



Institut für Chemie
Abteilung für Analytische
und Technische Chemie

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe für die Krebsprävention und – therapie

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium
(Dr. rer. nat.)
an der
Mathematisch – Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Universität Rostock

vorgelegt von
Christina Oppermann
geboren am 12. Januar 1983
in Kühlungsborn

Rostock, 12. Oktober 2012

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 2009 bis Juni 2012 im Institut für Chemie der Universität Rostock angefertigt.

1. Gutachter:

Prof. Dr. Udo Kragl
Institut für Chemie, Universität Rostock

2. Gutachter:

Prof. Dr. Michael Lalk
Institut für Biochemie, Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

Datum der Disputation: 16. April 2013

- Abstract -

Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe für die Krebsprävention und – therapie (Deutsch)

Krebs ist im Vergleich mit asiatischen Ländern eine der am häufigsten vorkommenden Krankheiten in der westlichen Welt. Bereits durchgeführte Studien deuten darauf hin, dass eine phytoöstrogenreiche Ernährung sich positiv auf die Gesundheit auswirken kann. Auffällig ist die Wirkung der Phytoöstrogene auf die hormonabhängigen Erkrankungen wie Brust- und Prostatakrebs. Im Rahmen dieser Arbeit wurden ethanolische Mikrowellenextrakte aus fünf einheimischen Pflanzen (Gemeiner Lein, Schwarzer Holunder, Sanddorn, Brennnessel, Rotbuche) gewonnen. Anschließend wurden deren zellbiologische Eigenschaften (Zellvitalität und –toxizität, Proliferationsverhalten, Zellzyklusanalysen) an verschiedenen Brustkrebszelllinien (MCF-7, BT-20 und T47D) getestet. Die Analyse der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe mit Hilfe von präparativen und massenspektrometischen Methoden gab Aufschluss über die Substanzen bzw. Substanzklassen, die entscheidend für die Proliferationshemmung der einzelnen Brustkrebszelllinien sind.

Secondary plant ingredients for the prevention of cancer and its therapy (English)

Compared with asian countries cancer is one of the most common diseases in the Western world. However conducted studies showed that a phytoestrogen rich diet could have a protective effect against cancer. The effect of phytoestrogens is specific to hormone-dependent diseases like breast and prostate carcinoma. The dissertation deals with the preparation of ethanolic microwave extracts from different parts of five native plants (flax root, elder berries and flowers, sea buckthorn berries, nettle leaves and bark of beech) and a cell biological analysis of proliferation behaviour, cell viability and cytotoxicity, long term survival and the mechanism of cell cycle regulation on different breast cancer cell lines (MCF-7, BT-20 and T47D). The analytical analysis of secondary plant metabolites by means of preparative and mass spectrometric methods provides information about the important substances and classes of substances which influence the proliferation inhibition on breast cancer cell lines.

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Prof. Dr. Udo Kragl bedanken, für die Überlassung des Themas, die Betreuung der Arbeit und die vielen Hinweise und Anregungen, aber auch für die Förderung und Unterstützung sowie den gewährten Freiraum.

Bei der Deutschen Krebshilfe bedanke ich mich für die finanzielle Unterstützung in den letzten 3 Jahren.

Bei Dr. Wolfgang Ruth bedanke ich mich ebenfalls für die Unterstützung und die Geduld bei jeglichen Fragen sowie für die gute Zusammenarbeit innerhalb des Projektes.

Auch Sandra Klehn danke ich für die praktische Unterstützung im Labor und beim Vermessen der Proben.

Bei allen Projektpartnern bedanke ich mich für eine gute Zusammenarbeit und die vielen wissenschaftlichen Diskussionen in unseren Seminaren. Vor allem Dr. Nadja Engel-Lutz und Dipl.-Biol. Marlen Szewczyk danke ich für Ihre Geduld, mir die biologischen und medizinischen Aspekte des Themas näher zu bringen und die Unterstützung bei den Wirkungsuntersuchungen der Proben sowie für die von Ihnen erlaubte Mitverwendung ihrer Ergebnisse.

Bei allen Praktikanten möchte ich mich für ihre Laborarbeit innerhalb des Projektes bedanken.

Ferner bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe Kragl, besonders bei Thomas, Florian, Sebastian, Regina sowie Sebastian und Annett für die vielen wissenschaftlichen und privaten Gespräche, die nicht nur eine Bereicherung waren sondern auch zum Spaß während der Arbeit führten.

Des Weiteren möchte ich all meine Freunde hier erwähnen, die trotz großer Distanz in den letzten Jahren immer für die richtige Abwechslung sorgten. Besonders bei Sweta, Anna, Johannes und Stephan für die schöne Zeit mit euch, die vielen gemeinsamen Konzertbesuche, die lustigen Urlaube und Wochenenden zusammen sowie vor allem für die unvergesslichen Momente zur Hochzeit.

Und zu guter letzt bedanke ich mich bei meiner ganzen Familie für die tatkräftige Unterstützung, das Verständnis und die Rücksicht während dieser Zeit sowie für die tolle Abwechslung und Freude zu Hause an der Ostsee und in den Bergen.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Arbeit bisher von mir weder an der Mathematischen – Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock noch einer anderen wissenschaftlichen Einrichtung zum Zwecke der Promotion eingereicht wurde.

Ferner erkläre ich, dass diese Arbeit selbstständig verfasst und nur unter Verwendung der darin angegebenen Hilfsmittel angefertigt wurde.

Christina Oppermann

Rostock, Oktober 2012

- Für meine Familie -

»Es ist anzunehmen, dass das Pflanzenreich eine unermessliche Fülle interessanter Wirkstoffe oder Leadsubstanzen für neue Arzneimittel enthält, die es noch zu entdecken gilt.«

-Schaffner 1995-

Inhaltsverzeichnis

I. Abbildungsverzeichnis	IX
II. Tabellenverzeichnis	XIII
III. Abkürzungsverzeichnis	XV
1. Einleitung.....	1
2. Ziel der Arbeit.....	4
3. Theorie.....	6
3.1. Brustkrebs	6
3.1.1. Therapiemöglichkeiten.....	7
3.2. Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe	8
3.2.1. Flavonoide.....	9
3.2.2. Phytoöstrogene	12
4. Experimenteller Teil	15
4.1. Pflanzenmaterialen.....	15
4.1.1. Gemeiner Lein (<i>Linum usitatissimum</i>).....	16
4.1.2. Schwarzer Holunder (<i>Sambucus nigra</i>)	16
4.1.3. Sanddorn (<i>Hippophae rhamnoides</i>)	17
4.1.4. Brennnessel (<i>Urticae dioica</i>)	18
4.1.5. Rotbuche (<i>Fagus sylvatica</i>)	19
4.2. Zelllinien	20
4.3. Methoden	21
4.3.1. Probenvorbereitung	21
4.3.1.1. Zerkleinerung.....	21
4.3.1.2. Extraktion.....	22
4.3.1.3. Festphasenextraktion (SPE)	24
4.3.1.4. Sprühtrockner	25
4.3.1.5. Analytische Untersuchungsmethoden.....	27
4.3.1.6. LC-MS.....	27
4.3.1.7. GC-MS.....	28
4.3.1.8. MS ⁿ – Messungen.....	30
4.3.1.9. Präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie(HPLC)	31
4.3.2. Zellbiologische Methoden	31
4.3.2.1. Proliferationsanalysen.....	32
4.3.2.1.1. Bromodeoxyuridin (BrdU) Test	32
4.3.2.1.2. FACS-Calibur (Zellzyklustest)	32
4.3.2.2. Stoffwechselphysiologische Analysen.....	33
4.3.2.2.1. Laktat-Dehydrogenase (LDH) Test	33

4.3.2.2.2.	MTT Test	33
4.3.2.2.3.	BIONAS-Messungen.....	33
5.	Ergebnisse und Diskussion	35
5.1.	Anwendung der Sprühtrocknung	35
5.2.	Stabilität der Mikrowellenextrakte	39
5.2.1.	Lagerungsstabilität der Extrakte.....	39
5.2.2.	Thermostabilität der Extrakte	43
5.3.	Untersuchung der Pflanzeninhaltsstoffe	48
5.3.1.	Die Leinwurzel (<i>Linum usitatissimum</i>)	48
5.3.1.1.	Untersuchung der Inhaltsstoffe.....	49
5.3.1.2.	Zelluntersuchungen.....	58
5.3.2.	Der Schwarze Holunder (<i>Sambucus nigra</i>)	60
5.3.2.1.	Blüten.....	60
5.3.2.2.	Beeren	65
5.3.2.3.	Zelluntersuchungen.....	69
5.3.3.	Der Sanddorn (<i>Hippophae rhamnoides</i>).....	73
5.3.3.1.	Beeren	73
5.3.3.2.	Zelluntersuchungen.....	76
5.3.4.	Die Brennnessel (<i>Urticae dioica</i>).....	80
5.3.4.1.	Blätter	80
5.3.4.2.	Zelluntersuchungen.....	84
5.3.5.	Die Rotbuche (<i>Fagus sylvatica</i>)	85
5.3.5.1.	Zelluntersuchungen.....	89
5.4.	Vergleich und Diskussion der Ergebnisse.....	91
6.	Zusammenfassung.....	96
7.	Ausblick.....	99
8.	Literaturverzeichnis	101
9.	Anhang.....	112
9.1.	Chemikalienliste für die Extraktion	127
9.2.	Chemikalienliste für die Analytik	127
9.3.	Geräteliste	128

I. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1- 1: Claudius Galenus (131 - 201 n. Chr.)	1
Abb. 1- 2: Übersicht der Welt-Krebsneuerkrankungsraten aller Krebsarten pro Jahr	2
Abb. 1- 3: Vergleich der Inzidenz und Mortalität von den asiatischen Ländern mit den westlichen Ländern.....	2
Abb. 2- 1: Fließschema der Arbeitsschwerpunkte	5
Abb. 3- 1: Aufbau der weiblich Brust	6
Abb. 3- 2: Biosynthesewege der Flavonoide	10
Abb. 3- 3: Die Hauptgruppen der Flavonoide	11
Abb. 3- 4: Strukturformeln der Phytoöstrogene und des Sexualhormons 17 β -Östradiol	13
Abb. 4- 1: Blüten und Samen der Leinpflanze	16
Abb. 4- 2: Photographien von Holunderpflanzen.....	17
Abb. 4- 3: Sanddornstrauch mit reifen Früchten	17
Abb. 4- 4: Die Brennnessel	18
Abb. 4- 5: Buchenmischwald in Dänemark und Querschnitt eines Rot-Buchenstammes mit ausgeprägtem Rotkern	19
Abb. 4- 9: Mikrofeinmühle IKA MF 10 (A) mit den Schneidschablonen (B).....	21
Abb. 4- 10: zerkleinertes Wurzelmaterial (Leinwurzel)	22
Abb. 4- 11: zerkleinertes Rindenmaterial der Rotbuche	22
Abb. 4- 12: Mars Xpress von CEM.....	23
Abb. 4- 13: A: Membran-Filtrations Anlage der Firma Millipore; B: Kolben mit klaren Extrakt nach der Abtrennung von Extraktionsmaterial.....	24
Abb. 4- 14: Prinzipieller Ablauf einer SPE	25
Abb. 4- 15: Sprühtrockner (B-290) der Firma Büchi (A) mit dem Fließschema (B)	26
Abb. 4- 16: Derivatisierungsgleichung für BSTFA	29
Abb. 4- 17: Temperaturgradient der GC-MS-Messungen.....	29
Abb. 4- 18: Schematische Darstellung einer MS ⁿ -Fragmentierung	30
Abb. 5- 1: versprühter Sanddornbeerenextrakt vor und nach der Festphasenextraktion	35
Abb. 5- 2: links: gelbliches Leinwurzelpulver bei einer Inlet-Temperatur von 100 °C und einer Pumpleistung von 5 %; rechts: dunkelgelbes Leinwurzelpulver bei einer Inlet-Temperatur von 120 °C und einer Pumpleistung von 5 %.....	36
Abb. 5- 3: gelb-bräunliches Pulver des Holunderblütenextraktes	37
Abb. 5- 4: Gegenüberstellung der Chromatogramme des Holunderblütenextraktes bzw. .-pulvers vor und nach dem Sprühtrocknen bei 180 °C	38
Abb. 5- 5: Darstellung der analytischen Messung im Chromatogramm	39

Abb. 5- 7: Darstellung der gefundenen Massen in Abhängigkeit vom Lagerungszeitraum eines durch Mikrowellenextraktion hergestellten Leinwurzelextraktes	41
Abb. 5- 8: Wirksamkeitsuntersuchungen des Leinwurzelextraktes in Abhängigkeit des Lagerzeitraumes auf die Brustkrebszelllinie MCF-7	42
Abb. 5- 9: Einfluss der Temperatur auf die Inhaltstoffe eines Buchenrindenextraktes.	43
Abb. 5- 10: Chromatogramme einer ethanolischen Naringeninstandardlösung ohne Temperatureinfluss	44
Abb. 5- 11: Massenspektrum einer ethanolischen Naringeninstandardlösung ohne Temperatureinfluss bei negativer (A) und positiver (B) Ionisierung	45
Abb. 5- 12: Massenspektrenvergleich einer ethanolischen Naringeninstandardlösung nach der Lagerung bei 65 °C über verschiedene Zeiträume	46
Abb. 5- 13: Massenspektrenvergleich einer ethanolischen Quercetinstandardlösung vor und nach der Lagerung bei 65 °C über verschiedene Zeiträume	47
Abb. 5- 14: Massenspektrenvergleich einer ethanolischen Rutinstandardlösung vor und nach der Lagerung bei 65 °C über verschiedene Zeiträume	47
Abb. 5- 15: LC-Chromatogramme von ethanolischen Mikrowellenextrakten des Faser- (A) und Öleins (B)	49
Abb. 5- 16: Chromatogramm eines ethanolischen Leinwurzelextraktes des Öleins	50
Abb. 5- 17: Chromatogramm der isolierten Massenspur m/z = 361 (oben) und dazugehöriges Massenspektrum von Secoisolariciresinol (unten).....	51
Abb. 5- 18: Strukturen der nachgewiesenen Lignane im ethanolischen Leinwurzelextrakt...	51
Abb. 5- 19: Chromatogramm von Fisetin im ethanolischen Leinwurzelextrakt.....	52
Abb. 5- 20: A: Massenspektrum der Komponente Fisetin im Leinwurzelextrakt, B: Massenspektrum des Standards Fisetin	52
Abb. 5- 21: leicht grün fluoreszierendes ethanolisches Leinwurzelextrakt	53
Abb. 5- 22: Chromatogramm (TIC) und isolierter Peak in der positiven Ionenspur (oben) sowie das dazugehörige Massenspektrum für den Peak RT = 9,53 min (unten)	53
Abb. 5- 23: MS ² -Massenspektrum ITMS + p ESI Full ms2 701,70@cid20,00 [190,00-2000,00].....	54
Abb. 5- 24: MS ³ -Massenspektrum ITMS + p ESI Full ms3 701,70@cid35,00; 539,00@cid20,00 [145,00 – 2000,00]; A: Vergrößerung des Massenbereichs von 523,10 amu bis 524,00 amu	55
Abb. 5- 25: Simulierte Fragmentierung der vermuteten Struktur von Secoisolariciresinoldiglycosid und mögliche Entstehungswege für die einzelnen Massenfragmente	56
Abb. 5- 28: Zellbiologische Untersuchungen des Leinwurzel (LW)-Vollextraktes (VE) und der drei Leinwurzel-Fraktionen (F1-3) an der T47D-Zelllinie.....	59
Abb. 5- 29: LC-MS Chromatogramm eines ethanolischen Holunderblütenextraktes	60
Abb. 5- 30: Strukturformel von Rutin	61
Abb. 5- 31: Vergleich des Chromatogramms vom ethanolischen Holunderblütenextrakt mit der ethanolischen Standardlösung Rutin.....	61
Abb. 5- 32: Massenspektrenvergleich vom Rutin (Holunderblütenextrakt) mit dem Rutinstandard	62

Abb. 5- 33: Chromatogrammübersicht vom Vollextrakt (oben) und der identifizierten Inhaltsstoffe Isoquerisetin (mitte) und Isorhamnetin-3- <i>O</i> -glucosid (unten).....	63
Abb. 5- 34: Massenspektrum von den identifizierten Inhaltsstoffen im Holunderblütenextrakt	63
Abb. 5- 35: Chromatogramm (TIC) und isolierte Massenspur von Malvidin (oben) sowie das Massenspektrum von Malvidin (unten) im Holunderblütenextrakt.....	65
Abb. 5- 36: LC-MS Chromatogramm eines ethanolischen Holunderbeerenextraktes	66
Abb. 5- 37: LC-MS Chromatogramm eines ethanolischen Holunderbeerenextraktes (gesammelt in Rostock 2011)	67
Abb. 5- 38: Massenspektren des positiven Ionenstroms der Flavonoide Fisetindiglucosid (oben) und Isorhamnetin-3- <i>O</i> -rutinosid (unten) im ethanolischen Holunderbeerenextrakt....	68
Abb. 5- 39: Strukturen der Anthocyanide Kuromanin, Idaein und Cyanidin	68
Abb. 5- 40: Chromatogramme von Kuroman, Idaein und der unbekannten Substanz mit RT = 2,48 min (oben) und Massenspektren der Standards Idaein und Kuromanin sowie der Substanz bei RT = 2,48 min (unten)	69
Abb. 5- 41: Zelltestuntersuchung des Holunderblüten-und Beerenextraktes an der Zelllinie MCF-7	70
Abb. 5- 42: Zelltestuntersuchung des Holunderblüten-und Beerenextraktes an der Zelllinie BT-20.....	71
Abb. 5- 43: Vergleich der Chromatogramme des Sanddorbeerensaftes (unten) und des ethanolisch Sanddornbeerenextraktes (oben).....	73
Abb. 5- 45: Proliferationsraten (%) der Zelllinie MCF-7 nach 48 h Behandlung mit den Testsubstanzen 17- β Estradiol (E2), Genistein (G), Daidzein (D), Sanddornsaf und Sanddornextrakt.	77
Abb. 5- 46: Proliferationsraten (%) der Zelllinie MCF-7 nach 48 h Behandlung mit den Sanddornfraktionen (SS1-SS10).....	78
Abb. 5- 47: Darstellung der Standardadhäsionrate (%) der Mammarkarzinomzelllinie MCF-7 unter dem Einfluss der Sanddornbeerenfraktionen 8 und 10.....	79
Abb. 5- 48: Vergleich von getrockneten (oben) und frischen (unten) Brennnesselblätterextrakten in Ethanol mittels ESI-LC-MS.....	81
Abb. 5- 49: Chromatogramme eines frischen ethanolischen Brennnesselblätterextraktes, ..	82
Abb. 5- 50: GC-MS Chromatogramm eines Brennnesselblätterextraktes.....	83
Abb. 5- 51: Proliferationsraten (%) der Zelllinie MCF-7 nach 48 h Behandlung mit verschiedenen Verdünnungen der Brennnesselblätterextrakte (BB 1-1, 1-10, 1-100).	84
Abb. 5- 52: LC-MS Chromatogramm eines ethanolischen Extraktes der Buchenrinde	86
Abb. 5- 53: Struktur des OPC in der Buchenrinde.....	87
Abb. 5- 54: Massenspektrum des OPC in der Buchenrinde	87
Abb. 5- 55: Struktur der Flavonoide Taxifolin und Quercetin	88
Abb. 5- 56: Synthese von Quercetin im pflanzlichen Stoffwechsel aus Taxifolin [185].....	89
Abb. 5- 57: Proliferationsraten (%) der Zelllinie MCF-7 nach 48 h Behandlung mit den Fraktionen (B1-4) und dem Extrakt der Buchenrinde.	90
Abb. 5- 58: Darstellung der Standardadhäsionrate (%) der Mammarkarzinomzelllinie MCF-7 unter dem Einfluss des Rindenextraktes der Rotbuche. Als Kontrolle diente EtOH.....	91

Abb. 5- 59: Vergleich der Proliferationshemmung (%) an der MCF-7 Zelllinie der untersuchten Pflanzenextrakte. Darstellung im Vergleich zur Kontrollmessung.	93
Abb. 5- 60: Darstellung der Standardadhäsionrate (%) der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 unter dem Einfluss der Extrakte von Sanddornbeeren und Buchenrinde.	94
Abb. 5- 61: Darstellung der Standardadhäsionrate (%) der Mammarkarzinomzelllinie MCF-7 unter dem Einfluss der Fraktionen des Sanddornbeerextraktes im Vergleich mit dem Vollextrakt der Buchenrinde.	95
Abb. A- 1: Vergleich der verwendeten C18-Säulen am Beispiel des Sanddornextraktes....	112
Abb. A- 2: Übersicht der auf ihre Temperaturstabilität hin untersuchten Standards.....	112
Abb. A- 3: Übersicht für die Komponente Biochanin A, welche im Leinwurzelextrakt nachgewiesen werden konnte. A: Totaler Ionenstrom des Leinwurzelextraktes, B: Chromatogramm der isolierten Massenspur m/z = 285. C: Massenspektrum des identifizierten Peaks mit RT = 12,63 min. D: Vergleichsmassenspektrum des Standards Biochanin A.....	116
Abb. A- 4: Vergleich der Chromatogramme des Leinwurzelextraktes und des Standards Podophyllotoxin. Oben: Totaler Ionenstrom des Leinwurzelextraktes, Unten: Totaler Ionenstrom des Standards Podophyllotoxin. Durch den Vergleich der Chromatogramme und der massenspektrometrischer Untersuchungen, konnte in den Mikrowellenextrakten der Leinwurzel kein Podophyllotoxin nachgewiesen werden.	116
Abb. A- 5: Übersicht der geschnittenen Fraktionen des Leinwurzelextraktes in Abhängigkeit der Zeit. F1 (6-12 min), F2 (15-20 min), F3 (34-40 min)	117
Abb. A- 6: Massenspektrum von Tocopherol-TMS, RT = 48,34 min, Molare Masse: 430,71 g/mol, Derivatisierte Masse ([M+TMS]): m/z = 502,28.....	117
Abb. A- 7: Struktur von Tocopherol-TMS	117
Abb. A- 8: Massenspektrum α -Sitosterol-TMS, RT =53,45 min. Molare Masse: 414,69 g/mol, Derivatisierte Masse ([M+TMS]): m/z = 486,23	118
Abb. A- 9: Struktur von α -Sitosterol-TMS.....	118
Abb. A- 10: Übersicht der geschnittenen Fraktionen des Sanddornbeerensaftes in Abhängigkeit der Zeit.	118
Abb. A- 11: Proliferationsraten (%)der Zelllinie MCF-7 nach 48 h Behandlung mit den einzelnen Sanddornfraktionen (F1-F12), Mittelwert \pm Standardabweichung (n=2-4) im Vergleich zur Kontrolle mit Wasser.	119
Abb. A- 12: Darstellung der geschnittenen Buchenrindenfraktionen an der präparativen HPLC. 280 nm. B1 (5,2-6,1 min), B2 (8,4-9,4 min), B3 (9,4-10,8 min), B4 (12,1-13,6 min).....	119
Abb. A- 13: Biosynthese der Flavonoide, 00941 9/24/12, © Kanehisa Laboratories.....	120
Abb. A- 14: Übersicht der Strukturen der gefundenen Pflanzeninhaltsstoffe	121

II. Tabellenverzeichnis

Tab. 3- 1: Effekte von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen	9
Tab. 3- 2: Die Verbindungsklassen der Flavonoide und ihre typischen Eigenschaften	12
Tab. 3- 3: Phytoöstrogengehalt einiger Lebensmittel	14
Tab. 4- 1: Übersicht der untersuchten Pflanzenarten	15
Tab. 4- 2: Verwendete Zelllinien	20
Tab. 4- 3: Mikrowellen-Methode für phytoöstrogenhaltige Extrakte	24
Tab. 4- 4: Sprührocknungsparameter die getestet wurden.....	27
Tab. 4- 5: Übersicht der verwendeten Chromatographiesäulen für die analytische Untersuchung der Pflanzenextrakte	27
Tab. 4- 6: Gradientenprogramm für die Zusammensetzung der mobile Phase der HPLC-MS Analytik.....	27
Tab. 4- 7: weitere für die LC wichtige Parametereinstellungen.....	28
Tab. 4- 8: Parametereinstellung für das Massenspektrometer	28
Tab. 4- 9: Eluentzusammensetzung für préparative HPLC-Messungen	31
Tab. 4- 10: Parametereinstellungen der HPLC für die Fraktionierung	31
Tab. 5- 1: Zusammenfassung der Ergebnisse und Parameter für die Sprühversuche des Holunderblütenextraktes	37
Tab. 5- 2: Auflistung der Anteile der Substanzklassen in der Leinwurzel in abhängigkeit unterschiedlicher Erntezeitpunkte	49
Tab. 5- 3: Chrakteristische Ionen der einzelnen Flavonoide der Holunderblüte bestimmt durch ESI-LC-MS.....	64
Tab. 5- 4: Charakteristische Ionen der einzelnen Phenolsäuren der Holunderblüte bestimmt durch ESI-LC-MS.....	64
Tab. 5- 5: Chrakteristische Ionen der einzelnen Flavonoide der Holunderbeeren bestimmt durch ESI-LC-MS.....	67
Tab. 5- 6: Chrakteristische Ionen der Inhaltsstoffe des Sanddornbeerensaftes bestimmt durch ESI-LC-MS.....	74
Tab. 5- 7: Identifizierte triglucosidisch gebundene Flavonoide im Sanddornbeerensaft.....	75
Tab. 5- 8: Flavonoide Syteme mit acylierten Hydroxizimtsäurederivaten im Sanddornsaft....	76
Tab. 5- 9: Übersicht der Inhaltsstoffe der Brennnesselblätter ermitteln mittels ESI-LC-MS ..	82
Tab. 5- 10: Übersicht der mittels EI-GC-MS identifizierten Inhaltsstoffe des Brennnesselblätterextraktes.....	84
Tab. 5- 11: Zusammensetzung der Buchenrinde in %.....	85
Tab. 5- 12: Übersicht der bisher identifizierten Flavonoide und Flavonoidglycoside der Buchenrinde	88
Tab. 5- 13: Übersicht der mittels EI-GC-MS identifizierten Inhaltsstoffe des Buchenrindenextraktes	89

Tab. 5- 14: Übersicht der gefundenen Substanzklassen in den einzelnen Pflanzenextrakten	92
Tab. 6- 1: Allgemeine Übersicht der Anzahl und Ergebnisse der untersuchten Extrakte bzw. Fraktionen (Proliferationshemmung: sehr gut: >50 %, gut: 50>x<20 %, befriedigend: <20 %). Signifikanz im Vergleich zur Kontrollmessung.....	96
Tab. A- 1: Übersicht der nachgewiesenen und identifizierten Substanzen in den einzelnen Pflanzenextrakten.....	114
Tab. A- 2: Fortsetzung der Übersicht der nachgewiesenen und identifizierten Substanzen in den einzelnen Pflanzenextrakten.....	115
Tab. A- 3: Chemikalienliste für die Extraktion.....	127
Tab. A- 4: Chemikalienliste für die Analytik	127
Tab. A- 5: Geräteliste	128
Tab. A- 6: Fortsetzung der Geräteliste	129

III. Abkürzungsverzeichnis

A	Angström
Abb.	Abbildung
amu	Atomic Mass units
BrdU	Bromdesoxyuridin
BSTFA	N, O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
bzw.	beziehungsweise
ca.	cirka
cm	Zentimeter
d	Tag(e)
d.h.	das heißt
Dipl.-Biol.	Diplom-Biologe
Dipl.-Chem.	Diplom-Chemiker
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dr.	Doktor
Dr. med.	Doctor medicinae
Exy	10^{xy}
EI	Electron Impact
EI-GC-MS	Gaschromatographie-Massenspektrometrie, Ionisierung erfolgte durch Elektron Impact
ER	Östrogenrezeptor bzw. Estrogenrezeptor
ESI	Electrospray Ionization
ESI-LC-MS	Liquid Chromatography mit MS-Detektor gekoppelt und Ioniierung erfolgte durch Elektrospray Ionization
et al.	und Mitarbeiter
EtOH	Ethanol
eV	Elektronenvolt
°C	Grad Celsius

g	Gramm
GC-MS	Gaschromatographie gekoppelt mit Massenspektrometer
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde(n)
H ₂ O	Wasser
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
i.Sp.	in Spuren
kg	Kilogramm
LC	Liquid Chromatography (Flüssigchromatographie)
LC-MS	Liquid Chromatography mit MS-Detektor gekoppelt
LDH	Lactatdehydrogenase
LTQ	Linear Trap Quadrupole
LUFA	Landwirtschaftliche Untersuchungs- und Forschungsanstalt
m	Meter
mm	Millimeter
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
mL	Milliliter
µL	Mikroliter
min	Minute
mind.	mindestens
MS	Massenspektrometrie, Massenspektrometer
MS/MS	zwei gekoppelte massenspektrometrische Messungen
MS ⁿ	mehrere gekoppelte massenspektrometrische Messungen (n = 1 bis 10)
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Molekulares Gewicht/ Masse
m/z	Masse-/ Ladungsverhältnis
n	Anzahl der Messungen
n. Chr.	nach Christus

NIST	National Institute of Standards and Technology (USA)
NL	Normalisations-Level
nm	Nanometer
NMR	Nuclear Magnetic Resonance
n.n.	nicht nagewiesen
n.U.	nicht Untersucht
OPC	oligomeres Proanthocyanidin
%	Prozent
r.	rechts
Relative Abundance	Relative Häufigkeit in %
RNA	Ribonukleinsäure
SPE	Solid Phase Extraction
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TIC	Totaler Ionenstrom
u	Mikrometer
&	und
u.a.	unter anderem
USA	United States of America
usw.	uns so weiter
UV	Ultraviolette Strahlung
v. l.	von links
W	Watt
WHO	Weltgesundheitsorganisation
z.B.	zum Beispiel

1. Einleitung

Der Begriff „Krebs“ unterliegt keiner einheitlichen Bezeichnung und fasst eine Reihe verschiedener Erkrankungen zusammen. Galenos nach wurde der Name Krebs durch die Ähnlichkeit der geschwollenen Venen eines äußeren Tumors mit Krebsbeinen interpretiert [1].



Abb. 1- 1: Claudius Galenus (131 - 201 n. Chr.) [2]

„.... und an der Brust sahen wir häufig Tumoren, die der Gestalt eines Krebses sehr ähnlich waren. So wie die Beine des Tieres an beiden Seiten des Körpers liegen, so verlassen die Venen den Tumor, der seiner Form nach dem Krebskörper gleicht [1].“

– Claudius Galenus –

Alle Erkrankungsarten haben jedoch eins gemeinsam, die krankhafte Veränderung von Zellen. Das hat die Folge, dass Krebszellen sich häufiger und schneller teilen können als gesunde Zellen. Dadurch können sie sich schnell unkontrolliert vermehren, sodass ein Verband aus entarteten Zellen entstehen kann. Diese bösartige (*malignen*) Neubildung, auch Tumor genannt, kann in benachbartes gesundes Gewebe einwachsen und es dadurch zerstören. Prinzipiell kann jedes Organ des menschlichen Körpers von Krebs befallen werden, da die entarteten Zellen von ihrem Entstehungsort aus über das Blut oder das Gefäßsystem (Lymphsystem) in andere Organe wandern können. Dort vermehren sie sich als Tochtergeschwülste, so genannte *Metastasen*, weiter [3]. So haben sich mit der Zeit viele verschiedene Krebsarten entwickelt, an denen der Mensch heute erkranken kann. Bis heute kennt man 100 verschiedene Arten von Krebs, die sich durch unterschiedliche Krankheitsverläufe, Beschwerden und verschiedene Ursachen bzw. Auslöser voneinander unterscheiden [1, 3]. Weltweit gesehen ist Krebs, laut der Weltgesundheitsorganisation (WHO), die zweithäufigste Todesursache an nichtinfektiösen Krankheiten, an der jährlich über 7,6 Millionen Menschen sterben [4, 5]. Hinzu kommt, dass mit jedem neuen Jahr rund 12 Millionen Neuerkrankungen diagnostiziert werden [5]. Die Krebsarten, die hauptsächlich für die hohe Sterblichkeitsrate verantwortlich sind, sind vor allem die Erkrankung an Lungen-, Magen-, Leber-, Darm- und Brustkrebs. Geschlechterspezifisch ist weltweit bei Frauen der Brustkrebs, mit ca. 39 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen die häufigste Krebsart. Unter Männern hingegen ist der Lungenkrebs, mit ca. 34 Neuerkrankungen pro 100.000 Männer die häufigste Krebserkrankungen, an der die Männer leiden [5].



Abb. 1- 2: Übersicht der Welt-Krebsneuerkrankungsraten aller Krebsarten pro Jahr (außer nicht melanomen Hautkrebs). Standardisiert auf die Anzahl der Neuerkrankungen von 100000 Menschen pro Jahr, für alle Altersgruppen und beide Geschlechter. [5]

Betrachtet man Abbildung 1-2, so wird erkenntlich, dass es weltweit deutliche Unterschiede in der Häufigkeitsverteilung von Krebs gibt. Viele Wissenschaftler haben sich mit der Entstehung, Vermeidung bzw. kontinentalen Verteilung von Krebs beschäftigt [5-8]. Speziell die Risikofaktoren, die das Wachstum von Krebs fördern bzw. erst hervorrufen können, sind immer wieder Bestandteil vieler Forschungen [5, 9-11]. Bis heute kann man nicht eindeutig sagen, welche Ursache allein maßgeblich an der Bildung von Krebs beteiligt ist.

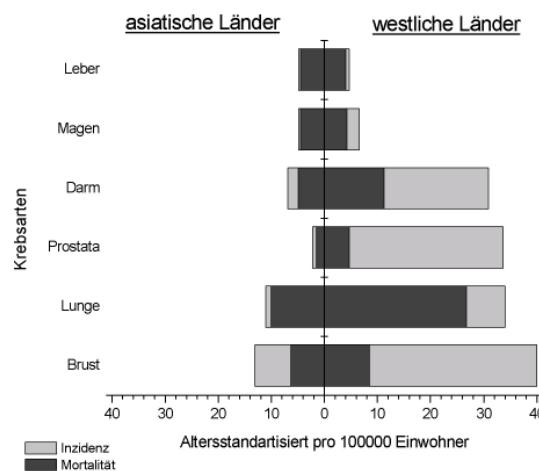


Abb. 1- 3: Vergleich der Inzidenz und Mortalität von den asiatischen Ländern mit den westlichen Ländern. Brustkrebs schließt nur die weibliche Bevölkerung ein und Prostatakrebs nur den männlichen Bevölkerungsteil [5].

Fakt ist, dass viele Faktoren, wie z.B. Lebensstil, Ernährung, körperliche Aktivität und die Zusammensetzung des Körpergewebes einen großen Einfluss auf die Entstehung von Krebs haben können [12]. Vor allem in der Krebsprävention wird der Einfluss der

Ernährung in vielen Studien heiß diskutiert. Vergleicht man zum Beispiel die Krebsneuerkrankungsraten der westlichen Länder mit denen der asiatischen Länder (Abb. 1- 2, Abb. 1- 3), so erkennt man, dass gerade in den asiatischen Ländern ein geringeres Krebsrisiko besteht. Einige epidemiologische Daten zeigen, dass die unterschiedliche Ernährung einen großen Einfluss auf das verminderte Krebsrisiko haben könnte [13-15]. Gerade der sehr hohe Anteil von Fisch und vegetarischen Nahrungsmitteln der asiatischen Kultur scheint im Vergleich zur hauptsächlich fleisch-lastigen Ernährung der westlichen Länder diesen positiven Effekt hervorzurufen [16, 17]. So kann ein übermäßiger Fleischkonsum das Darmkrebsrisiko erhöhen [18, 19]. Im Gegenteil dazu konnte für den Verzehr von Fisch keine krebsfördernde Wirkung beobachtet werden [19, 20]. Insbesondere für die hormonabhängigen Krebsarten, wie Prostata- und Brustkrebs variieren die kontinentalen Häufigkeitsverteilungen am stärksten (Abb. 1- 3). So ist die Inzidenz vom Brustkrebs bei den asiatischen Frauen verglichen mit den Frauen der westlichen Länder deutlich geringer [5, 21, 22]. Auch hier zeigen Studien einen ernährungsbedingten Zusammenhang. Es besteht die Vermutung, dass der hohe Anteil von sojahaltigen Nahrungsmitteln, das Brustkrebsrisiko reduzieren könnte [21-24]. Diese sojahaltigen Lebensmittel sind reich an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, wie Phytoöstrogene und Flavonoide [25]. Speziell die Phytoöstrogene mit ihrer östrogenen Wirkung werden wiederholt im Zusammenhang mit den Auftreten von Brustkrebs genannt [6, 11]. So leiden asiatische Frauen durch ihre phytoöstrogenreiche Ernährung weniger an menopausalen Beschwerden und scheiden mit dem Urin höhere Konzentrationen von Phytoöstrogenen aus, als Testpersonen aus den USA [26]. Auch Migrationsstudien bestätigen den ernährungsbedingten Einfluss auf das Krebsrisiko hormonell beeinflusster Krebsarten. So ist bei emigrierten Japanerinnen ein Anstieg der Inzidenz von Brustkrebs in der nächsten Generation festgestellt worden [27-29].

Alle diese Ergebnisse zeigen, dass gerade die Ernährungsgewohnheiten eine große Rolle im Zusammenhang mit der Entstehung von Brustkrebs haben. Die Ergebnisse dieser Studien sind neu und bieten einen lohneswerten Ansatzpunkt für weiterführende Untersuchungen. In der weiteren Forschung können diese Ergebnisse vertieft und neue Erkenntnisse bezüglich des Einflusses von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen auf das Wachstum von Brustkrebs gewonnen werden.

2. Ziel der Arbeit

Da Brustkrebs mit ca. 39 Neuerkrankungen pro 100.000 Frauen, die häufigste Krebsart bei Frauen weltweit ist, hat es gerade heute in der onkologischen und gynäkologischen Forschung einen wichtigen Schwerpunkt. Erkrankten in Deutschland 2003 noch etwa 58.640 Frauen an Brustkrebs, so waren es 2009 bereits 71.874 Frauen [30]. Diese starke Erkrankungszunahme zeigt deutlich, dass besonders in der Prävention von Brustkrebs, trotz etablierter Therapien, noch Forschungsbedarf besteht. Die Datenlage vieler epidemiologischer Studien deuten an, dass eine phytoöstrogenreiche Ernährung mit einem verminderten Brustkrebsrisiko verknüpft sein könnte [6-8, 10, 11, 31]. Doch leider sind diese Zusammenhänge, besonders im Hinblick auf Langzeituntersuchungen noch recht neu. Um so mehr besteht ein Bedarf für weiterführende Untersuchungen, welche die schon vorhandenen Daten aufgreifen oder auch neue Ansätze für eine Prävention gegen Krebs ermöglichen.

Diese Arbeit wurde im Rahmen eines interdisziplinären Projektes angefertigt, welches sich zum Ziel gesetzt hat, diese Zusammenhänge zwischen der Ernährung und der Prävention sowie der Therapie des Mammakarzinoms genauer zu betrachten. Hierbei sind vor allem einheimische Pflanzen in den Fokus gerückt, welche hinsichtlich ihrer molekularen und zellbiologischen Eigenschaften der hier vorhandenen Phytoöstrogene genauer untersucht werden sollten. So wurden der Gemeine Lein, der Holunder und Sanddorn, die Brennnessel und auch die Rotbuche ausgewählt, um ein weites Spektrum unterschiedlicher Pflanzen abstecken zu können. Hierbei sind jeweils unterschiedliche Materialen, wie z. B. Blätter, Blüten, Früchte und Wurzeln der unterschiedlichen Pflanzen untersucht worden, um hier eventuelle Rückschlüsse auf mögliche Quellen von besonderen Leitsubstanzen, die einen Einfluss auf das Wachstum des Mammakarzinoms haben, schließen zu können. Dazu wurden die mit Hilfe der Mikrowelle hergestellten ethanolischen Pflanzenextrakte genaustens mit Hilfe von massenspektrometrischen Untersuchungsmethoden analysiert, um die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe hinsichtlich ihrer Struktur bzw. strukturelle Unterschiede identifizieren und miteinander vergleichen zu können. Mit Hilfe der präparativen HPLC sind Mehrstoffgemische und mögliche Einzelsubstanzen isoliert worden, um diese ebenfalls wie die Vollextrakte ausführlichen zellbiologischen Untersuchungen unterziehen zu können.

Alle erhaltenen Ergebnisse wurden zum Schluss zusammengetragen und miteinander verglichen. Hieraus sollten dann hinsichtlich der Struktur-Wirkungsbeziehung von potentiellen Phytoöstrogenen, Informationen zur Eingrenzung interessanter Substanzklassen erhalten werden, die in der Prävention und Therapie der Krebsforschung einen weiteren bzw. neuen Ansatz in der Bekämpfung gegen Brustkrebs liefern könnten.

Im folgenden Fließschema können die einzelnen Etappen dieser Arbeit zusammenfassend betrachtet werden.

