	0,246	0,249	0,246	2,33E+00	0,182	0,191	0,188
0,583	0,222	0,235	0,229	0,174	0,165	0,167	1,17E+00	0,133	0,136	0,135
0,233	0,133	0,15	0,141	0,106	0,123	0,112	4,67E-01	0,097	0,106	0,099
0,117	0,113	0,123	0,109	0,096	0,095	0,095	2,33E-01	0,088	0,093	0,09
0,058	0,096	0,098	0,107	0,088	0,089	0,087	1,17E-01	0,082	0,087	0,083
0,029	0,095	0,094	0,099	0,083	0,084	0,075	5,83E-02	0,079	0,079	0,081

C. tinctorius

A 0,02M Fe: 0,42

<i>c</i> (g/l)	Vollextrakt			<i>c</i> (g/l)	Ether			Butanol		
0,583	0,344	0,324	0,342	1,17E+00	0,426	0,431	0,421	0,17	0,171	0,173
0,437	0,263	0,283	0,276	8,75E-01	0,341	0,337	0,348	0,149	0,15	0,148
0,292	0,209	0,208	0,236	5,84E-01	0,261	0,263	0,262	0,145	0,131	0,126
0,146	0,151	0,155	0,157	2,92E-01	0,174	0,199	0,168	0,112	0,111	0,126
0,058	0,105	0,111	0,105	1,17E-01	0,112	0,13	0,115	0,087	0,095	0,105
0,029	0,091	0,09	0,091	5,84E-02	0,097	0,1	0,104	0,091	0,094	0,093
0,015	0,086	0,085	0,085	2,92E-02	0,089	0,088	0,092	0,081	0,085	0,086
0,007	0,081	0,081	0,081	1,46E-02	0,084	0,093	0,081	0,077	0,077	0,084

<i>c</i> (g/l)	Chloroform			Ethylacetat			Wasser		
2,333	0,453	0,387	0,418	0,312	0,318	0,315	0,274	0,269	0,258
1,750	0,366	0,371	0,38	0,277	0,26	0,273	0,229	0,228	0,221
1,167	0,277	0,272	0,302	0,205	0,206	0,202	0,169	0,188	0,177
0,583	0,194	0,188	0,2	0,142	0,157	0,154	0,135	0,129	0,136
0,233	0,136	0,128	0,12	0,109	0,11	0,112	0,098	0,097	0,106
0,117	0,098	0,105	0,099	0,09	0,097	0,095	0,094	0,101	0,089
0,058	0,087	0,089	0,087	0,093	0,082	0,086	0,088	0,083	0,084
0,029	0,084	0,092	0,085	0,079	0,08	0,08	0,084	0,084	0,086

E. sphaerocephalus**A 0,02M Fe: 0,42**

c (g/l)	Vollextrakt			c (g/l)	Butanol			c (g/l)	Wasser		
0,145	0,692	0,68	0,7	2,92E-01	0,831	0,847	0,88	5,83E-01	0,865	0,872	0,875
0,109	0,535	0,544	0,548	2,19E-01	0,649	0,661	0,667	4,37E-01	0,687	0,682	0,714
0,073	0,4	0,38	0,379	1,46E-01	0,476	0,462	0,472	2,92E-01	0,45	0,481	0,481
0,036	0,24	0,237	0,239	7,30E-02	0,283	0,289	0,279	1,46E-01	0,278	0,288	0,291
0,015	0,139	0,118	0,139	2,92E-02	0,147	0,144	0,156	5,83E-02	0,15	0,166	0,164
0,007	0,125	0,11	0,103	1,46E-02	0,12	0,132	0,133	2,92E-02	0,118	0,12	0,125
0,004	0,097	0,096	0,101	7,30E-03	0,099	0,106	0,101	1,46E-02	0,106	0,102	0,102
0,002	0,1	0,096	0,088	3,65E-03	0,09	0,091	0,097	7,29E-03	0,091	0,09	0,092