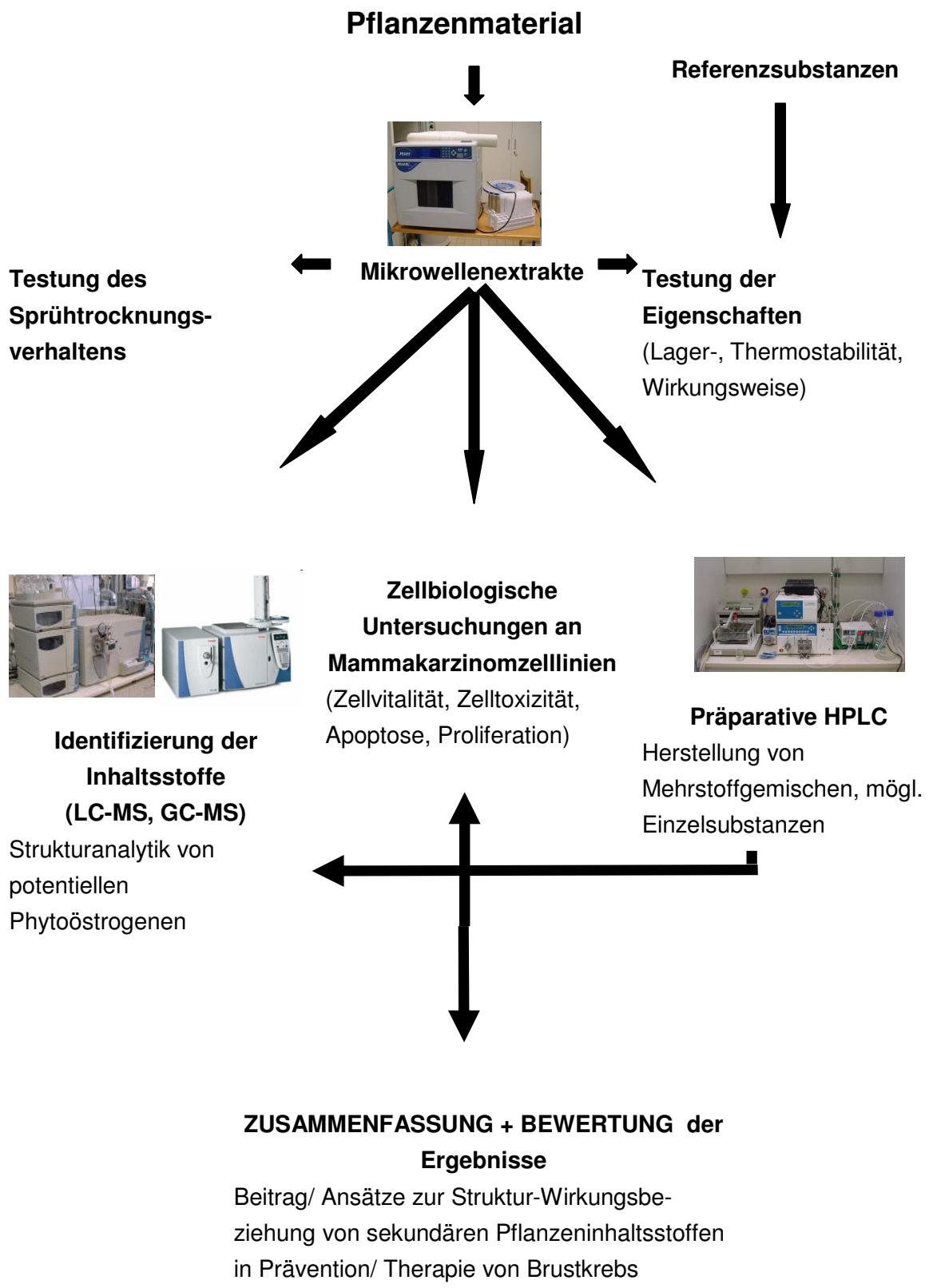


Abb. 2- 1: Fließschema der Arbeitsschwerpunkte

3. Theorie

3.1. Brustkrebs

Mit jährlich 74.500 Neuerkrankungen in Deutschland ist das *Mammakarzinom* die häufigste Krebsart bei Frauen [32]. Der Begriff *Mammakarzinom* leitet sich von der lateinischen Bezeichnung für die Brust (*Mamma*) ab und bezeichnet eine bösartige Tumorerkrankung (Karzinom) der weiblichen Brust. Man unterscheidet mehrere Typen von Brustkrebs, unterteilt sie jedoch in zwei große Arten [33]. Zum Einem das am häufigsten Vorkommende duktale Karzinom (Milchgangkrebs), welches sich vorwiegend aus den Zellen der Milchgänge entwickelt. Hierbei handelt es sich um eine Art Krebsvorstufe, bei der sich noch keine Metastasen gebildet haben [33]. Die zweitwichtigste Art ist das eher seltene lobuläre Karzinom (Läppchenkrebs), welches von den Drüsengläppchen im Brustgewebe ausgeht (Abb. 3- 1) [33]. Diese Art wird meistens als Indikator für ein erhöhtes Brustkrebsrisiko gewertet und kann in beiden Brüsten entstehen [33].

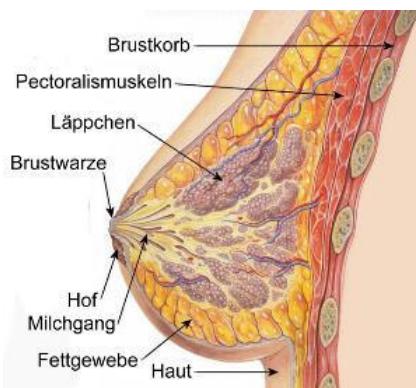


Abb. 3- 1: Aufbau der weiblich Brust [34]

Warum Brustkrebs entsteht ist noch weitestgehend ungewiss. Klar ist jedoch, dass einige Faktoren das Risiko an Brustkrebs zu erkranken erhöhen können. Dazu gehören nicht nur das allgemeine Altersrisiko eines Menschen, sondern auch genetische Faktoren, wie eine familiäre Vorbelastung [35]. Aber auch die Einflüsse von Hormonen, Lebensstil und schädliche Umweltfaktoren scheinen eine gewisse Rolle zu spielen [36]. So sind vor allem eine ungünstige Ernährung, Übergewicht und z.B. ein Schwangerschaftsabbruch als potenzielles Krebsrisiko in Diskussion [36]. Viele der brustkrebsfördernden Faktoren lassen sich jedoch kaum beeinflussen und sind auch nicht in jedem Lebensabschnitt gleich hoch. Aus diesem Grund wird die Nachfrage nach einer möglichen Prävention gegen Brustkrebs immer stärker. So kann ein gesundes Ernährungsverhalten und eine geringere Aufnahme von Hormonpräparaten in den Wechseljahren das Erkrankungsrisiko entscheidend beeinflussen [37-40].

3.1.1. Therapiemöglichkeiten

Obwohl die Erkrankung an Krebs schon seit der Antike bekannt und gefürchtet ist, gibt es bis heute noch kein zuverlässiges Heilmittel. Auch wenn der Brustkrebs die häufigste Krebserkrankung bei Frauen ist, ist sie nicht die gefährlichste, an der sie erkranken können [41]. Wird der Krebs rechtzeitig erkannt und behandelt, so sind die Erkrankungen meistens heilbar. Allerdings sind diese Heilungschancen oft mit langen Behandlungswegen und unangenehmen Nebenwirkungen verbunden [42].

Es existieren mehrere Therapieansätze um den Brustkrebs zu bekämpfen. Alle zusammen haben das Ziel, den Tumor und eventuell vorhandene Tochtergeschwülste zu entfernen bzw. zu vernichten. Wird dieses Ziel nicht erreicht, versucht man den Tumor so lange wie möglich „in Schach zu halten“ [43]. In der Medizin differenziert man deshalb zwischen konventionellen und unkonventionellen Behandlungsverfahren. Die konventionellen Methoden stützen sich auf drei Hauptansätze: die Operation, die Bestrahlung und die Behandlung mit Medikamenten, wie z.B. die Chemotherapie oder die Hormontherapie [44].

Der primäre Schritt bei der Diagnose Brustkrebs, ist immer noch die Operation, die oft mit der Strahlentherapie zusammengeht. Beide werden als örtliche Anwendungsmöglichkeit bezeichnet, da sie den Krebs dort angreifen wo er sich befindet bzw. befunden hatte. Die Operation allein kann zur Heilung führen, sofern ein Tumor vollständig entfernt werden konnte [45]. Bei der Strahlentherapie werden hochenergetische, ionisierende Strahlen gezielt auf den Tumorbereich gerichtet und dort gebündelt. Dieser Therapieansatz wird entweder vor einer Operation eingesetzt, um den Tumor zu verkleinern, damit der chirurgische Eingriff erst möglich wird oder als begleitende Maßnahme [46].

Bei der Behandlung mit Medikamenten, wie der Chemotherapie, verwendet man so genannte Zytostatika. Zu ihnen zählt man Wirkstoffe, die chemisch hergestellt werden aber auch aus der Natur stammen können. Diese bewirken, dass sich die Krebszellen nicht mehr teilen und somit absterben. Da diese Medikamente durch die direkte Injektion in die Vene verabreicht werden, verteilen sie sich durch das Blut im gesamten Körper und belasten ihn somit extrem [42].

Der Ansatz der Hormontherapie, kann in der Behandlung gegen Brustkrebs einen Vorteil bringen, da die meisten Tumore der weiblichen Brust östrogenabhängig sind [43]. Hormone werden auch als körpereigene Botenstoffe bezeichnet, die an Stoffwechselprozessen und teilweise auch an der Zellvermehrung beteiligt sind. Das Tumorgewebe der Brust kann „rezeptor-positive“ Tumorzellen besitzen, die Hormonen gegenüber empfindlich sind. Körpereigene Hormone führen dann dazu, dass der Tumor wächst und Metastasen bildet [41, 43]. Verändert man den Hormonhaushalt der Frau auf ganz bestimmte Weise, z.B. durch Verabreichung so genannter Antihormone, besteht die Möglichkeit die Entstehung von Metastasen zu verhindern bzw. ein Rückgang der Brustkrebserkrankung zu erreichen [42]. Allerdings führt der Fund von „rezeptor-negativen“ Tumorgeweben zum Ausschluss dieser Therapiemöglichkeit.

Die Wirkungsweisen der bisher beschriebenen Behandlungsmethoden sind durch langjährige und wissenschaftliche Studien nachgewiesen. Jedoch sucht man immer noch schonende Behandlungsverfahren, die eine komplette Heilung bzw. begleitende Unterstützung zur schulmedizinischen Krebstherapie oder sogar eine Prävention ermöglichen. Zu den gebräuchlichsten Behandlungsmethoden zählen die Phytotherapie (Krebsdiäten, Phytotherapeutika), Immunologische Therapie und die Homöopathie. Wobei Letzteres viele pflanzliche, anorganische oder tierische Präparate umfasst, die oft so stark verdünnt sind, dass aufgrund physikalischer Gesetze kein Molekühl an wirksamer Substanz nachweisbar ist [47, 48]. Die Medikamente, die in einer Immunologischen Therapie angewendet werden, sollen die körpereigene Abwehr stärken und gezielt auf spezielle Krebszellen und deren Vernichtung „abrichten“. Mit diesem Ziel beschäftigt sich die wissenschaftliche Krebsforschung schon seit Jahrzehnten und konnte zumindest belegen, dass die Zukunft in der spezifischen Immunstimulation liegt [49, 50]. Die Anwendung von Phytotherapien nimmt in der modernen Medizin mehr und mehr einen größeren Stellenwert ein. Sie ist mit einer der ältesten medizinischen Behandlungsmethoden und in vielen Kulturen auf der ganzen Welt vertreten. Viele Medikamente haben ihren Ursprung in der Natur. Die chemische Zusammensetzung einiger Pflanzen und ihrer Produkte ist zum heutigen Zeitpunkt sehr gut erforscht, sodass viele Stoffe schon künstlich hergestellt werden können. Teilweise finden diese schon als Zellgift (Zytostatika) in der schulmedizinischen Krebsbehandlung ihre Anwendung [43]. Jedoch sind zum jetzigen Zeitpunkt alle hier genannten unkonventionellen Behandlungsmethoden, im Vergleich zu den konventionellen Therapien, sehr umstritten, da sie nicht durch ausreichend langjährige und wissenschaftliche Studien belegt sind.

3.2. Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe

Eine Pflanze besteht aus vielen Inhaltsstoffen, die einen positiven Effekt auf unsere Gesundheit haben können. Man weiß heute, dass neben den primären Stoffen, wie z.B. den Vitaminen, auch die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe teilweise für die gesundheitsfördernde Wirkung verantwortlich sind. Diese natürlichen Inhaltsstoffe sind chemisch sehr unterschiedlich und kommen in den Pflanzen nur in sehr geringen Mengen vor. Aus diesem Grund waren sie für die Wissenschaft auch für lange Zeit ohne Bedeutung. Erst seit ca. 20 Jahren können epidemiologische Studien das gesundheitsfördernde Potenzial dieser Verbindungen belegen [51]. Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe dienen eigentlich nur der Pflanze selbst. Sie produziert diese hauptsächlich als Wachstumsregulatoren und Schutzstoffe gegen Umwelteinflüsse und Fraßfeinde. Aber auch als Aroma-, Duft- und Farbstoff kommen diese Verbindungen in der Pflanze zum Einsatz [52]. Anders als bei den primären Inhaltsstoffen sind die sekundären Pflanzenstoffe nicht lebensnotwendig, da sie weder im Energiestoffwechsel noch im Primärstoffwechsel der Pflanze produziert werden [53]. Aufgrund ihrer chemisch Struktur und ihrer unterschiedlichen Eigenschaften teilt man sie in neun verschiedene Gruppen ein: Carotinoide, Polyphenole, Phytosterine, Glycosinolate, Sulfide, Protease-

Inhibitoren, Terpene, Phytoöstrogene und Saponine [53, 54]. Zu den Polyphenolen zählt man vor allem die Stoffklasse der Flavonoide, die im Vergleich zu den anderen Gruppen, ein sehr breites Wirkungsspektrum besitzen (Tab. 3- 1). Aber auch die Phytoöstrogene können aus chemischer Sicht in die Gruppe der Polyphenole eingegliedert werden [55]. Die nachstehende Tabelle zeigt das Potenzial der physiologischen Wirkungsmöglichkeiten der Pflanzenstoffe, die bereits 1933 der Arzt Dr. med Max Birchner-Benner aufgrund seiner therapeutischen Erfolge erkannte: „Der vegetable Nahrungsschatz ist ein pharmakologisches Arsenal, das noch viel zu wenig erforscht ist.“ [56]. Obwohl die analytischen Untersuchungen der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe in den letzten Jahren weit voran geschritten sind, gibt es bis heute kaum Datenbanken mit grundlegenden Angaben.

Tab. 3- 1: Effekte von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen [51]

Sekundäre Pflanzenstoffe	A	B	C	D	E	F	G	H	I
Carotinoide	X		X		X				
Polyphenole	X	X	X	X	X	X	X		X
Phytosterine	X	X			X			X	
Glycosinolate	X	X						X	
Sulfide	X	X	X	X	X	X	X	X	
Protease-Inhibitoren	X			X					X
Terpene	X	X				X		X	
Phytoöstrogene		X			X				
Saponine	X							X	

A = antikanzerogen
 B = antimikrobiell
 C = antioxidativ
 D = antithrombotisch
 E = Immunmodulation
 F = entzündungshemmend
 G = Blutdruck beeinflussend
 H = Cholesterin senkend
 I = Blutglucose beeinflussend

3.2.1. Flavonoide

Die große Gruppe der Flavonoide ist, mit mehr als 6500 charakterisierten Verbindungen, die wohl am weitesten in der Nahrung verbreitete Untergruppe der Polyphenole [54]. Sie sind bis jetzt am besten von allen Klassen der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe untersucht [53]. Diese Verbindungen sind Bestandteil unserer Lebensmittel und kommen vor allem in vielen unterschiedlichen Obst und Gemüsesorten vor [57]. Hier findet man sie hauptsächlich in den Blüten, Blättern und äußeren Randschichten der Pflanzen [58]. Da die Flavonoide dort als Schutzstoff gegen schädliche Umwelteinflüsse (z.B. UV-Strahlung) und Krankheitserreger eingesetzt und von den Pflanzen synthetisiert werden. Eine weitere wichtige Funktion ist die Beteiligung am Aufbau der Zellwände und der Reparatur von Zellschäden [59].

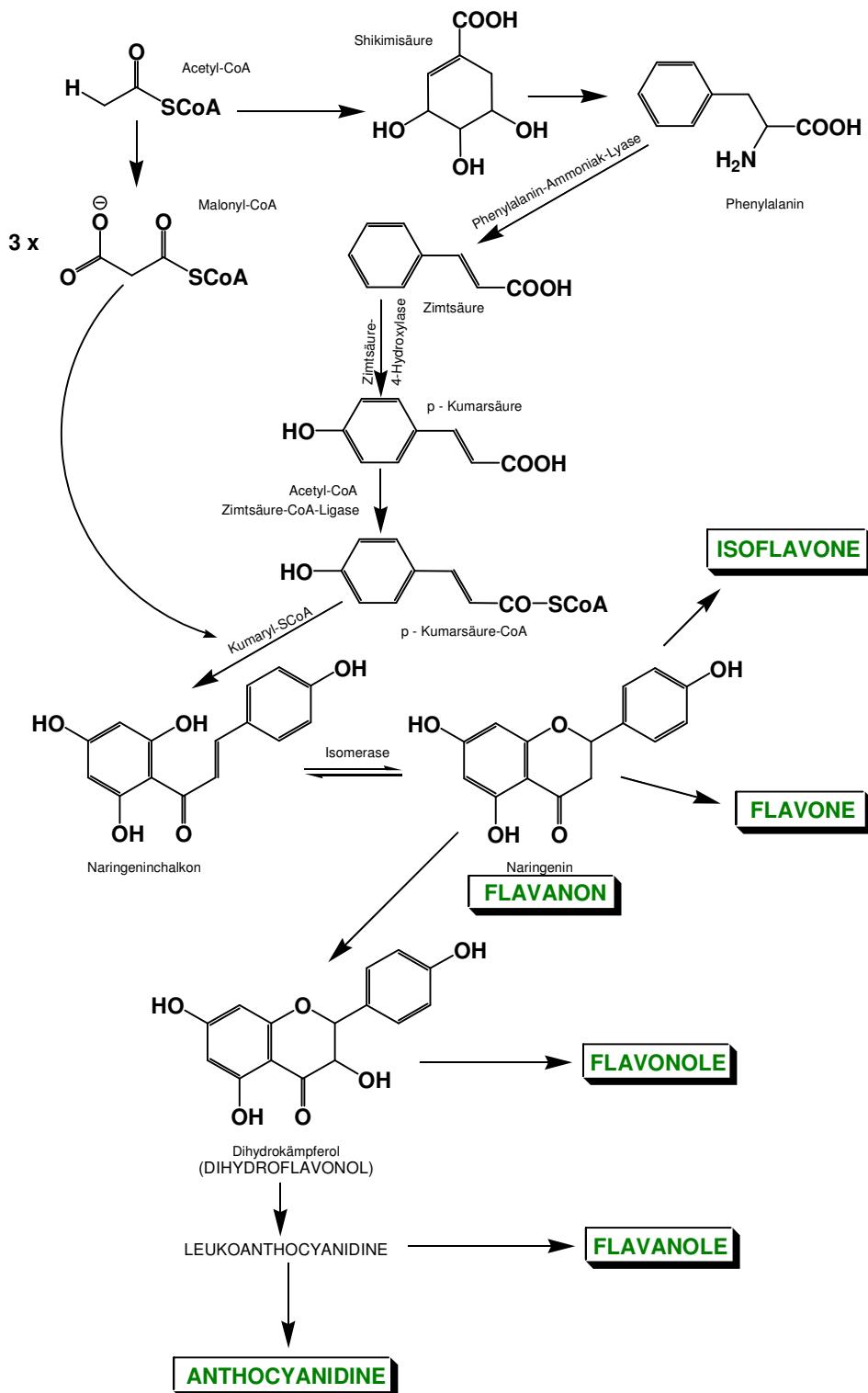


Abb. 3- 2: Biosynthesewege der Flavonoide [60-62]

Die Vorstufen für die Synthese der Flavonoide werden im Kohlenhydratstoffwechsel der Pflanze gebildet (Abb. 3- 2) [63]. Hier ist der erste Schritt die Synthesierung der Aminosäure Phenylalanin über den Shikimisäureweg. Die Aminosäure wird dann im nächsten Schritt durch verschiedene Lyasen in Zimtsäure umgewandelt und zu p-Kumarsäure hydroxyliert. Im letzten Schritt erfolgt die Bildung des C₆-C₃-C₆-Grundgerüstes (Naringinchalcon), von dem sich die Flavonoide ableiten (Abb. 3- 2) [60, 63]. Die strukturelle Basis aller Flavonoide ist der Flavangrundkörper. Er besteht aus zwei

aromatischen Ringen (A und B), die über einen Tetrahydropyran-Ring (C) miteinander verbunden sind (Abb. 3- 3) [58].

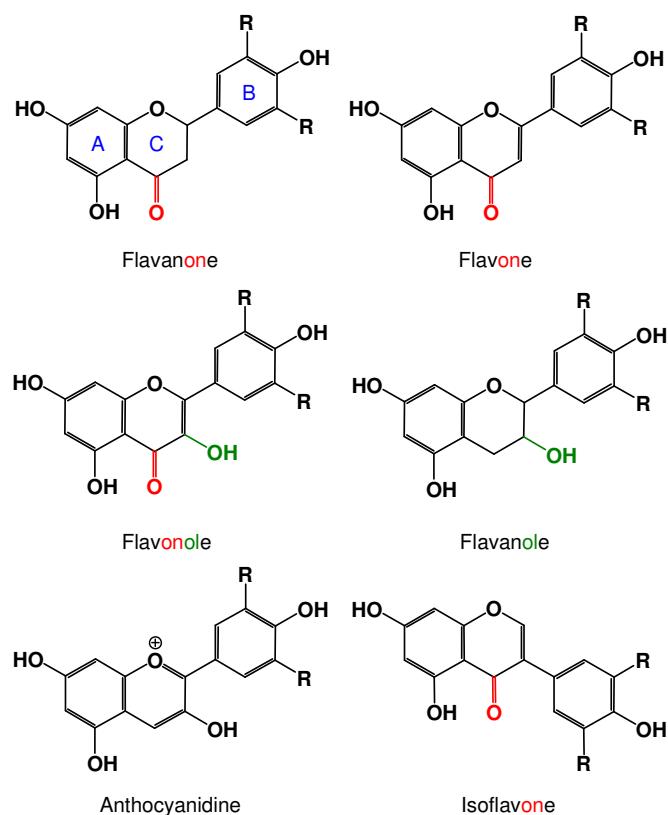


Abb. 3- 3: Die Hauptgruppen der Flavonoide [64]

Aufgrund ihrer unterschiedlichen Substitutions- und Oxidationsgrade am C-Ring unterteilt man die Flavonoide in sechs große Untergruppen: Flavanone, Flavone, Flavonole, Flavanone, Anthocyanidine und Isoflavone (Abb. 3- 3) [53]. Ihre strukturelle Vielfalt besitzen sie aber nicht nur durch die große Variabilität sowie die Methylierung und/ oder Hydroxylierungen der drei Ringe, sondern auch durch die Art, Anzahl und unterschiedliche Anordnung von verschiedenen Zuckerresten [65]. Die Glykosylierung erfolgt über die Hydroxylgruppen und bewirkt eine Erhöhung der Polarität dieser flavonoiden Verbindungen [66]. Somit wird auch ermöglicht, dass die Flavonoide in den Vakuolen der Pflanzen gespeichert werden können [66, 67].

Die vielen kleinen strukturellen Unterschiede haben einen entscheidenden Einfluss auf das biologische Verhalten der Flavonoide. Dadurch besitzen sie nicht nur antikanzerogene und antioxidative Eigenschaften, sondern auch immunomodulierende, entzündungshemmende und antithrombotische Effekte [53]. Die folgende Tabelle fasst die typischen Eigenschaften in Abhängigkeit vom strukturellen Aufbau der Verbindungen zusammen.

Tab. 3- 2: Die Verbindungsklassen der Flavonoide und ihre typischen Eigenschaften [58]

Verbindungen	Vertreter	Eigenschaften
Flavanole	Catechin Epicatechingallate	entzündungshemmende Wirkung
Flavanone	Naringenin Hesperidin	Bitterstoffe
Flavone	Apigenin Luteolin	hellgelbe Farbpigmente
Flavonole	Quercetin Kämpferol	hellgelbe Farbpigmente
Anthocyane	Malvidin Cyanidin	rote und blaue Farbpigmente antioxidative Wirkung
Isoflavonoide	Genistein Daidzein	Phytoöstrogene

Aufgrund dieser Eigenschaften beschäftigen sich viele epidemiologische Studien mit dem Zusammenhang der Ernährung und dem Auftreten von chronischen Krankheiten [68]. Hierbei konnten besonders für einige Krebs- und Herz-Kreislauf-Erkrankungen eine Assoziation mit einer erhöhten Aufnahme an Flavonoiden nachgewiesen werden. Der größte Zusammenhang konnte beim Lungenkrebs festgestellt werden [69]. Hier werden hohe Flavonoidaufnahmen mit einer geringen Erkrankungsrate assoziiert, die zu einer Risikosenkung von ca. 25 % führten [70]. Aber auch das Brustkrebs-, Dickdarm- und Herz-Kreislauf-Erkrankungsrisiko konnte beeinflusst werden. So wurde für den Dickdarmkrebs eine Risikosenkung von ca. 20 % erreicht [71]. Das Erkrankungsrisiko für Brustkrebs und Herz-Kreislauf konnte jedoch nur um ca. 13 % verringert werden [8, 10, 72, 73].

3.2.2. Phytoöstrogene

Auch die Phytoöstrogene gehören aus chemischer Sicht zur Gruppe der Polyphenole. Unter diesem Begriff fasst man vor allem auf der Phenolstruktur basierende Substanzen zusammen [53]. Somit ordnet man den Phytoöstrogenen drei verschiedene Strukturklassen zu: die Isoflavone, die Lignane und Coumostane (Abb. 3- 4) [55]. Wobei die Isoflavone und Lignane als Hauptgruppen der Phytoöstrogene bezeichnet werden und die Coumostane hingegen eher eine untergeordnete Rolle spielen [55]. Strukturell unterscheiden sich alle drei Klassen sehr voneinander (Abb. 3- 4). Der allgemeine Aufbau der Isoflavone, auf den bereits in Kapitel 3.2.1 eingegangen wurde, unterscheidet sich nur durch die unterschiedliche Verknüpfung des Phenylringes am Chromon von den anderen Flavonoiden [55]. Die Lignane bestehen aus zwei Phenylpropaneinheiten, die durch eine 8,8'-Verknüpfung miteinander verbunden sind (Abb. 3- 4). Ihre strukturelle Vielfalt erhalten sie durch Brückenbindungen über Sauerstoffatome oder durch verschiedene Anordnungen und Verknüpfungen der C₃-Seitenketten [74].

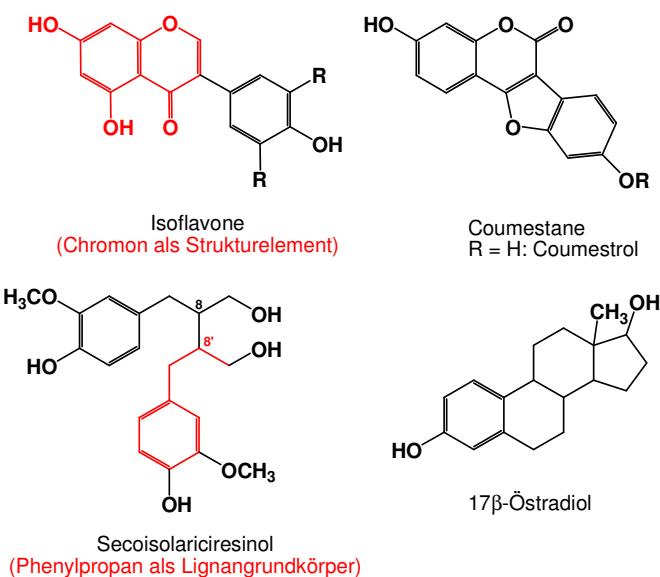


Abb. 3- 4: Strukturformeln der Phytoöstrogene und des Sexualhormons 17β-Östradiol [55]

Die Coumestane besitzen eine strukturelle Ähnlichkeit zu den Isoflavonen [75]. Sie sind in sehr wenigen Pflanzen vertreten und einer ihrer wichtigsten Vertreter ist das Coumestrol (Abb. 3- 4). So hat man sie z.B. im Klee, Broccoli und Sojasprossen finden können [55]. Aufgrund ihres geringen Vorkommens spielen sie aber in der menschlichen Ernährung eher eine untergeordnete Rolle [55]. Obwohl alle drei Substanzklassen strukturell kaum bzw. keinerlei Ähnlichkeit besitzen, fasst man sie trotzdem zu einer Gruppe zusammen (Abb. 3- 4). Der Grund ist ihre östrogene Aktivität, die alle drei Gruppen als biologische Eigenschaft gemeinsam haben. Phytoöstrogene besitzen eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem weiblichen Sexualhormon 17β-Östradiol (Abb. 3- 4) [76]. Diese Ähnlichkeit bewirkt, dass sie sich an den Östrogenrezeptor (ER) binden können und dadurch die physiologische Wirkung des Steroidhormons blockieren bzw. nachahmen [77]. Somit erzielen sie in Abhängigkeit des schon vorhandenen Östrogenspiegels eine östrogene oder auch antiöstrogene Wirkung [76]. Allerdings ist ihre östrogene Aktivität sehr gering. Vergleicht man diese mit der des 17β-Östradiols, so besitzen sie nur eine um den Faktor 1000 bis 10000 geringer Wirkung [55]. Jedoch liegen die Phytoöstrogene in einer höheren Konzentration im Körper vor. Diese kann bis zu 100 oder 10000fach größer sein als die der endogenen Östrogene [55]. Das Coumestrol (Abb. 3- 4), ein Coumestan, ist bis heute das mit der stärksten östrogene Wirkung bekannteste Phytoöstrogen [6, 78].

Die ersten Phytoöstrogene entdeckte man in den 50er Jahren. In Australien hatten viele Schäfer Probleme mit der Zucht ihrer Scharfherden. Erst Jahre später konnten Wissenschaftler eine Lösung für die Unfruchtbarkeit der Tiere finden. Die Ursache lag im Futter, da die Scharfe überwiegen auf Kleewiesen weideten, nahmen sie mit dem Klee eine große Menge von Genistein und Formononetin auf. Zwei Phytoöstrogene die auf Grund ihrer biologischen Eigenschaft für dieses Phänomen verantwortlich gemacht werden konnten [79]. Diese empfängnisverhütende östrogene Wirkung hat einen negativen Effekt auf die Frassfeinde der Pflanzen. Allerdings ist die Pflanze vor dem

Verzehr nicht geschützt, weswegen sie die Phytoöstrogene eher als Farb-, Gerb- und Bitterstoffe einsetzt [80].

Der Klee ist nicht die einzige Quelle der Phytoöstrogene. Weitere Quellen sind Hülsenfrüchte, Pflanzensamen und Getreide. Man findet aber auch geringe Mengen in einigen Obst- und Gemüsesorten sowie Kräutern. In Tabelle 3-3 sind die Isoflavon- und Lignangehalte einiger Lebensmittel angegeben.

Tab. 3- 3: Phytoöstrogengehalt einiger Lebensmittel [81, 82]

Lebensmittel	Isoflavone [µg/ mg]		Lignane [µg/ kg]	
	Daizein	Genistein	Secoisolariciresinol	Matairesinol
Apfel [#]	124	i. Sp.	i. Sp.	n.n.
Erdbeere*	4.5	46.1	15000	780
Leinsamen [#]	n.U.	n.U.	3699000	108700
Sojabohne [#]	105000- 850000	286-1025	130-27330	i. Sp.
Sonnenblumenkern [#]	80	139	6100	n.n.

* bezogen auf das Frischgewicht

bezogen auf das Trockengewicht

n.U. nicht Untersucht

i. Sp. in Spuren

n.n. nicht nachgewiesen

4. Experimenteller Teil

4.1. Pflanzenmaterialen

Dass die Vielfalt der sekundären Inhaltsstoffe von Pflanzen ein gewaltiges Reservoir für neue medizinisch Ansätze liefert, ist bekannt [83]. Für die Anwendung in der Prävention und Therapie von Brustkrebs sind diese jedoch noch nicht alltäglich. Grund hierfür sind wenige wissenschaftlich belegte Erkenntnisse bzw. epidemiologische Studien, welche eine eindeutige Wirkung der Pflanze bzw. des isolierten Pflanzeninhaltsstoffes beschreiben. Aus diesem Grund ist für diese Arbeit ein umfassendes Pflanzenscreening mit mehreren einheimischen Pflanzenarten gemacht worden. Hierbei wurden hauptsächlich Pflanzen der Ordnung *Rosales*, *Malpighiales* und *Dipsacales* gewählt.

Tab. 4- 1: Übersicht der untersuchten Pflanzenarten

Art [62]	Familie [62]	Ordnung [62]	untersuchte Pflanzenteile
Lein (<i>Linum usitatissimum</i>)	Leingewächse (<i>Linaceae</i>)	Malpighienartige (<i>Malpighiales</i>)	Wurzel
Sanddorn (<i>Hippophae rhamnoides</i>)	Ölweidengewächse (<i>Elaeagnaceae</i>)	Rosenartig (<i>Rosales</i>)	Frucht
Holunder (<i>Sambucus nigra</i>)	Moschuskrautgewächse (<i>Adoxaceae</i>)	Kardenartige (<i>Dipsacales</i>)	Blüten, Frucht
Brennnesseln (<i>Urtica dioica</i>)	Brennnesselgewächse (<i>Urticaceae</i>)	Rosenartig (<i>Rosales</i>)	Blätter
Rotbuche (<i>Fagus sylvatica</i>)	Buchengewächse (<i>Fagaceae</i>)	Buchenartig (<i>Fagales</i>)	Rinde

Die Tabelle 4-1 zeigt alle im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Pflanzenarten. Bei den Untersuchungen sind unterschiedliche Pflanzenteile, wie Wurzel, Blüten, Blätter oder Früchte verwendet worden, um auch lokal resultierende Unterschiede des Wirkungsspektrums der Pflanze zu betrachten.

Ebenfalls ist das jeweilige Pflanzenmaterial zu unterschiedlichen Jahreszeiten an den entsprechenden „natürlichen“ Standorten in Rostock (Mecklenburg-Vorpommern, Deutschland) und Umgebung gesammelt bzw. durch die Landesforschungsanstalt Mecklenburg-Vorpommern (Gützkow, Deutschland) zur Verfügung gestellt worden. Im Fall der Leinpflanze wurden Pflanzen durch Projektpartner im Institut für Biologie der Universität Rostock, über einen gewissen Zeitraum selbst angepflanzt und geerntet. Des Weiteren wurde zum Vergleich auch Saft der Sanddornbeeren bei hier in Norddeutschland angesiedelten Herstellern käuflich erworben. So wurde z.B. der Sanddornbeerensaft (100 % Direktsaft) von der Firma Storchenest GmbH (Ludwigslust, Deutschland) untersucht.

Im dem folgenden Abschnitt sollen kurz typische Eigenschaften und Herkunftsorte für die untersuchten Pflanzenarten vorgestellt werden.

4.1.1. Gemeiner Lein (*Linum usitatissimum*)

Der Gemeine Lein ist eine alte Kulturpflanze, die schon seit der Antike angebaut wird [62, 84]. Ihren Ursprung hat sie im Mittelmeerraum, Vorderasien und Nordafrika. Erst mit der ältesten bäuerlichen Kultur, der Bandkeramischen Kultur, wurde der Lein auch in Mitteleuropa verbreitet [85].



Abb. 4- 1: Blüten und Samen der Leinpflanze [86, 87]

Heute wird er vorwiegend in den Gebieten mit gemäßigtem Klima angebaut und wird auch als Flachs oder Saat-Lein bezeichnet. Der Lein ist eine einjährige Pflanze, die Wuchshöhen von bis zu 1,5 m erreichen kann. Jede Pflanze besitzt eine kurze, spindelförmige Pfahlwurzel mit feinen Seitenwurzeln. Im Juni bis August blüht die Pflanze und bildet dabei große weiß-blaue Blüten. Aus diesen Blüten entwickeln sich dann im Spätsommer hellbraune Kapseln, die bis zu zehn Samen enthalten können [88]. Aufgrund seiner Anwendung wird der Lein in zwei verschiedene Arten unterteilt: Faserlein und Öllein. Der Faserlein wird hauptsächlich zur Gewinnung von Lein-, Dämm- oder Naturfaserverbundwerkstoffen verwendet. Den Öllein hingegen nutzt man zur Gewinnung von Leinöl, welches aus den reifen Leinsamen hergestellt wird [62]. Heutzutage sind vor allem die Leinsamen sehr beliebt. Sie sind reich an Fetten, Proteinen, Ballaststoffen, Schleimstoffen und Vitaminen. Daher werden sie oft zur Behandlung von Verstopfungen oder Entzündungen angewendet. Aber auch als diätetisches Nahrungsergänzungsmittel haben sie ihre Wirkung. So wird den Inhaltsstoffen der Leinsamen eine Schutzwirkung gegen Darm- und Brustkrebs zugeschrieben [89].

Da die Leinsamen aufgrund ihrer viel versprechenden antikanzerogenen Wirkung sehr gut erforscht wurden, sind für diese Arbeit die Wurzeln der Faserlein- und Öllein-Pflanze untersucht worden.

4.1.2. Schwarzer Holunder (*Sambucus nigra*)

Der Schwarze Holunder, der auch unter dem Namen Holunderbusch, Holler oder auch als Flieder (in Norddeutschland) bekannt ist, gehört in Europa zu den häufigsten Straucharten. Diese Pflanze ist aber ebenfalls in Nordafrika sowie West- und Mittelasien beheimatet [90]. Sie kann bis zu sieben Meter hoch wachsen und ist oft sehr buschig und breit. Zwischen Mai und Juli stehen die Holundersträucher in voller Blüte. Sie bilden dabei viele kleine Einzelblüten, die in großen weiß-gelblichen Dolden am Strauch hängen (Abb. 4- 2).



Abb. 4- 2: Photographien von Holunderpflanzen. (v. l. nach r.: Blütenstaude einer Holunderpflanze; Blühender Holunderstrauch in Damm [Mecklenb.-Vorpommern] 2010; Reife Beeren des Schwarzen Holunders)

Der Duft den sie dabei verströmen ist fruchtig, frisch und typisch für den Holunder. Im August bis September reifen die Blüten zu schwarzen, saftigen Beeren heran (Abb. 4- 2). Diese sind aber erst nach Verarbeitung, z.B. Abkochen, zum Verzehr geeignet. Über die in den Früchten befindlichen Samen sind viele Vogelarten durch den Verzehr der Beeren an der Verbreitung der Pflanze beteiligt [91].

Holunder findet vor allem in der Pflanzenheilkunde und in der Küche vielfache Verwendung. So werden die Blüten oft bei Erkältungskrankheiten und Fieber zu Tee verarbeitet. Die Beeren besitzen einen hohen Anteil an Vitamin C und werden oft zur Stärkung des Immunsystems als Saft verabreicht [92].

Auf Grund der beschriebenen Wirkungsweise wurden Holunderblüten und –beeren für diese Arbeit inhaltstoffsichtlich untersucht und auf eine mögliche Antikrebswirkung an Mammakarzinomzellen getestet. Dazu sind Blüten und Beeren des schwarzen Holunders der Sorte ‚Haschberg‘ von der Landesforschungsanstalt Mecklenburg-Vorpommern (Gützow, Deutschland) zur Verfügung gestellt worden. Aber auch in Rostock und Umgebung gesammelte Holunderbeeren wurden untersucht.

4.1.3. Sanddorn (*Hippophae rhamnoides*)



Abb. 4- 3: Sanddornstrauch mit reifen Früchten [93]

Der Sanddorn ist in vielen Teilen von Europa und Asien zu finden. In Deutschland ist er vor allem an den Küstengebieten von Nord- und Ostsee, aber auch in den Alpenregionen beheimatet. Seine strauchförmige Wuchsform erreicht Höhen von ein bis sechs Metern [90]. Von August bis Anfang Dezember bilden sich dann, die für den Sanddorn typischen orangeroten bis gelben Beeren. Aufgrund ihrer Inhaltsstoffe werden diese vorwiegend in der Kosmetik- und Lebensmittelindustrie verarbeitet. Den Titel „Zitrone des Nordens“

erhielten die Beeren auf Grund ihres hohen Vitamin C-Gehalts. Dieser ist um das drei- bis siebenfache größer als der Gehalt einer Zitrone oder Orange [94].

Das Sanddorn „Heilende Kräfte“ besitzt, weiß man in Ostasien seit ca. 2000 Jahren. In Europa hingegen wird er erst im Mittelalter in den Kräuterbüchern erwähnt. Besonders die Beeren wurden durch ihren hohen Vitamin C-Gehalt gegen Seekrankheit und Fieber empfohlen [89]. Aber auch das gewonnene Öl aus den Beeren wurde zur Behandlung von Hautreizungen, Geschwüren und Magen-Darm-Problemen eingesetzt. Heute sind in der Naturheilkunde überwiegend die entzündungshemmenden und antibakteriellen Wirkungen des Sanddorns von Bedeutung, die den Einsatz als Heilmittel rechtfertigen [89].

Die Inhaltsstoffanalytik sowie die Untersuchung der Wirkungsweise der Sanddornbeerextrakte auf Mammarkarzinomzellen waren ebenfalls Bestandteil der vorliegenden Arbeit. Hierfür wurden an verschiedenen Orten in und um Rostock (Mecklenburg-Vorpommern, Deutschland) reife Beeren gesammelt und mit dem Sanddornbeerensaft (100 % Direktsaft) der Firma Storchenest GmbH (Ludwigslust, Deutschland) verglichen.

4.1.4. Brennnessel (*Urticae dioica*)



Abb. 4- 4: Die Brennnessel [95]

Die Brennnessel ist fast überall auf der Welt verbreitet. Gerade in Deutschland ist sie in vielen Gärten als Unkrautpflanze bekannt [92]. In der Landwirtschaft wird sie aber auch auf Grund ihrer Vitamine als Nutzpflanze dem Tierfutter beigemischt. Die Brennnessel ist eine mehrjährige Pflanze, die bis zu 1,5 Meter hoch wachsen kann. Ihr Name bezieht sich auf die Reaktion bzw. Reizung der Haut, die die Pflanze bei Berührung auslöst [90]. Dies wird verursacht durch die Brennhaare, die sich auf allen grünen Pflanzenteilen der Brennnessel befinden. Durch Kontakt mit der Haut brechen diese und injizieren unter hohem Druck ein Pflanzensaftgemisch aus ameisensäure- und aminhaltigen Komponenten. Der Pflanzensaft verursacht einen brennenden Schmerz und die Entzündung der Haut, die zur Quaddelbildung führen kann. Die Blätter der Brennnessel wachsen in spitzer-eiförmiger Form und sind graugrün [90]. Ihnen wird eine harntreibende, schmerzstillende und entzündungshemmende Wirkung zugeschrieben, was die eigentliche Nutzpflanze auch zu einem bekannten Heilmittel macht. So kann man sie heute als Tee zur Behandlung von Nieren-Blasen-Entzündungen oder zum Ausschwemmen von Giftstoffen, wie bei Rheuma und Gicht, trinken [89].

Die besondere Wirkung wird den phenolischen Inhaltsstoffen der Pflanze zugeschrieben, weswegen sie auch für diese Arbeit in Betracht gezogen wurde. Dafür sind die Blätter der Brennnesselpflanze gesammelt worden und hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffe und der Wirkung auf die Brustkrebszellen untersucht worden.