c (g/l)	Ether			Chloroform			Ethylacetat		
4,666	0,439	0,454	0,489	0,458	0,48	0,46	0,609	0,613	0,618
3,500	0,362	0,363	0,368	0,372	0,373	0,426	0,486	0,48	0,508
2,333	0,273	0,281	0,284	0,258	0,268	0,264	0,349	0,332	0,367
1,167	0,184	0,177	0,175	0,176	0,175	0,181	0,217	0,217	0,211
0,467	0,115	0,118	0,117	0,113	0,114	0,117	0,126	0,126	0,13
0,233	0,101	0,099	0,099	0,099	0,101	0,102	0,107	0,103	0,111
0,117	0,097	0,092	0,089	0,099	0,092	0,103	0,094	0,09	0,111
0,058	0,085	0,086	0,1	0,098	0,088	0,104	0,082	0,084	0,087

O. acanthium**A 0,02M Fe: 0,42**

c (g/l)	Vollextrakt			c (g/l)	Ether			Chloroform			Butanol		
0,145	0,471	0,458	0,466	1,17E+00	0,859	0,859	0,862	0,5	0,517	0,517	1,099	1,15	1,126
0,109	0,38	0,372	0,383	8,75E-01	0,67	0,688	0,663	0,402	0,403	0,412	0,902	0,885	0,853
0,073	0,271	0,273	0,273	5,84E-01	0,471	0,489	0,491	0,298	0,307	0,302	0,626	0,593	0,617
0,036	0,18	0,183	0,172	2,92E-01	0,281	0,293	0,302	0,185	0,191	0,191	0,372	0,365	0,35
0,015	0,116	0,104	0,106	1,17E-01	0,148	0,153	0,154	0,119	0,115	0,133	0,182	0,193	0,188
0,007	0,097	0,096	0,103	5,84E-02	0,113	0,121	0,116	0,094	0,094	0,101	0,138	0,142	0,136
0,004	0,082	0,102	0,111	2,92E-02	0,093	0,094	0,1	0,083	0,084	0,081	0,105	0,105	0,108
0,002	0,083	0,102	0,074	1,46E-02	0,086	0,09	0,082	0,087	0,083	0,077	0,09	0,095	0,089

c (g/l)	Ethylacetat			c (g/l)	Wasser		
2,333	0,521	0,553	0,55	4,67E+00	0,482	0,478	0,465
1,750	0,41	0,439	0,428	3,50E+00	0,375	0,378	0,38
1,167	0,317	0,305	0,28	2,33E+00	0,268	0,273	0,291
0,583	0,202	0,203	0,215	1,17E+00	0,191	0,177	0,179
0,233	0,111	0,139	0,12	4,67E-01	0,116	0,113	0,114
0,117	0,098	0,116	0,097	2,33E-01	0,101	0,094	0,092
0,058	0,085	0,087	0,09	1,17E-01	0,085	0,085	0,086
0,029	0,078	0,081	0,095	5,83E-02	0,089	0,079	0,081

6.4 Prozentuale Inhibition im XOD-Test – Einzelwerte

<i>Arctiin</i>							<i>Catechin</i>						
<i>c (M)</i>	<i>I (%)</i>						<i>c (M)</i>	<i>I (%)</i>					
9,68E-03	59,0	58,8	58,9	64,6	63,9		5,9E-05	65,1	59,1	65,1	65,9	73,5	68,6
7,26E-03	44,3	45,6	45,6	53,3	52,4	53,6	4,5E-05	67,0	60,5	64,7	62,4	74,9	63,8
5,44E-03	29,6	32,2	30,2	35,9	43,7	39,8	3,3E-05	62,8	58,1	61,4	64,1	67,2	60,3
4,08E-03	17,8	18,0	17,5	27,6	30,8	28,0	2,5E-05	61,4	54,4	58,1	59,9	61,3	54,4
3,06E-03	15,5	12,6	12,1	25,1	27,4	25,7	1,9E-05	57,2	52,1	44,2	38,7	49,1	43,9
1,53E-03	13,1	12,4	11,3	9,0	10,8	9,0	9,4E-06	44,2	31,6	29,3	33,8	33,4	32,1
7,65E-04	7,2	5,2	6,4	5,3	5,3	9,0	4,7E-06	34,4	24,7	36,3	-1,7	16,7	8,7
3,83E-04	9,8	8,5	5,7	12,4	7,1	10,3	2,3E-06	4,2	-4,7	6,5	28,2	-9,8	18,5