4.1.5. Rotbuche (*Fagus sylvatica*)



Abb. 4- 5: Buchenmischwald in Dänemark und Querschnitt eines Rot-Buchenstamms mit ausgeprägtem Rotkern [96, 97]

Die Rotbuche ist in ganz Mitteleuropa verbreitet. Allein in Deutschland gehört sie mit einem Anteil von 14 % zu den häufigsten Laubbäumen [98]. Die Buche gehört zu den sommergrünen Bäumen und kann Wuchshöhen von 30 bis 45 Metern erreichen. Auf Grund ihrer boden- und bestandspfleglichen Eigenschaften wird die Rotbuche auch als „Mutter des Waldes“ bezeichnet. Typisch für diese Baumart ist eine dünne, glatte und silbergraue, unverborkte Rinde [98]. Ihren Namenteil „Rot“ hat sie durch die leicht rötliche Färbung des Holzes erhalten. Alle fünf bis acht Jahre produziert die Buche Bucheckern, dreikantige kleine Nüsse, die Samen enthalten. Im 19. Jahrhundert wurde aus diesen Nüsschen, Öl zum Kochen und als Lampenöl hergestellt. Auch als Nahrungsmittel fanden sie damals Verwendung. Doch sind die Nüsse aufgrund ihrer enthaltenden Alkaloide und dem Trimethylamin leicht giftig. Heute wird die Buche hauptsächlich als Nutz- und Industrieholz verwendet [99]. Auch in der Naturheilkunde ist die Buche nicht ohne Bedeutung, so gelten ihre Blätter als entzündungshemmend und wurden oft als Wundaupflagen verwendet oder bei Zahnfleischproblemen zerkaut [100]. Die Buchenrinde ist als fiebersenkendes Mittel bekannt oder wird zur Buchenrindenkohle verarbeitet. Diese kann dann als Gegenmittel gegen Schierling und Strychnin eingesetzt werden.

Für das eigentliche Projekt war die Bucherinde zunächst nicht in betracht gezogen wurden. Erst durch spontane Testung der Rinde auf ihre Wirkung auf die Mammarkarzinomzellen, ist die Buchenrinde für diese Arbeit in den Fokus gerückt. Das hierfür verwendet Buchenmaterial stammte vom Sägewerk Drewes & Suderow GmbH in Malchow (Mecklenburg-Vorpommern, Deutschland).

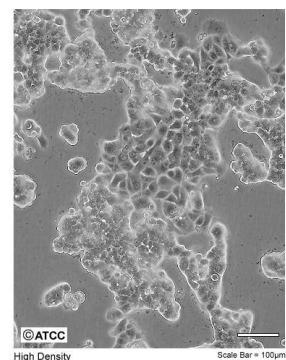
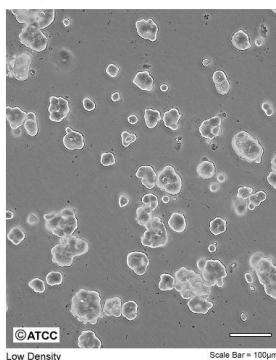
4.2. Zelllinien

Die kanzerogenen und nicht-kanzerogenen Zelllinien, die für die Untersuchung der möglichen antikazerogene Wirkung der Pflanzenextrakte verwendet wurden, sind im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik im Klinikum Südstadt und im Zentrum für Medizinische Forschung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock kultiviert worden. Hierfür sind einheitliche Methoden geschaffen worden, die vor allem Zellkulturmedium, Serum, Antibiotika und die Behandlungsdauer betreffen. In den Untersuchungen sind hauptsächlich Zelllinien des Brustgewebes verwendet worden, die sich in der Art des Estrogenrezeptors (ER) unterscheiden. In Tabelle 4-2 sind die zum Einsatz gekommenen Zelllinien aufgelistet.

Tab. 4- 2: Verwendete Zelllinien (Estrogenrezeptor = ER, ATCC = American Type Culture Collection

Zelllinie	Art	Eigenschaft	Firma	ATCC®-Nummer
MCF-7	tumorige Brustkrebszelllinie (Adenokarzinom)	positiver α , β ER	ATCC	HTB-22™ [101]
T-47D	tumorige Brustkrebszelllinie (duktales Karzinom)	positiver α , β ER	ATCC	HTB-133™ [102]
BT-20	tumorige Brustkrebszelllinie (Karzinom)	negativer α , β ER	ATCC	HTB-19™ [103]

ATCC Number: HTB-22
Designation: MCF-7



ATCC Number: HTB-133
Designation: T-47D

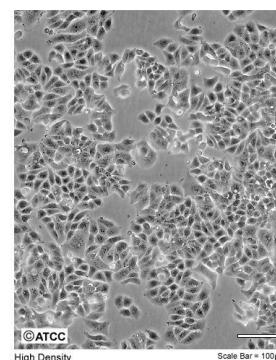
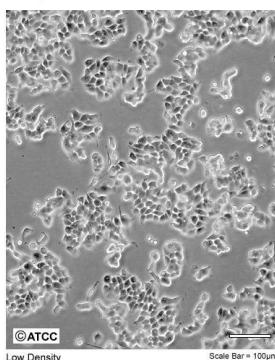


Abb. 4- 6: tumorige Brustkrebszelllinie MCF-7

Abb. 4- 7: tumorige Brustkrebszelllinie T-47D

ATCC Number: HTB-19™
Designation: BT-20

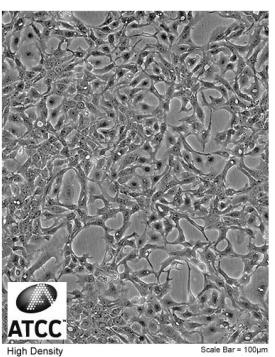
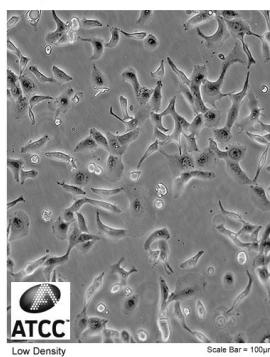


Abb. 4- 8: tumorige Brustkrebszelllinie BT-20

4.3. Methoden

4.3.1. Probenvorbereitung

Die gesammelten und bereitgestellten Pflanzenproben wurden sowohl getrocknet als auch frisch verarbeitet. Dabei sind die Leinwurzelproben nach der Ernte auf einem Sieb kurz mit Wasser gewaschen worden, um sie grob von der Erde zu befreien. Bis zu weiteren Verarbeitung wurden die Wurzeln dann im Institut für Biowissenschaften, der Universität Rostock und im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik im Klinikum Südstadt Rostock bei -70 °C gelagert.

Die Holunderblütenproben, die von der Landesforschungsanstalt Mecklenburg-Vorpommern (Gültow, Deutschland) zur Verfügung gestellt worden sind, sind Anfang Juni 2009 am Nachmittag mit offenen Blüten gepflückt worden. Die Holunderbeeren sind mit der Hand, mitte September 2009, gesammelt worden. Beide Pflanzenmaterialien hat man nach ihrer Ernte in Gefrierbeuteln bei ca. -27 °C bis zur Untersuchung gelagert. Das selbst gesammelte Material der Holunderblüten, -beeren, Brennesselblätter und Sanddornbeeren ist nach Entfernung von Stängeln und kleineren Ästen teilweise frisch zur Analyse verwendet worden bzw. ebenfalls in Gefrierbeuteln bei ca. -27 °C gelagert worden.

4.3.1.1. Zerkleinerung

Das Leinwurzelmaterial und die Rinde der Buche musste für die Extraktherstellung zerkleinert werden. Durch die Zerkleinerung werden zum einen die Oberfläche und die damit verbundene Angriffsfläche für das Extraktionsmittel größer. Zum anderen verletzt man durch das Zerkleinern die Pflanzenzellen, deren Inhalt so besser durch das Lösungsmittel direkt aufgenommen werden kann.

Bevor das Pflanzenmaterial zerkleinert wurde, sind die Wurzeln auf mehreren Petrischalen großzügig verteilt worden und im Trockenschrank bei 70-100 °C für eine Stunde getrocknet worden.

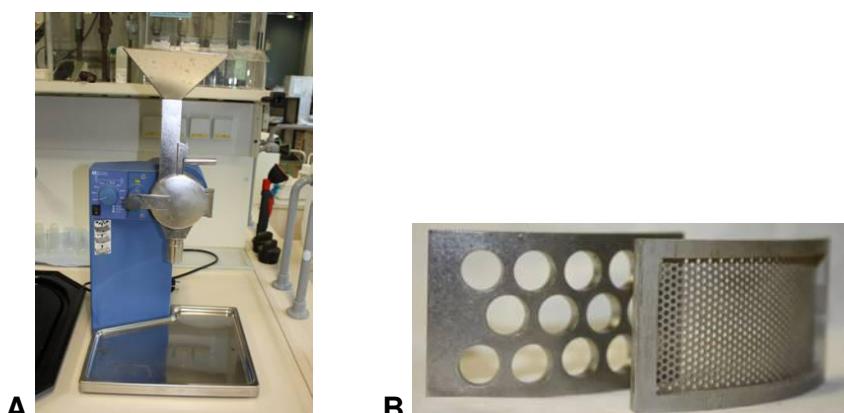


Abb. 4- 9: Mikrofeinmühle IKA MF 10 (A) mit den Schneidschablonen (B)

Im Anschluss erfolgte die Zerkleinerung mit Hilfe einer elektrischen Mikrofeinmühle (IKA MF 10) in kleinere Bruchstücke mit einer maximalen Korngrößenbegrenzung von 1,0 mm (Abb. 4- 9).

Hierfür ist zuerst mit einer größeren Schneidschablone, die eine Korngrößenbegrenzung von bis zu 8,0 mm hat, das Wurzelmaterial grob zerkleinert worden. Im Anschluss ist dann mit der feineren Schneidschablone ein einheitliches Probenmaterial mit einer Korngröße von bis zu 1,0 mm hergestellt worden.



Abb. 4- 10: zerkleinertes Wurzelmaterial (Leinwurzel)

Das Rindenmaterial der Rotbuche (Abb. 4- 11) ist ebenfalls mit einer Mikroschneidmühle in kleinen Hackschnitzeln mit einem Zerkleinerungsgrad von 0,25 – 1,0 mm verarbeitet worden. Dies wurde von der Firma Sägewerk Drewes & Suderow GmbH in Malchow (Mecklenburg-Vorpommern, Deutschland) geliefert, so dass das Material schon fertig zur Verarbeitung vorlag.

Alle weiteren ‚weichen‘ Pflanzenmaterialen, wie Blüten, Blätter und Beeren sind für die Extraktion im Originalzustand verarbeitet worden bzw. mit Hilfe eines Skalpells grob zerkleinert worden.



Abb. 4- 11: zerkleinertes Rindenmaterial der Rotbuche

4.3.1.2. Extraktion

Bei der Herstellung von pflanzlichen Extrakten gibt es zahlreiche Möglichkeiten und Methoden die Inhaltsstoffe aus dem getrockneten oder frischen Material herauszulösen. Zu den konventionellen Methoden gehören vor allem die Extraktion durch einfaches Kochen unter Rückfluss, Mazeration oder auch Soxhlet. Diese Schritte laufen immer in zwei Phasen ab. In der ersten Phase werden die Inhaltsstoffe aus den beschädigten Zellen herausgelöst, die durch vorherige Probenvorbereitung entstanden sind bzw. sein

können. Dieser Vorgang geht umso schneller je kleiner die Pflanzenmaterialien sind, weil umso mehr beschädigte Zellen vorliegen können. Im zweiten Schritt werden die Bestandteile aus den unbeschädigten Zellen herausgelöst. Dazu muss das Extraktionsmittel in die Zellen eindringen können, damit die Zellwände und Membranen aufquellen. Diese Phase kann durch Temperatur, Zeit und Lösungsmittel beeinflusst werden. Wichtig für den Extraktionsprozess an sich ist vor allem, dass die potentiellen Wirkstoffe (Inhaltsstoffe) möglichst unverändert und in ausreichender Menge extrahiert werden. Für die Herstellung der Pflanzenextrakte dieser Arbeit wurde die Extraktionsmethode durch Mikrowellen verwendet. Diese Art der Extraktion ist eine relative neue Methode, welche als Alternative zu den konventionellen Methoden immer mehr Aufmerksamkeit gewinnt [104, 105]. Das Prinzip der Mikrowellen-basierten Extraktion besteht aus der kapazitiven Erwärmung des Pflanzenmaterials bzw. des Lösungsmittels, welches durch die Mikrowellen von innen heraus erwärmt wird. Dieses geschieht durch die direkte Wechselwirkung der Mikrowellen mit dem Zielmolekül. Diese regen den Rotationszustand der dipolaren Moleküle an, weswegen diese sich dann im oszillierenden Feld entsprechend ausrichten. Hierbei entsteht eine Art molekulare Reibung, die dann in Wärme umgesetzt wird und somit den Extrakt erwärmt [106]. Diese Mikrowellenextraktion hat gegenüber vielen konventionellen Methoden einige Vorteile. Nicht nur der geringe Verbrauch von Lösungsmitteln, sondern auch die Standardisierung der Aufschlussbedingungen dieser Methode machen die Mikrowellenextraktion gegenüber anderen Extraktionsmethoden effizienter und reproduzierbar [107-109]. Dies macht die Extraktion durch Mikrowellen zu einer der einfachsten und wirtschaftlichsten Methoden im Hinblick auf den geringen Energieverbrauch und der erheblichen Minimierung der Extraktionszeiten [110]. Somit ist auch ein hoher Probendurchsatz in kürzester Zeit realisierbar.

Für diese Arbeit wurde die Extraktion mit einer Labormikrowelle des Typs Mars Xpress der Firma CEM durchgeführt (Abb. 4- 12).



Abb. 4- 12: Mars Xpress von CEM

Dazu wurden ca. drei bis zehn Gramm zerkleinertes Pflanzenmaterial in Teflongefäß überführt und in etwa 20 bis 30 mL absoluten Ethanol suspendiert. Anschließend sind die Materialien dem Microwave Extraction System mit einer Zeit-Temperatur-Rampe (Tab. 4- 3) unterzogen worden. Es erfolgte ein gleichmäßiges Erhitzen der Proben für

zehn Minuten bis zu einem Temperaturmaximum von 60 °C und bei einer Leistung von 800 W. Im Anschluss ist die Probe für zehn Minuten bei dem Temperatur-Optimum von 60°C gehalten worden, indem die Leistung prozentual vom Gerät automatisch reguliert wurde. Da das Mikrowellen-System keine Rührfunktion besitzt, ist jeweils nach dem Ende der Extraktion die Probe für ca. eine Minute per Hand geschüttelt worden. Dieser Vorgang hat den Vorteil, dass die Inhaltsstoffe durch das Bewegen des Extraktionsgutes besser herausgelöst werden können. Das ganze wurde jeweils dreimal gemacht, um auf eine gesamt Extraktionszeit von 30 min zu kommen. Nach dem Abkühlen der Proben auf ca. 40 °C, wurde das Extrakt vom überschüssigen Schwebteilchen und Probenmaterial abgetrennt.

Tab. 4- 3: Mikrowellen-Methode für phytoöstrogenhaltige Extrakte

Stufe	Leistung				
	Max[W]	%	Rampe [min]	Temperatur [°C]	Halten [min]
1	800	60	10:00	60 °C	10:00

Zu diesem Zweck ist eine Membran-Filtrationsanlage von Millipore verwendet worden (Abb. 4- 13 A). Diese Anlage ermöglicht in kürzester Zeit, schnell und sauber, das Abtrennen von Feststoffbestandteilen mit Hilfe von Vakuum. Hierfür wurde ein mittel- bis weitporig und mittelschnell filtrierender Filter (Filtrak Nr. 389; Niederschlag) verwendet, um klare Extrakte zu erhalten (Abb. 4- 13 B). Die klaren Extrakte standen dann für zellbiologische, weiterführende Probenvorbereitungsschritte und analytischen Untersuchungen mit GC-MS und LC-MS zur Verfügung.

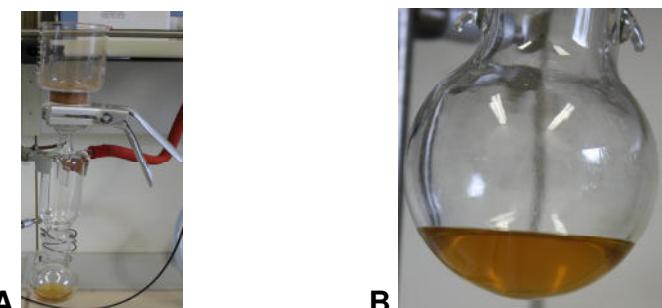


Abb. 4- 13: A: Membran-Filtrations Anlage der Firma Millipore; B: Kolben mit klaren Extrakt nach der Abtrennung von Extraktionsmaterial

4.3.1.3. Festphasenextraktion (SPE)

Eine Festphasenextraktion ermöglicht das Anreichern, Aufkonzentrieren oder Isolieren eines Analyten. Das Prinzip funktioniert durch die Wechselwirkungen des Analyten mit der stationären und mobilen Phase [111].

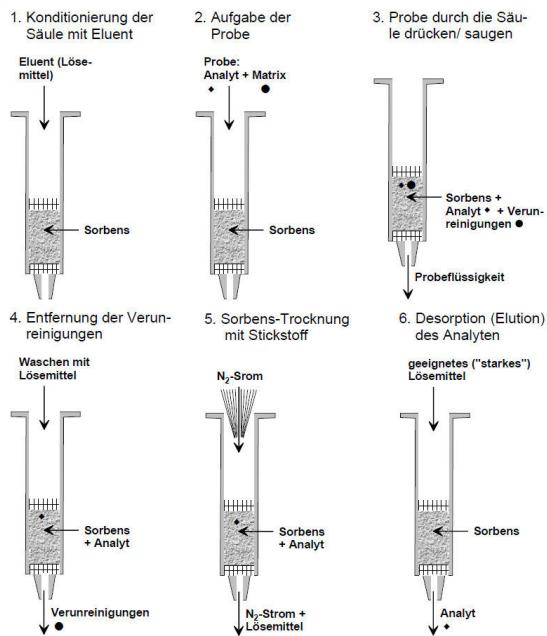


Abb. 4- 14: Prinzipieller Ablauf einer SPE [111]

Dadurch kann man den Zielanalyten zurückhalten und die störenden Substanzen abtrennen bzw. die störenden Substanzen zurückhalten und den Zielanalyten abtrennen. Der prinzipielle Ablauf einer Festphasenextraktion ist in Abbildung 4-11 dargestellt.

Je nach Methode und Zielanalyt können die einzelnen Ablaufschritte der SPE variieren. Für die potenziellen Wirkstoff-Extrakte wurde auf eine Festphasenextraktion zurückgegriffen, um eine Abtrennung der unpolaren Substanzen zu erzielen. Hierfür wurde als Festphase eine BOND ELUT PPL Phase (Varian) verwendet. Diese besteht aus einem Styrol-divinylbenzol Polymer, welches so verändert wurde, das sie für polare Substanzen, wie z.B. Polyphenole, eine enorm hohe Oberfläche und Kapazität besitzt. Die Festphasensäulen sind zunächst mit Methanol konditioniert wurden, um das Gleichgewicht zwischen der stationären und mobilen Phase einzustellen. Danach sind zwei Milliliter ethanolischer Pflanzenextrakt aufgegeben worden, um sie anschließend ins Festbett einsickern zu lassen. Hier verblieb die Lösung für ca. fünf Minuten. In dieser Zeit werden in der stationären Phase durch unpolare und elektrostatische Wechselwirkungen die polaren Pflanzeninhaltsstoffe zurückgehalten und somit angereichert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Festphasen durch Anlegen des Vakuums trocken gelegt und der so genannte Vorlauf gewonnen. Nach dem Trocknen der Festphase, erfolgte mit Hilfe von Methanol die selektive Desorption der polaren Pflanzeninhaltstoffe. Das dann erhaltene Eluat konnte durch weitere Operationen, wie z.B. Abdampfen unter Argon, eingeengt werden, so dass eine bis zu ca. 100 fache Aufkonzentrierung des polaren Pflanzenextraktes möglich wurde.

4.3.1.4. Sprühtrockner

Das Sprühtrocken-Verfahren ist ein schonender und effizienter Prozess zur Gewinnung von Feststoffen bzw. Pulvern aus Lösungen und Extrakten. Dieses Verfahren findet in

vielen Fachgebieten, wie Pharmazie, Chemie, Nahrungsmittelindustrie oder auch Aroma- und Riechstoffindustrie ihren Einsatz [112]. Die Grundbasis dieses Verfahrens ist das Prinzip der Oberflächenvergrößerung. So werden wässrige flüssige Produkte (2) mittels einer Düse (1) im oberen Teil des Sprühturms durch Pressluft in kleine feine Tröpfchen zerstäubt (Abb. 4- 15). Diese fallen dann durch einen Heißluftstrom (3), der sie in kurzer Zeit zu einem feinen Pulver trocknet (Abb. 4- 15). Das erhaltende Pulver wird dann in einem Zyklonabscheider (4) vom Luftstrom getrennt und in einem Behälter aufgefangen (Abb. 4- 15). Der Luftstrom (5), der die Gesamtströmung in diesem offenen System überhaupt ermöglicht, wird nach dem Abtrennen mit Hilfe eines Abluftfilters von Feinpartikelchen befreit und über einen Aspirator (6) erzeugt und abgeführt (Abb. 4- 15).

Jedoch basieren viele pflanzliche Extrakte auf organischen Lösungsmitteln. Aus diesem Grund wurde von Büchi ein Zusatzgerät entwickelt, den Inert-Loop B295, welches das Sprühtrocknungsverfahren auch in einem geschlossenen System ermöglicht. In diesem geschlossenen System wird in Abwesenheit von Sauerstoff gearbeitet, welches durch einen Inertgasstrom (oft Stickstoff) erzeugt wird. Der Inertgasstrom verhindert, dass ein zündfähiges Gemisch entsteht und kühlt gleichzeitig den mit Lösungsmitteln beladenen Gasstrom ab. Das Lösungsmittel kann somit kondensieren und separat gesammelt werden. Der lösungsmittelfreie Gasstrom wird dann in dem Sprühtrocknungsprozess zurückgeführt.

In dieser Arbeit wurde versucht, das Sprühtrocknungsverfahren im geschlossenen System im Hinblick auf eine mögliche vereinfachte Lagerung und Dosierung der Naturstoffextrakte anzuwenden. Hierfür sind mit Hilfe der Labormikrowelle Pflanzenextrakte von der Leinwurzel, den Sanddornbeeren und den Holunderblüten hergestellt und anschließend

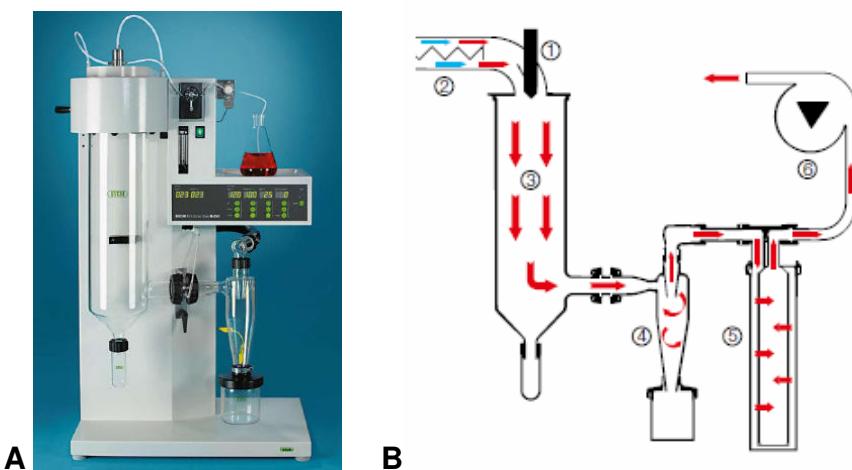


Abb. 4- 15: Sprühtrockner (B-290) der Firma Büchi (A) mit dem Fließschema (B) [112]

dem Sprühtrocknungsprozess mit einem Mini Sprühtrockner B-290 der Firma Büchi Labortechnik GmbH unterzogen worden. Damit die Sprühtrocknung möglichst schonend abläuft, wurden niedrige Temperaturen gewählt um die gelösten Inhaltsstoffe der Extrakte nicht zu schädigen. Dabei sind die einzustellenden Parameter den Extrakten nach gewählt worden:

Tab. 4- 4: Sprühtrocknungsparameter die getestet wurden

Extrakte	Extraktmenge [g]	Inlet-Temperatur [°C]	Pumpleistung [%]
Sanddornbeeren	30	80	5
Leinwurzel			
Leinwurzel	30	100	5
		120	
Holunderblüten	50	180	20
	60		30

4.3.1.5. Analytische Untersuchungsmethoden

4.3.1.6. LC-MS

Die aufkonzentrierten bzw. auch direkt nach der Mikrowellenextraktion erhaltenden phytoöstrogenhaltigen Pflanzenextrakte sind auf einem Finnigan Surveyor High Pressure Liquid Chromatography (HPLC) System gekoppelt mit einer Finnigan Linear Trap Quadrupole (LTQ) Mass Spectrometer (Thermo Scientific) vermessen worden. Dabei erfolgte die chromatographische Trennung an unterschiedlichen C-18 Säulen (Tab. 4- 5) bei einer einheitlichen Säulentemperatur von 35 °C. Die Verwendung einer weiteren Säule wie der Kinetx Säule von Phenomenex führte durch die andere Beschaffenheit der Säulenpartikel zu einer Steigerung der Trennleistung, da die Diffusionseffekte minimiert wurden und der Probendurchsatz somit gesteigert werden konnte. Der Einfluss kann in der Abbildung A- 1 im Anhang betrachtet werden. Die Flussrate betrug dabei je nach verwendeter Säule 150 µL bis 200 µL pro Minute (Tab. 4- 5) und als Injektionsvolumen wurde eine Menge von 3 bis 5 µL injiziert.

Tab. 4- 5: Übersicht der verwendeten Chromatographiesäulen für die analytische Untersuchung der Pflanzenextrakte

Säule	Parameter	Flussrate [µL/ min]	Hersteller
Discovery® HS-C18	15 cm x 2,1 cm, 3 µm	150; 200	Supelco
Kinetex	150 x 4,6 mm, 2,6 µm, C18, 100 Å	150; 200	Phenomenex

Tab. 4- 6: Gradientenprogramm für die Zusammensetzung der mobile Phase der HPLC-MS Analytik. A: Methanol mit 0.1 % Ameisensäure, B: Wasser mit 0.1 % Ameisensäure

Zeit (min)	0	10	20	30	35	40
A (v/v, %)	40	95	95	80	40	40
B (v/v, %)	60	5	5	20	60	60

Die mobile Phase bestand aus einem Gradientenelutions-System. Als Lösungsmittel A wurde Methanol mit 0.1 % Ameisensäure (LC-MS Chromasolv®, Fluka) verwendet und als Lösungsmittel B: Wasser mit 0.1 % Ameisensäure (LC-MS Chromasolv®, Fluka). Die

Elution der Standardsubstanzen und extrahierten Pflanzeninhaltstoffen erfolgte mit dem in Tabelle 4-6 angegebenen Gradientenprogramm. Weitere wichtige Parameter für die Einstellung des LC-Systems können der Tabelle 4-7 entnommen werden.

Tab. 4- 7: weitere für die LC wichtige Parametereinstellungen

Geräteparameter	Einstellungen
AutosamplerTemperatur	15 °C
Injecti onsnadelhöhe	Mikrovials: 4 mm über den Boden Probenvials: 2 mm über den Boden
Waschvolumen (vor Injektion)	5000 µL
Waschvolumen (nach Injektion)	5000 µL

Die Inhaltstoffe wurden mit Hilfe der Ionenfallen Technologie identifiziert. Die Erzeugung der Ionen erfolgte mit Hilfe des Elektronsprayionisations (ESI) - Verfahrens. Diese Interfacetechnik übernimmt hierbei mehrere Aufgaben. Es wandelt die in der Lösung befindlichen Ionen in solvatisierte und schließlich desolvatisierte, protonierte oder deprotonierte Gasphasenionen um [113, 114]. Die erzeugt Analytionen werden dann über eine Transferkapillare ins Massenspektrometer geschleust, welches sowohl negative als auch positive Ionenströme über einen Massenbereich von m/z 90.00 – 2000.00 aufzeichnet. Alle weiteren Parameter, die für die Einstellung des Massenspektrometers wichtig sind, sind in Tabelle 4-8 dargestellt.

Alle Daten wurden mit Hilfe von der Software Xcalibur und Mass FrontierTM ausgewertet und interpretiert (Thermo Scientific, Dreieich, Germany). Die dann erhaltenen Daten sind mit Standardmessungen und typischen Fragmentierungsmustern unter Zuhilfenahme einer selbst angefertigten Standardbibliothek verglichen worden. Dabei erfolgte die Identifizierung über die typischen Massenspuren der freien Verbindungen, der Glycoside, der Glycosid-Dimere, der Diglycoside und der Deoxydiglycoside.

Tab. 4- 8: Parametereinstellung für das Massenspektrometer

		Geräteparameter	Einstellungen
S E G M E	Scan Event 1	Mode	Poitive Ion
		Modus	Full scan
		Scanbereich	90.00-2000.00 m/z
		Skimmer	35-70
		Analysendauer	40 min
N T 1	Scan Event 2	Mode	Negative Ion
		Modus	Full scan
		Scanbereich	90.00-2000.00 m/z
		Skimmer	60-90
		Analysendauer	40 min

4.3.1.7. GC-MS

Die hergestellten Extrakte sind ebenfalls an der GC-MS (ITQ 1100 GC-Ion Trap MS, Thermo Sienctific) vermessen worden. Hierfür sind entweder die Mikrowellenextrakte

direkt verwendet worden oder aber auch solche, die durch Derivatisierung mit N, O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA, Supelco) oder Dimethylformamid (DMF), bei 50 °C für 60 Minuten, für die qualitative Untersuchung am GC-MS vorbereitet worden (Abb. 4- 13). Durch die Derivatisierung werden aktive Hydroxylgruppen durch Trimethylsilylgruppen ersetzt. Die Silylderivate sind besser flüchtig, weniger polar und thermisch stabiler und somit erhält man bessere analytische Signale bzw. eventuelle Zucker-/fragmente werden durch die Derivatisierung überhaupt erst analysierbar.

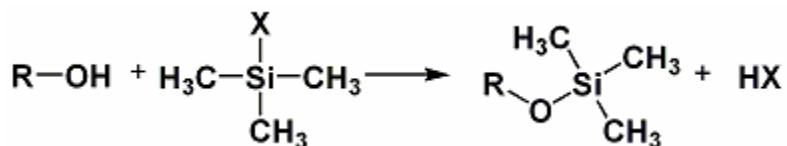


Abb. 4- 16: Derivatisierungsgleichung für BSTFA; R: Probe, X: $CF_3C=NSi(CH_3)_3OSi(CH_3)_3$ [115]

Die Gaschromatographische Trennung wurde mit einer DB5-MS Säule (30 m x 0.25 mm, 0.25 µm) von J&W Scientific erzielt. Als Injektions-Mode wurde die Splitless-Methode (2.00 min) genutzt mit einem Fluss von 20 mL/min. Hierbei wird das gesamte Probenvolumen verdampft und auf die Trennsäule übertragen. Diese hat den Vorteil, dass auch Substanzen die nur in minimaler Konzentration vorhanden sind, analytisch untersucht werden können. Das Probeninjektionsvolumen betrug 1 µL und die Inlettemperatur wurde bei 260 °C gehalten. Zur Auftrennung der Inhaltsstoffe wurde ein Temperaturgradient gefahren, dieser ist der Abbildung 4-14 zu entnehmen.

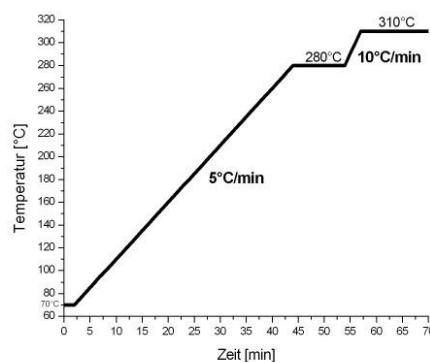


Abb. 4- 17: Temperaturgradient der GC-MS-Messungen : von 70 °C (2,00 min) auf 280 °C, von 280 °C (10,00 min) auf 310°C (12,00 min)

Als Trägergas wurde Helium mit einem konstanten Flussrate von 1,1 mL/min gewählt. Die MS-Transferline hatte eine Temperatur von 270 °C. Sowohl die Standardproben, als auch die Naturstoffproben sind mit Hilfe der Elektronenstoßionisation (Elektron Impact - EI) bei 70 eV ionisiert worden. Dabei werden die Analytmoleküle mit Elektronen hoher Energie beschossen, was zur Bildung von Ionen führt. Diese Ionisierungsmöglichkeit kann für die positive und negative Ionenbildung genutzt werden. Für die Untersuchungen der verschiedenen Pflanzenextrakte wurde die positive Elektronenstoßionisation verwendet. Dabei nimmt der Analyt durch die Wechselwirkung mit den Elektronen die notwendige

Energie für die Abspaltung eines Elektrons auf, wodurch es zur Bildung von positiv geladenen Ionen kommt [116]. Alle Daten wurden dann in einem Full scan von m/z 50.00-1000.00 im positiven Ionenmodus erfasst. Die Identifizierung der Inhaltsstoffe von den Pflanzen erfolgte durch Vergleich der Retentionszeiten bzw. Fragmentierungsmuster mit den Standards, als auch durch Abgleich mit Datenbanken.

4.3.1.8. **MSⁿ – Messungen**

In einigen Fällen wurde auch die Direktinfusionstechnik mittels Spritzenpumpe an der LC-MS durchgeführt, um die Absicherung einiger, wenig eindeutiger Strukturen zu klären. Dies ist möglich, da das genutzte LC-MS Gerät eine Ionenfalle als Analysator besitzt. Diese Technik ermöglicht, durch direkte Injektion der Extrakte in das Massenspektrometer in kürzester Zeit Ionen mit einer bestimmten Masse in der Ionenfalle zu isolieren. Andere werden durch die Variation der Spannung an den Ringelektroden aus der Ionenfalle ausgeschlossen. Zur veranschaulich einer MSⁿ-Messung dient die schematische Darstellung in Abbildung 4-15.

Für die Untersuchung der verschiedenen Pflanzenextrakte wurden 100 μL Extrakt in eine Injektionsspritze überführt, in die Spritzenpumpvorrichtung der LTQ eingespannt und über eine Kapillare mit der Interfacetechnik (ESI) verbunden. Über das Programm Xcalibur erfolgte die Programmierung bzw. Beobachtung der Messung. Nachdem die Ionen mit der spezifischen Masse gesammelt wurden, erfolgte eine Variation der Kollisionsenergie in der Ionenfalle.

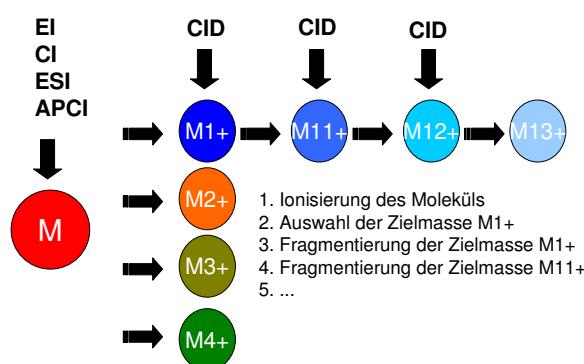


Abb. 4- 18: Schematische Darstellung einer MSⁿ-Fragmentierung [117]

Dadurch wird erreicht, die Ionen durch Kollision mit Heliumatomen in der Falle zu definierten, leichteren Bruchstücken zerfallen. Somit kann man charakteristische Fragmentierungsmuster des untersuchten Moleküls beobachten. Wird die Intensität der gewählten Masse mit der Änderung der Kollisionsenergie kleiner, so wird die Kollisionsenergie des intensivsten Massenfragmentes variiert, dessen Intensität mit der zuvor veränderten Kollisionsenergie größer wurde. Diesen Prozess kann man beliebig oft fortsetzen, jedoch ist er begrenzt durch die Anzahl der gesammelten Ionen in der Falle. Da die Parametereinstellung für diese Untersuchungen individuell nach den jeweiligen Inhaltsstoffen der Extrakte erfolgen muss, können hier leider keine definierten Geräteparameter angegeben werden.

4.3.1.9. Präparative Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC)

Mit Hilfe der préparativen HPLC sollten aus den verschiedenen Pflanzenextrakten so genannte Vielstoffgemische und eventuelle Einzelsubstanzen gewonnen werden. Dazu wurde eine HPLC-Anlage der Firma Knauer verwendet, die mit einem Fraktionssammler zusammen geschaltet wurde. Die mobile Phase bestand dabei aus einer ähnlichen Lösungsmittelzusammensetzung wie für die LC-MS Messungen. Jedoch wurde die Anlage isokratisch betrieben und der Eluent zuvor selbst angesetzt. Der verwendete Eluent bestand aus 40 % Methanol und 60 % Reinstwasser. Für die Arbeiten an der préparativen HPLC wurde der Eluent immer nach dem in Tabelle 4-9 dargestellten Verhältnis zusammengemischt.

Als Säule wurde die Eurospher 100-10 C18 der Firma Knauer für die chromatographische Trennung verwendet. Die Systemeinstellungen wurden auch hier den gewählten Extrakten angepasst. Die einzelnen Einstellungen können der Tabelle 4-10 entnommen werden.

Tab. 4- 9: Eluentzusammensetzung für préparative HPLC-Messungen

Eluentmenge [mL]	40 % Methanol [mL]	60 % Reinstwasser [mL]
2000	800	1200

Tab. 4- 10: Parametereinstellungen der HPLC für die Fraktionierung

Extrakte	Flussrate [mL/min]	UV-Einstellung [nm]	Gesamtaufzeit [min]
Leinwurzel	3	240	40
Holunderblüten	1	280	30
Holunderbeeren	1	254	40
Sanddorn	3	350	40
Buche	3	280	30

4.3.2. Zellbiologische Methoden

Die antikanzerogene Wirkung der Pflanzenextrakte und ihrer Inhaltsstoffe wurde hauptsächlich durch Frau Dipl.-Biol. M. Szewczyk im Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik im Klinikum Südstadt und durch Frau Dr. N. Engel-Lutz im Zentrum für Medizinische Forschung der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock untersucht. Dafür sind die zu untersuchenden Substanzen bzw. Stoffgemische als Extrakt oder Lösung für zwei Tage zu den Zellkulturen dazugegeben worden und wurden anschließend auf ihre zellphysiologischen Auswirkungen analysiert. Zur Verfügung standen verschiedene Methoden, welche die Zellvitalität, Proliferation, Wachstumshemmung und Apoptose der kanzerogenen und nicht-kanzerogenen Zelllinien bewerten.

Im folgenden Kapitel sollen die verwendeten Zelltests der Proliferations- und stoffwechselphysiologischen Analysen für diese Arbeit kurz vorgestellt werden.

4.3.2.1. Proliferationsanalysen

4.3.2.1.1. Bromodeoxyuridin (BrdU) Test [118]

Der Bromodeoxyuridin Test ist ein nicht-isotopisches Enzymimmunoassay, welches die Bestimmung der Zellproliferation als Vortest bzw. Schnelltest ermöglicht [119]. Mit der Zellproliferation wird das Wachstum bzw. die Vermehrung von Zellen beschrieben [120]. Ihre Bestimmung ist ein wichtiger Bestandteil vieler zellbiologischer Untersuchungen. Hierfür sind optimierte BrdU Cell Proliferation Assay Kits entwickelt worden, welche das Nukleolid Thymidin gegen ein anderes Nukleotid-Analog austauscht [121]. Dabei wird mit Anti-BrdU Antikörpern das Thymidinanalог Bromodeoxyuridin (BrdU) in neu synthetisierte DNA-Stränge aktiver, proliferierender Zellen eingebaut [119, 121]. Der Einbau wird dann durch einen Farbumschlag dargestellt [121]. Somit ermöglicht diese Methode die Zellproliferation von Zelllinien quantitativ zu untersuchen.

4.3.2.1.2. FACS-Calibur (Zellzyklustest)

Zellzyklusanalysen sind quantitative Zellmessmethoden, die auf dem Prinzip der Durchflußzytometrie basieren. Diese Methode ist eine weiterführende Zellanalyse mit der nützlichen Informationen über physikalische und molekulare Eigenschaften der Zellen gewonnen werden können [122]. Dabei werden der Zeitraum zwischen der Entstehung einer Zelle aus der Mutterzelle (Wachstums bzw. Interphase) und ihre erneute Teilung in zwei weitere Tochterzellen (Mitosephase) beobachtet [123]. Die Interphase unterteilt man in drei verschiedene Stadien, die G₁-, S- und G₂-Phase [123]. Das erste Stadium, die G₁-Phase, dient zum Wachstum der Zelle, damit sie sich überhaupt teilen kann [124-126]. In ihr verankert ist ein so genannter Kontrollpunkt, bei dem entschieden wird, ob die Zelle den gesamten Zyklus durchläuft oder sie in den Ruhezustand (G₀-Phase) geht [124, 125]. Wenn die Zelle groß genug ist beginnt die S-Phase (Synthese). Hier bereitet sie sich auf die bevorstehende Teilung (Mitose) vor, indem sie ihre DNA verdoppelt und durch Produktion von RNA und Proteinen weiter wächst. Im letzten Stadium der Interphase, der G₂-Phase (Postsynthese), wächst die Zelle weiter und beendet die Vorbereitungen für die Mitose. Auch hier befindet sich ein Kontrollpunkt, an dem entschieden wird, ob die Mitose stattfinden kann [126]. In der Mitose-Phase wächst die Zelle nicht mehr und teilt sich in zwei Tochterzellen. Diese können dann den Zellzyklus erneut durchlaufen oder treten in die G₀-Phase ein [125, 126]. All diese Prozesse benötigen je nach Gewebeart zwischen 10 bis 30 Stunden [127]. Der Zellzyklus von Krebszellen ist gegenüber normalen Zellen gestört. Dieser wird nicht mehr vom Organismus kontrolliert und die Zellen teilen sich autonom. Aus diesem Grund ist der Zellzyklus von Tumoren oftmals in seiner Aktivität deutlich erhöht oder zeitlich sehr ausgedehnt [128]. Häufig beobachtet man dann eine vermehrte Biosynthese von RNA und Proteinen oder aber auch einen teilweisen Verlust von proteinabhängigen Kinase (CDK) – Inhibitoren [128]. Für die antikanzerogenen

Wirkungsuntersuchungen der Pflanzenextrakte und ihrer Inhaltsstoffe wurden die Zellzyklusanalysen unter zu Hilfenahme eines FACS-Calibur Gerätes der Firma BD Bioscience durchgeführt. Dafür wird die DNA der Zelle mittels spezieller fluoreszierender Farbstoffe angefärbt. Dieser Farbstoff wird dann mit einem geeigneten Laser angeregt und jede einzelne Zelle in einem Flüssigkeitsstrom auf ihre Teilungsaktivität und ihr Entwicklungsstadium untersucht [129]. Dieses Verfahren ermöglicht somit die Analyse von mehr als 100000 Zellen in wenigen Minuten.

4.3.2.2. Stoffwechselphysiologische Analysen

4.3.2.2.1. Laktat-Dehydrogenase (LDH) Test [130]

Der Laktat-Dehydrogenase Test ist ein Zytotoxizitätstest, der den Zelltod der Zelllinien untersucht. Dieser Test basiert auf der Bestimmung der Enzymaktivität von Laktatdehydrogenase (LDH) und kann ebenfalls als Schnellsuchtest bzw. Vortest verwendet werden [131]. Die LDH befindet sich im Zytoplasma aller Zellen und ist ein Biokatalysator, der einige Stoffwechselvorgänge in der Zelle ermöglicht. Ein wichtiger Schritt im Energiestoffwechsel ist das Verbrennen von Zucker. Hierbei kommt die LDH zum Einsatz, da sie die Umwandlung von Laktat in Pyruvat und umgekehrt ermöglicht [132]. Werden Zellen zerstört oder beschädigt, wird die in der Zellmembran befindliche LDH sehr schnell an das Zellkulturmedium abgegeben [131]. Dadurch kann man die LDH im Zellkulturmedium nachweisen und deren Aktivität mittels eines enzymatischen Tests bestimmen. Gerade bei kanzerogenen Zelluntersuchungen kann man mit diesem Test Tumorerkrankungen beobachten bzw. das Ausmaß der Erkrankung abschätzen.

4.3.2.2.2. MTT Test [133]

Der MTT-Test ist ebenfalls ein Zytotoxizitätstest. Mit ihm wird jedoch die Zellvitalität in einem Vortest bzw. Schnelltest nachgewiesen [134]. Mit der Zellvitalität können Aussagen über die zelluläre Proliferation, die Lebensfähigkeit und die Zytotoxizität der Zelle getroffen werden. Der MTT-Test beruht auf der Reduktion des gelben, wasserlöslichen Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) in ein wasserlösliches, violettes Formazan [135, 136]. Diese Umwandlung erfolgt nur in lebenden, stoffwechselaktiven Zellen, da sie von den Enzymen (Succinat-Dehydrogenase) des Endoplasmatischen Retikulums abhängig sind. Ist die Zelle beschädigt so ist die Formazanbildung im Vergleich mit Kontrollen wesentlich geringer [134, 136]. Für die Messungen kann das gebildete Formazan durch die Behandlung mit organischen Lösungsmitteln aus den Zellen herausgelöst werden und photometrisch bestimmt werden [135].

4.3.2.2.3. BIONAS-Messungen

BIONAS – Untersuchungen sind so genannte zellbasierte, makierungsreie, real-Time Assays zur Überwachung stoffwechselphysiologischer Parameter von Zelllinien und

Primärzellen. Mit ihnen können lebend-Zellmessungen durchgeführt werden, bei denen der momentane Effekt auf die Zelle über verschieden lange Zeiträume bis hin zu mehreren Tagen kontinuierlich beobachtet und gemessen werden kann. Dieses Verfahren ist vorteilhafter gegenüber anderen herkömmlichen Zelluntersuchungsmethoden. Man erhält nicht nur Auskunft über den physiologischen Status der Zelle, sondern erkennt auch direkt und zeitgleich die Veränderung von verschiedenen Parametern, wie z. B. Adhäsion, Proliferation oder die Membranintegrität, bei einer Wirkstoffzugabe oder auch das Regenerationsvermögen der Zelle nach einer Wirkstoffabsetzung. Mit anderen Zelltest (BrdU, MTT, LDH) hingegen kann nur der IST-Zustand der Zelle nach mehreren Stunden und Tagen nach einer Wirkstoffzugabe bzw. -absetzung untersucht werden.

5. Ergebnisse und Diskussion

5.1. Anwendung der Sprühtrocknung

Mit der Sprühtrocknung wurde versucht, die erhaltenen Pflanzenextrakte für eine gute Lagerung bzw. Dosierung, in Pulverform zu überführen. Hierzu wurde aus Sicherheitsgründen das geschlossene Sprühtrocknungsverfahren angewendet. Dies geschah, da es sich bei den meisten Pflanzenextrakten um ethanolische Lösungen handelte, die bei einem einfachen Sprühtrocknungsverfahren explosive Gemische bilden können.

Als Proben kamen der ethanolische Sanddornbeeren- und Holunderblütenextrakt zum Einsatz. Zunächst wurden 30 g des Sanddornbeerextraktes bei einer Inlet-Temperatur von 80 °C und einer Pumpleistung von 5 % versprüht. Jedoch führte dies nicht zum gewünschten Ergebnis. Es konnte kein pulverförmiges Produkt erzeugt werden. Das Produkt war feucht und sehr viskos, mit einer honigartigen Konsistenz (Abb. 5- 1, links). Der Grund hierfür können gelöste Kohlenhydrate oder Fette sein, die einen Einfluss auf das Sprühergebnis haben.

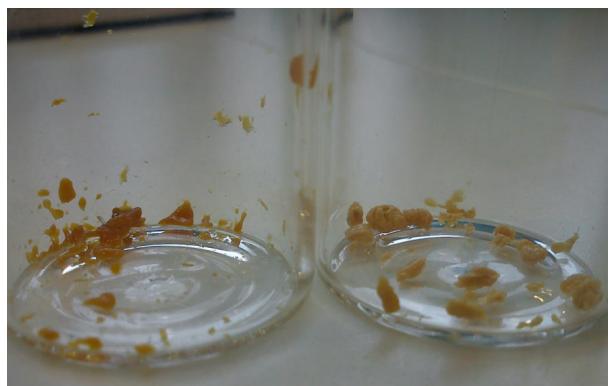


Abb. 5- 1: versprühter Sanddornbeerextrakt vor (links) und nach der Festphasenextraktion (rechts)

Mittels einer einfachen Festphasenextraktion (SPE) wurden diese Bestandteile aus dem Extrakt entfernt. Das dann erhaltende Eluat wurde anschließend mit einer Inlet-Temperatur von 80 °C versprüht. Hierbei wurde ein Produkt mit gummiartiger Konsistenz erhalten (Abb. 5- 1, rechts). Da die Festphasenextraktion auch nicht den gewünschten Erfolg brachte, wurde im nächsten Schritt das Sprühtrocknungsverhalten am Leinwurzelextrakt getestet. Dieses Extrakt hat in den inhaltsstofflichen Analysen gezeigt, dass es kaum Kohlenhydrate besitzt. Für das Sprühtrocknungsverfahren sind ebenfalls 30 g Leinwurzelextrakt mit den gleichen Bedingungen vom Sanddornbeerextrakt versprüht worden. Es kam jedoch nur zur Abscheidung von kleinen Tropfen mit einer ölichen Konsistenz. Ein trockenes Produkt konnte nicht erhalten werden. Es bildete sich eine honigartige Masse, die sich schlecht aus dem Auffanggefäß entfernen ließ.

Um das Sprühergebnis zu verbessern wurde in einem weiteren Sprühversuch die Inlet-Temperatur um 20 °C erhöht, bei gleich bleibender Pumpleistung. Dieses führte zu einem

pulverartigen Feststoff mit gelber Farbe (Abb. 5- 2, links). Allerdings konnten nur geringe Ausbeuten von ca. 43 % erreicht werden.

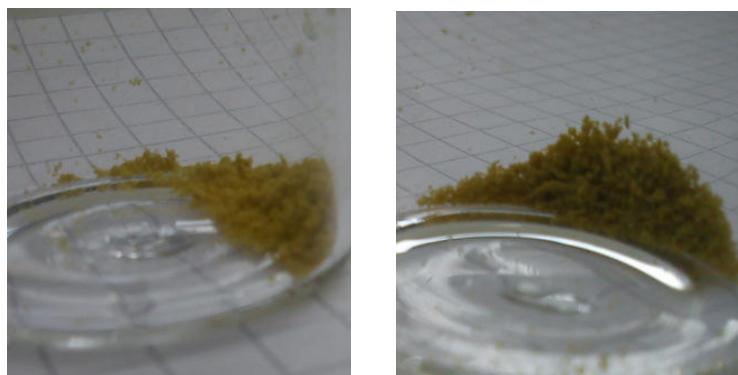


Abb. 5- 2: links: gelbliches Leinwurzelpulver bei einer Inlet-Temperatur von 100 °C und einer Pumpleistung von 5 %; rechts: dunkelgelbes Leinwurzelpulver bei einer Inlet-Temperatur von 120 °C und einer Pumpleistung von 5 %

Um die Ausbeute etwas steigern zu können wurde für einen nächsten Sprühversuch die Inlet-Temperatur nochmals um 20 °C erhöht. Aber diese Parameteränderung konnte die Ausbeute nur gering beeinflussen und steigerte sie um ca. 7 %. Da das Produkt bei einer Inlet-Temperatur von 120 °C schon eine deutliche Farbveränderung zeigte (Abb. 5- 2, rechts), wurde eine weitere Erhöhung der Inlet-Temperatur nicht in Betracht gezogen. Dies geschah, da zu hohe Temperaturen einzelne Inhaltsstoffe wegen ihrer thermischen Instabilität zerstören können. Da die Ausbeute für diese Sprühversuche nur zwischen 40-50 % beträgt, kann zum einen auch an der Ausgangskonzentration des hergestellten Wurzelextraktes liegen. Eine Ermittlung des Feststoffgehalts für das Wurzelextrakt ergab, dass in einem Mikrowellenextrakt der Leinwurzel ca. 2,57 mg Feststoff pro Milliliter Lösungsmittel gelöst sind. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass durch einen erhöhten Stoffstrom sich ein Teil der Feststoffbestandteile im Abluftfilter verfangen haben können. Aber auch Parameter wie Aspirationsrate, Luftfeuchtigkeit, Lösungsmittel und der Sprühluftfluss können einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbeute haben. Da die Sprühversuche des Leinwurzelextraktes einigermaßen gut verliefen, wurden die Erfahrungswerte dieses Sprühverfahrens auf das Holunderblütenextrakt übertragen. Die Inhaltsstoffe der Holunderblüten wurden ebenfalls mit einer Mikrowelle extrahiert. Allerdings ist hier Reinstwasser als Extraktionsmittel verwendet worden. Die eingesetzten Parameter und Ergebnisse sind in der Tabelle 5-1 zusammengefasst.

Tab. 5- 1: Zusammenfassung der Ergebnisse und Parameter für die Sprühversuche des Holunderblütenextraktes

Parameter	Sprühversuch 1	Sprühversuch 2	Sprühversuch 3
T_{Inlet} in °C	180	180	180
Pumpleistung in %	20	30	30
Feststoffgehalt pro mL	32,2	32,2	32,2
Extrakt in mg			
m_{Extrakt} in g	49,13	69,78	66,36
m_{Pulver} in g	0,318	0,622	0,647
Ausbeute in %	20,1	27,7	30,3

Mit diesen Sprühversuchen konnte ein vergleichbares Ergebnis erhalten werden. Es bildete sich immer ein pulverartiger Feststoff mit gelb-bräunlicher Farbe im Auffangbehälter und es konnten Ausbeuten von ca. 30 % erreicht werden (Abb. 5- 3). Des Weiteren ist mit den Sprühversuchen 2 und 3 auch eine gute Reproduzierbarkeit der Ergebnisse erkennbar. Die Inlet-Temperatur musste hier höher gewählt werden als bei den bisherigen Versuchen, da es sich bei den Holunderblüten um ein wässriges Extrakt handelt. Nur bei einer Inlet-Temperatur von ca. 180 °C konnte eine vollständige Verdampfung des Lösungsmittels erreicht werden.

**Abb. 5- 3: gelb-bräunliches Pulver des Holunderblütenextraktes**

Aus diesem Grund erfolgte eine Kontrolle der Inhaltsstoffzusammensetzung mit Hilfe von MS-Messungen, um den Einfluss der erhöhten Inlet-Temperatur und des Sprühtrocknungsverfahrens auf die Zusammensetzung des Extraktes bzw. auf die Stabilität der Inhaltsstoffe zu untersuchen. In Abbildung 5-4 sind die Chromatogramme der Holunderblüten vor und nach dem Sprühverfahren gegenübergestellt.

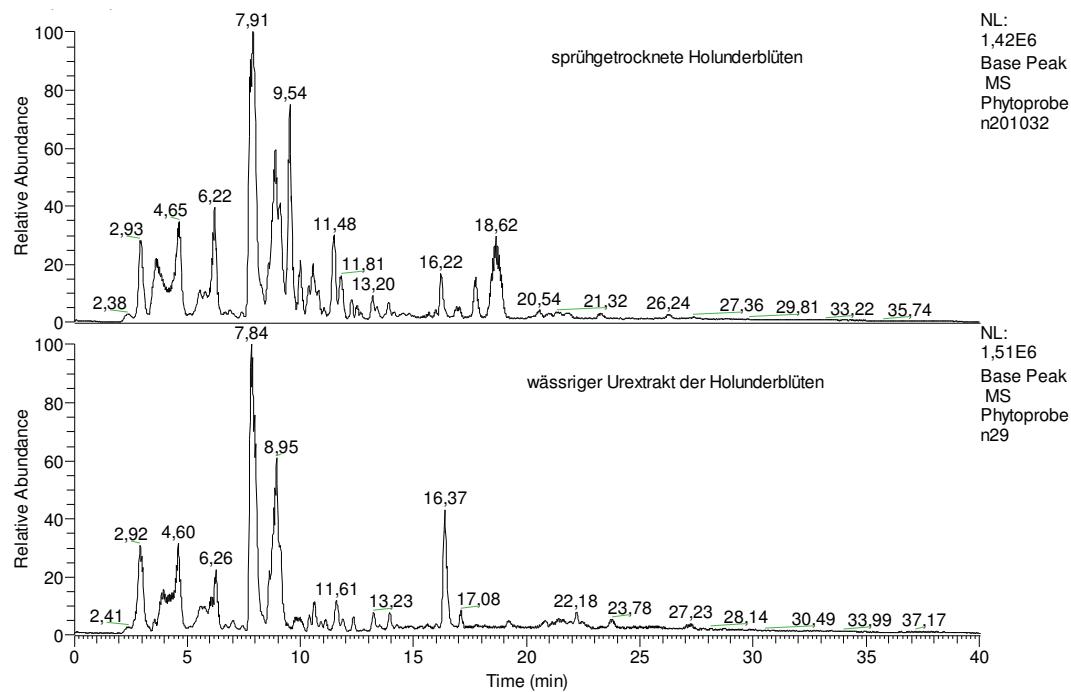


Abb. 5- 4: Gegenüberstellung der Chromatogramme des Holunderblütenextraktes bzw. -pulvers vor und nach dem Sprühtrocknen bei 180 °C

Ein Vergleich der Chromatogramme und Massenspektren konnte zeigen, dass die Sprühtrocknung bei einer Inlet-Temperatur von 180 °C keinen nachteiligen Effekt auf die Zusammensetzung der Extrakte hat. Eine Schädigung bzw. Veränderung der Inhaltsstoffe durch die erhöhte Inlet-Temperatur ist nicht ersichtlich bzw. hält sich durch kurze Kontaktzeiten und den Kühleffekten bei der Verdampfung in Grenzen. Lediglich ein Unterschied in der Intensität der verschiedenen Peaks konnte im Vergleich festgestellt werden. Dies hängt jedoch mit der Konzentration des Uretraktes zusammen, welches für die Messungen im Vergleich zum wieder gelösten Holunderblütenpulver wesentlich geringer konzentriert ist. Somit kann zusammengefasst gesagt werden, dass das Sprühtrocknungsverfahren für spätere Anwendungen genutzt werden kann. Besonders für eine bessere Lagerung und Dosierung sind diese Pulver gut geeignet. Sie können in dieser Form die Anwendung in verschiedenen Zelltestuntersuchungen erleichtern.

Um die Ausbeute der Sprühprodukte auf ein Maximum zu steigern, können verschiedene Parameter wie Pumpleistung, Inlet-Temperatur, Aspirationsrate, Luftfeuchtigkeit, Lösungsmittel und der Sprühluftfluss beeinflusst werden. Auch eine andere Art Sprühtrocknungsverfahren mit Hilfe eines Carrier-System könnte eingesetzt werden. Dabei wird das gewünschte Extrakt beim Sprühtrocknungsprozess an eine Art Trägermolekül gebunden, was zu einem besseren Sprühergebnis führt. Als ein mögliches Carrier-System könnte Maltodextrin, ein wasserlösliches Kohlenhydratgemisch aus Monomeren, Dimeren, Oligomeren und Polymeren der Glucose, verwendet werden. Dieses Gemisch wird bereits heute erfolgreich als Trägersubstanz für empfindliche oder flüchtige Stoffe wie Aromen, Vitaminen oder Gewürzen in der Lebensmittelproduktion angewendet. Allerdings müsste hier der Einfluss des Maltodextrin-Wirkstoffpulvers auf die

Hemmung des Brustkrebswachstums für den *in vitro*-Test ausführlich untersucht werden. Für *in vivo* Studien jedoch sind Extrakte in Pulverform besonders gut geeignet, da sie in der Verabreichung an Versuchstiere die Anwendung erleichtern können. So können diese Wirkstoffpulver durch Beimengung ins Futter oder in Form von Pellets verabreicht werden. Da das Sprühtrocknungsverfahren aber nicht Hauptbestandteil dieser Arbeit war, sind hier nur anfängliche Versuche erfolgt, um zeigen zu können, dass eine Sprühtrocknung für weiterführende Untersuchungen in Betracht gezogen werden kann. Allerdings bedarf dies noch weiterer Forschung und könnte Bestandteil einer folgenden Arbeit sein.

5.2. Stabilität der Mikrowellenextrakte

Die Stabilität der Extrakte ist von besonderer Wichtigkeit. Die wirksamen Inhaltsstoffe sollten möglichst unbeschadet extrahiert werden und über längeren Zeitraum lagerbar bleiben. Aus diesem Grund wurden Untersuchungen zur Lagerungsstabilität und Thermostabilität der Inhaltsstoffe gemacht. Gerade im Hinblick auf eine spätere Anwendung oder eine industrielle Umsetzung zur Herstellung bzw. Gewinnung der potenziellen Antikrebswirkstoffe sind die zellbiologischen und analytischen Untersuchungen von großer Bedeutung.

5.2.1. Lagerungsstabilität der Extrakte

Für die Untersuchungen zur Lagerungsstabilität der Pflanzenextrakte wurde beispielhaft ein einfacher Mikrowellenextrakt von den Wurzeln der Leinpflanze (Sorte: Barbara) hergestellt. Das erhaltende Extrakt ist dann über einen Zeitraum von einem Jahr in regelmäßigen Abständen chromatographisch an der LC-MS und zellbiologisch vermessen bzw. untersucht worden. Die Aufbewahrung erfolgte bei -27 °C. In Abbildung 5-5 sind die verschiedenen Chromatogramme des Leinwurzelextraktes über den getesteten Zeitraum dargestellt. Es ist klar zu erkennen, dass das Extrakt sich über den Zeitraum kaum verändert. Vor allem die markanten Peaks im vorderen und hinteren Bereich des Chromatogrammlaufes sind stabil.

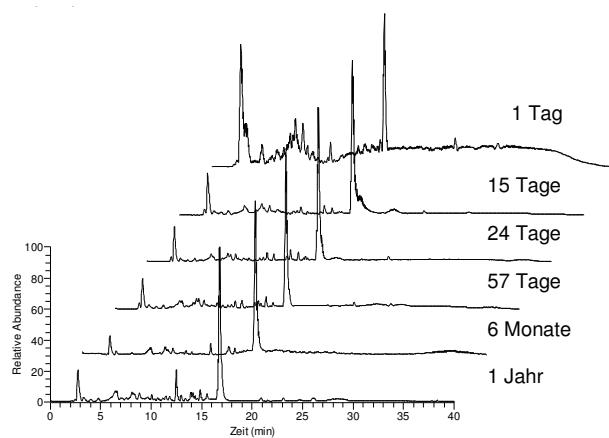


Abb. 5-5: Darstellung der analytischen Messung im Chromatogramm

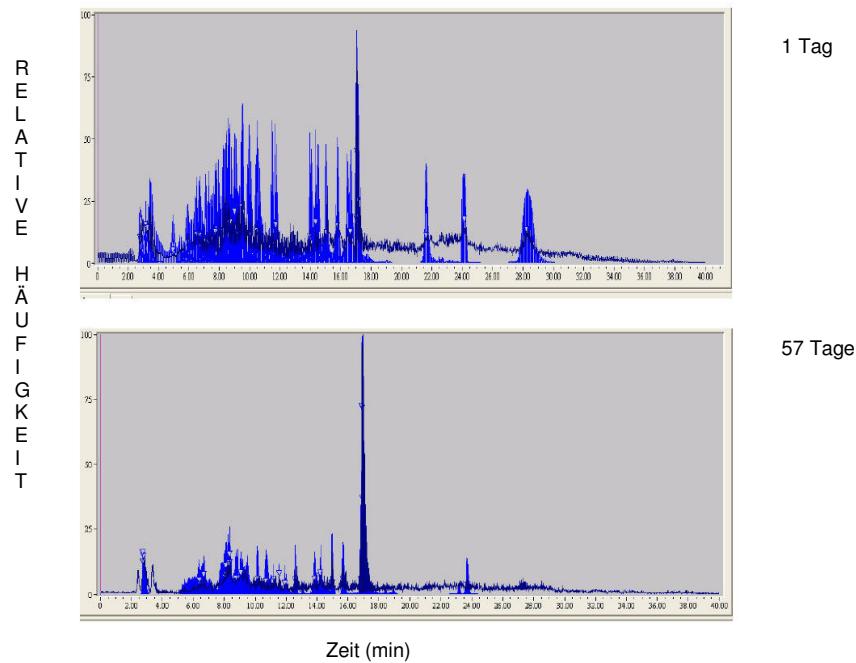


Abb. 5- 6: Chromatogramme des Leinwurzelextraktes, oben: nach 1 Tag, unten: nach 57 Tagen

Da jedoch die Aussagekraft dieser Chromatogramme nicht ausreichend ist, wurden die Chromatogramme, mit Hilfe der Mass Frontier Software, verfeinert. Mit dem Programm Mass Frontier ist es möglich für jede gefundene Masse einen Peak im Chromatogramm darzustellen. Dadurch erhält man wesentlich deutlichere und anschaulichere Chromatogramme (Abb. 5- 6).

Jetzt ist zu erkennen, dass sich das Extrakt über den Zeitraum in der Intensität und Anzahl der Peaks verändert. Zu Beginn der Lagerung sind viele verschiedene Inhaltsstoffe mit einer hohen Intensität im Extrakt zu erkennen. Über den Zeitraum der Lagerung nehmen diese gravierend in der Intensität ab, einige Inhaltsstoffe sind in späteren Messungen gar nicht mehr zu finden. Das lässt vermuten, dass sich Inhaltsstoffe über den Zeitraum der Lagerung verändern bzw. zerfallen sind.

Um das genauer zu untersuchen, wurden alle gefundenen Massen ermittelt und diese in einen grafischen Zusammenhang gebracht (Abb. 5- 7).

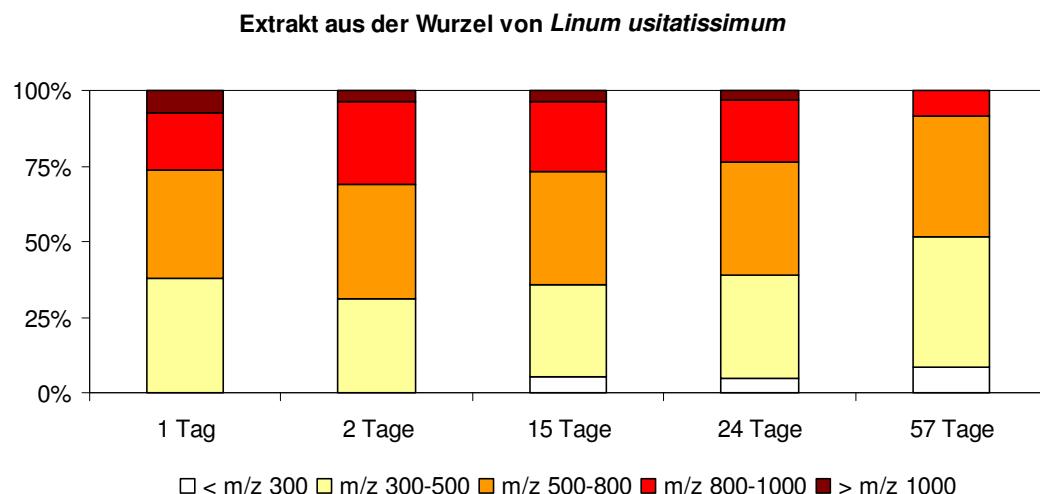


Abb. 5- 7: Darstellung der gefundenen Massen in Abhängigkeit vom Lagerungszeitraum eines durch Mikrowellenextraktion hergestellten Leinwurzelextraktes

In dieser Darstellung sind die mit Hilfe von Mass Frontier gefundenen Massen mit dem Lagerungszeitraum in einen Zusammenhang gebracht worden. Nun erkennt man deutlich, dass große Massen von m/z 800 bis 1000 und $\geq m/z$ 1000 über den Zeitraum abnehmen und kleinere Massen der Größenordnung von $\leq m/z$ 300 bis m/z 500 bis 800 zunehmen. Dieser Zusammenhang bestätigt die Aussage, dass gerade Substanzen bzw. Inhaltstoffe mit einer hohen Masse über den Zeitraum der Lagerung in kleinere Massenfragmente zerfallen, was zu einer Zunahme der selbigen führt.

Die Inhaltsstoffe des Extraktes verändern sich strukturell über den Zeitraum der Lagerung. Ob sich das auch in der Wirkung der Extrakte auf die Zelllinien bemerkbar macht bzw. überhaupt einen Einfluss auf diese hat, sollten die Zelluntersuchungen klären. Hierzu ist die Wirkung des Leinwurzelextraktes zu definierten Lagerungszeitpunkten an der tumorigen und rezeptorpositiven Brustkrebszelllinie MCF-7 durch Dipl.-Biol. Marlen Szewczyk am Forschungslabors der Universitätsfrauenklinik des Klinikums Südstadt getestet worden. Dafür wurde der durch die Mikrowelle hergestellte Leinwurzelextrakt verschiedenen Zelltestuntersuchungen zur Toxizität, Proliferation und Vitalität unterzogen. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Abbildung 5-8 zusammenfassend dargestellt.

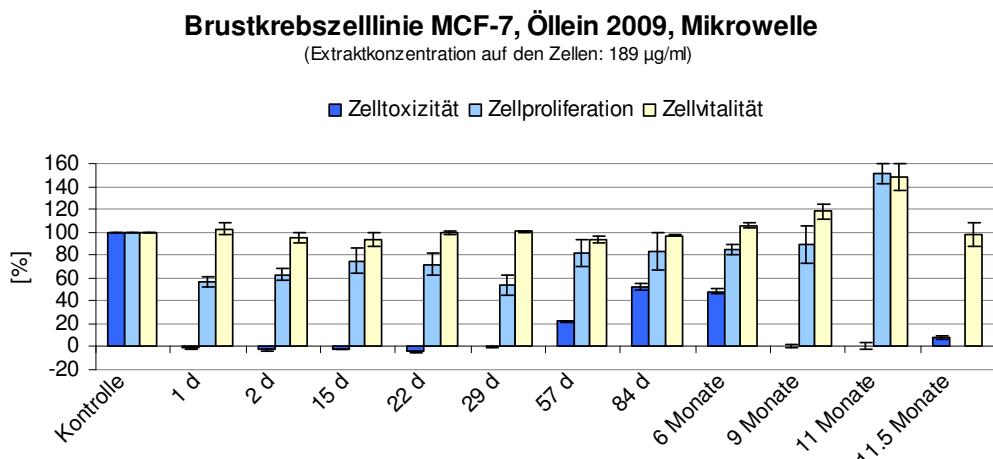


Abb. 5- 8: Wirksamkeitsuntersuchungen des Leinwurzelextraktes in Abhängigkeit des Lagerzeitraumes auf die Brustkrebszelllinie MCF-7. Mittelwert ± Standardabweichung (n=4)
Kontrollmessung für den LDH Test mit Triton. Kontrollmessung für den BrdU Test mit Ethanol, keine BrdU Untersuchung nach 11.5 Monaten. Kontrollmessung für den MTT Test mit Ethanol.

Der LDH Test (dunkelblau) beschreibt die Zytotoxizität des Extraktes. Die Kontrollmessung zeigt, dass bei Zugabe von Triton ein 100 % -iger Zelltod der MCF-7 Zelllinien erreicht wird. Bei der Zugabe des Leinwurzelextraktes erkennt man, dass erst nach ca. 57 Tagen Lagerung des Extraktes, die Zytotoxizität auf die Brustkrebszelllinie MCF-7 zunimmt. Diese steigt dann leicht über einen kurzen Zeitraum an, nimmt jedoch mit dem Alter des Extraktes wieder stark ab. Das alleine zeigt schon, dass die strukturelle Veränderung der Inhaltsstoffe einen Einfluss auf die Zelllinie hat. Die zunächst vorhandenen Inhaltsstoffe des Leinwurzelextraktes haben keine zytotoxischen Eigenschaften. Durch die strukturellen Veränderungen der Inhaltsstoffe wie z.B. der Zerfall in kleinere Massenfragmente oder die Bildung von Abbauprodukten mit einer kleineren Masse nimmt die zytotoxische Eigenschaft der Inhaltstoffe zu und 20-50 % der MCF-7 Zellen sterben.

Dieser Zusammenhang spiegelt sich auch in der Zellproliferation (BrdU Test, hellblau) wieder. Die Kontrollmessung beschreibt das Zellwachstum unter dem Einfluss des Lösungsmittels Ethanol. Die Untersuchung mit dem Leinwurzelextrakt zeigt, dass das Zellwachstum der Brustkrebszelllinie MCF-7 zunächst um ca. 25 % bis sogar 40 % gehemmt wird. Nach ca. 57 Tagen Lagerung nährt es sich dem Zellwachstum der Kontrolle wieder an. Nach einer Lagerung von ca. 11 Monaten weist der Leinwurzelextrakt keinerlei zellwachstumshemmende Eigenschaften mehr auf. Dahingegen wird durch die Zugabe des überlagerten Leinwurzelextraktes das Zellwachstum der Brustkrebszelllinie MCF-7 stark gefördert, was durch eine starke Zunahme der Zellvitalität (MTT Test, gelb) bestätigt wird. Auch hier beschreibt die Kontrollmessung das normale Verhalten (Stoffwechselaktivität, Wachstum usw.) der Zelle unter dem Einfluss von Ethanol. Durch die Zugabe des Leinwurzelextraktes wird die Zellvitalität der MCF-7 Zelllinien kaum

beeinflusst. Aber mit Zunahme des Alters des Leinwurzelextraktes steigert sich auch die Zellvitalität, was wiederum mit den strukturellen Veränderungen der Inhaltsstoffe zusammenhängt.

Zusammenfassend kann man hier sagen, dass die Lagerung bei einer Temperatur von -27 °C nicht optimal ist. Es konnte gezeigt werden, dass der Anteil der Inhaltstoffe mit einer größeren Masse über den Verlauf der Lagerung abnimmt und dafür der Anteil der kleineren Massenfragmente zunimmt. Diese Veränderungen spiegeln sich vor allem in der Zunahme der toxischen Aktivität, gleichzeitig aber auch in der Abnahme der proliferationshemmenden Wirkung wieder. Die Inhaltstoffe werden durch die strukturelle Veränderung in ihrer Wirkung toxischer und durch den Zerfall in kleinere Massenfragmente verlieren die Inhaltstoffe auch ihren wachstumshemmenden Eigenschaften. Trotz alledem kann der Leinwurzelextrakt aber die ersten ein bis zwei Monate gut verwendet werden, da er nicht toxisch wirkt und das Wachstum der Brustkrebszelllinie MCF-7 stark hemmt.

5.2.2. Thermostabilität der Extrakte

Da die Herstellung der Extrakte unter Einfluss von Wärme passiert, musste auch der Einfluss der Temperatur auf die Inhaltstoffe der Extrakte untersucht werden. Hierfür wurde zunächst die Mikrowellenextraktion bei 60 °C mit einer herkömmlichen Rühretraktion bei Raumtemperatur verglichen. Für beide Ansätze wurde das gleiche Probenmaterial in der gleichen Menge abgewogen und mit der gleichen Menge vom Lösungsmittel extrahiert. Die Mikrowellenextraktion erfolgte mit der in Kapitel 4.3.1.2 beschriebenen Methode. Die Extraktion bei Raumtemperatur wurde über 24 h unter ständigem Rühren in einem verschlossenen 40 mL Glasvial durchgeführt. Die erhaltenen Extrakte wurden dann zum Vergleich mit Hilfe der LC-MS untersucht (Abb. 5- 9).

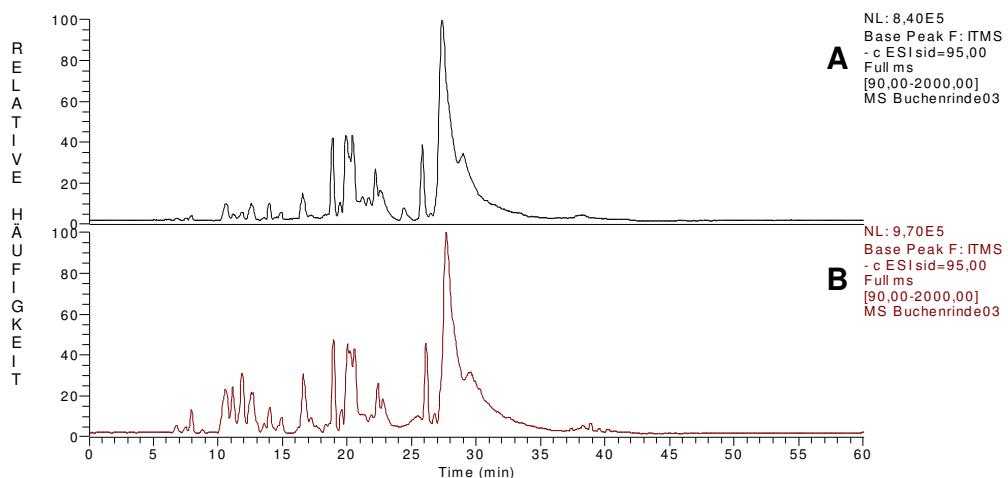


Abb. 5- 9: Einfluss der Temperatur auf die Inhaltsstoffe eines Buchenrindenextraktes. A: 24 h Extraktion unter Rühren bei Raumtemperatur. B: Mikrowellenextraktion bei 60 °C

Ein Vergleich beider Extrakte zeigt deutlich, dass der Einfluss durch die Erwärmung mit der Mikrowelle keinen negativen Effekt auf die Inhaltsstoffe hat. Es ist deutlich zu

erkennen, dass beide Chromatogrammprofile sich nur leicht voneinander unterscheiden. Vergleicht man die Intensitäten beider Chromatogramme miteinander, so ist festzustellen, dass die Erwärmung durch die Mikrowelle eher einen positiven Einfluss auf die Menge der extrahierten Inhaltsstoffe hat. So erreicht man bei einer Extraktion unter Einfluss der Raumtemperatur nur einen Normalisierungswert (NL) von nur 8,40E05. Bei der Extraktion unter Erwärmung durch Mikrowellen beträgt der NL-Wert 9,70E05. Das zeigt deutlich, dass die Inhaltsstoffe durch den Einfluss der Wärme mit einer höheren Intensität extrahiert werden als ohne.

Um diesen Einfluss noch genauer zu untersuchen, sind einige käuflich erworbene Standardsubstanzen ebenfalls verschiedenen Temperaturen ausgesetzt worden, um sie dann mit der LC-MS qualitatativ auf strukturelle Veränderungen untersuchen zu können. Dazu sind ethanolische Standardlösungen, mit einer Konzentration von jeweils 1 mg/ mL, einfacher Flavonoid-Aglycone und einfach bzw. mehrfach glycosidisch gebundener Flavonoide mehrere Stunden (5, 10, 15, 20 und 70 h) in verschlossenen Vials in einem Temperaturblock (Thermo Scientific) gestellt worden und ständig einer definierten Temperatur von 65 °C ausgesetzt worden. Eine Übersicht der untersuchten Phytostandards und deren Strukturen sind im Anhang (Abb. A- 2) hinterlegt. Um Veränderungen durch Temperatureinflüsse feststellen zu können, wurden die Standards mit Hilfe der LC-MS analytisch untersucht, um einen möglichen Zerfall der Substanzen durch Fragmentierungen in den Massenspektren und neu auftretenden Peaks im Chromatogramm durch Zerfall oder Veresterung der Komponenten beobachten zu können.

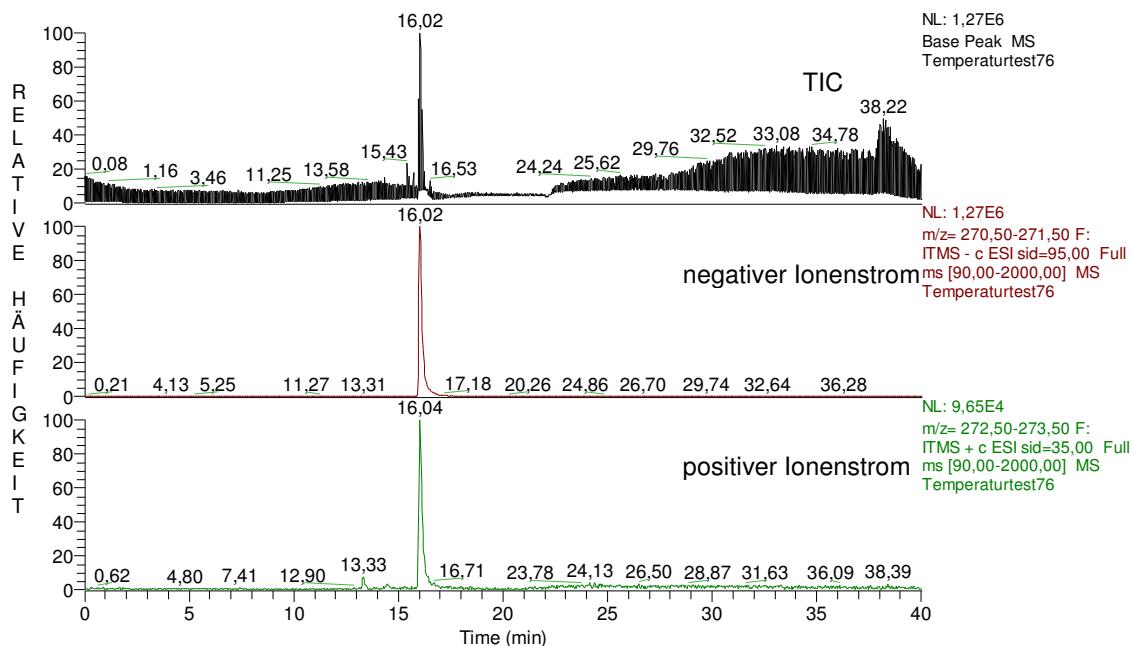


Abb. 5- 10: Chromatogramme einer ethanolischen Naringeninstandardlösung (1 mg/ mL) ohne Temperatureinfluss, Oben: Totaler Ionenstrom (TIC), Mitte: Negativer Ionenstrom, Unten: Positiver Ionenstrom

In Abbildung 5-10 ist beispielhaft das Chromatogramm einer ethanolischen Naringeninstandardlösung (1 mg/mL) dargestellt. Man kann deutlich erkennen, dass sowohl im negativen als auch im positiven Ionenstrom ein Peak für Naringenin bei einer Retentionszeit von ca. 16,00 min auftritt. Durch die unterschiedlichen Ionisierungsmöglichkeiten kann die gleiche Substanz mit zwei unterschiedlichen Massenspektren dargestellt werden (Abb. 5-11). So wird die Standardsubstanz Naringenin bei einer negativen Ionisierung deprotoniert. Dadurch erhält man einfach geladene Ionen der Art $[M-H^+]$ als Massenfragmente (Abb. 5-11 A). Da die Molekülmasse von Naringenin 272 g/mol beträgt. Ist bei einer negativen Ionisierung nach dem eben beschriebenen Mechanismus ein $m/z = 271$ zu erwarten. In Abbildung 5-11 A ist das zu erwartende Masse/Ladungsverhältnis klar erkennbar.

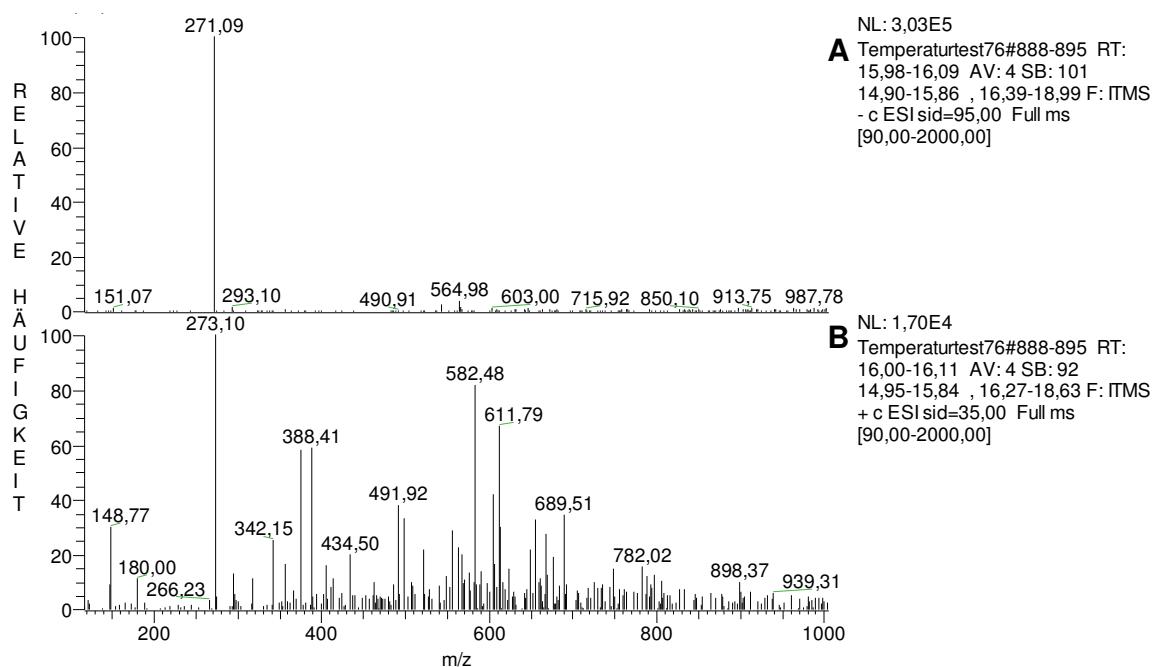


Abb. 5-11: Massenspektrum einer ethanolischen Naringeninstandardlösung (1 mg/ mL) ohne Temperatureinfluss bei negativer (A) und positiver (B) Ionisierung

Bei einer positiven Ionisierung hingegen wird die Substanz protoniert und man erhält $[M+H^+]^+$ als Massenfragment. Im Fall von Naringenin kann man im Massenspektrum der Abbildung 5-11 B ein $m/z = 273$ erkennen, welches deutliche eine Protonierung der Molekülmasse von 272 g/mol durch H^+ (= 1 g/mol) anzeigt.