<i>Matairesinol</i>				<i>Arctigenin</i>								
<i>c (M)</i>	<i>I (%)</i>			<i>c (M)</i>	<i>I (%)</i>							
1,10E-04	40,1	18,3	-3,8	1,67E-03	40,5	37,6	40,2	35,9	34,5	40,0		
1,86E-04			12,1	-1,4	17,7	1,25E-03	39,2	38,7	39,4	40,0	40,0	49,0
2,10E-04	20,5	-4,1	20,2			9,39E-04	32,2	35,3	34,8	29,0	27,4	28,0
2,80E-04			19,1	3,7	12,6	4,69E-04	28,6	29,6	28,6	33,1	33,1	17,5
3,98E-04	30,9	-2,5	3,8			2,35E-04	16,2	18,8	22,2	11,0	15,6	9,9
4,89E-04			29,8	23,3	9,8	1,17E-04	13,1	17,0	14,4	5,7	6,2	6,0
5,46E-04	34,7	-0,9	10,4									
6,73E-04			22,3	15,3	16,3							
7,48E-04	29,0	10,7	13,6									
9,25E-04			33,0	12,1	31,2							
1,02E-03	33,4	23,3	23,7									
1,27E-03			28,4	27,4	24,2							
1,40E-03	29,0	42,9	26,5									
1,75E-03			29,3	27,9	29,8							
1,92E-03	43,8	50,8	37,9									
2,41E-03			40,0	42,8	57,7							

6.5 Prozentuale Inhibition im XOD-Test – Einzelwerte

A.lappa	A.nem.	A.tom.	A.minus	C.tinct.	E. spaeroc.	C.bened.	O.acanth.	C.stoebe	C.jacea
68,1	58,4	45,4	90,3	54,6	107,6	50,8	112,4	96,8	88,1
93,0	85,4	39,5	82,7	110,8	95,7	36,2	124,9	125,4	54,6
84,3	66,5	47,0	90,8	65,9	93,0	55,1	114,6	85,4	57,8

6.6 Prozentuale Aktivität der Lignanstandards im YES-Assay - Einzelwerte

Estradiol

c (M)	% Response							
1,10E-09	94,7	88,6	97,3	93,2	94,3	100,4	93,5	99,6
2,20E-10	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
1,47E-10	97,4	104,3	97,1	98,5	98,1	95,7	96,4	99,6
1,10E-10	95,9	97,4	96,7	94,0	97,5	90,8	93,1	97,2
7,34E-11	93,7	91,3	86,5	95,0	89,2	84,2	82,1	92,3
5,51E-11	69,8	54,2	68,6	79,5	66,5	72,8	63,8	85,3
2,75E-11	23,4	21,2	27,9	42,8	19,5	46,7	38,6	53,5
1,38E-11	6,9	6,5	9,4	13,1	4,4	21,2	17,1	26,2
6,88E-12	3,2	2,8	4,3	5,3	0,8	9,9	5,5	12,9
3,44E-12	6,7	5,8	3,0	2,3	5,4	3,8	1,7	6,6
1,72E-12	0,7	0,7	2,1	1,7	-1,1	2,0	1,5	1,4
1,00E-13	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
EC50	4,0E-11	4,8E-11	4,0E-11	3,1E-11	3,4E-11	3,0E-11	3,6E-11	2,4E-11