Da die Temperatur Auswirkungen auf die Struktur von Substanzen haben kann, wird durch den Vergleich der Massenspektren und Chromatogramme abschätzbar, ob es zur Strukturveränderungen kommt oder nicht. Abbildung 5-12 zeigt alle Massenspektren von Naringenin bei einer negativen Ionisierung im Vergleich nach einem Temperatureinfluss von 65 °C über mehrere Stunden. Wie man sieht kommt es durch den Temperatureinfluss zu keiner strukturellen Veränderung von Naringenin, da in jedem Massenspektrum das typische Masse/Ladungs-Verhältnis (m/z) von 271 zu finden ist. Alle Massenspektren sind

nahezu identisch. Auffallend ist die Masse $m/z = 542$ in allen Spektren. Diese steht für ein Dimer von Naringenin mit dem Massenfragment $[M+271]$, welches durch die Elektronspray-Ionisierung bei einem Überschuss an Naringenin in der Standardlösung gebildet werden kann. Da die anderen untersuchten Aglycone wie Hesperitin, Quercetin, Isorhamnetin und Kaempferol ebenfalls keine Veränderung im Massenspektrum zeigten, ist davon auszugehen, dass einfache Aglycone in einer ethanolischen Lösung ohne Matrixeffekte durch den hier untersuchten Temperatureinfluss strukturell nicht verändert werden.

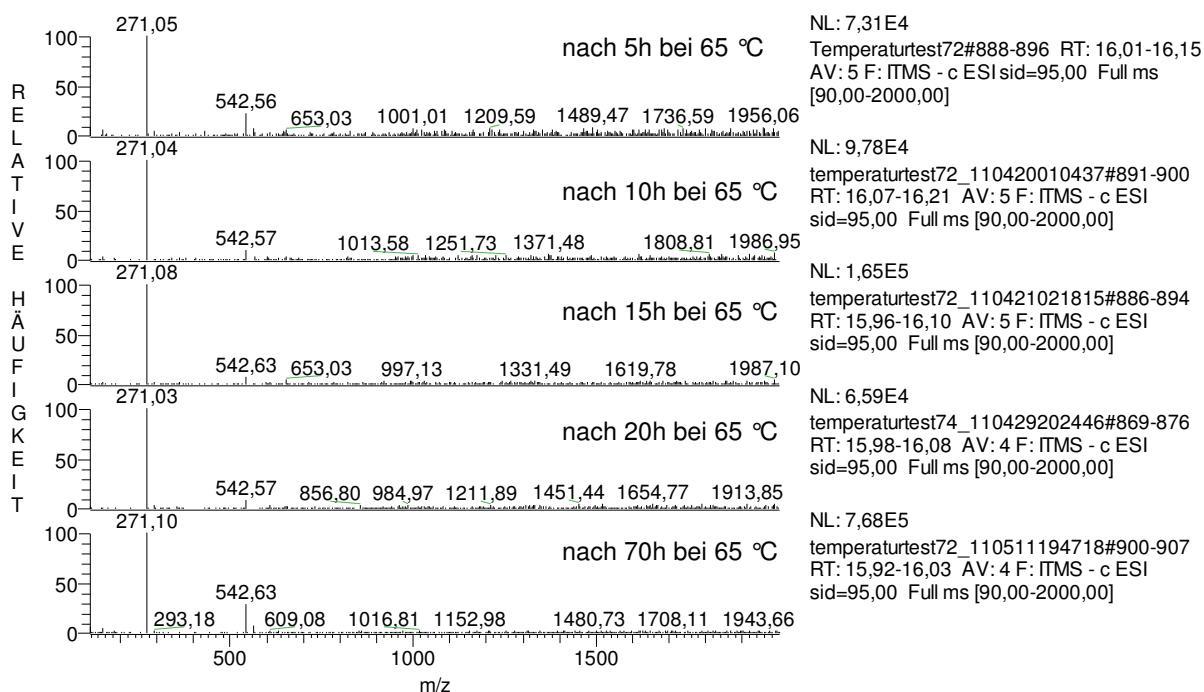


Abb. 5- 12: Massenpektralvergleich einer ethanolischen Naringeninstandardlösung (1 mg/mL) nach der Lagerung bei 65 °C über verschiedenen Zeiträume

Da aber viele sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe als einfach oder mehrfach glycosidisch gebundene Moleküle vorliegen, wurden die gleichen Untersuchungen wie an den Aglyconen auch an den Glycosiden durchgeführt (Abb. 5- 13). Wie die Abbildung 5-13 zeigt, ergaben diese Untersuchungen keine anderen Resultate. Auch für Quercetin (Quercetin-3-rhamnosid, MW = 448 g/mol), ein Flavonglycosid, sind keine strukturellen Veränderungen durch einen Temperatureinfluss festgestellt worden. Die negativen Ionenströme sind in einem Vergleich fast identisch miteinander. Man findet vor und nach der Lagerung bei einer Temperatur von 65 °C (Abb. 5- 13) die gleichen Massenfragmente. So hat man bei einer negativen Ionisierung das Hauptfragment $[M-H^+]$ mit einem $m/z = 447$. Durch die Abspaltung des Zuckers entsteht das Fragment $[M-147]$ mit einem $m/z = 300$, welches für das deprotonierte Flavonol Quercetin steht. Die Masse $m/z = 894$ ist das Fragment $[M+447]$, ein Dimer des Quercertrins. Dieses kommt durch die Elektronspray-Ionisierung zu Stande, bei der es durch hoch konzentrierte Standardlösungen zu Dimerbildung kommen kann.

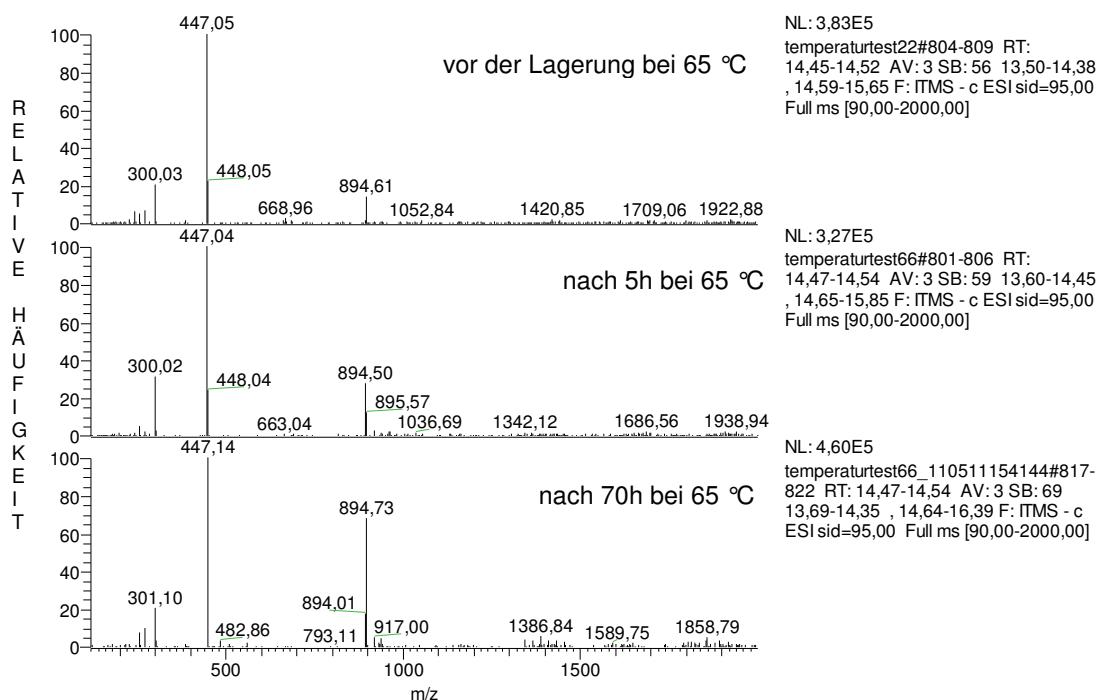


Abb. 5- 13: Massenspektrenvergleich einer ethanolischen Quercetrinstandardlösung (1 mg/mL) vor und nach der Lagerung bei 65 °C über verschiedene Zeiträume

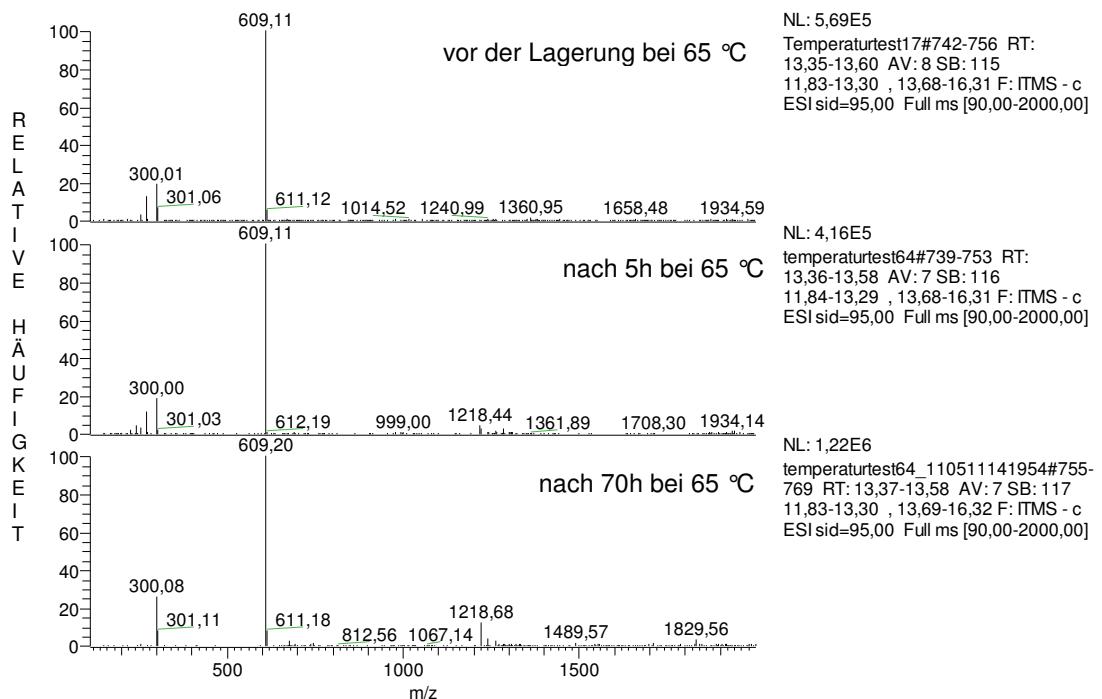


Abb. 5- 14: Massenspektrenvergleich einer ethanolischen Rutinstandardlösung (1 mg/ mL) vor und nach der Lagerung bei 65 °C über verschiedene Zeiträume

Auch das diglycosidisch gebundene Flavonoid Rutin (Quercetin-3-O-rutinosid, MW = 610,52 g/mol) hat in den Thermostabilitätsuntersuchungen keine Veränderungen in den typischen Fragmentmassen aufgezeigt (Abb. 5- 14). So kann auch hier in jedem Massenspektrum das Hauptfragment [M-H⁺] mit einem m/z = 609 gefunden werden

(Abb. 5- 14). Auch die Abspaltung des Disaccharids Rutinose, welches sich aus Rhamnose und Glucose zusammensetzt, ist in jedem Massenspektrum gleich und auch gut zu erkennen. Das Fragment [M-309] zeigt deutlich die Abspaltung der Rutinose, welches zum einfachen Flavonid Quercetin, mit einem $m/z = 300$ führt (Abb. 5- 14).

Auch die Untersuchungen von Naringin und Hesperidin zeigten keine strukturellen Veränderungen durch die ständige Lagerung bei 65 °C.

Zusammenfassend ist also zu sagen, dass eine Mikrowellenextraktion der Pflanzeninhaltsstoffe bei einer Temperatur von 60 °C über ca. zehn bis dreißig Minuten keinen nachgewiesenen Einfluss auf die Inhaltsstoffe hat. Die zuvor dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, dass die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe selbst bei einem längerem Temperatureinfluss von 65 °C keinerlei strukturelle Veränderungen aufzeigen, da weder im Massenspektrum noch im Chromatogramm mögliche Veresterungen bzw. Bruchstücke der Ausgangskomponente nachgewiesen werden konnten.

5.3. Untersuchung der Pflanzeninhaltsstoffe

Um feststellen zu können, welche Inhaltsstoffe im Hinblick auf eine mögliche Antikrebswirkung auf die Brustkrebszellen von Bedeutung sind, müssen diese identifiziert werden. Im Folgenden werden die Ergebnisse der Untersuchung der einzelnen Pflanzensorten dargestellt, erläutert und ausführlich diskutiert.

5.3.1. Die Leinwurzel (*Linum usitatissimum*)

Um die Inhaltsstoffe der Leinwurzel untersuchen zu können, sind ethanolische Extrakte mit Hilfe der Mikrowellentechnik hergestellt und mit LC-MS untersucht worden. Für die inhaltsstofflichen Untersuchungen standen zwei verschiedene Leinwurzeltypen zur Verfügung. Zum einem der Faserlein, der im Freiland unter landwirtschaftlichen Bedingungen gewachsen ist, zum anderen der Öllein der Sorte „Barbara“, dessen Samen 2005 von der Landwirtschaftlichen Untersuchungs- und Forschungsanstalt (LUFA, Rostock) erworben wurde, um sie dann ebenfalls unter Freilandbedingungen auf dem Gelände der Biowissenschaften der naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Rostock anbauen zu können.

In Abbildung 5-15 sind die typischen Fingerprintchromatogramme der verschiedenen Leinwurzelsorten, Öllein und Faserlein, dargestellt, die sich nach der ethanolischen Extraktion der Wurzeln mit Hilfe einer Mikrowelle ergeben. Wie man sieht, unterscheiden sich beide Chromatogramme vor allem in der Intensität aber auch in der Zusammensetzung voneinander. Diese Unterschiede sind jedoch im Rahmen der Schwankungen zwischen den Arten und berücksichtigen somit die Sortenspezifität beider Leinwurzeltypen. Auch unterschiedliche Witterungseinflüsse und unterschiedliche Erntezeitpunkte der Pflanzen können dazu führen, dass sich Inhaltsstoffe in verschiedener Konzentration in der Pflanze ausbilden können. Da die Wurzel des Öleins jedoch innerhalb des Projektes selbst angepflanzt, geerntet und teilweise zellbiologisch

untersucht worden ist, wurde auch die inhaltsstoffliche Analyse hauptsächlich an dieser Leinwurzelsorte durchgeführt.

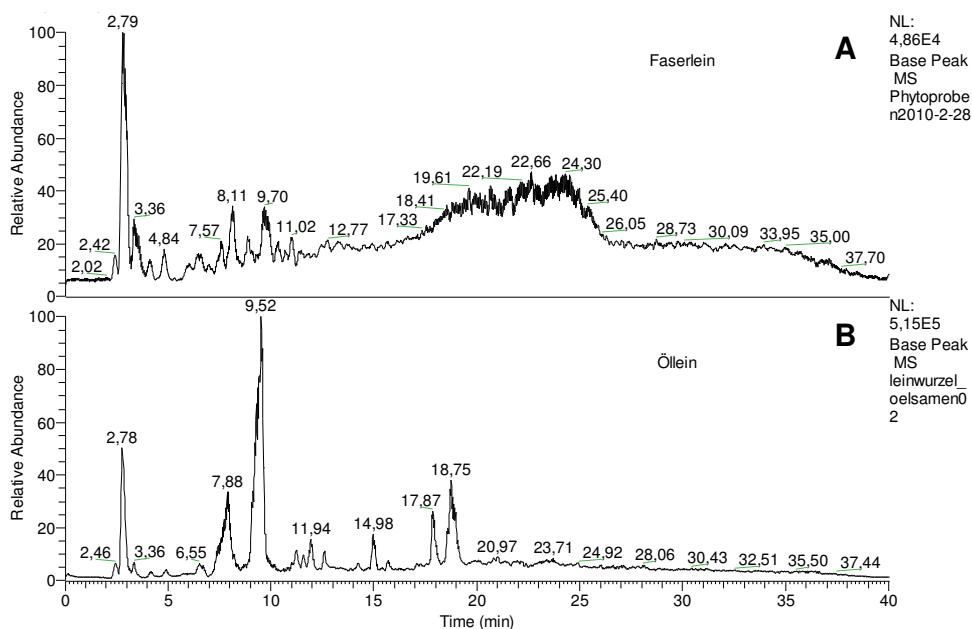


Abb. 5- 15: LC-Chromatogramme von ethanolischen Mikrowellenextrakten des Faser- (A) und Ölleins (B)

5.3.1.1. Untersuchung der Inhaltsstoffe

In der Leinpflanze und auch in der Wurzel findet man neben Wasser vor allem Flavonoide, Lignane, Aminosäuren, Kohlenhydrate und Lipide [137]. Vorhergehende Untersuchungen [138, 139] konnten zeigen, dass nicht nur die Wachstumsbedingungen, sondern auch unterschiedliche Erntezeitpunkte der Leinpflanzen einen Einfluss auf die Quantität der Inhaltsstoffe der Wurzel haben können. So konnte festgestellt werden, dass vor allem ältere Pflanzen einen höheren Anteil an Flavonoiden und Lignanen enthalten [138]. Die Wurzeln von jüngeren Pflanzen hingegen, enthalten im Vergleich nur ein Drittel soviel Flavonoide und sogar nur ein zehntel soviel Lignane (Tab. 5- 2).

Tab. 5- 2: Auflistung der Anteile der Substanzklassen in der Leinwurzel in Abhängigkeit unterschiedlicher Erntezeitpunkte (ermittelt mit Hilfe von Pyrolyse-Feldionisationsmassenspektrometrie/Totalintensität in %) [138]

Substanzklassen	3 Wochen alte Wurzel	6 Wochen alte Wurzel	9 Wochen alte Wurzel
Flavonoide	0,4 %	0,8 %	1,3 %
Lignane	0,3 %	2,2 %	3,0 %

Aus diesem Grund sind hauptsächlich die Wurzeln von älteren Pflanzen zum Zeitpunkt der Samenbildung bezüglich ihrer Zusammensetzung massenspektrometrisch untersucht worden. Ein typisches LC-Chromatogramm der Wurzeln zu diesem Erntezeitpunkt ist in Abbildung 5-16 dargestellt.

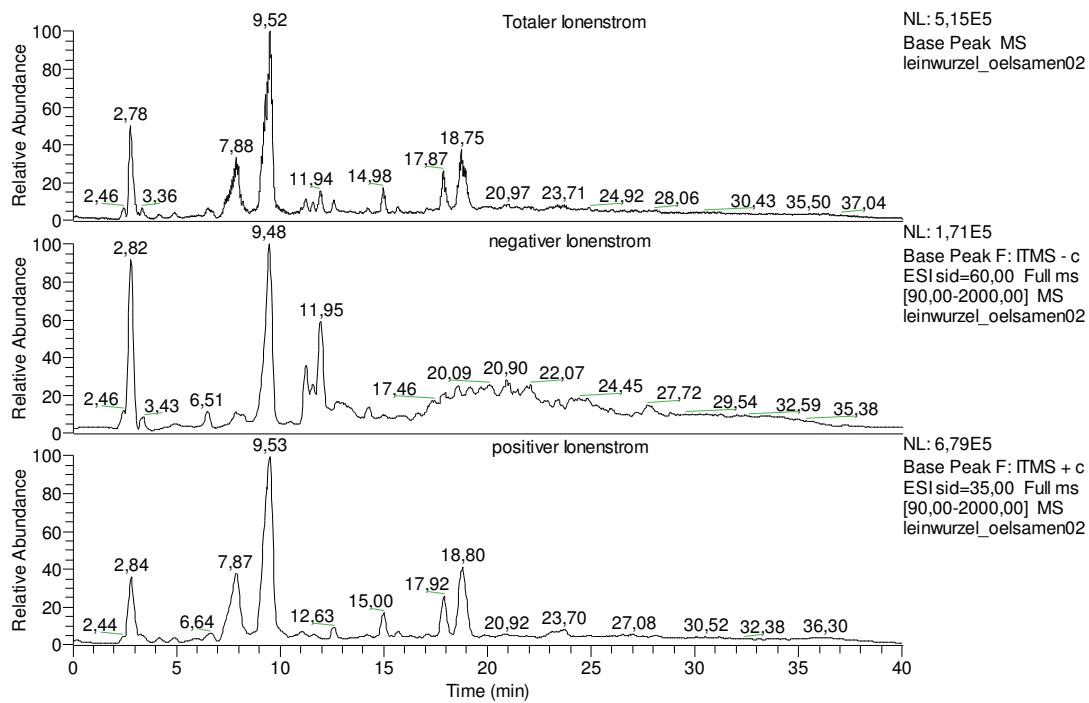


Abb. 5- 16: Chromatogramm eines ethanolischen Leinwurzelextraktes des Öleins (Erntezeitpunkt: April – August 2009 – Zeitpunkt der Samenbildung), Oben: Totaler Ionenstrom (TIC), Mitte: negativer Ionenstrom, Unten: positiver Ionenstrom

Man kann deutlich erkennen, dass sich das LC-Chromatogramm des negativen und positiven Ionenstroms voneinander unterscheiden. Da die unterschiedlichen Inhaltsstoffe nicht alle gleich gut positiv oder negativ ionisiert werden, entstehen die unterschiedlichen LC-Chromatogramme in den einzelnen Scanmodi (Abb. 5- 16). Durch ausführliche Analysen der gemessenen Chromatogramme und unter Zuhilfenahme von verschiedenen Massenspektren einzelner Standardsubstanzen und Literaturdaten, konnten einzelne Inhaltsstoffe der Leinwurzel identifiziert und ihre Struktur bestimmt werden.

Die LC-MS Messungen haben gezeigt, dass es sich bei dem ethanolischen Wurzelextrakt um ein Gemisch vieler komplexer Inhaltsstoffe handelt. Vorangegangene Untersuchungen haben gezeigt, dass als so genannte Phytoöstrogene hauptsächlich Lignane und Isoflavone im Wurzelextrakt vorhanden sind [31, 140]. So konnten die Massenspuren von Secoisolariciresinol im ethanolisch Leinwurzelextrakt nachgewiesen werden (Abb. 5- 17), ein Lignan welches sich durch einen dimeren Phenylpropanoid-Körper auszeichnet (Abb. 5- 18, 1) und im Chromatogramm mit einem Peak bei einer Retentionszeit von ca. 6,43 min eluiert (Abb. 5- 17). Im Massenspektrum des negativen Ionenstroms ist hierfür das zugehörige Massenfragment $[M-H^+]$ mit einem Wert von 361 Atomic Mass Units (amu) zu finden (Abb. 5- 17).

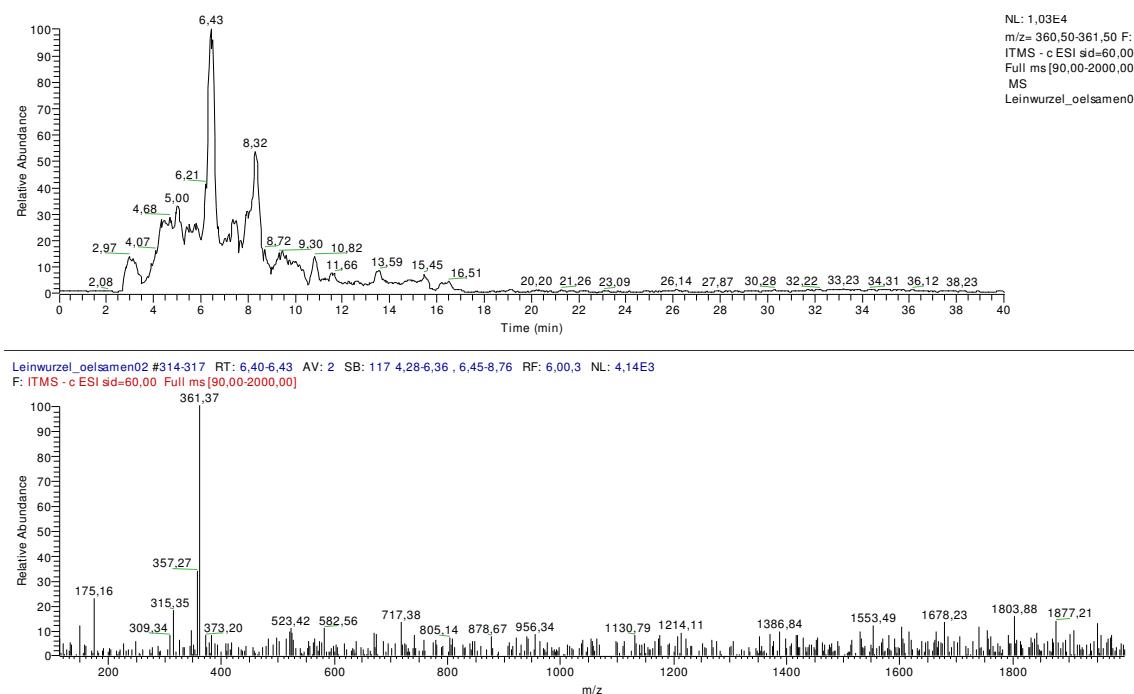


Abb. 5- 17: Chromatogramm der isolierten Massenspur m/z = 361 (oben) und dazugehöriges Massenspektrum von Secoisolariciresinol (unten)

Neben Secoisolariciresinol konnten noch weitere Lignane wie Matairesinol (**2**), Pinoresinol (**3**), Lariciresinol (**4**), Isolariciresinol (**5**) und Arctigenin (**6**) nachgewiesen werden (Abb. 5- 18, **2-6**). All diese Verbindungen zeichnen sich durch dimere Phenylpropanoid-Körper aus, die über ein mittleres C-Atom miteinander verbunden sind. Somit können sie eindeutig der Stoffgruppe der Lignane zugeschrieben werden.

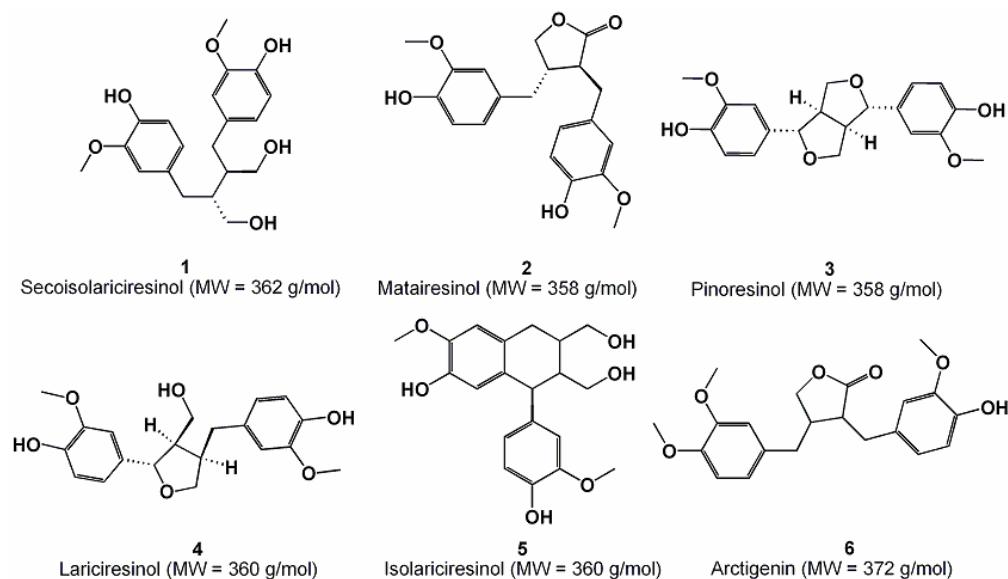


Abb. 5- 18: Strukturen der nachgewiesenen Lignane im ethanolischen Leinwurzelextrakt

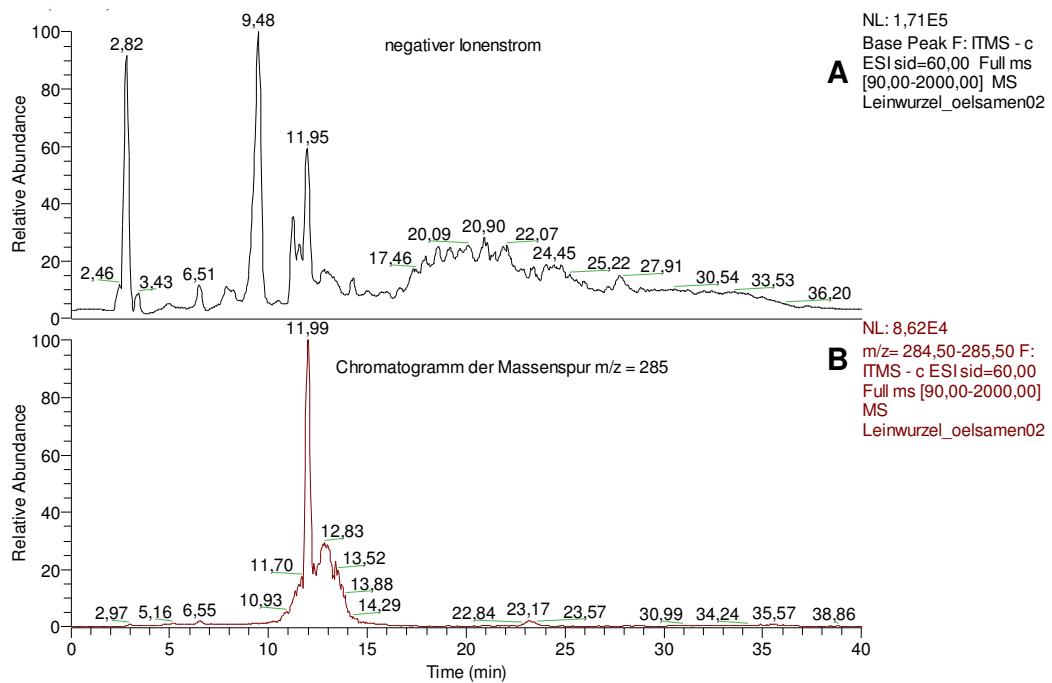


Abb. 5- 19: Chromatogramm von Fisetin im ethanolischen Leinwurzelextrakt, A: negativer Ionenstrom des Leinwurzelextraktes, B: Chromatogramm der isolierte Massenspur für Fisetin (MW = 286 g / mol)

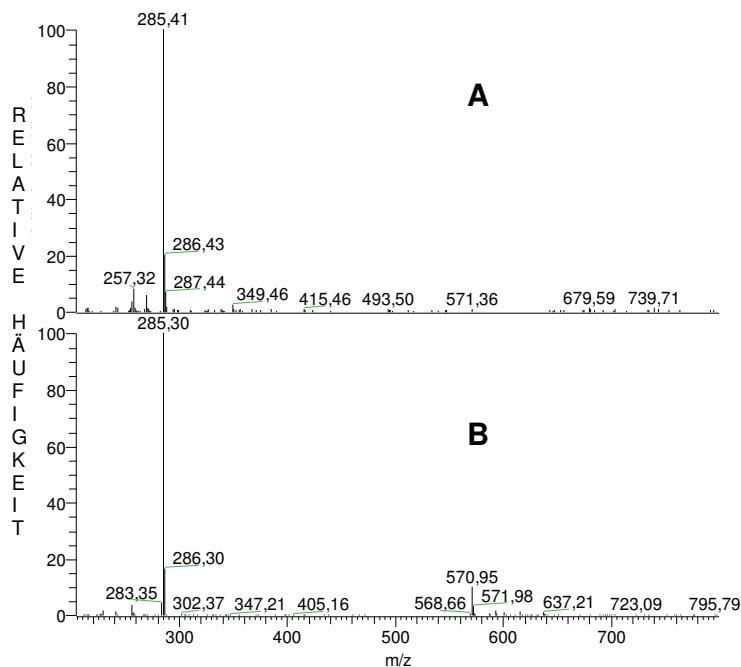


Abb. 5- 20: A: Massenspektrum der Komponente Fisetin im Leinwurzelextrakt, B: Massenspektrum des Standards Fisetin

Des Weiteren konnten auch Flavonoide nachgewiesen werden. Unter anderem Fisetin (3, 3', 4', 7-Tetrahydroxyflavon), ein Flavonol, dessen Massenspur im negativen Ionenstrom gefunden werden konnte. Abbildung 5-19 zeigt das Chromatogramm des negativen Ionenstroms des ethanolischen Leinwurzelextraktes. Fisetin eluiert mit einer

Retentionszeit von ca. 11,95 min mit einer mittleren Intensität im Vergleich zu den anderen Peaks (Abb. 5- 19). Mit Hilfe von Xcalibur® ist es jedoch möglich einzelne Massenspuren in einem Chromatogramm darzustellen. Durch die Isolierung der Massenspur $m/z = 285$ (Abb. 5- 19) wird deutlich, das Fisetin mit einer Retentionszeit von ca. 12 min als Peak im Chromatogramm zu sehen ist. Ein Vergleich mit dem Massenspektrum des Standards Fisetin bestätigt, dass es sich um dieses Flavonol handelt (Abb. 5- 20).

Auch optisch kann man am Extrakt das Vorhandensein von Fisetin erkennen. Dieses Flavonol besitzt eine grün fluoreszierende Eigenschaft [141], welche in ethanolischen Lösungen sichtbar wird. Auch das Leinwurzelextrakt hat diese leicht grün fluoreszierende Eigenschaft, welche als optischer Hinweis auf Fisetin gewertet werden kann (Abb. 5- 21).



Abb. 5- 21: leicht grün fluoreszierendes ethanolisches Leinwurzelextrakt

Auch andere Flavonoide wie Daizein, Glycitein und Biochanin A konnten massenspektrometrisch nachgewiesen werden. Eine Übersicht der sicher identifizierten sekundären Pflanzeninhaltsstoffe in der Leinwurzel und deren Strukturen sind der Tabelle A- 1 sowie der Abbildung A- 14 im Anhang zu entnehmen.

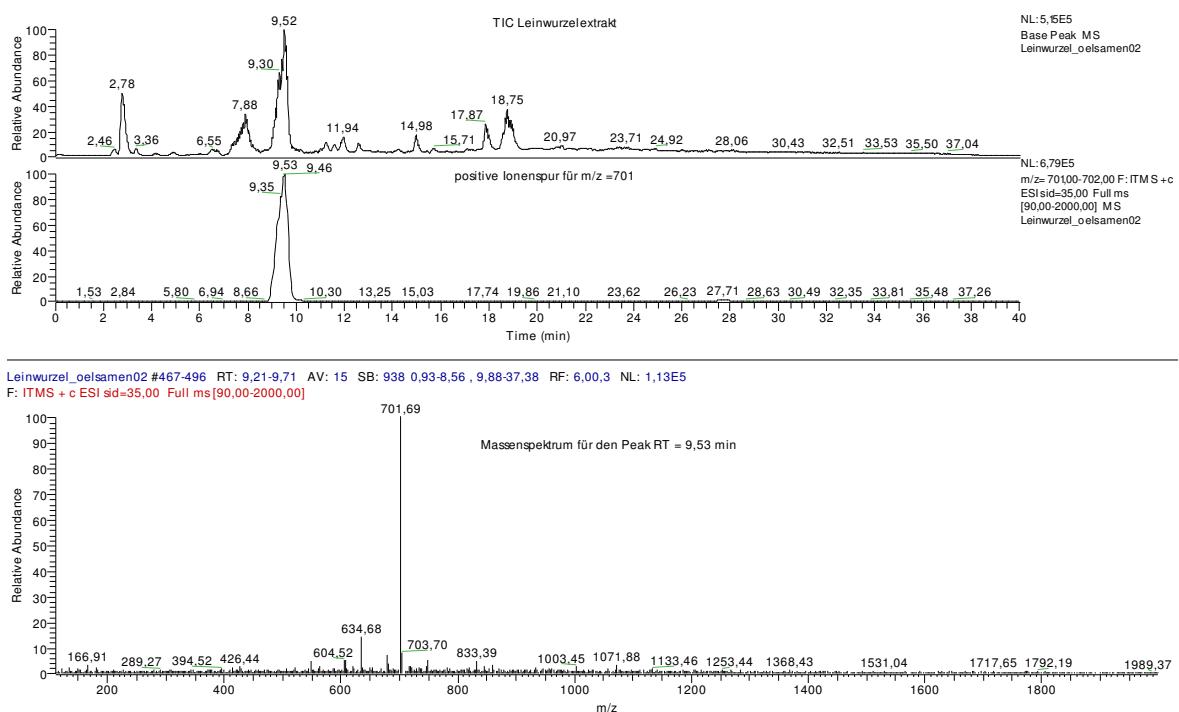


Abb. 5- 22: Chromatogramm (TIC) und isolierter Peak in der positiven Ionenspur (oben) sowie das dazugehörige Massenspektrum für den Peak RT = 9,53 min (unten)

Im Einzelfall konnten gefundene Massenspuren nicht direkt mit Hilfe von Standards oder Literaturdaten identifiziert werden. Bei genauer Betrachtung des Leinwurzel-Chromatogramms ist der Peak mit einer Retentionszeit von ca. 9,52 min auffällig, da er die höchste Intensität besitzt (NL: 5,15E05). Im Chromatogramm der positiven Ionenspur verbirgt sich ein Masse/Ladungsverhältnis von 701 amu dahinter (Abb. 5- 22).

Ein Vergleich mit Datenbanken, Standards und verschiedenen Literaturdaten konnte zunächst keinen Aufschluss geben, um was für eine Substanz es sich hierbei handeln könnte. Erst durch direkte Injektion der Extrakte in das Massenspektrometer konnten Hinweise gefunden werden. Durch diese Spritzenpumpenmessungen war es möglich die unbekannte Masse zu fragmentieren. So wurden zunächst alle Ionen mit einer Masse von 701 amu in der Ionenfalle gesammelt, um sie dann mit einer Energie von 20 % zu beschließen, damit sie fragmentieren. Dabei ist folgendes Massenspektrum entstanden.

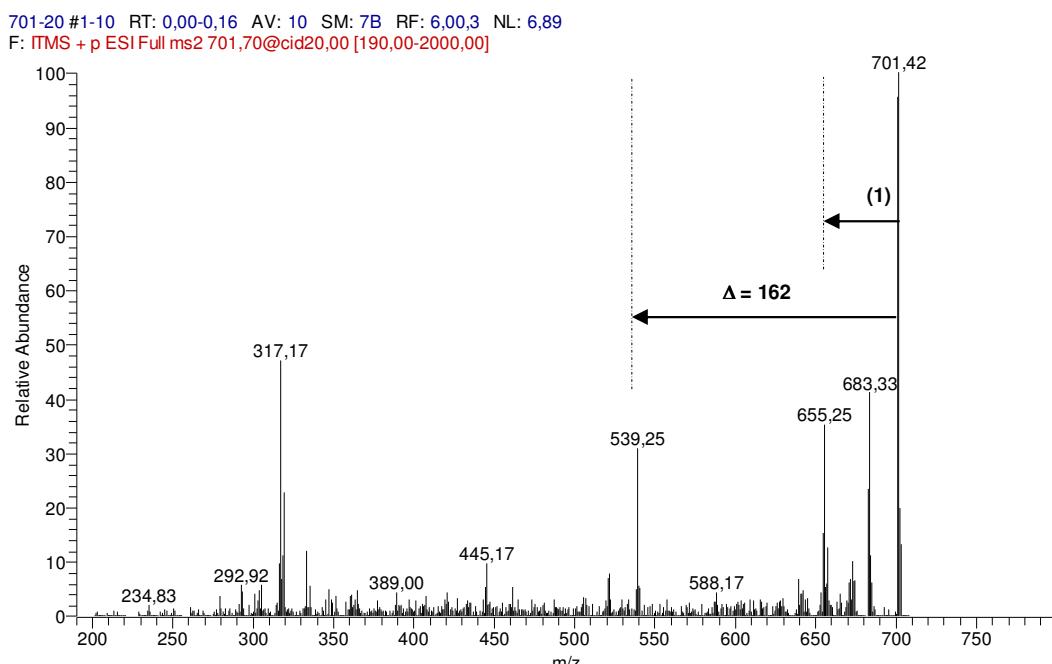


Abb. 5- 23: MS^2 -Massenspektrum ITMS + p ESI Full ms2 701,70@cid20,00 [190,00-2000,00]

Durch die Entstehung neuer Massenfragmente mit einem Wert von 683,33 amu, 655,25 amu und 539,25 amu ist die Fragmentierung deutlich zu erkennen. Durch die Differenz von 18 amu ($m/z = 701,42 \rightarrow m/z = 683,33$) wird die Abspaltung eines OH^- -Fragments gezeigt. Dieses lässt erwarten, dass der Wert von 701 amu, dem mit Wasser gebildeten Addukt $[\text{M}+\text{H}_2\text{O}]^+$ der unbekannten Struktur entspricht. So etwas ist möglich, wenn es zwischen Analyt- und Eluentmolekülen zur Adduktbildung kommt. Die Massendifferenz von 46 amu könnte eine Abspaltung einer Ethoxyverbindung sein (Abb. 5- 23, 1). Ebenso ist in der unbekannten Struktur eine glycosidische Bindung vorhanden, da auch die Abspaltung von einem Glycosid mit einer Differenz von 162 amu im Massenspektrum nachgewiesen werden kann (Abb. 5- 23). Durch eine Erhöhung der

Energie um 15 % und einer weiteren MS^n -Fragmentierung des 701 amu Fragmentes auf 539,00 amu wird der vollständige Zerfall der ursprünglichen Struktur erreicht (Abb. 5- 24).

Auch hier entstehen neue Massenfragmente bzw. schon bereits vorhandene Fragmente, wie z.B. das Fragment 539, werden im Vergleich zur MS^2 -Fragmentierung (Abb. 5- 23, Abb. 5- 24) in ihrer Intensität höher. Auch in der MS^3 -Fragmentierung konnte ein weiteres Glycosid nachgewiesen werden, da auch hier die Abspaltung von 162 amu nachgewiesen werden konnte (Abb. 5- 24) Da hier zwei Zuckerreste im einzelnen abgespalten werden, kann man nach Erfahrungswerten davon ausgehen, dass diese auch jeweils einzeln an die gesuchte Struktur gebunden sein müssen. Bei einer Diglycosidischen-Bindung werden überwiegend Massendifferenzen von 309 amu gefunden (Abb. 5- 14).

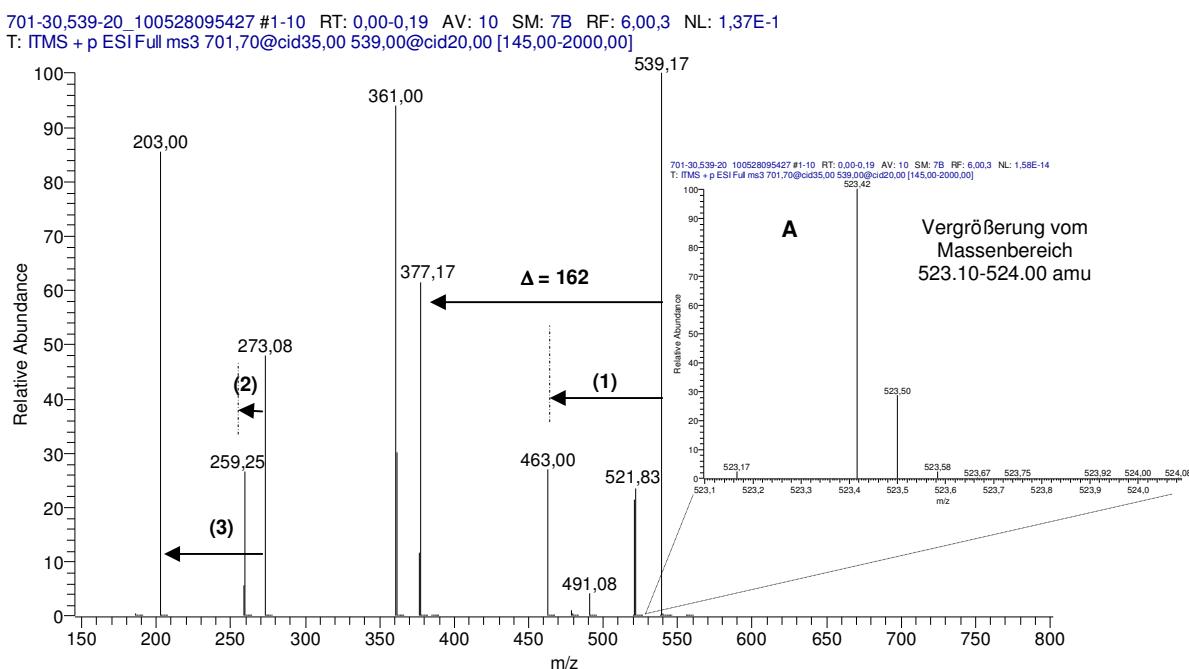


Abb. 5- 24: MS^3 -Massenspektrum ITMS + p ESI Full ms3 701,70@cid35,00; 539,00@cid20,00 [145,00 – 2000,00]; A: Vergrößerung des Massenbereichs von 523,10 amu bis 524,00 amu

Des Weiteren ist hier auch eine Abspaltung eines Phenyl-Restes (1), einer Propansauerstoffverbindung (3) und eines CH_2 -Restes (2) zu erkennen (Abb. 5- 24). Auch der Wert 361 amu, welcher bei der kompletten Fragmentierung der unbekannten Struktur entsteht, könnte vom Lignan Secoisolariciresinol (MW = 362 g/mol) stammen. Nach ausführlicher Überlegung und Abgleichung mit massenspektrometrischen Untersuchungen bekannter Standards, könnte es sich bei dieser Struktur um den Grundkörper des Lignans Secoisolariciresinol handeln, welcher zweifach glycosidisch gebunden ist, wobei einer der Zuckerreste eine Methoxy-Bindung enthalten muss. Die mögliche Struktur ist in Abbildung 5-25 dargestellt. Mit Hilfe der Mass Frontier Software konnte zur Kontrolle eine Fragmentierung der vermuteten Struktur simuliert werden. So wird durch positive Elektronsprayionisation die Struktur protoniert und das Massenfragment $[M+H]^+$ mit dem Wert 701 amu entsteht (Abb. 5- 23, Abb. 5- 25).

Ausgehend von diesem Fragment, können weitere Abspaltungen und Ladungsumlagerungen zu weiteren kleineren Fragmenten führen. So führt, wie schon vermutet, die Abspaltung von Wasser zum Wert 683 amu (Abb. 5- 23, Abb. 5- 25). Eine anschließende Abspaltung von einem Zuckerfragment kann zum wiederum kleineren Massenfragment mit dem Wert von 521 amu führen (Abb. 5- 24). Eine andere Form der Wasserstoffumlagerung und Abspaltung kann die Bildung des Massenfragments mit dem Wert 655 amu (Abb. 5- 25) ergeben, welche wiederum als eines der Hauptfragmente im Massenspektrum sichtbar ist (Abb. 5- 23).

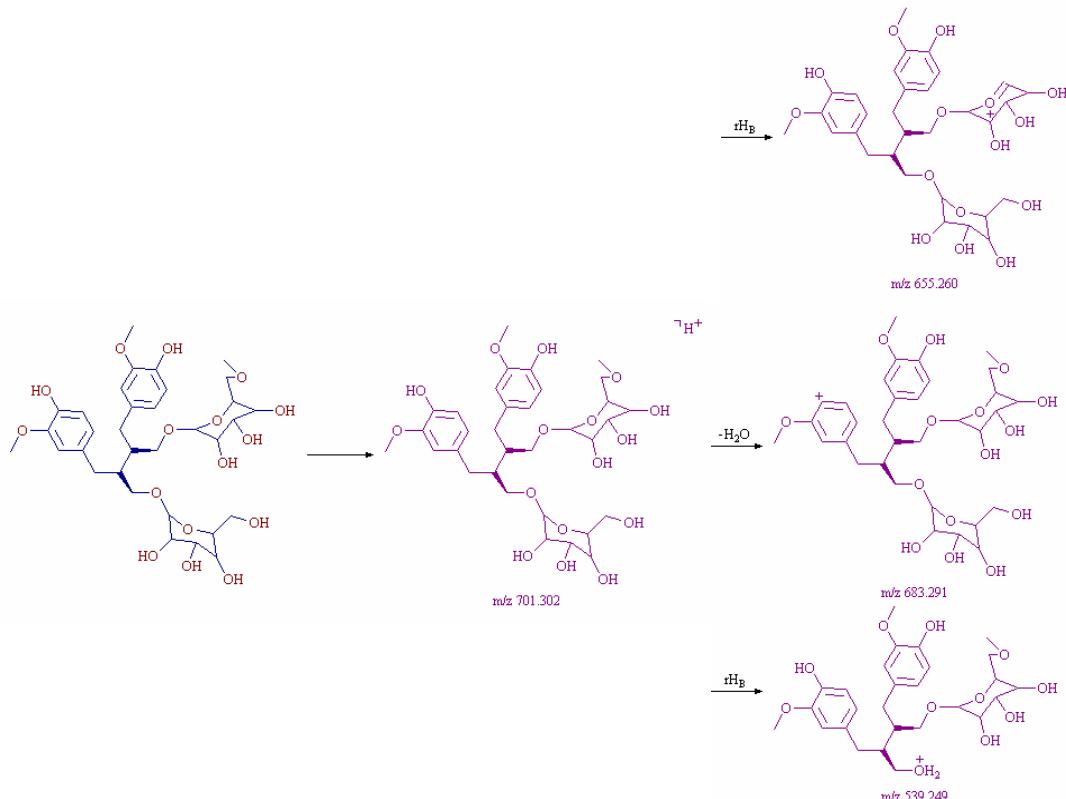


Abb. 5- 25: Simulierte Fragmentierung der vermuteten Struktur von Secoisolariciresinoldiglycosid und mögliche Entstehungswege für die einzelnen Massenfragmente

Die direkte Zuckerabspaltung vom Hauptfragment $[M+H^+]$ = 701 amu und anschließende α, β -Wasserstoffumlagerung führt zum Massenfragment $[M-162]^+$ mit dem Wert 539 amu (Abb. 5- 25). Weitere Wasserstoffumlagerungen können auch hier die Bildung vom kleineren Nebenfragment mit 521 amu bestätigen (Abb. 5- 26).

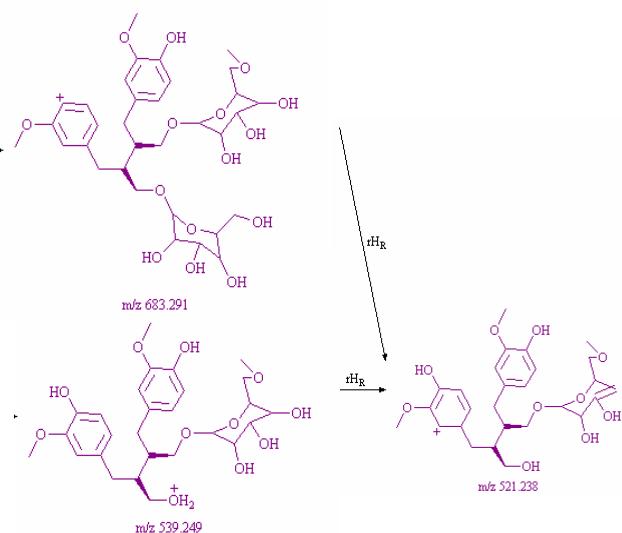


Abb. 5- 26: Simulierte MS³-Fragmentierung der vermuteten Struktur von Secoisolariciresinoldiglycosid und mögliche Entstehungswege für das Massefragment mit einem Wert von 521 amu

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es nach der ersten direkten Zuckerabspaltung und Wasserstoff- sowie Ladungsumlagerung gleich das zweite Zuckerfragment abgespalten wird. Hierdurch entsteht dann das Grundgerüst der Struktur Secoisolariciresinol mit einem Wert von 361 amu (Abb. 5- 27) Die Bildung des selbigen geht jedoch über ein etwas größeres Massenfragment mit einem Wert von 523 amu. Dieser Wert ist aber keines der Hauptfragmente im Massenspektrum (Abb. 5- 24). Erst durch Vergrößerung des Massenbereichs 523,10 amu bis 524,00 amu wird er im Massenspektrum sichtbar (Abb. 5- 24). Somit ist anzunehmen, dass die Entstehung des Grundkörpers sehr schnell über die Abspaltung und Umlagerung erfolgt, weswegen das Massenfragment mit 523 amu nur mit einer sehr geringen Intensität registriert werden kann. Hingegen ist der Grundkörper mit 361 amu deutlich und mit hoher Intensität zu erkennen (Abb. 5- 24).

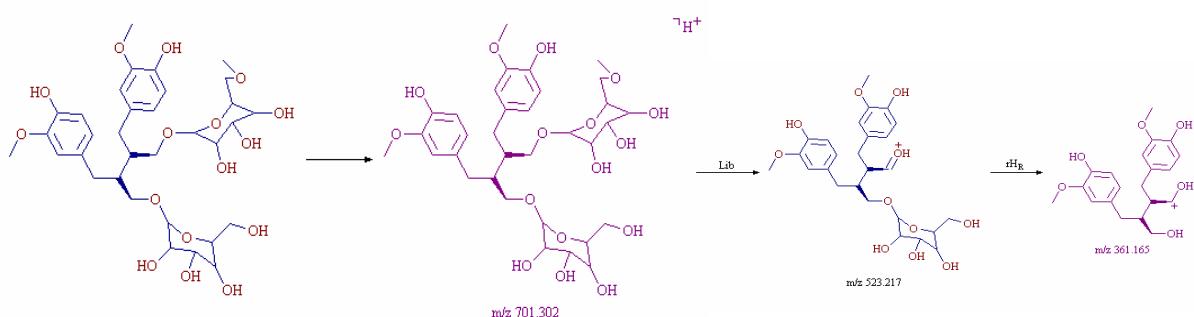


Abb. 5- 27: Simulierte Fragmentierung bei kompletter Abspaltung beider Zuckerfragmente

Eine Isolierung dieser Substanz sowie weiteren Untersuchungen mit NMR, würde diese Vermutung unterstützen. Leider war in dieser Arbeit die Isolierung durch die präparative HPLC nicht erfolgreich. Zum einen waren die Feststoffgehalte der Mikrowellenextrakte

(ca. 3-4 mg/ mL) zu gering, zum anderen konnte nicht genügend Extraktmenge mit einer höheren Konzentration hergestellt werden, da nicht genügend Leinwurzelmaterial zur Verfügung stand. Allerdings wäre die genaue Untersuchung dieser Substanz für eine folgende Arbeit ein interessanter Ansatzpunkt, da bis zum jetzigen Zeitpunkt die vermutete Struktur noch nicht in der Literatur beschrieben worden ist.

Eine weitere Besonderheit der ethanolischen Leinwurzelextrakte ist, dass im Vergleich zur Literatur [140], in den untersuchten Wurzelextrakten dieser Arbeit kein Podophyllotoxin (Abb. A- 14) durch massenspektrometisch Untersuchungen nachgewiesen werden konnte (Abb. A- 4). Podophyllotoxin ist ebenfalls ein Lignan, das heute als Arzneistoff gegen Feigwarzen angewendet und überwiegend aus den Wurzeln des *Podophyllum peltatum L.* gewonnen wird [142, 143]. Diese Substanz ist jedoch ein starkes Spindelgift, das insbesondere die Zellteilung stark beeinflusst [144]. Aufgrund seiner starken Nebenwirkungen hat es sich in der modernen Krebstherapie bis heute nicht durchsetzen können [144, 145]. Ursachen dafür, dass dieses Lignan in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden konnte, können zum einen die unterschiedlich verwendeten Extraktionsmethoden sein. Die Wurzelextrakte in der Arbeit von Arbarzua et al. (2007) wurden mit einer einfachen Kochextraktion unter Rückfluss nach Luyengi et al. (1996) hergestellt [140, 146]. Die Extrakte dieser Arbeit sind durch eine Mikrowellen-basierten Extraktion entstanden. Aber auch sorten- bzw. umweltspezifische Einflüsse können auf die Entstehung bestimmter Inhaltsstoffe wirken. Da das Podophyllotoxin nicht gefunden werden konnte, ist jedoch kein Nachteil für die Wirkung der durch Mikrowellen hergestellten Extrakte. Im Gegenteil, da das Podophyllotoxin ein starkes Zellgift ist [147], sind die Mikrowellen-basierten Wurzelextrakte bei weitem nicht so toxisch wie die nach der Methode von Luyengi hergestellt Wurzelextrakte.

5.3.1.2. Zelluntersuchungen

Die mit Hilfe der Mikrowelle hergestellten ethanolischen Leinwurzelextrakte sind am Forschungslabor der Universitätsfrauenklinik des Klinikums Südstadt, durch Dipl.-Biol. Marlen Szewczyk, verschiedenen zellbiologischen Untersuchungen zur Toxizität, Proliferation und Vitalität unterzogen worden. Eine ausführliche Auswertung des Vollextraktes und seine Wirkung auf die Brustkrebszelllinie MCF-7 ist bereits im Kapitel 5.2.1 beschrieben. Um Abhängigkeiten bestimmter Inhaltsstoffe des Extraktes auf die Wirkung der Hemmung des Brustkrebswachstums besser bestimmen zu können, ist mit Hilfe der präparativen HPLC das Wurzelextrakt in drei Fraktionen getrennt worden. Hierzu wurde das Vollextrakt der Leinwurzel zeitlich in einzelne Abschnitte (Fraktionen) eingeteilt. Die Aufteilung der Fraktionen kann der Abbildung 3-A im Anhang entnommen werden. Sowohl die Fraktionen als auch das Vollextrakt der Leinwurzel sind an der Mammakarzinomzelllinie T47D getestet worden (Abb. 5- 28). Der Arzneistoff Tamoxifen ist hier als Vergleichssubstanz verwendet worden, da er standardmäßig zur Therapie gegen Brustkrebs angewendet wird. Es ist gut zu sehen, dass sowohl das Vollextrakt als auch die einzelnen Fraktionen des Vollextraktes keinerlei zytotoxische Aktivität auf die

Zelllinie T47D zeigen (Abb. 5- 28). Das Tamoxifen und die Kontrollmessung mit Triton führen zu fast 100 % zum Zelltod. Dieses spiegelt sich auch in der Zellvitalität wieder (Abb. 5- 28), die bei Tamoxifen praktisch nicht mehr vorhanden ist. Das Zellwachstum wird jedoch durch die Einwirkung des Tamoxifens um ca. 75 % gehemmt.

Effekte an Brustkrebszelllinie T47D

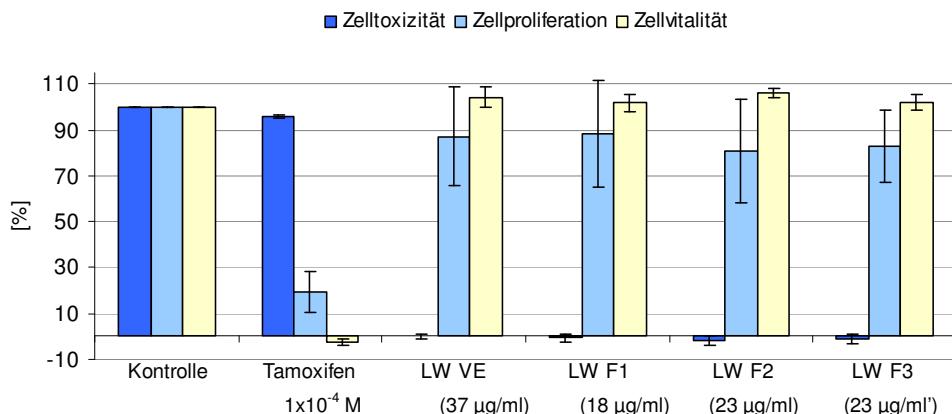


Abb. 5- 28: Zellbiologische Untersuchungen des Leinwurzel (LW)-Vollextraktes (VE) und der drei Leinwurzel-Fraktionen (F1-3) an der T47D-Zelllinie. Mittelwert \pm Standardabweichung (n=12) Kontrollmessung für den LDH-Test mit Triton. Kontrollmessung für den BrdU-Test mit Ethanol. Kontrollmessung für den MTT-Test mit Ethanol.

Im Vergleich hierzu, ist die Wirkung des Leinwurzelextraktes nicht ganz so aggressiv und stark. Das Vollextrakt kann das Brustkrebswachstum nur zu ca. 25 % hemmen und ist in seiner Wirkung auf die Zellvitalität genauso stark wie die Kontrollmessung mit EtOH (Abb. 5- 28). Die einzelnen Fraktionen haben im Vergleich eine ähnliche Wirkung auf die Hemmung des Zellwachstums der Brustkrebszelllinie T47D wie das Vollextrakt. Lediglich die Fraktion 2 (F2) scheint hier um ca. 5 % mehr einen höheren Einfluss auf die Hemmung der T47D Zelllinie zu haben, als die anderen beiden Fraktionen F1 und F3. Diese könnte an den zuvor identifizierten Inhaltsstoffen, wie Fisetin, Secoisolariziresinol, Biochanin A oder das Methoxysecoisolariciresinoldiglucosid liegen. Hierbei handelt es sich aber um ein Gemisch verschiedener Substanzklassen, wie Lignane und Flavonoide. Allerdings ist diese erhöhte Proliferationshemmung statistisch nicht signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit EtOH. Aus diesem Grund kann zusammenfassend gesagt werden, dass keine der untersuchten Leinwurzelfraktionen, in den untersuchten Konzentrationsbereichen, in seiner antiproliferativen Wirkung signifikant hervorsticht. So das dies durchaus ein Hinweis darauf ist, dass das Vollextrakt als Gemisch aus Flavonoiden und Lignanen die Hemmung des Zellwachstums der Brustkrebszelllinie T47D hervorruft, und nicht wie angenommen einzelne spezifische Phytoöstrogene oder Substanzklassen. Höhere Konzentrationsbereiche werden noch von der Universitätsfrauenklinik des Südstadt Klinikums Rostock untersucht, da schon bestehende Literaturdaten eine konzentrationsabhängige Proliferationshemmung des Leinwurzelvollextraktes bestätigen können [139, 140]

5.3.2. Der Schwarze Holunder (*Sambucus nigra*)

Für die Inhaltsstoffbestimmung der Holunderfrüchte und – blüten sind hauptsächlich die Beeren und Blüten der Holundersorte ‚Haschberg‘ untersucht worden. Die Pflanzen sind von der Landesforschungsanstalt Mecklenburg-Vorpommern (Gültow, Deutschland) unter standardisierten Bedingungen angebaut und die entsprechenden Pflanzenteile (Blüte und Frucht) zur entsprechenden Erntezeit per Hand gepflückt worden.

5.3.2.1. Blüten

Die Blüten des Holunderstrauches wurden Anfang Juni 2009 mit weit offenem Blütenköpfen über die Mittagszeit gepflückt und bis zur Analyse bei -27°C im Gefrierschrank gelagert. Die Inhaltsstoffanalyse erfolgte durch die LC-MS vom frischen Extrakt des Pflanzenmaterials. Abbildung 5-29 zeigt ein typisches Chromatogramm eines ethanolischen Mikrowellenextraktes der Holunderblüten aus Gültow (Mecklenburg-Vorpommern, Deutschland). Man kann deutlich erkennen, dass der Holunderblütenextrakt reich an verschiedenen Inhaltsstoffen ist. Des Weiteren ist zu sehen, dass sowohl im negativen als auch im positiven Ionenstrom, Substanzen detektiert werden konnten (Abb. 5- 29). Dabei handelt es sich um ein Gemisch aus vielen verschiedenen potentiell bioaktiven Substanzen wie Flavonoide oder andere Phenole.

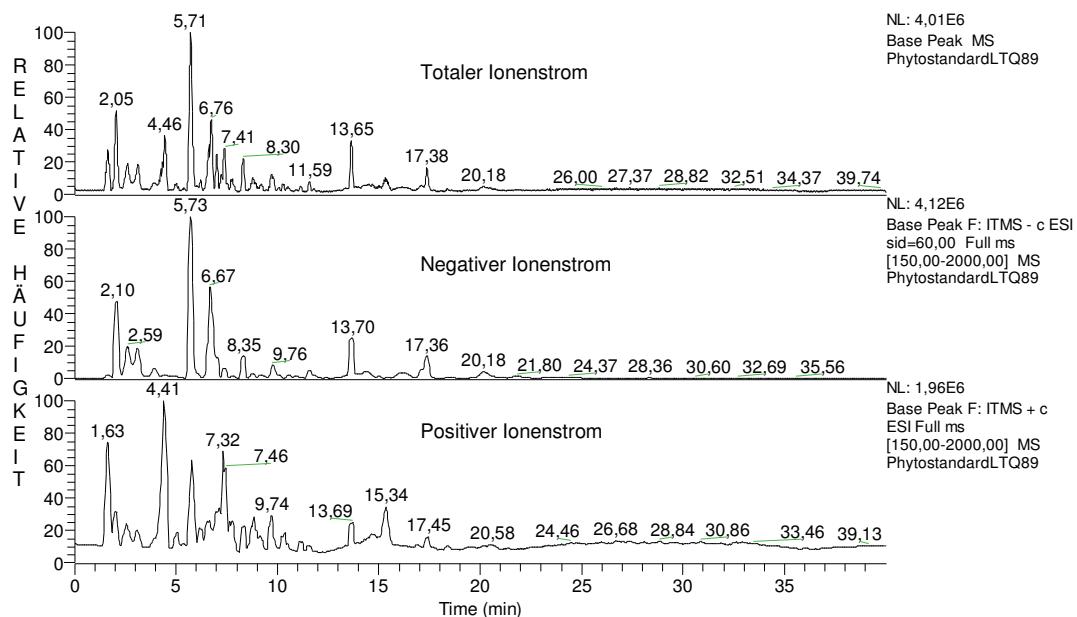


Abb. 5- 29: LC-MS Chromatogramm eines ethanolischen Holunderblütenextraktes (Gültow, 2009), aufgeteilt in verschiedene Ionenströme. Oben: Totaler Ionenstrom (TIC). Mitte: Negativer Ionenstrom $[M-H]^-$. Unten: Positiver Ionenstrom $[M+H]^+$

So konnte z.B. nach dem Vergleich durch Retentionszeiten und Massenspektren von Standardsubstanzen, die Massenspur von Rutin identifiziert werden (Abb. 5- 30).

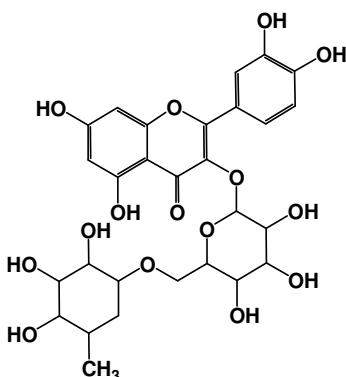


Abb. 5- 30: Strukturformel von Rutin (Quercetin-3-O-rutinosid, MW = 610.52 g/mol)

Die Standardsubstanz Rutin eluiert mit einer Retentionszeit von ca. 5,78 min. Diese Retentionszeit stimmt mit dem Peak der gefundenen Substanz im Holunderblütenextrakt überein (Abb. 5- 31).

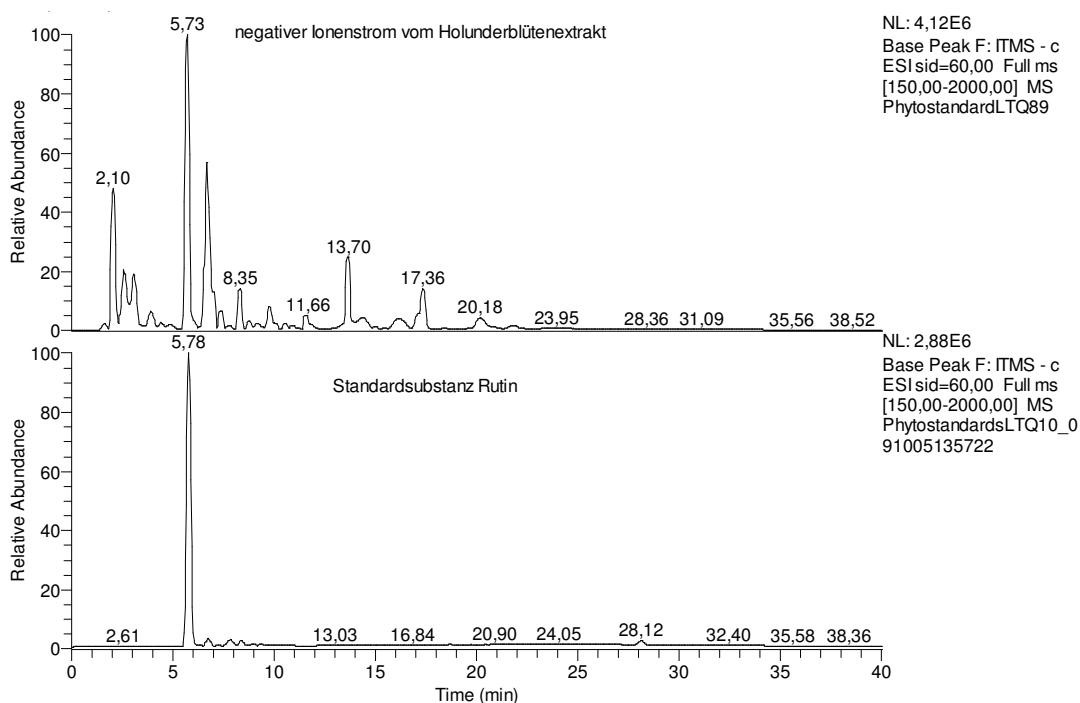


Abb. 5- 31: Vergleich des Chromatogramms vom ethanolischen Holunderblütenextrakt mit der ethanolischen Standardlösung Rutin

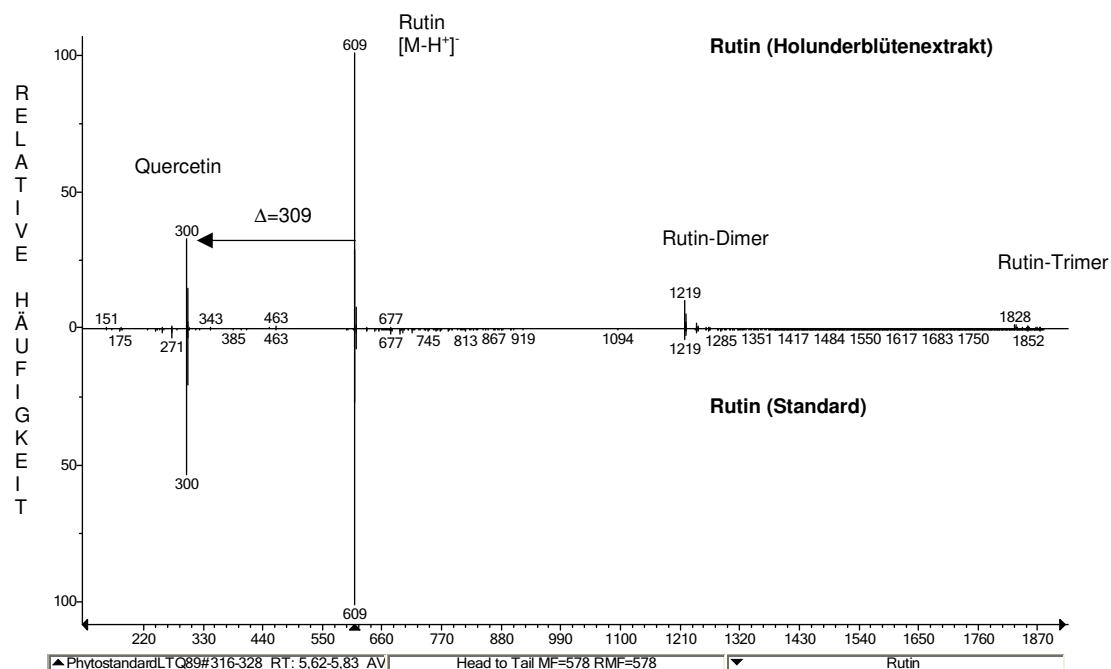


Abb. 5- 32: Massenspektenvergleich vom Rutin (Holunderblütenextrakt) mit dem Rutinstandard

Durch das Programm NIST MS Search 2.0 erfolgte ein Massenspektrenvergleich beider Peaks. Dieser konnte ebenfalls bestätigen, dass es sich bei der Substanz, mit der Retentionszeit von 5,73 min eindeutig um Rutin handelt. In Abbildung 5-32 wird dieses deutlich dargestellt. Die Abspaltung des Disaccharids ist erkennbar durch die Differenz von 309 amu (Abb. 5- 32). Rutin selbst bildet im negativen Ionenstrom das Fragment $[M-H^+]^-$ mit $m/z=609$. Durch die Elektronspray-Ionisation werden Rhamnose und Glucose von der Struktur des Rutins abgespalten, wodurch das einfache Aglycon Quercetin entsteht. Weiterhin ist das Dimer $[M+609]$ bzw. sogar das Trimer $[M+609+609]$ des Standards Rutin im Massenspektrum zu erkennen. Allerdings kommen diese nicht in natürlicher Form im Holunderblütenextrakt vor, sondern sind lediglich eine Erscheinungsform bedingt durch die Ionisierungsart.

Ebenfalls konnten Spuren von Isoquercetin (Quercetin-3-O-glucosid) und Isorhamnetin-3-O-glucosid nachgewiesen werden. Abbildung 5- 33 zeigt das Chromatogramm und die Abbildung 5- 34 die dazugehörigen Massenspektren beider Inhaltsstoffe. So kann man deutlich das deprotonierte Fragment $[M-H^+]^-$ für Isoquercetin erkennen mit einer Masse von 463 amu (Abb. 5- 34).

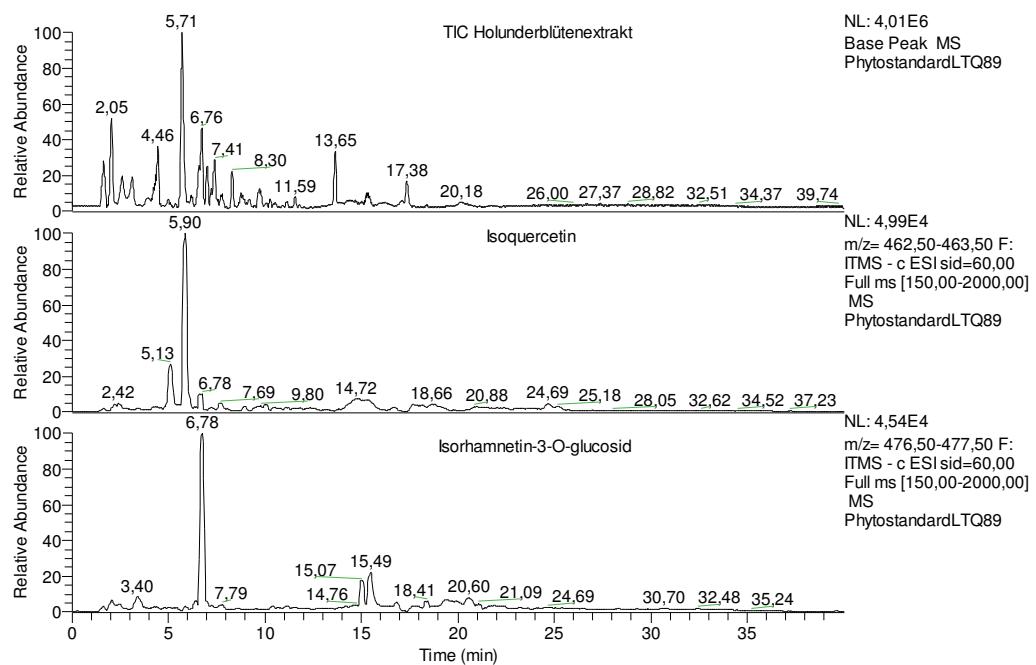


Abb. 5- 33: Chromatogrammübersicht vom Vollextrakt (oben) und der identifizierten Inhaltsstoffe Isoquerctin (mitte) und Isorhamnetin-3-O-glucosid (unten)

Im Massenspektrum von Isorhamnetin-3-O-glucosid sieht man nicht nur das deprotonierte Fragment $[M-H^+]$ mit einer Masse von 477 amu und die dazugehörige Abspaltung des Zuckers mit einer Differenz von 163 amu, sondern auch das Massenspektrum für das Isorhamnetin-3-O-rutinosid (Abb. 5- 34). Erkennbar wird dies durch die Masse von 623 amu, welche für das deprotonierte Massenfragment $[M-H^+]$ steht und das Massenfragment $[M-308]$, welches durch die Abspaltung des Disacharids Rutinose entsteht (Abb. 5- 34).

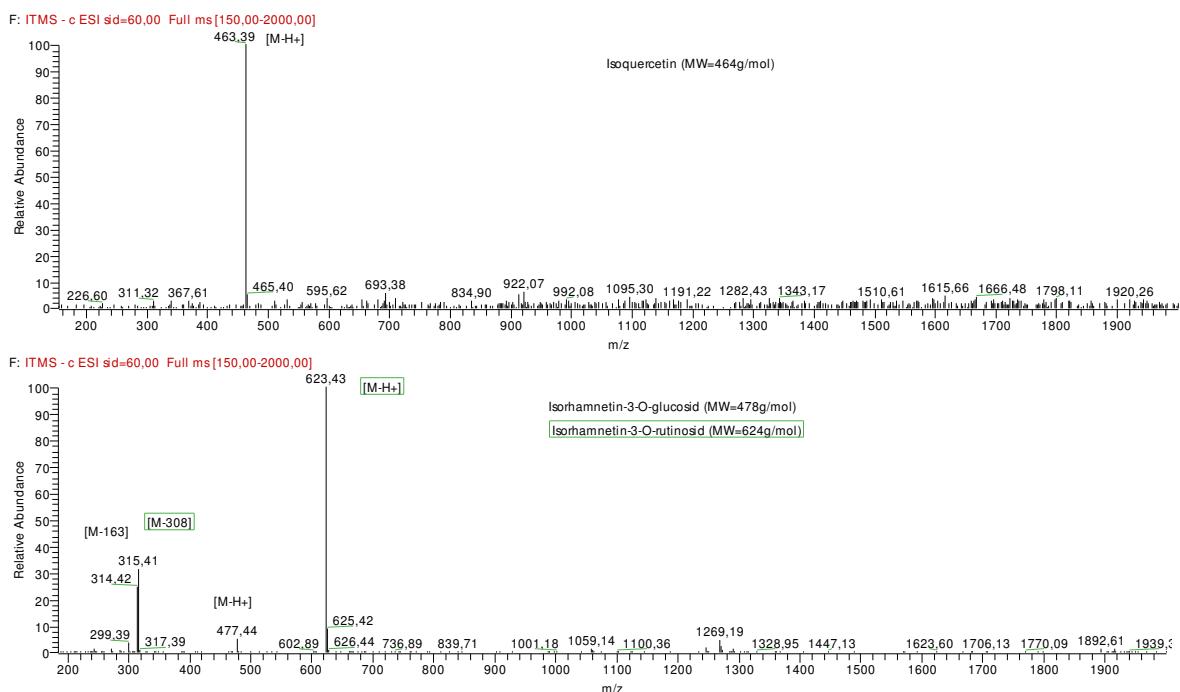


Abb. 5- 34: Massenspektrum von den identifizierten Inhaltsstoffen im Holunderblütenextrakt

Neben den Flavonoiden Isoquercetin, Rutin und dem gebundenen Glucosid bzw. Rhamnosid des Isorhamnetin und Quercetins konnten noch weitere flavonoide Inhaltsstoffe identifiziert werden. Die dazugehörigen Massenfragmente und Retentionszeiten können der Tabelle 5-3 entnommen werden.

Tab. 5- 3: Charakteristische Ionen der einzelnen Flavonoide der Holunderblüte bestimmt durch ESI-LC-MS [(Relative Häufigkeit in %)]

RT (min)	Substanz	ESI (positiv Mode), m/z	ESI (negativ Mode), m/z
5,78	Rutin	611 (100), 465 (2), 303 (4)	609 (100), 301 (30)
5,90	Isoquercetin	-	463 (100)
6,08	Quercetin-3-O-6-acetylglucosid	-	505 (42), 300 (100), 301 (37)
6,22	Quercetin	-	447 (100), 285 (45)
6,64	Fisetindiglucosid	595 (100), 287 (4), 449 (2)	593 (100), 285 (26)
6,78	Isorhamnetin-3-O-glucosid	-	477 (21), 314 (100)
6,78	Isorhamnetin-3-O-rutinosid	625 (100), 317 (3)	623 (100), 315 (32)
8,07	Quercetin	303 (100)	301 (100)
8,34	Naringenin	273 (100)	271 (100)
9,06	Kaempferol	-	285 (100)
13,88	Chrysin	-	253 (100)

Mit Hilfe von Massenspektrenanalysen und Literaturdaten [148] konnten auch einige Phenolsäuren identifiziert werden. Diese liegen vor allem als glycosidisch gebundene Verbindungen vor und sind in der Tabelle 5-4 dargestellt.

Tab. 5- 4: Charakteristische Ionen der einzelnen Phenolsäuren der Holunderblüte bestimmt durch ESI-LC-MS [(Relative Häufigkeit in %)]

RT (min)	Substanz	ESI (positiv Mode), m/z	ESI (negativ Mode), m/z
3,09	Caffeoylchinasäure	355 (100), 163 (2)	353 (12), 191 (100)
3,93	p-Coumaroylchinasäure	-	697 (24), 337 (29), 359 (20), 191 (100), 173 (12), 163 (5)

Auch Vertreter der flavon-ähnlichen Untergruppe der Anthocyane konnten im Blütenextrakt der Holunderpflanze nachgewiesen werden, so zum Beispiel das Malvidin, welches bei ca. 6,08 min eluiert.

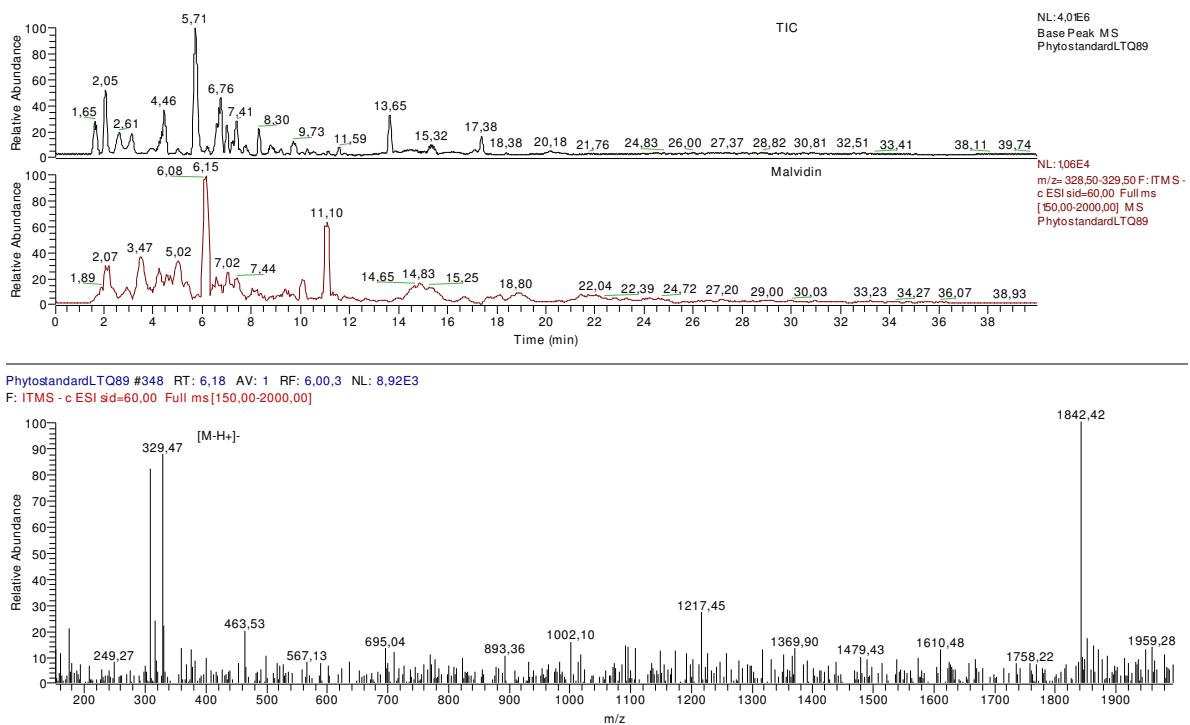


Abb. 5- 35: Chromatogramm (TIC) und isolierte Massenspur von Malvidin (oben) sowie das Massenspektrum von Malvidin (unten) im Holunderblütenextrakt

In den LC-MS Messungen sieht man in der Massenspur von Malvidin hauptsächlich das Chlorid-freie Massenfragment. Deshalb entsteht bei einer negativen Ionisierung mit ESI auch das negative Ion der Form $[M-H]^-$ mit einem Wert von 329 amu (Abb. 5- 35), da das Chloridion in diesen Messungen nicht sichtbar ist.