Enterodiol

c (M)	% Response							
1,65E-03	151,6	122,6	78,6	63,6	105,3	76,8	60,5	53,5
8,27E-04	95,6	76,8	127,4	102,1	97,1	76,0	43,4	50,2
4,13E-04	87,1	58,7	107,4	90,2	56,5	71,7	28,5	22,5
2,07E-04	48,4	34,7	33,1	30,8	25,9	16,8	5,3	6,5
1,03E-04	18,8	14,9	12,6	6,9	6,2	3,2	0,9	2,5
5,17E-05	23,0	14,0	2,6	1,4	1,5	0,7	-0,9	1,4
2,58E-05	12,4	7,9	1,6	0,6	0,7	-0,3	-2,0	0,4
1,29E-05	26,6	28,2	0,4	0,1	0,2	-0,6	-0,5	-0,5
6,46E-06	22,8	21,3	1,0	0,2	0,0	0,9	0,0	-0,2
3,23E-06	5,6	5,3	0,0	0,1	0,2	-0,6	-0,3	0,7
1,61E-06	5,5	5,9	0,0	0,0	0,6	-0,7	-0,2	0,2
1,00E-07	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
EC50	2,2E-04	3,9E-04	2,1E-04	2,1E-04	3,5E-04	2,9E-04	9,4E-04	9,0E-04

Genistein

c (M)	% Response			
7,40E-06	121,3	119,9	107,3	121,9
3,70E-06	126,1	119,6	115,4	116,0
1,85E-06	128,2	126,6	117,8	122,4
9,25E-07	125,3	121,5	119,0	119,9
4,63E-07	94,1	103,5	90,5	96,7
2,31E-07	33,7	51,2	30,2	38,4
1,16E-07	7,7	10,7	10,0	12,8
5,78E-08	1,6	4,6	-0,2	5,0
2,89E-08	-1,1	0,6	4,9	3,5
1,45E-08	-1,7	0,4	-1,2	1,4
7,23E-09	0,0	-1,1	-0,2	0,4
1,00E-10	0,0	0,0	0,0	0,0
EC50	2,8E-07	2,3E-07	2,9E-07	2,6E-07

Daidzein

c (M)	%Response			
7,87E-05	112,5	111,4	112,1	110,5
3,93E-05	114,3	123,6	122,9	119,9
1,97E-05	123,5	117,0	122,3	112,5
1,31E-05	118,5	117,5	111,6	118,8
9,83E-06	110,2	106,4	105,6	112,1
7,87E-06	86,4	96,0	67,9	102,8
6,56E-06	79,6	80,9	57,2	81,3
4,92E-06	54,5			43,0
3,93E-06	31,6	39,6	31,2	20,5
1,97E-06	2,4	5,0	7,3	7,2
9,83E-07	0,6	1,9	5,6	2,4
1,00E-07	0,0	0,0	0,0	0,0
EC50	4,8E-06	4,5E-06	5,8E-06	5,2E-06

Arctigenin

c (M)	% Response			
2,01E-03	136,5	109,6	171,1	182,4
1,01E-03	140,2	121,3	164,8	166,7
5,03E-04	138,3	115,3	163,7	176,3
2,52E-04	135,9	118,9	155,4	163,0
1,26E-04	137,9	121,8	151,5	151,4
6,29E-05	126,8	118,3	116,5	109,1
3,15E-05	96,2	101,4	62,8	61,8
1,57E-05	51,8	54,1	34,7	24,5
7,87E-06	22,1	22,7	16,2	16,1
3,93E-06	9,9	9,2	5,2	6,0
1,97E-06	4,4	4,1	1,5	3,6
1,00E-07	0,0	0,0	0,0	0,0

EC50 1,5E-05 1,4E-05 2,3E-05 2,6E-05

Enterolacton

c (M)	% Response					
1,68E-03	25,04	18,34	49,9	55,5	36,3	34,9
8,38E-04	47,09	24,88	78,7	94,7	19,2	16,6
4,19E-04	25,25	13,84	36,7	39,5	9,5	7,5
2,09E-04	11,26	7,17	8,3	7,5	1,8	3,2
1,05E-04	24,62	47,23	4,6	2,7	1,1	1,0
5,24E-05	6,86	4,33	1,5	0,6	0,7	1,1
2,62E-05	1,62	4,19	0,7	0,8	0,3	0,7
1,31E-05	5,71	11,13	1,0	0,5	0,1	0,4
6,55E-06	3,40	3,52	0,4	0,6	0,4	0,0
3,27E-06	3,72	3,29	0,8	0,3	0,3	1,2
1,00E-07	4,71	16,27	0,6	0,5	0,5	0,5

6.7 Prozentuale Estradiol-Aktivität von Estradiol im YES-Assay unter Zugabe der Lignanstandards - Einzelwerte

Arctiin

c (M)	% Resp			
1,40E-03	24,8	34,0		
9,04E-04			43,4	23,2
7,02E-04	36,6	61,9		
4,52E-04			78,4	48,7
3,51E-04	58,0	68,6		
2,26E-04			93,3	75,8
1,75E-04	60,3	95,8		
1,13E-04			93,7	92,0
8,77E-05	69,5	98,7		
5,65E-05			110,3	111,6
4,38E-05	67,7	105,6		
2,83E-05			102,8	107,5
2,19E-05	87,0	96,9		
1,41E-05			101,9	105,8
1,10E-05	91,5	106,6		
7,06E-06			110,4	115,7
5,48E-06	88,8	113,5		
3,53E-06			106,8	114,5
2,74E-06	96,9	110,1		
1,77E-06			104,6	107,2
1,00E-07	100,0	100,0	100,0	100,0

IC50 3,2E-04 8,7E-04 8,3E-04 4,7E-04

Isolariciresinol

c (M)	% Resp					
1,55E-03	17,7	19,8				
1,29E-03			36,64	36,83	16,56	39,93
7,77E-04	35,3	32,6				
6,47E-04			62,87	63,81	42,57	68,59
3,88E-04	60,7	57,2				
3,24E-04			84,00	86,90	60,82	96,76
1,94E-04	76,8	65,9				
1,62E-04			95,06	101,14	75,16	109,35
9,71E-05	87,6	85,6				
8,09E-05			94,28	104,96	88,34	124,62
4,86E-05	87,5	115,0				
4,05E-05			97,32	105,90	92,01	101,03
2,43E-05	107,7	103,5				
2,02E-05			104,54	109,96	93,99	103,87
1,21E-05	83,0	125,9				
1,01E-05			103,94	109,78	102,27	120,05
6,07E-06	104,0	102,0				
5,06E-06			104,19	107,94	105,48	112,93
3,03E-06	83,9	89,5				
2,53E-06			105,00	105,41	104,31	101,66
1,00E-07	100,0	100,0	100,00	100,00	100,00	100,00

IC 50 2,4E-04 4,4E-04 9,5E-04 9,8E-04 4,6E-04 1,1E-03

Enterolacton

c (M)	% Resp					
1,68E-03	50,1	39,6	62,5	76,3	51,3	56,1
8,38E-04	97,5	58,0	97,9	101,2	73,3	68,4
4,19E-04	80,5	84,7	101,9	104,2	86,2	80,2
2,09E-04	93,5	84,1	105,4	113,3	87,5	94,6
1,05E-04	136,7	114,6	103,4	101,4	99,1	96,1
5,24E-05	122,3	94,6	102,7	100,7	94,8	99,9
2,62E-05	111,8	96,8	101,8	99,5	102,3	102,2
1,31E-05	116,7	102,3	104,2	104,8	102,6	98,5
6,55E-06	112,1	102,0	106,3	99,5	105,8	105,6
3,27E-06	107,5	107,1	109,3	98,1	103,3	101,9
1,00E-07	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

Trachelogenin

c (M)	% Resp			
1,34E-03	32,9	36,0	47,7	43,1
6,68E-04	42,6	60,3	60,8	54,0
3,34E-04	49,9	71,3	67,9	82,9
1,67E-04	67,7	97,3	79,1	78,7
8,35E-05	82,9	116,8	109,4	115,0
4,17E-05	92,3	106,8	111,3	101,3
2,09E-05	92,2	108,7	101,9	105,6
1,04E-05	98,5	120,6	106,2	114,5
5,22E-06	93,2	110,4	106,8	107,9
2,61E-06	101,5	107,5	107,7	99,9
1,00E-09	100,0	100,0	100,0	100,0