Auffällig bei der Aufklärung der Inhaltsstoffe der Holunderblüten ist, dass mit den hier verwendeten Untersuchungsmethoden keinerlei Lignane im Extrakt nachgewiesen werden konnten. Eine zusammenfassende Übersicht aller identifizierten Inhaltsstoffe und deren Strukturen kann der Tabelle A- 1 und der Abbildung A- 14 im Anhang entnommen werden.

5.3.2.2. Beeren

Die untersuchten Holunderbeeren stammen ebenfalls aus Gültzow. Sie wurden Mitte September 2009 per Hand geerntet und ebenfalls bis zur Untersuchung bei $-27\text{ }^\circ\text{C}$ im Gefrierfach gelagert. In der folgenden Abbildung ist ein typisches Chromatogramm eines ethanolischen Holunderbeerenextraktes dargestellt. Auch selbst gesammelte Beeren aus Rostock und Umgebung wurden zum Vergleich untersucht. Allerdings sind hier die Chromatogramme sehr unterschiedlich (Abb. 5- 37, Abb. 5- 37). Dies hat sortenspezifische Ursachen, oder ist durch verschiedene Umwelteinflüsse der unterschiedlichen Standorte bedingt. Aus diesem Grund sind die Untersuchungen hauptsächlich an den in Gültzow gewachsenen und geernteten Holunderbeeren durchgeführt worden. Hier sind die äußeren Einflüsse von der Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei (Gültzow, Mecklenburg-Vorpommern) dokumentiert worden [149].

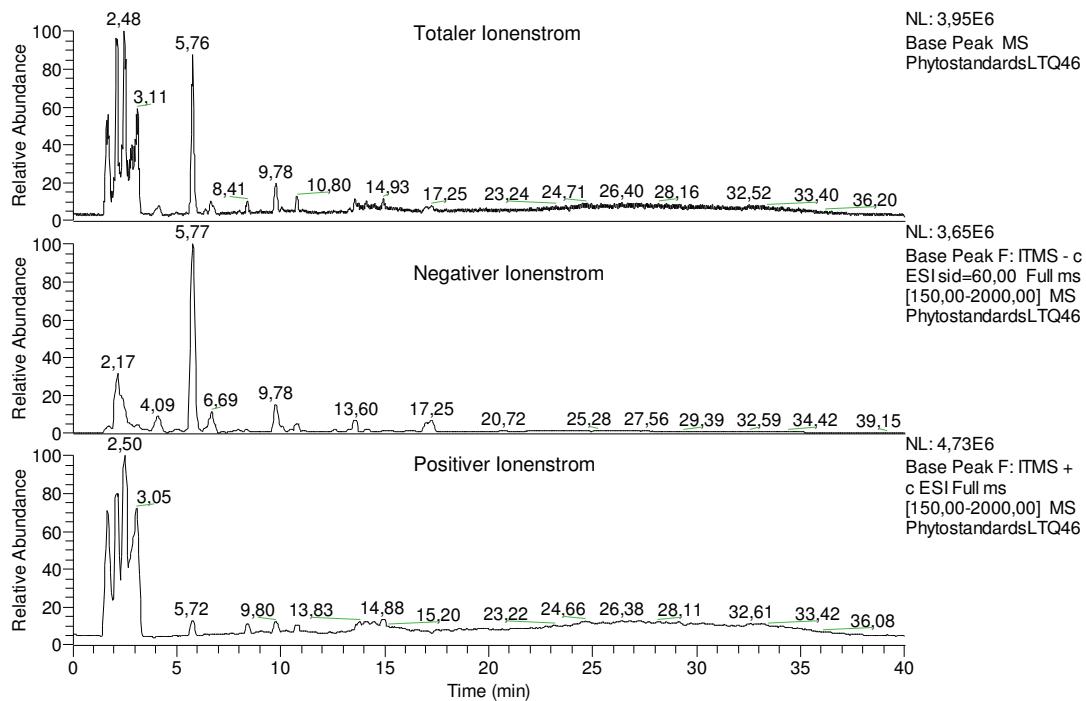


Abb. 5- 36: LC-MS Chromatogramm eines ethanolischen Holunderbeerenextraktes (Güldow, 2009), aufgesplittet in verschiedene Ionenströme. Oben: Totaler Ionenstrom (TIC). Mitte: Negativer Ionenstrom $[M-H^+]^-$. Unten: Positiver Ionenstrom $[M+H^+]^+$

Laut Literatur bestehen Holunderbeeren überwiegend aus Wasser (80 %) [150]. Proteine (0,7 %), Fette (0,5 %), Kohlenhydrate (18 %) und Ballaststoffe (7 %) sind im Vergleich mit einem geringen Anteil in den Beeren vorhanden [150]. Ebenfalls enthalten die Holunderbeeren auch zahlreiche phenolische Verbindungen. So ist bei einer strukturellen Aufklärung der Inhaltsstoffe des Holunderblütenextraktes auffällig, dass einige bekannte Flavonoide aus dem Holunderblütenextrakt ebenfalls in dem Beerenextrakt nachweisbar sind. Obwohl die Inhaltsstoffe der Blüten und Beeren sich ähnlich sind, konnte trotzdem kein Quercetin und Isorhamnetin-3-O-glucosid im ethanolischen Beerenextrakt massenspektrometrisch detektiert bzw. nachgewiesen werden. Tabelle 5- 5 fasst die identifizierten Flavonoide zusammen.

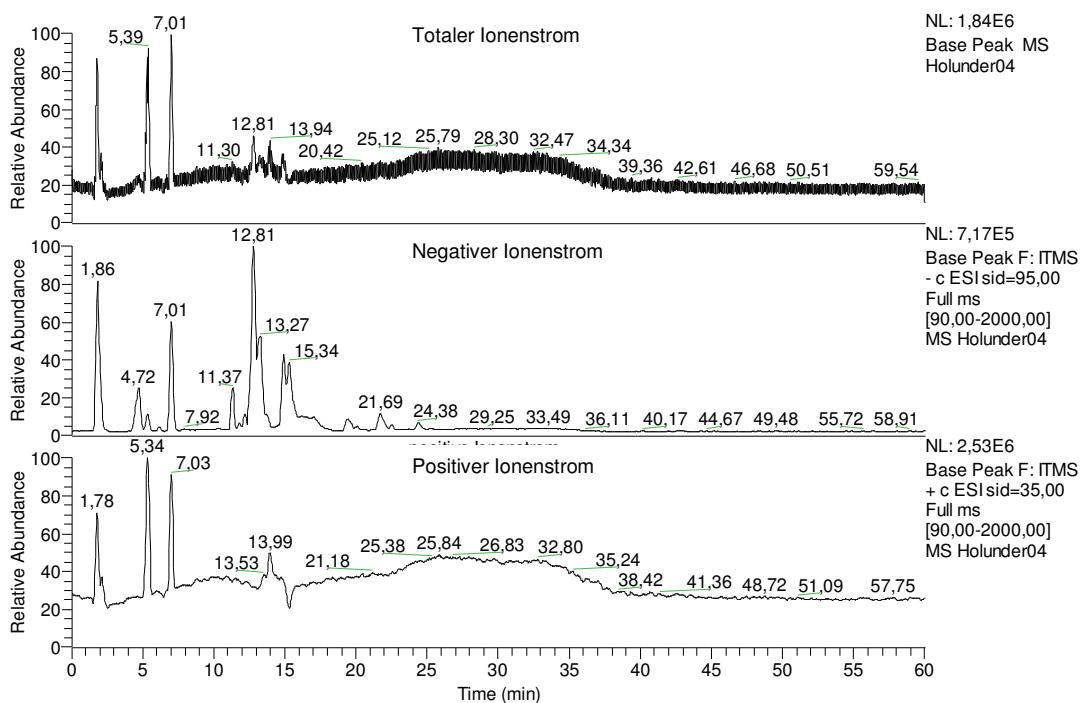


Abb. 5- 37: LC-MS Chromatogramm eines ethanolischen Holunderbeerenextraktes (gesammelt in Rostock 2011), Oben: Totaler Ionenstrom (TIC), Mitte: Negativer Ionenstrom, Unten: Positiver Ionenstrom

Tab. 5- 5: Chrakteristische Ionen der einzelnen Flavonoide der Holunderbeeren bestimmt durch ESI-LC-MS [(Relative Häufigkeit in %)]

RT (min)	Substanz	ESI (positiv Mode), m/z	ESI (negativ Mode), m/z
5,77	Rutin	611 (100)	609 (100), 300 (11)
5,91	Isoquerzetin	-	463 (100), 301 (22), 300(45)
6,12	Quercetin-3-O-6-acetylglucosid	-	505 (100), 301 (43), 300(98)
6,65	Fisetindiglucosid	617 (100), 595 (67)	593 (100), 285 (12)
6,76	Isorhamnetin-3-O-rutinosid	647 (100), 625 (50)	623 (49), 477 (4), 315 (10), 301 (100)
6,79	Morin	-	301 (100)
8,06	Quercetin	303 (100)	301 (100)
8,30	Naringenin	-	271 (100)
9,11	Kaempferol	-	285 (100)
13,9	Chrysin	-	253 (100)

Anzumerken ist auch, dass bei einigen Inhaltsstoffen im positiven Ionenstrom hauptsächlich die Natriumaddukte nachweisbar sind. So bildet das Flavonoidglucosid des Fisetins hauptsächlich das Fragment $[M+Na^+]^+$ mit 617 amu. Die Differenz von 22 amu zum protonierten Ion $[M+H^+]^+$ mit 595 amu, zeigt deutlich die Natrium-Adduktbildung (Abb. 5- 38). Diese Adduktbildung ist jedoch nicht ungewöhnlich. Je nach Größe und Gewicht der Verbindung kann sie recht unterschiedlich ausfallen und somit bei einigen Substanzen auch zu einer Adduktbildung mit den Lösungsmittelmolekülen führen. Das gleiche Prinzip ist bei Isorhamnetin-3-O-rutinosid vorhanden. Das protonierte Ion $[M+H^+]^+$

mit 625 amu hat im Massenspektrum eine wesentlich geringere Intensität als erwartet. Im Vergleich dazu wird bevorzugt das Natriumaddukt $[M+Na^+]$ mit einem Wert von 647 amu gebildet (Abb. 5- 38).

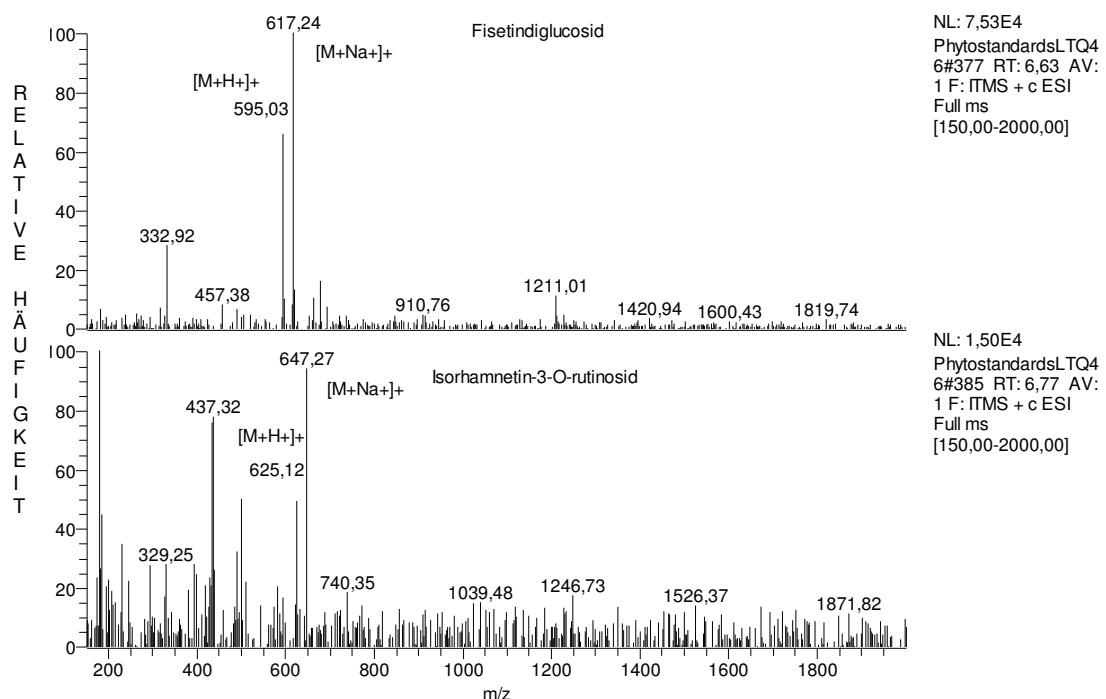


Abb. 5- 38: Massenspektren des positiven Ionenstroms der Flavonoide Fisetindiglucosid (oben) und Isorhamnetin-3-O-rutinosid (unten) im ethanolischen Holunderbeerenextrakt

Auch im Beerenextrakt konnten Anthocyane gefunden werden. So zum Beispiel die Anthocyanine Idaein (Cyanidin-3-galactosid) bzw. Kuromanin (Cyanidin-3-glucosid). Beide Substanzen unterscheiden sich nur in der Struktur des gebundenen Zuckers (Galactose und Glucose) (Abb. 5- 39).

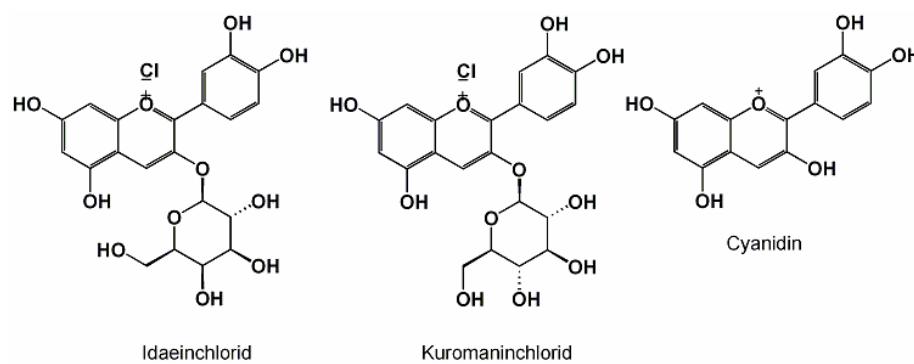


Abb. 5- 39: Strukturen der Anthocyanide Kuromanin, Idaein und Cyanidin

Somit haben sie beide die gleiche Masse von 484 g/mol und eluieren auch mit der gleichen Retentionszeit von 2,47 min (Abb. 5- 40). In den LC-MS Messungen dieser beiden Substanzen sieht man hauptsächlich das Chlorid-freie Massenfragment, da das Chloridion in diesen Messungen nicht sichtbar ist. So entsteht bei einer negativen Ionisierung mit ESI ein negatives Ion der Form $[M-H^+]$ mit einem Wert von 447 amu (Abb. 5- 40). Die Abspaltung der Galactose bzw. Glucose mit einer Differenz von 163 amu

führt zum Fragment [M-163] mit einem Wert von 284 amu (Abb. 5- 40). Dieses Fragment entspricht dann letztendlich dem einfachen Aglycon Cyanidin (Abb. 5- 39). Das beschriebene Massenspektrum ist auch identisch mit dem des Peaks im Holunderbeerenextrakt, bei einer Retentionszeit von ca. 2,48 min (Abb. 5- 40). Allerdings ist aufgrund der beschriebenen Zusammenhänge mit den hier verwendeten Methoden keine eindeutige Zuordnung möglich.

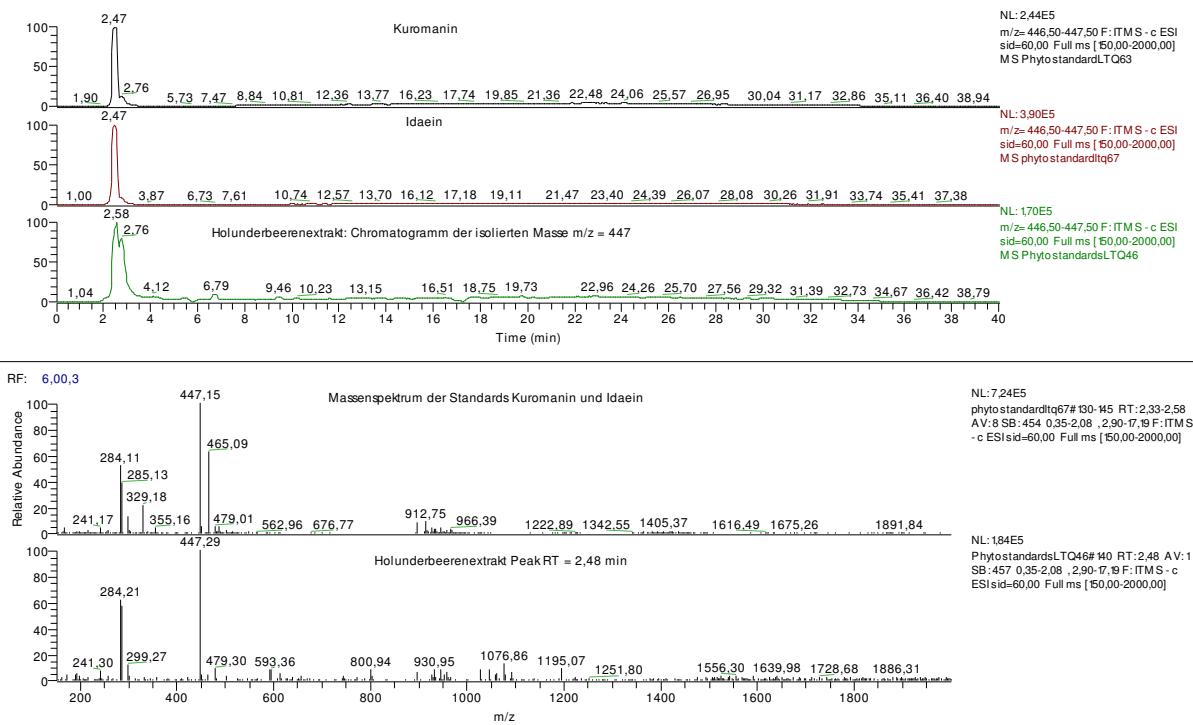


Abb. 5- 40: Chromatogramme von Kuromarin, Idaein und der unbekannten Substanz mit RT = 2,48 min (oben) und Massenspektren der Standards Idaein und Kuromarin sowie der Substanz bei RT = 2,48 min (unten)

Durch Literaturrecherche ergab es sich, dass es sich bei der Komponente mit der Retentionszeit von 2,48 min wahrscheinlich um das Kuromarin handeln muss [150, 151]. Hier wird diese Komponente unter dem Trivialnamen Chrysanthemin geführt und gehört mit zu einer der Hauptfarbstoffe der Holunderbeere, welcher für die intensiv rot bis lila Farbe der Beeren verantwortlich ist.

Eine zusammenfassende Übersicht der Strukturen und identifizierten Inhaltsstoffe kann der Tabelle A- 1 und der Abbildung A- 14 im Anhang entnommen werden.

5.3.2.3. Zelluntersuchungen

Die Wirkung der ethanolischen Mikrowellenextrakte der Holunderblüten und -beeren sind im Rahmen der Diplomarbeit von Frau Dipl.-Biol. Jana Stapel in der Universitätsfrauenklinik Rostock ausführlicher untersucht worden [152]. Hier sind sowohl die Rohextrakte der Blüten und Beeren, als auch sieben einzelne Fraktionen des Holunderbeerenextraktes sowie einzelne identifizierte Flavonoide des Holunderblüten-

bzw- Beerenextraktes auf die Zellproliferation (BrdU), -vitalität (MTT) sowie -toxizität (LDH) an den MCF-7 und BT-20 Brustkrebszelllinien sowie Fibroblasten getestet worden [152]. Für diese Arbeit wird nur auf die Untersuchungen der Rohextrakte an den MCF-7 und BT-20 Zeillinien eingegangen, da die einzelnen Fraktionen keinen großen Effekt aufweisen konnten. Hierzu können weitere ausführliche Informationen der Diplomarbeit von Dipl.-Biol. Frau Jana Stapel entnommen werden [152].

Effekte an der Brustkrebszelllinie MCF-7

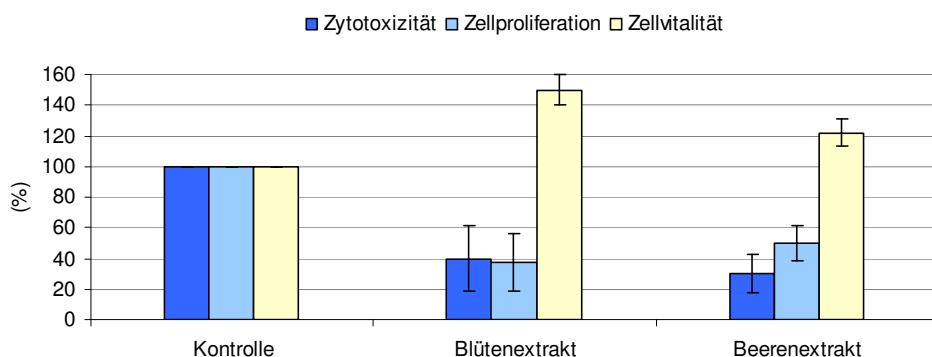


Abb. 5- 41: Zelltestuntersuchung des Holunderblüten-und Beerenextraktes an der Zelllinie MCF-7. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert mit der Standardabweichung in %. Kontrollmessung für den LDH-Test mit Triton. Kontrollmessung für den BrdU-Test mit Ethanol. Kontrollmessung für den MTT-Test mit Ethanol. Kontrolle = Medium+Zellen+Ethanol als negative Kontrollmessung von 100 % dargestellt [152]

Der LDH Test (dunkelblau), der die Zytotoxizität des Extraktes auf die einzelnen Zelllinien beschreibt, zeigt dass bei der Kontrollmessung durch die Zugabe von Triton ein 100 % -iger Zelltod der beiden Zelllinien erreicht wird (Abb. 5- 41, Abb. 5- 42). Es gibt aber gravierende Unterschiede bei der Zugabe der einzelnen Holunderextrakte. So wird bei der Zugabe von dem Holunderblütenextrakt auf die MCF-7 Zelllinie eine Zytotoxizität von ca. 40 % erreicht und bei der Zugabe des Holunderbeerenextraktes besteht eine zytotoxische Wirkung von ca. 30 % (Abb. 5- 41). Bei der BT-20 Zelllinien hingegen zeigt keiner der beiden Extrakte eine zytotoxische Aktivität (Abb. 5- 42). Dieses spricht dafür, dass in den Holunderextrakten mehr Inhaltsstoffe gelöst sind, die bevorzugt an einer α und β Estrogenrezeptor positiven Zelllinie wie MCF-7 anbinden können. Im Vergleich dazu werden die BT-20 Zellen, die Estrogenrezeptor negativ sind, nicht angesprochen. Dieser Zusammenhang spiegelt sich auch in der Zellproliferation (BrdU Test, hellblau) wieder. Die Kontrollmessung beschreibt hier das Zellwachstum unter dem Einfluss des Zellmediums der Zellen und dem Lösungsmittel Ethanol. Die Untersuchung mit den Holunderextrakten zeigt, dass das Zellwachstum der Brustkrebszelllinie MCF-7 zunächst gesenkt wird (Abb. 5- 41). Im Vergleich dazu erfolgt bei den BT-20 Zelllinien eine wesentlich geringere Hemmung bzw. sogar eine Förderung der Proliferation (Abb. 5- 42). So hemmen die Blütenextrakte das Zellwachstum der BT-20 Zelllinien nur um ca. 10 %.

Bei den MCF-7 Zelllinien besitzt dieses Extrakt eine wesentlich stärkere proliferative Hemmung von ca. 60 %.

Effekte an der Brustkrebszelllinie BT-20

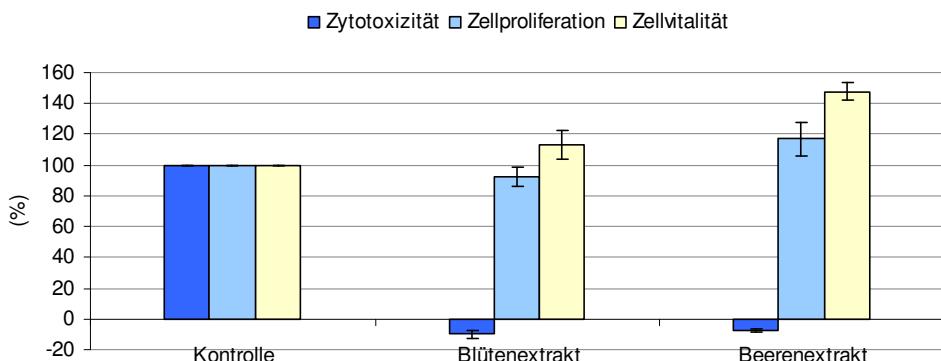


Abb. 5- 42: Zelltestuntersuchung des Holunderblüten- und Beerextraktes an der Zelllinie BT-20. Gezeigt ist jeweils der Mittelwert mit der Standardabweichung in %. Kontrolle = Medium+Zellen+Ethanol als negative Kontrollmessung von 100 % dargestellt [152]

Das Beerextrakt ist in seiner hemmenden Wirkung wesentlich schwächer. So wird hier das Wachstum der MCF-7 Zelllinien um ca. 50 % gehemmt (Abb. 5- 41). Bei den BT-20 Zelllinien wird das Wachstum der Krebszellen sogar um 18-20 % erhöht (Abb. 5- 42). Dieser Effekt könnte ein weiterer Hinweis für den schon beschriebenen Zusammenhang zwischen der proliferationshemmenden Wirkung der Extrakte und dem Estrogenrezeptor sein [152].

Die Stoffwechselaktivität der Zellen wurde mit Hilfe des MTT Tests (gelb) untersucht. Auch hier beschreibt die Kontrollmessung das Verhalten (Stoffwechselaktivität, Wachstum usw.) der Zellen unter dem Einfluss des Lösungsmittels EtOH. Durch die Zugabe der einzelnen Extrakte wird die Vitalität der Zellen unterschiedlich beeinflusst. Bei den BT-20 Zellen erhöht sich die Stoffwechselaktivität unter dem Einfluss des Blütenextraktes um ca. 10-17 % (Abb. 5- 42). Bei dem Beerextrakt liegt die Enzymaktivität wesentlich höher. Hier wird sie um ca. 50 % gesteigert (Abb. 5- 42). Dieses kann mit der Zunahme der Proliferation zusammenhängen. Durch das erhöhte Wachstum müssen sich mehr Zellen teilen, weswegen die metabolische Aktivität der Zelle stark zunimmt. Die MCF-7 Zellen zeigen einen ähnlichen Effekt (Abb. 5- 41). Sie besitzen im Vergleich zu den BT-20 Zellen die höchste Stoffwechselaktivität unter dem Einfluss des Holunderblütenextraktes. Diese ist um ca. 30 % höher als bei den BT-20 Zellen. Da die Stoffwechselaktivität von MCF-7 unter dem Einfluss des Blütenextraktes besonders stark erhöht wird, kann mit der starken Hemmung der Zellproliferation zusammen hängen. Im Vergleich dazu fällt beim Holunderbeerextrakt hingegen die metabolische Aktivität von MCF-7 wesentlich geringer aus und steigert sich nur um ca. 20 % (Abb. 5- 41). Zusammenfassend kann gesagt werden, dass beide Extrakte bei den MCF-7 Zelllinien eine Hemmung auf die Zellproliferation haben und zu einer Erhöhung der Stoffwechselaktivität führen. Durch die sehr starke Proliferationshemmung kann es sein, dass die Krebszellen unter Stress

geraten, dadurch können Stoffwechselprozesse umgelagert werden oder die Zellen reagieren kurz vor der Induktion einer möglichen Apoptose mit einer Zunahme der Stoffwechselaktivität. Welcher stoffphysiologische Mechanismus genau betroffen ist, kann mit einem MTT-Vortest nicht bestimmt werden und muss in weiteren zellbiologischen Untersuchungen geprüft werden. Fakt ist, dass der Stoffwechsel von Krebszellen anders beeinflusst wird als der von nicht-tumorigen Zellen [153, 154]. Des Weiteren wird aufgrund ihrer erhöhten zytotoxischen Eigenschaften und der antiproliferativen Wirkung die Zelllinie MCF-7 mit ihrem positiven α und β Estrogenrezeptor eher bevorzugt als die BT-20 Zelllinien. Da dieser einen negativen α und β Estrogenrezeptor besitzt, ist er für die weiteren Untersuchungen der proliferierenden Effekte beider Extrakte eher ungeeignet. Aus diesem Grund sind diese Untersuchungen ein weiterer Beweis dafür, dass die phytoöstrogenen Inhaltsstoffe hauptsächlich über die Bindung des α und β Estrogenrezeptor eine proliferative Hemmung ermöglichen [155].

Zusammenfassung

Nach inhaltsstofflicher und zellbiologischer Untersuchung, kann zusammenfassend gesagt werden, dass die untersuchten Pflanzenteile des schwarzen Holunders *Sambucus nigra* reich an komplexen Inhaltsstoffen sind. Diese sind in der Lage die Proliferation von den Brustkrebszelllinien MCF-7 und BT-20 zu beeinflussen. Sowohl die Blüten als auch die Beeren der Holunderpflanze bestehen aus einem Gemisch aus vielen verschiedenen Flavonoiden und Phenolen. Viele dieser Substanzen, wie z.B. Rutin, Isoquercetin, Chrysin und Kaempferol findet man, in Übereinstimmung mit der Literatur, in beiden Pflanzenteilen wieder [148]. Auffällig ist hierbei das sie selten in reiner Form vorliegen und oftmals nur in Kombination mit Zuckern nachgewiesen werden konnten. Das Vorkommen von den Phenolsäuren Kaffeoyl- und Cumarylchinasäure konnte mit den hier verwendeten Analysenmethoden nur in den Holunderblüten nachgewiesen werden. Im Vergleich mit der Literatur konnten jedoch bis jetzt keine neuen Substanzen nachgewiesen werden [148, 156-158]. Allerdings erwies sich die Verwendung der Kinetex-Säule (Phenomenex) aufgrund ihrer effizienteren Trennleistung als bessere Methode als die in der Literatur verwendeten Säulen [148, 156-158]. Es konnte gezeigt werden, dass die Vollextrakte der Holunderblüten die Zellproliferation von den MCF-7 Zelllinien am stärksten hemmt als das Vollextrakt der Holunderbeeren. Bei den BT-20 Zelllinien hingegen wird durch das Vollextrakt der Blüten im Vergleich eine um etwa 10 % geringer Proliferationshemmung erreicht und bei dem Beerenextrakt wird sogar eine Zellwachstumssteigerung erreicht. Der Vergleich beider Zelllinien untereinander zeigt, dass die Vollextrakte der Holunderpflanze überwiegend auf die Brustkrebszelllinie MCF-7 eine antikanzerogene Wirkung haben. Des Weiteren gibt es bisher keine Literaturdaten die sich auf die Wirkungsweise des schwarzen Holunders *Sambucus nigra* beziehen.

5.3.3. Der Sanddorn (*Hippophae rhamnoides*)

Die Inhaltsstoffanalytik des Sanddorns erfolgte für die orange-roten Beeren dieser Pflanze. Diese sind in Rostock und Umgebung selbst gesammelt worden und bis zur analytischen Untersuchung im Gefrierfach bei -27 °C aufbewahrt worden. Um für spätere Anwendungsmöglichkeiten eine einheitliche Mischprobe von Sanddornbeeren zu haben, wurden die Untersuchungen auch am Sanddornbeeren Direktsaft der Firma Storchennest GmbH durchgeführt.

5.3.3.1. Beeren

Die inhaltsstoffliche Analyse wurde mit Hilfe der LC-MS und der GC-MS durchgeführt. Aus den gesammelten Sanddornbeeren ist ein ethanolischer Extrakt mit Hilfe der Mikrowelle angefertigt worden, um diesen mit dem Sanddornbeeren Direktsaft der Firma Storchennest GmbH vergleichen zu können. In der Abbildung 5-43 sind die Chromatogramme der LC-MS Messungen beider Extrakte gegenübergestellt. Beide Extrakte haben ähnliche Chromatogramme (Abb. 5- 43).

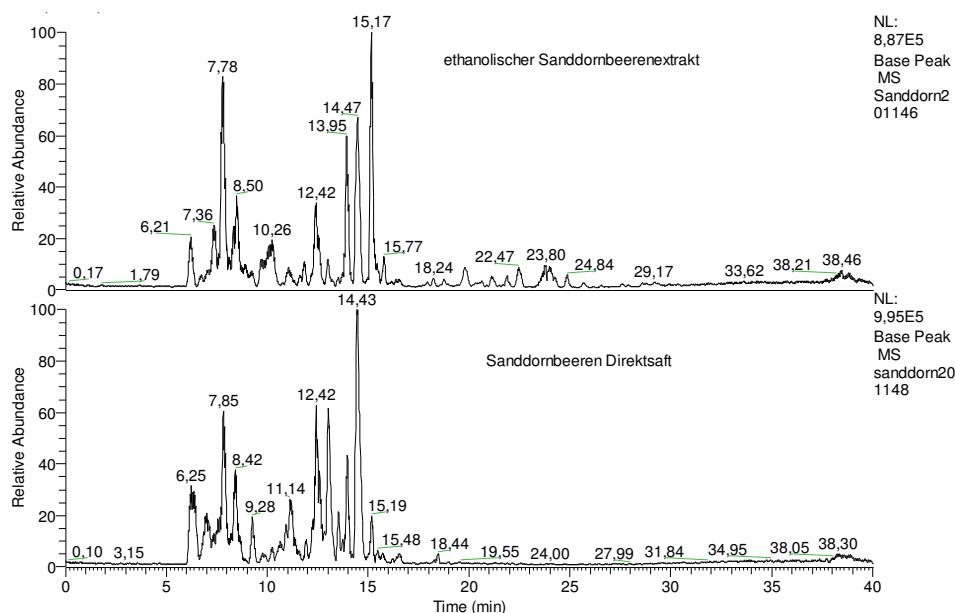


Abb. 5- 43: Vergleich der Chromatogramme des Sanddorbeerensaftes (unten) und des ethanolisch Sanddornbeerensextraktes (oben)

Sie unterscheiden sich lediglich in der Intensität einiger Peaks. So ist der ethanolische Sanddornbeerensextrakt (NL: 8,87E5) etwas geringer konzentriert als der Sanddorbeerensaft (NL: 9,95E5), da hier nur zehn Gramm Beeren für die Extraktherstellung verwendet wurden. Bei der Herstellung des Sanddornbeeren Direktsaftes werden ca. 6-7 kg Beeren benötigt, damit ein Liter Direktsaft entsteht [159].

Da der käuflich erworbene Saft als so genannte Mischprobe mit stabilen Herstellungsbedingungen gewertet werden kann, ist dieser auf seine Inhaltsstoffe genauer analytisch untersucht worden.

Einige der durch die LC-MS Messung mit Hilfe von Standards und Literaturrecherche massenspektrometisch identifizierten Inhaltsstoffe sind in Tabelle 5-6 zusammengestellt.

Besonders auffällig ist, dass vor allem viele glycosidisch gebundene Flavonoide in den Sanddornbeeren vorkommen, wie zum Beispiel das Isorhamnetin, Rutin, Quercetin und Hesperidin, welche einzeln Glucosid oder Rutinosid binden. Diese flavonoiden Inhaltsstoffe binden die Zuckermoleküle hauptsächlich über ihre C₃-, C₅- bzw. C₇-Atom ständigen Hydroxylgruppen an Mono- bzw. Disaccharide

Tab. 5- 6: Charakteristische Ionen der Inhaltsstoffe des Sanddornbeerensaftes bestimmt durch ESI-LC-MS [(Relative Häufigkeit in %)]

RT (min)	Substanz	ESI (positiv Mode), m/z	ESI (negativ Mode), m/z
10,76	Isorhamnetin-3-sophorosid-7-rhamnosid	809 (100), 786 (43)	784 (100), 639 (51), 460 (15), 314 (23)
11,75	Vitexin	433 (10)	431 (100)
12,14	Quercetin-3-glucosid-7-rhamnosid	633 (54), 611 (24)	609 (100), 463 (3), 447 (3), 301 (7), 300 (26), 271 (6)
12,31	Isorhamnetin-3-coumaryl-glucosyl-glucosid-7-rhamnosid	786 (69), 405 (100)	931 (71), 785 (100), 459 (6), 314 (11)
12,69	Rutin	633 (100), 611 (44)	609 (100), 300 (27), 271 (7)
12,88	Isorhamnetin-3-glucosid-7-rhamnosid	1270 (100), 1248 (26), 625 (85), 463 (44)	1246 (20), 623 (100), 477 (4), 461 (3), 315 (2)
13,58	Isoquercetin	-	463 (100), 301 (22), 300 (30), 285 (3)
13,93	Hesperidin	633 (100), 611 (69)	609 (100), 300 (22)
14,18	Kaempferol-rutinosid	-	593 (100), 284 (18)
14,32	Isorhamnetin-3-rutinosid	647 (51), 625 (100), 478 (24)	623 (100), 316 (4), 300 (3)
14,42	Isorhamnetin-3-glucosid	479 (24)	477 (100), 314 (9), 300 (7), 285 (6)
17,45	Isorhamnetin	317 (100)	315 (100), 285 (7), 191 (26)

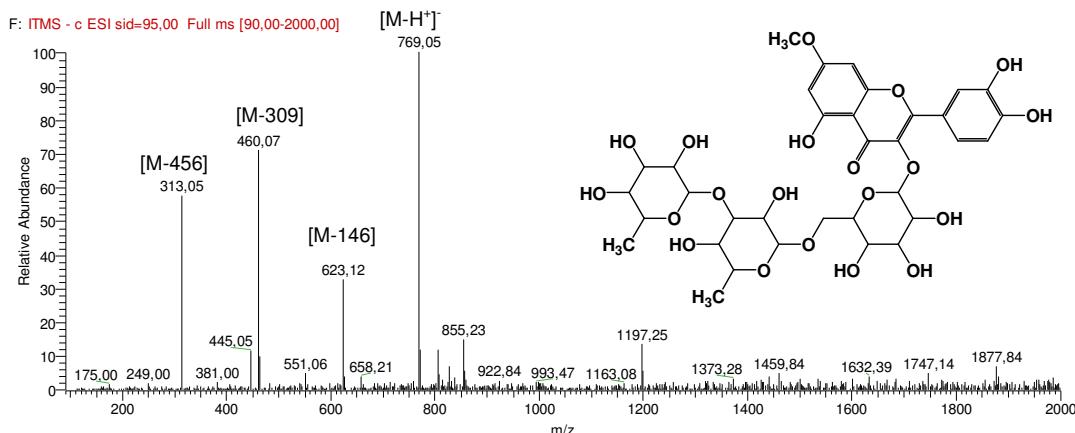
In den Sanddornbeeren ist vor allem Rutin für die Farbgebung der Beeren verantwortlich. Die anderen Inhaltsstoffe wie Hesperidin schützen die Pflanze vor Fraßfeinden oder Infektionen durch Pilze [160]. Die glycosidische Bindung hat vor allem einen großen Einfluss auf die Polarität der Flavonoide, wodurch ihre Löslichkeit beeinflusst wird [58, 66]. Aus diesem Grund ist es für die Pflanze wesentlich einfacher, die in den Beeren vorkommenden Flavonoide in ihren Vakuolen zu speichern [58, 66].

Ein interessanter Aspekt der Sanddornbeere ist auch das Vorkommen von mehreren triglycosidisch gebundenen Flavonoiden (Tab. 5- 7).

Tab. 5- 7: Identifizierte triglucosidisch gebundene Flavonoide im Sanddornbeerensaft [(relative Häufigkeit in %)]

RT (min)	Substanz	ESI (positiv Mode), m/z	ESI (negativ Mode), m/z
10,26	Quercetintriglucosid (glu-glu-rha)	795 (100), 773(24)	771 (100), 625 (10), 300 (17)
12,00	Quercetintriglucosid (glu-rha-rha)	779 (59), 757 (100)	755 (100), 300 (55)
12,91	Xanthorhamnin	793 (100), 771 (35)	769 (100), 623 (34), 460 (75), 313 (58)

Im Xanthorhamnin ist das einfache Aglycon Rhamnetin über sein C₃-Atom mit einem Trisaccharid verknüpft. Dieses kann man deutlich durch die einzelnen Fragmentierungsschritte im Massenspektrum erkennen (Abb. 5- 44). So ist im negativen Scanmodus das deprotonierte Ion [M-H⁺]⁻ mit einem Wert von 769,05 amu zu sehen (Abb. 5- 44). Die Abspaltung des ersten Zuckermoleküls wird erkennbar durch die Differenz von 146 amu und dem Fragment [M-H⁺-146]⁻ mit einem Wert von 623 amu (Abb. 5- 44). Durch weitere Fragmentierung wird auch das zweite und dritte Zuckermolekül abgespalten. Diese Abspaltung der einzelnen Zucker ist wiederum erkennbar durch die Massendifferenz von 163 amu bzw. 147 amu, welche jeweils für Glucose und Rhamnose stehen. Hierdurch entstehen die Massenfragmente [M-H⁺-309]⁻ und [M-H⁺-456]⁻ mit den Werten 460,07 amu bzw. 313,05 amu. Das Massenfragment [M-H⁺-456]⁻ mit dem Wert 313,05 steht wiederum für das einfache Aglycon Rhamnetin, welches nicht glycosidisch gebunden ist (Abb. 5- 44).