IC 50 3,7E-04 8,7E-04 1,1E-03 9,2E-04

Pinoresinol

c (M)	% Resp			
1,37E-03	47,2	42,2		36,5
6,86E-04	61,7	53,5	50,5	55,2
3,43E-04	84,5	84,5	115,0	75,2
1,71E-04	94,5	89,7	135,3	86,5
8,57E-05	106,9	101,8	124,6	94,9
4,29E-05	117,4	103,4	118,0	95,1
2,14E-05	99,7	105,1	117,8	92,7
1,07E-05	109,1	108,4	119,3	94,2
5,36E-06	106,7	109,4	112,9	99,8
2,68E-06	110,7	104,4	112,3	95,4
1,00E-09	100,0	100,0	100,0	100,0

IC 50 1,2E-03 9,6E-04 9,3E-04 8,8E-04

Matairesinol

[mM/RG]	% Resp					
1,36E-03	7,2	12,2	11,0	15,6	42,4	42,4
6,79E-04	26,0	33,7	31,1	38,3	82,3	77,3
3,39E-04	51,0	51,1	55,6	58,9	97,1	95,8
1,70E-04	64,0	66,2	76,1	86,0	95,6	105,2
8,49E-05	81,5	83,2	103,2	90,4	101,2	107,0
4,24E-05	92,8	92,3	105,5	103,7	107,7	119,3
2,12E-05	95,9	102,5	108,5	98,8	106,3	106,3
1,06E-05	100,2	103,8	114,3	104,4	108,6	107,3
5,30E-06	102,9	106,2	115,7	113,5	112,6	107,3
2,65E-06	103,9	106,0	103,7	103,9	109,6	117,4
1,00E-09	100,0		100,0	100,0	100,0	100,0

IC 50 3,2E-04 3,3E-04 4,2E-04 4,9E-04 1,3E-03 1,2E-03

S3

c (M)	% Resp			
1,16E-03	18,7	20,8	16,3	15,7
5,80E-04	53,1	63,1	37,2	35,0
2,90E-04	74,4	78,8	64,5	53,6
1,45E-04	90,3	93,0	85,9	82,0
7,25E-05	94,8	102,5	90,7	92,1
3,63E-05	98,3	107,7	92,7	97,1
1,81E-05	99,8	101,1	96,3	94,2
9,06E-06	100,9	103,6		
4,53E-06	103,1	109,9	101,1	101,7
2,27E-06	101,5	108,8	103,3	101,8
1,00E-07	100,0	100,0	100,0	100,0

IC 50 6,3E-04 7,3E-04 4,5E-04 3,8E-04

S6

c (M)	% Resp			
1,11E-03	2,0	2,3	0,1	0,0
5,53E-04	9,3	9,8	1,8	1,5
2,76E-04	34,8	31,1	6,3	7,2
1,38E-04	59,6	64,1	14,8	20,3
6,91E-05	103,5	92,5	36,5	33,8
3,45E-05	91,5	105,7	66,4	54,0
1,73E-05	105,4	104,9	74,3	80,7
8,64E-06	107,3	101,5	95,6	89,2
4,32E-06	107,7	99,9	97,1	97,0
2,16E-06	107,3	104,3	98,9	106,1
1,00E-07	100,0	100,0	100,0	100,0

IC 50 2,1E-04 2,1E-04 5,0E-05 4,6E-05

S5

c (M)	% Resp			
1,67E-03	-3,2	40,6	6,1	2,8
8,37E-04	15,2	80,0	18,7	6,6
4,18E-04	46,7	89,7	40,9	5,8
2,09E-04	61,2	104,5	69,0	24,3
1,05E-04	91,8	103,9	80,4	53,8
5,23E-05	106,7	106,3	85,9	76,3
2,61E-05	105,5	107,9	92,1	94,6
1,31E-05	103,1	106,1	96,0	100,8
6,54E-06	102,4	101,9	97,2	102,9
3,27E-06	99,5	102,5	94,3	106,8
1,00E-07	100,0	100,0	100,0	100,0

IC 50 3,7E-04 1,5E-03 3,4E-04 1,1E-04

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Pharmazie in der Abteilung Biogene Arzneistoffe angefertigt. Zuerst möchte ich mich bei Frau Prof. Dräger dafür bedanken, dass sie diese Arbeit ermöglicht hat, indem sie mir das interessante Thema zur Verfügung gestellt hat sowie für die Betreuung der Arbeit und für manche hilfreiche Gedankenanstöße.

Herrn Dr. Yahya Mrestani möchte ich danken für die Einarbeitung in die Kapillarelektrophorese, die fachliche Unterstützung bei der Methodenentwicklung zur Enantiomerentrennung und für die dabei stetig an den Tag gelegte Freundlichkeit und Geduld.

Allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe danke ich für die gute Zusammenarbeit und die angenehme Arbeitsatmosphäre und auch für die schönen gemeinsam verbrachten Stunden außerhalb des Labors.

Im technischen Bereich möchte ich mich bei Frau Ursula Ködel, Frau Brigitte Marx, Frau Dorothea Watzka, Frau Anja Wodak und Frau Beate Schöne für die freundliche und hilfsbereite Unterstützung bedanken.

Nadine Mehnert danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen ihrer Diplomarbeit.

Herrn Dr. Jürgen Schmidt aus der Abteilung Natur- und Wirkstoffchemie am IPB Halle danke ich für die fachliche Unterstützung bei den HPLC-MS-Messungen und bei der Auswertung der GC-MS-Daten.

Herrn Gert Horn danke ich für die großzügige Bereitstellung des Pflanzenmaterials.

Frau Dr. Elke Aehle danke ich herzlich für ihre stetige fachliche und moralische Unterstützung während der Arbeit, für viele kleine Aufmunterungen und für das Korrekturlesen des Manuskripts.

Herrn Dr. Joachim Hans möchte ich danken für seine Unterstützung und Hilfsbereitschaft während der Entstehung der Arbeit, für seine stetige Bereitschaft zu fachlichen Diskussionen und für das Korrekturlesen des Manuskripts.

Ich danke meinen Eltern, dass sie mir mein Studium und somit auch diese Arbeit ermöglicht haben.

Persönliche Daten

Geburtsdatum : 15.02.1973
Geburtsort: Säckingen
Adresse: Adlerstr. 25
44137 Dortmund

Berufliche Praxis

seit 07/2008 Angestellte Apothekerin in der Delta-Apotheke in Dortmund

05/2008 - 06/2008 Wissenschaftliche Angestellte am Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle im FORMAT-Projekt „Process Analytical Technology (PAT) und Ceramide aus Pflanzen“

01/2004 – 01/2008 Wissenschaftliche Angestellte im Institut für Pharmazie der Martin-Luther-Universität Halle, Abteilung Biogene Arzneistoffe (Frau Prof. Dr. Dräger) und Arbeit an der vorliegenden Dissertation

10/2000 - 12/2003 Wissenschaftliche Angestellte im Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit
Bereich: Zulassung von Tierarzneimittel – Qualität und Formalpharmazie

06/2000 - 09/2000 Angestellte Apothekerin in der Apotheke Paul, Konstanz

Schul- und Hochschulausbildung

05/2000 Drittes Staatsexamen, Approbation

05/1999 - 04/2000 Praktisches Jahr in der Apotheke Paul, Konstanz

04/1994 - 02/1999 Pharmaziestudium an der Universität Marburg

10/1993 - 02/1994 Chemiestudium an der Universität Freiburg

1993 Abitur

1990 Mittlere Reife

1988 Hauptschulabschluss

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Dissertation erstmals um die Erlangung eines Doktorgrades bewerbe.

Ferner erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt habe und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Dortmund, den 18.11.2009

Ulrike Müller