**Abb. 5- 44: Massenspektrum von Xanthorhamnin MW = 770,68 g/mol**

Unter zu Hilfenahme der Untersuchungen von Rösch et al. (2004) und Llorach et al. (2003) konnten auch Hinweise für vorhandene flavonoide Systeme mit acylierten Hydroxyzimtsäurederivaten gefunden werden (Tab. 5- 8).

Tab. 5- 8: Flavonoide Syteme mit acylierten Hydroxzimtsäurederivaten im Sanddornsaft [161, 162] [(Relative Häufigkeit in %)]

RT (min)	Substanz	ESI (positiv Mode), m/z	ESI (negativ Mode), m/z
12,07	Quercetindimethylether-3-hydroxferulylglucosyl-glucosid-7-rhamnosid	1015 (100), 993 (17), 525 (67)	1013 (96), 991 (100), 845 (92)
12,17	Quercetindimethylether-3-cafferoylglucosyl-glucosid-7-rhamnosid	-	983 (63), 961 (100), 815 (45)

Hier konnten die Hauptfragmente $[M-H^+]$ mit 991 amu für das Quercetindimethylether-3-hydroxferulylglucosyl-glucosid-7-rhamnosid und 961 amu für das Quercetindimethylether-3-cafferoylglucosyl-glucosid-7-rhamnosid im Massenspektrum gefunden werden. Allerdings handelt es sich hierbei nur um einen Hinweis, der noch durch weitere MS^n -Messungen bestätigt werden muss.

Des Weiteren ist der Sanddornbeerensaft auch durch GC-MS-Messungen charakterisiert worden, um auch andere Substanzklassen wie z.B. gesättigte Kohlenwasserstoffe zu erfassen, die durch LC-MS nicht detektiert werden können. Bei dieser Analyse konnten eindeutig Vitamin E bzw. Tocopherol (Abb. A- 6, Abb. A- 7) und das Phytosterin β -Sitosterol (Abb. A- 8, Abb. A- 9) identifiziert werden. Die jeweiligen Massenspektren der GC-MS-Messungen bzw. eine Übersicht aller Strukturen und identifizierten Inhaltsstoffe des Sanddornbeerensaftes können dem Anhang (Tab. A- 1, Abb. A- 14) entnommen werden.

5.3.3.2. Zelluntersuchungen

Die Wirkungsweise der Sanddornbeeren auf die Krebszelle MCF-7 wurde von Frau Dr. Nadja Engel-Lutz ausführlich durch Zellzyklusanalysen untersucht. Hierzu wurde sowohl der Saft als auch der ethanolische Mikrowellenextrakt der Beeren getestet. Die Zellzyklusphasen G₂ und S sind die proliferierenden Stadien der Interphase. Sie werden für die Bewertung der Wirkung zusammengefasst, da diese Phasen für die Zelle essentiell zur Teilung in zwei Tochterzellen benötigt werden (Kapitel 4.3.2.1.2). Mit ihnen kann das Wachstum einer Krebszelle beurteilt werden. Die Ergebnisse der Zellzyklusanalysen können der Abbildung 5-44 entnommen werden. Für die Kontrollmessung wurden Ethanol und Wasser genommen. Da das Sanddornbeerensextrakt in Ethanol gelöst wurde und der Saft ein wässriger Auszug der Beeren ist.

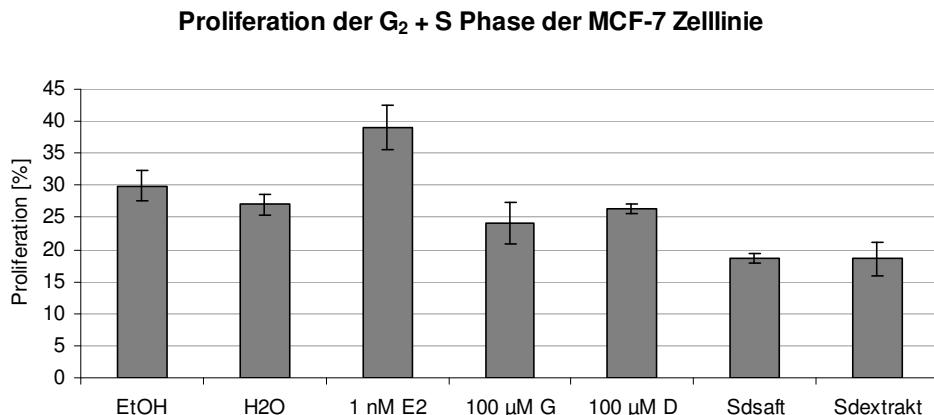


Abb. 5- 45: Proliferationsraten (%) der Zelllinie MCF-7 nach 48 h Behandlung mit den Testsubstanzen 17-β Estradiol (E2), Genistein (G), Daidzein (D), Sanddornsaft und Sanddornextrakt. Mittelwert ± Standardabweichung (n=4-10) im Vergleich zur Ethanol- und Wasser-Kontrolle

Wie man sieht, unterschieden sich die Kontrollwerte für die Ethanol- und Wasserproben nicht signifikant voneinander. Unter dem Einfluss von reinem Lösungsmittel ohne Testsubstanz, sind im Grundzustand der Zellen ca. 27-30 % proliferierende MCF-7 Krebszellen vorhanden. Das 17-β Estradiol ist ein Sexualhormon des Menschen, welches sowohl bei Frauen als auch bei Männern vorkommt. Für diese Untersuchungen wurde es als positive Kontrollmessung verwendet, da es das Wachstum von Östrogenrezeptor-positiven Krebszelllinien stimuliert [163, 164]. Die Mammakarzinomzelle MCF-7 reagiert mit einer Steigerung ihrer Proliferationsrate um ca. 18 % im Vergleich zur Kontrolle mit Ethanol. Da die Wirkung von den Phytoöstrogenen Genistein und Daidzein auf Mammakarzinomzellen schon oft in der Literatur beschrieben wurde, dienen diese hier ebenfalls als Positivkontrolle [7, 140, 165, 166]. Die Darstellung macht diesen Einfluss deutlich. Sowohl unter dem Einfluss von Genistein als auch von Daidzein wird, im Vergleich zur Kontrolle mit Ethanol, die Anzahl der proliferierenden Krebszellen um ca. 3-6 % gesenkt. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Wirkungsuntersuchungen des Sanddornsaftes bzw. -extraktes, so wird deutlich, dass die Proliferation bei beiden Testsubstanzen deutlich geringer ist als im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle sowie der Kontrollmessungen. Die Wirkungsweisen vom Saft und des Mikrowellenextraktes unterscheiden sich untereinander kaum. Unter dem Einfluss von beiden Testextrakten wird die Proliferationsrate der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 im Vergleich zur jeweiligen Lösungsmittelkontrolle (Saft mit H₂O/ Extrakt mit EtOH) um ca. 10 % gesenkt. Auch im Vergleich zur positiv Kontrolle zeigen beide Sanddorn-Testextrakte wesentlich bessere Resultate. Die gelösten Inhaltsstoffe sind in der Lage, das Krebszellwachstum besser zu hemmen als es Genistein und Daidzein alleine tun können.

Da der Sanddornbeerensaft von den gelösten Inhaltsstoffen wesentlich höher konzentriert ist als das Mikrowellenextrakt der Sanddornbeeren, sind von ihm mit Hilfe der präparativen HPLC Fraktionen geschnitten wurden. Die Einteilung der einzelnen

Fraktionen ist im Anhang unter Abbildung A- 10 farblich dargestellt. Im Anschluss wurden diese Fraktionen zunächst durch Einengen am Rotationsverdampfer aufkonzentriert und mittels Zellzyklusanalysen untersucht (Abb. A- 11). Jedoch ergaben die einzelnen Fraktionen keine signifikanten Unterschiede in ihrer Wirkung, da sie vermutlich zu gering konzentriert waren. Aus diesem Grund sind die Fraktionen lyophyliert worden, um sie nochmals aufzukonzentrieren. Der Rückstand ist dann in einer geringen Menge von DMSO wieder aufgenommen und erneuten Zellzyklusanalysen unterzogen worden. Die erhaltenen Ergebnisse dieser Zellzyklusanalysen sind in Abbildung 5- 46 dargestellt.

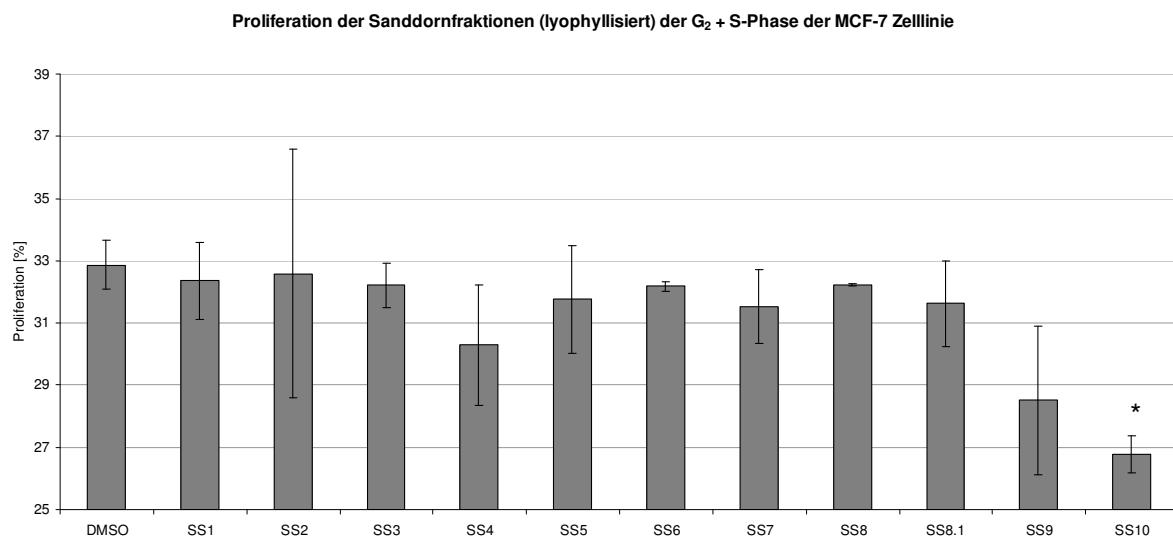


Abb. 5- 46: Proliferationsraten (%) der Zelllinie MCF-7 nach 48 h Behandlung mit den Sanddornfraktionen (SS1-SS10). Mittelwert ± Standardabweichung (n=3) im Vergleich zur Kontrolle mit DMSO. Signifikanzermittlung mit ungepaarten t-Test: * = p<0,05

Auch hier ist die Aussage über die Anzahl der proliferierenden Zellen schwierig. Nur durch reine Behandlung mit dem Lösungsmittel DMSO sind noch ca. 33 % der Krebszellen in der Lage, ihre DNA zu verdoppeln bzw. weitere Proteine zu bilden und zu wachsen. Vergleicht man die einzelnen Fraktionen, so wird deutlich, dass nur die Fraktionen SS10 und SS8 einen signifikanten Einfluss auf die Proliferationsrate der MCF-7 Zellen haben. Alle anderen Fraktionen liegen mit ihrer Standardabweichung im Wirkungsbereich der Kontrollmessung mit DMSO, so dass man davon ausgehen kann, dass die hier in den Fraktionen gelösten Inhaltsstoffe alleine keine eindeutige Auswirkung auf die Krebszelle haben. Die gelösten Inhaltsstoffe in den Fraktionen SS8 und SS10 führen hingegen, unabhängig von den anderen Fraktionen zu einer Herabsetzung der Proliferationsrate (Abb. 5- 46). Dabei ist die Behandlung mit der Fraktion SS10 sogar so effektiv, dass unter ihrem Einfluss im Vergleich zur Kontrollmessung mit DMSO, ca. 6 % weniger Mammakarzinomzellen in der Lage sind sich zu vermehren. Somit ist die Fraktion SS10 auch signifikant im Vergleich zur Kontrollmessung. Dies wird auch besonders deutlich durch den Vergleich der Standardadhäsionsrate der BIONAS-Messungen (Abb. 5- 47).

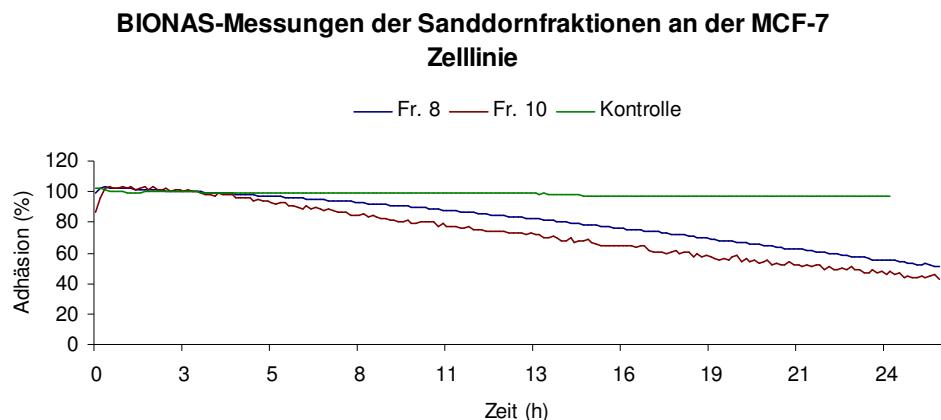


Abb. 5- 47: Darstellung der Standardadhäsionrate (%) der Mammarkarzinomzelllinie MCF-7 unter dem Einfluss der Sanddornbeerensäfte 8 und 10. Als Kontrolle diente EtOH.

Mit der Standardadhäsionratenmessung untersucht man Kontaktwechselwirkungen zwischen Zellen und Gewebeoberflächen. Über diese Messungen können indirekt Rückschlüsse zum Apoptoseverhalten der Zellen gezogen werden. In Abbildung 5- 47 sieht man bei der Echtzeit Messung, dass die Adhäsionsrate im Vergleich zur Kontrolle über einen Zeitraum von 24 h sehr stark reduziert wird. Besonders die Fraktion 10 des Sanddornbeerensaftes ist hier sehr wirksam. Die Mammakarzinomzellen werden so stark in ihrem Stoffwechselprozess beeinflusst, dass ihre Adhäsionsrate um bis zu ca. 60 % reduziert wird. Dieses kann ein Indiz dafür sein, dass die Krebszellen apoptotisch werden. Sie lösen sich aus dem Zellverband und zerstören sich selbst, ohne dass dabei das Nachbargewebe geschädigt wird.

Durch den Vergleich mit den zuvor erfolgten Inhaltsstoffanalysen des Saftes, kann nun ein Rückschluss auf die in den Fraktionen gelösten Inhaltsstoffe gezogen werden, die diese starke Wirkung haben könnten. So lagen in den einzelnen Fraktionen folgende Inhaltsstoffe vor:

- Fraktion 08: Rhamnetin-trisaccharid, Rhamnetin-diglycosid, Isorhamnetin-trisaccharid
- Fraktion 10: Isorhamnetin-desoxydiglycosid, Quercetin-trisaccharide (Gluc-Rham-Rham)

Diese Ergebnisse zeigen, dass vor allem die Inhaltsstoffe der glycosidisch gebundene Flavonoide des Sanddornbeerensaftes eine besondere Wirkung auf die Krebszelle MCF-7 haben. Auffällig ist auch, dass gerade die Trisaccharide in den effektiv wirkenden Fraktionen vorhanden sind. Somit kann zusammenfassend gesagt werden, dass vor allem die Kombination von einfachen Flavonoiden mit zwei bzw. drei Zuckermolekülen entscheidend ist für die positive Wirkung der Sanddornbeeren auf die Mammarkarzinomzelllinie MCF-7.

Zusammenfassung

Auch im Direktsaft der Sanddornbeeren konnten eine Reihe von vielen verschiedenen komplexen Inhaltsstoffen nachgewiesen werden. So konnte in Übereinstimmung mit schon vorhandener Literatur, das Vorkommen von acylierten Hydroxizimtsäurederivaten, Flavonolen und Anthocyanen bestätigt werden [108, 161, 167-169]. Das Vorkommen von Inhaltsstoffen der Stoffklasse der Lignane wie z. B. Secoisolariciresinol, Matairesinol oder Lariciresinol konnte nicht nachgewiesen werden. Auch die sekundären Inhaltsstoffe der Sanddornbeeren sind hauptsächlich glycosidisch gebunden. Eine Besonderheit ist das Vorkommen von triglycosidischen Pflanzeninhaltsstoffen, wie z. B. Xanthorhamnin oder Quercetintriglucosid. Fraktionen die diese Substanzen beinhalten, besitzen nicht nur eine bessere Wirkung auf die Hemmung des Proliferationswachstums der Zelllinien MCF-7 sondern können auch die untersuchte Krebszelllinie in einen apoptotischen Zustand überführen. Das Vollextrakt des Sanddornbeerensaftes und Fraktionen, die frei von triglycosidisch gebundenen Inhaltsstoffen sind, besitzen solche effektiven zellbiologischen Eigenschaften nicht.

5.3.4. Die Brennnessel (*Urticae dioica*)

Die Inhaltsstoffanalytik der Brennnesselpflanze erfolgte hauptsächlich an den Blättern. Diese wurden ebenfalls in Rostock und Umgebung gesammelt und sowohl im frischen als auch im getrockneten Zustand analytisch untersucht. Die Lagerung des Materials erfolgte im Gefrierfach bei ca. -27 °C.

5.3.4.1. Blätter

Die gesammelten Blätter sind frisch und nach dem Trocknen bei Raumtemperatur mit Hilfe der Mikrowelle zu Extrakten verarbeitet worden. Die entstandenen ethanolischen Lösungen sind mittels LC-MS vermessen worden, um eventuelle Unterschiede feststellen zu können. Die Abbildung 5-48 zeigt die erhaltenen Chromatogramme der LC-MS Messungen. Demnach hat der Einfluss des Trocknungsprozesses einen erheblichen Einfluss auf die vorhandenen Inhaltsstoffe. Der Extrakt, welcher aus dem getrockneten Brennnesselblättern hergestellt wurde, ist im Vergleich zum frischen Brennnesselblätterextrakt wesentlich geringer konzentriert. So besitzt der höchste Peak des getrockneten Blätterextraktes mit der Retentionszeit von 2,76 min, welcher auf eine Intensität von 100 % gesetzt worden ist, nur einen NL-Wert von ca. 7,03E05. Im Vergleich dazu hat der gleiche Peak im frischen Blätterextrakt mit einer Retentionszeit von 2,75 min einen NL-Wert von 2,58E06. Dies ist ein Hinweis, dass sich aus dem getrockneten Blättern mit Ethanol wesentlich weniger in der Mikrowellenextraktion löst. Ein möglicher Grund hierfür könnte sein, dass viele Inhaltsstoffe sich nicht gut im reinen Lösungsmittel wie Ethanol lösen. Das dann in den frischen Blättern vorhandene Wasser unterstützt die Löslichkeit dieser Inhaltsstoffe im absoluten Ethanol.

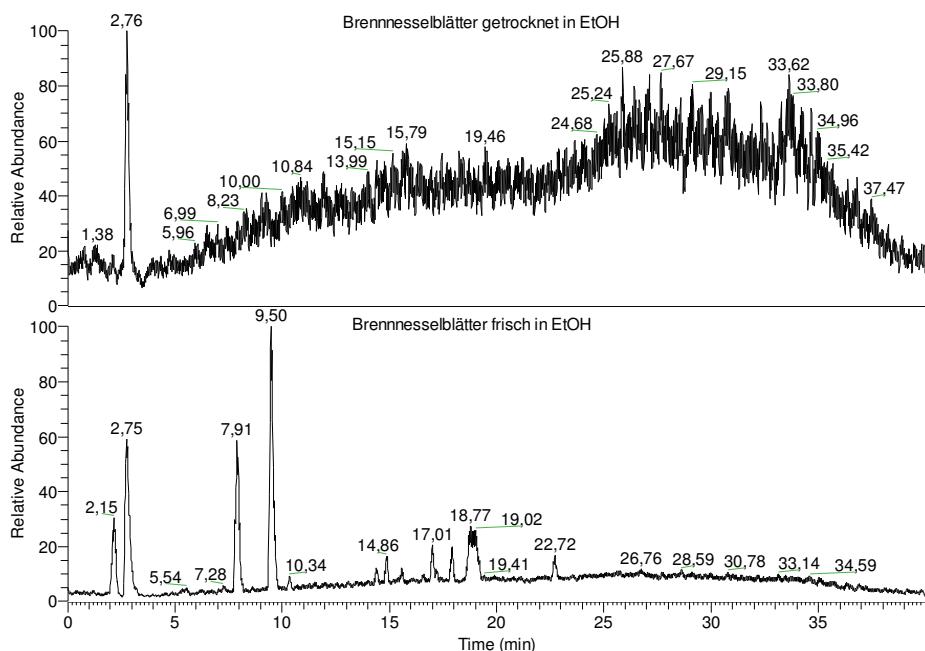


Abb. 5- 48: Vergleich von getrockneten (oben) und frischen (unten) Brennnesselblätterextrakten in Ethanol mittels ESI-LC-MS

Dies wiederum führt zu einem besseren Chromatogramm mit mehr sichtbaren Inhaltsstoffen (Abb. 5- 48). Ein Grund für die bessere Effizienz des Wasser-Ethanol-Gemisches könnten Matrixeffekte sein. Der geringe Anteil von Wasser in den Blättern könnte als so genannter Vermittler zwischen der Pflanzenmatrix und dem Lösungsmittel fungieren. Ein weiterer Grund wurde in der Diplomarbeit von Frau S. Dorbritz (2002) diskutiert. Vermutlich besitzt das Wasser auch eine enzymaktivierende Wirkung, welche die Bindungen zwischen der Pflanzenmatrix und dem zu extrahierenden Inhaltsstoff spaltet und somit für eine bessere Löslichkeit und damit zu qualitativ und quantitativ besseren Chromatogrammen führt [170].

Wegen dieser ausführlich diskutierten Einflüsse [170] ist bei der Brennnessel im weiteren das frische Blattmaterial inhaltsstofflich mit LC-MS und GC-MS untersucht worden.

Das erhaltende Chromatogramm des frischen ethanolischen Blätterextraktes kann der Abbildung 5-49 entnommen werden. Auch hier ist gut zu erkennen, dass die extrahierten Inhaltsstoffe unterschiedlich gut auf die verschiedenen Scanmodi ansprechen.

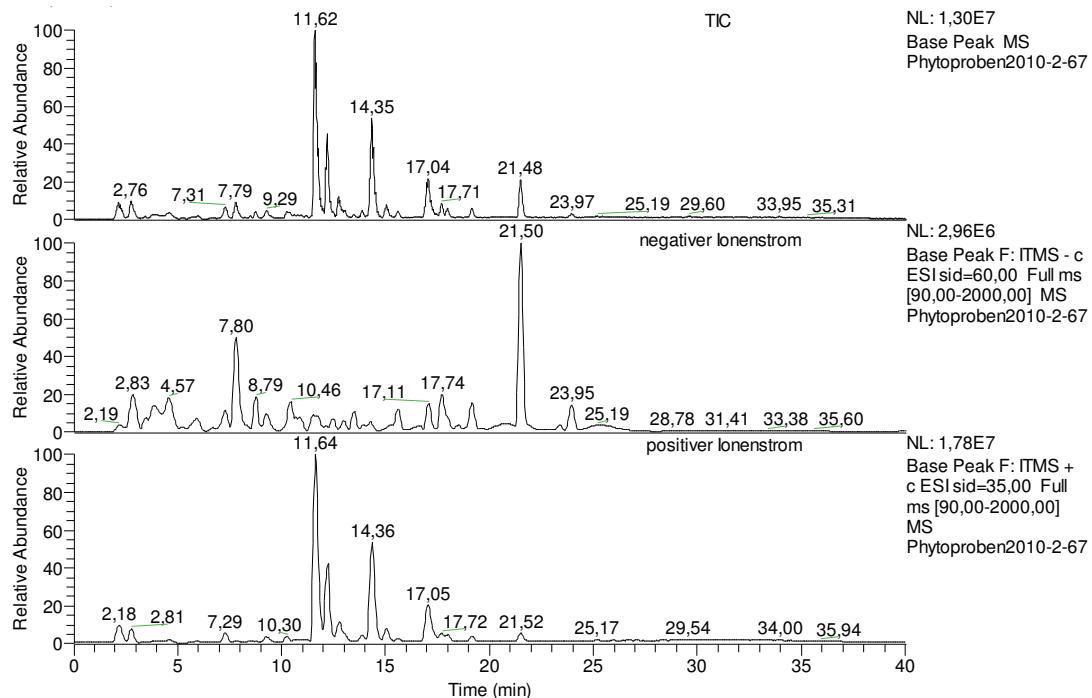


Abb. 5- 49: Chromatogramme eines frischen ethanolischen Brennnesselblätterextraktes, Oben: Totaler Ionenstrom (TIC), Mitte: Negativer Ionenstrom, Unten: Positiver Ionenstrom

So werden die meisten Inhaltsstoffe bevorzugt durch negative Ionisierung deprotoniert (Abb. 5- 49). Aber auch im positiven Ionenstrom konnten Inhaltsstoffe detektiert werden, vor allem im Retentionsbereich von 11 bis 19 min. Die hier vorhandenen Inhaltsstoffe sind leichter durch die positive Ionisierung mit ESI zu protonieren (Abb. 5- 49). Durch den Vergleich mit Referenzsubstanz und die Durchführung von MS^n -Messungen konnten folgende Inhaltsstoffe mittels der LC-MS Messung identifiziert werden (Tab. A- 2, Abb. A- 14):

Tab. 5- 9: Übersicht der Inhaltsstoffe der Brennnesselblätter ermitteln mittels ESI-LC-MS [(Relative Häufigkeit in %)]

RT (min)	Substanz	ESI (positiv Mode), m/z	ESI (negativ Mode), m/z
2,18	p-Cumarinsäure	165 (100), 127 (2)	-
4,54	Scopoletin glucosid	377 (100), 355 (51), 163 (23)	375 (25), 353 (53), 191 (100)
7,80	Rutin	-	609 (100)
7,98	Quercetin glucosid	487 (24), 465 (24)	463 (100), 300 (17)
7,99	Hesperidin	303 (100)	-
8,72	Fisetin diglucosid	617 (100), 595 (45)	593 (100)
8,79	Isorhamnetin-3-O-rutinosid	-	623 (100), 477 (5), 300 (3)
9,75	Methoxyisoflavan	267 (100)	265 (100), 249 (48), 234 (25)
10,53	Naringenin	273 (100)	271 (100)
10,56	Moringlucosid	-	463 (100)
10,99	Hesperitin glucosid	-	463 (100)
12,61	Myricitin	-	317 (100), 300 (12), 191 (54)
13,53	Chrysin	255 (100)	253 (100)

Auffällig bei der Analyse des Blätterextraktes der Brennnessel ist, dass überwiegend flavonoide Pflanzeninhaltsstoffe nachgewiesen werden konnten. Es konnten keine Massenspuren von lignanen Systemen detektiert bzw. im Extrakt aufgezeigt werden. Überraschen ist auch, dass nur sehr wenig bzw. geringe Spuren von Anthocyanaugen gefunden werden konnten, obwohl sie eine Untergruppe der Flavonoide sind. So konnte lediglich Keracyanin mit einer Retentionszeit von 2.41 min im positiven [m/z = 595 (33)] und negativen [m/z = 593 (32)] Ionenstrom nachgewiesen werden. Da die Pflanzen die Anthocyane hauptsächlich zum Schutz vor starker UV-Strahlung bilden und sie diese in den äußeren Zellschichten von Blüten und Blättern anlagern, ist anzunehmen, dass die verwendete Methode nicht ganz so gut geeignet ist zur qualitativen Untersuchung der Anthocyane, oder dass die untersuchte Brennnesselpflanze dieser extremen Umweltbelastung nur zum Teil bzw. nicht ausgesetzt war.

Im Anschluss ist das Blätterextrakt auch einer GC-MS Analyse unterzogen worden. Dabei konnten Phytosterine und Fettsäuren nachgewiesen werden. Eine Übersicht eines typischen Chromatogramms eines Extraktes der Brennnesselblätter ist in Abbildung 5-50 dargestellt.

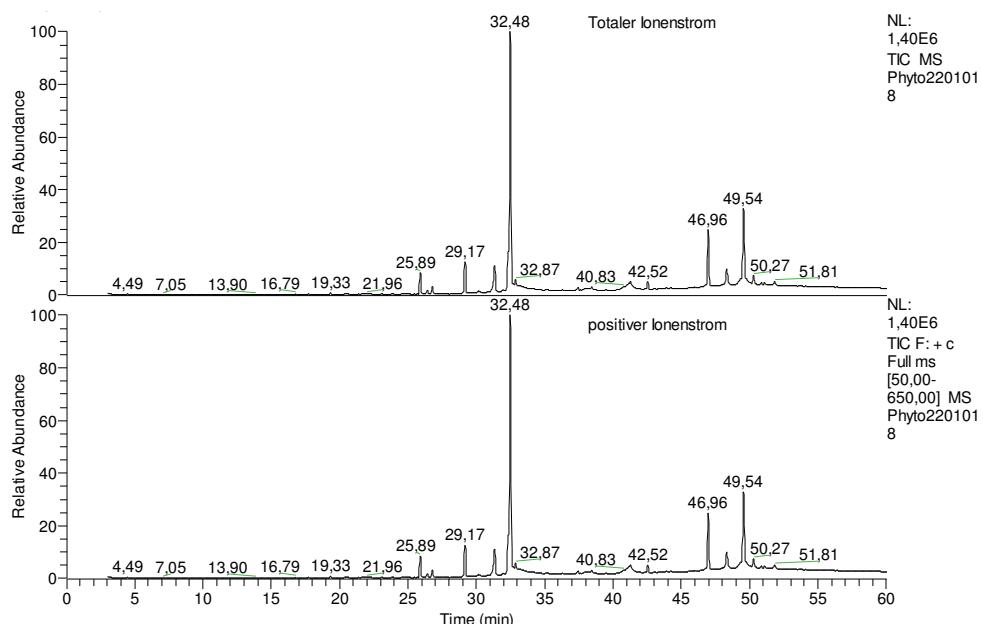


Abb. 5- 50: GC-MS Chromatogramm eines Brennnesselblätterextraktes, Oben: Totaler Ionenstrom, Unten: positiver Ionenstrom

Diese per GC-MS identifizierten Inhaltsstoffe können der Tabelle 5- 11 entnommen werden. Besonders auffällig in dieser Analysenmethode ist die hohe Intensität an Serotonin (Abb. A- 14). Dieser biochemische Botenstoff ist in der Natur der Pflanzenwelt weit verbreitet [171]. In der Brennnessel wird die Substanz durch Kontakt mit den Brennhaaren freigesetzt und ist so mit verantwortlich für die brennende Wirkung des Pflanzensaftgemisches auf der Haut.

Tab. 5- 10: Übersicht der mittels EI-GC-MS identifizierten Inhaltsstoffe (Tab. A- 2, Abb. A- 14) des Brennnesselblätterextraktes [(Relative Häufigkeit in %)]

RT (min)	Substanz	ESI (positiv Mode), m/z
29,17	Stearinsäure	284 (100)
32,48	Serotonin	176 (100)
46,86	Tocopherol	430 (86), 165 (100)
48,23	Campesterol	400 (90)
49,54	Sitosterol	414 (100)

5.3.4.2. Zelluntersuchungen

Auch für das Blattextrakt der Brennnessel erfolgte eine Zellzyklusanalyse durch Frau Dr. Nadja Engel-Lutz. Das Resultat dieser Untersuchung ist in Abbildung 5-51 dargestellt. Bei diesen Untersuchungen ist auch der Einfluss des Verdünnungsfaktors der Ausgangslösung untersucht worden.

Proliferationsraten der MCF-7 Zelllinie unter dem Einfluss des Brennnesselextraktes

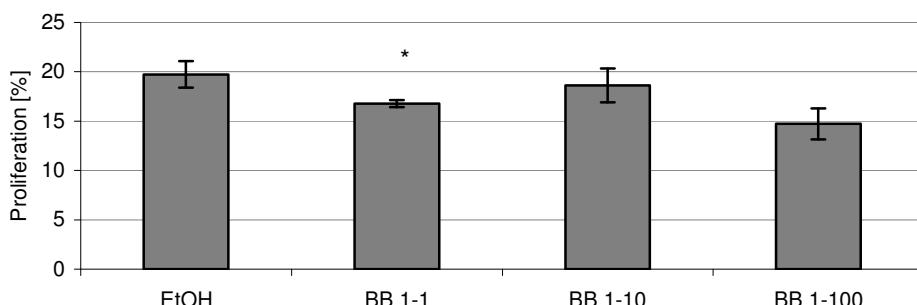


Abb. 5- 51: Proliferationsraten (%) der Zelllinie MCF-7 nach 48 h Behandlung mit verschiedenen Verdünnungen der Brennnesselblätterextrakte (BB 1-1, 1-10, 1-100)). Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3) im Vergleich zur Kontrolle mit EtOH. Signifikanzermittlung mit ungepaarten t-Test: * = p<0,001

Durch den Einfluss des reinen Lösungsmittels Ethanol (EtOH) sind bei der Kontrollmessung ca. 19 % proliferierende MCF-7 Zellen vorhanden. Durch die Behandlung mit den verschiedenen Konzentrationen des Brennnesselblätterextraktes, wird die Proliferation der Zellen bei allen Verdünnungsstufen herabgesetzt. Auffällig hierbei ist, dass die 1:100 Verdünnung die Proliferation um ca. 5 % herabsetzt. Dies ist etwas mehr als bei der 1:1 und 1:10 Verdünnung. Die 1:1 Verdünnung senkt die Proliferation zwar nur um ca. 2-3 %, allerdings ist hier die antikanzerogene Wirkung signifikant im Vergleich zur Kontrolle mit EtOH. Bei der 1:10 Verdünnung hingegen steigt die Proliferation im Vergleich zu 1:1 und 1:100 Verdünnung wieder an, jedoch ist sie im Vergleich zur Kontrolle immer noch um ca. 1-2 % gehemmt und nicht signifikant. Somit könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass auch Konzentrationseinflüsse im Zusammenhang mit der Proliferationshemmung der MCF-7 Zelle stehen. Die

Untersuchungen zeigen, dass geringere Konzentrationen des Brennnesselblätterextraktes keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation der MCF-7 Zelllinien haben als höher konzentrierte Extrakte. Allerdings fällt das Ergebnis der 1:100 Verdünnung aus diesem Schema heraus. Hierbei könnte es sein, dass eine Kombination verschiedener flavonoider Inhaltsstoffe wieder einen positiven Effekt hervorruft, welcher aber gegenüber der Kontrolle nicht signifikant ist bzw. in der 1: 10 Verdünnung geringer ausfällt und somit nicht zum tragen kommen. Diese Aussagen müssten aber in weiteren Untersuchungen noch bestätigt werden. So könnte eine weitere Erhöhung der Konzentration auch in einen negativen Effekt umschlagen und eher zu einer Förderung des Brustkrebszellwachstums führen, da bereits in anderen Studien mit isolierten Isoflavonen solche Zusammenhänge belegt werden konnten [40, 172].

Zusammenfassung

In den ethanolischen Extrakten der Brennnesselblätter konnten ebenfalls eine Vielzahl von verschiedenen komplexen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen mit Hilfe der LC-MS und GC-MS nachgewiesen werden. Diese sind ebenfalls überwiegend glycosidisch gebunden und unterscheiden sich kaum von den Pflanzeninhaltsstoffen die bereits in dieser Arbeit in anderen Pflanzen nachgewiesen werden konnten. Das Vorkommen von lignanen Leitstrukturen wie bei der Leinwurzel konnte nicht nachgewiesen werden. Dafür konnten jedoch Strukturen der Substanzklasse der Anthocyane identifiziert werden. Die zellbiologischen Untersuchungen konnten zeigen, dass eine signifikante Proliferationshemmung des Blattvollextraktes auf die MCF-7 Zellen nachgewiesen werden kann.

5.3.5. Die Rotbuche (*Fagus sylvatica*)

Bei der Rotbuche wurde nur die Rinde untersucht. Das getrocknete und zerkleinerte Material ist ebenfalls mit Ethanol extrahiert worden. Die Lagerung des Materials erfolgte trocken und lichtgeschützt bei Raumtemperatur. Das untersuchte Rindenmaterial der Rotbuche wurde bereits für die Arbeiten von Herrn Dr. Jochen Michels und Dipl.-Chem. Sebastian Pryzmusinski hinsichtlich seines Ligninanteils und seiner Zuckerbestandteile untersucht [173].

Tab. 5- 11: Zusammensetzung der Buchenrinde in % (bezogen auf trockenes Holz, * enthält neben Lignin auch Verbindungen, wie Kork und Wachse) [173]

Inhaltsstoffe	Buchenrinde
Lignin (als Hydrolyserückstand)	40.4 *
Σ Zucker	35.2
davon Glucose	18.3
-“- Xylose	10.5
-“- Mannose	0.5
-“- Arabinose	2.9
-“- Rhamnose	0.8

Wie aus der Tabelle 5- 11 ersichtlich ist, besteht die Rinde der Rotbuche zum großen Teil aus dem phenolischen Makromolekül Lignin und vielen verschiedenen Kohlenhydraten. Dabei überwiegend Glucose und Xylose, welche Bestandteile der Cellulose und Hemicellulose sind. Beide Faserstoffe bilden mit dem Lignin zusammen die so genannte Struktur- bzw. Stützsubstanz der Pflanze, mit der sie durch die Verholzung der äußeren Pflanzenschichten an Stabilität und Elastizität gewinnen. Trotz des großen Anteils an verholztem Material in der Rinde, konnten durch die Mikrowellenextraktion ebenfalls sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe extrahiert werden. Ein typisches LC-MS Chromatogramm eines ethanolischen Buchenrindenextraktes ist im folgenden Diagramm dargestellt.

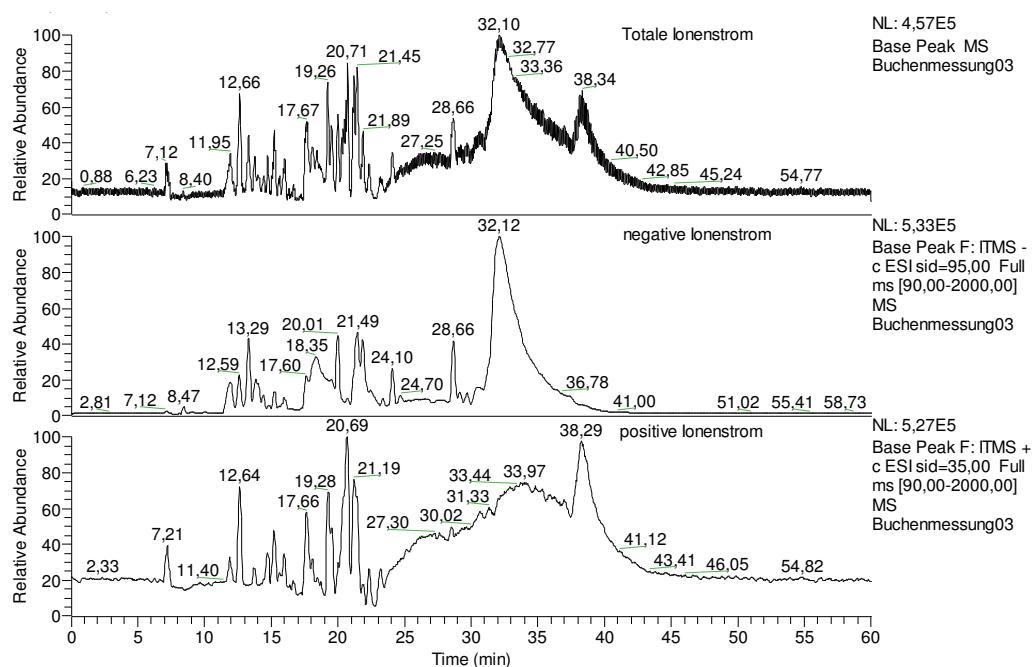


Abb. 5- 52: LC-MS Chromatogramm eines ethanolischen Extraktes der Buchenrinde, aufgeteilt in verschiedene Ionenströme. Oben: Totaler Ionenstrom (TIC), Mitte: Negativer Ionenstrom $[M-H^+]^-$, Unten: Positiver Ionenstrom $[M+H^+]^+$

Auch hier wird deutlich, dass wieder viele phenolische bzw. flavonoidähnliche Verbindungen mit Hilfe von ESI hauptsächlich negativ ionisiert werden (Abb. 5- 52). So konnten Hinweise auf lignanähnliche Strukturausteine im Massenspektrum gefunden werden, welche bis jetzt nicht näher definiert werden können. Des Weiteren konnte ein oligomeres Proanthocyanidin (OPC) bei einer Retentionszeit von 8.47 min identifiziert werden, welches sich strukturell aus Dimeren oder Trimeren von Catechinen zusammensetzt (Abb. 5- 53).

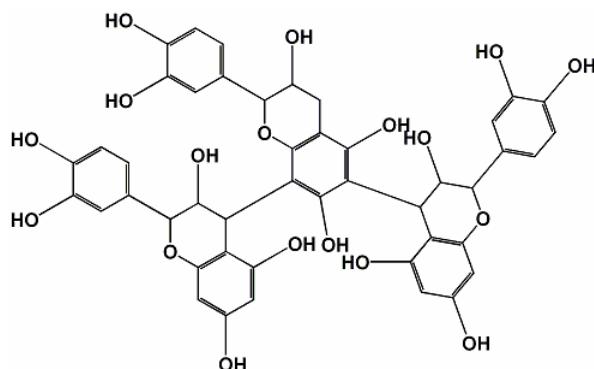


Abb. 5- 53: Struktur des OPC in der Buchenrinde

Diese Zusammensetzung wird im Massenspektrum sehr gut deutlich (Abb. 5- 54). So erhält man durch die negative Ionisierung mit ESI das nachstehende Fragmentmuster (Abb. 5- 54). So bildet sich für das gesamte Molekül das Ion $[M-H^+]$ mit einem Wert von 856 amu. Durch die Abspaltung eines Catechinmoleküls entsteht das Fragment $[M-288]$ mit dem Wert von 577 amu. Die weitere Abspaltung eines zweiten Catechinmoleküls führt dann zum Massenfragment mit 289 amu (Abb. 5- 54).

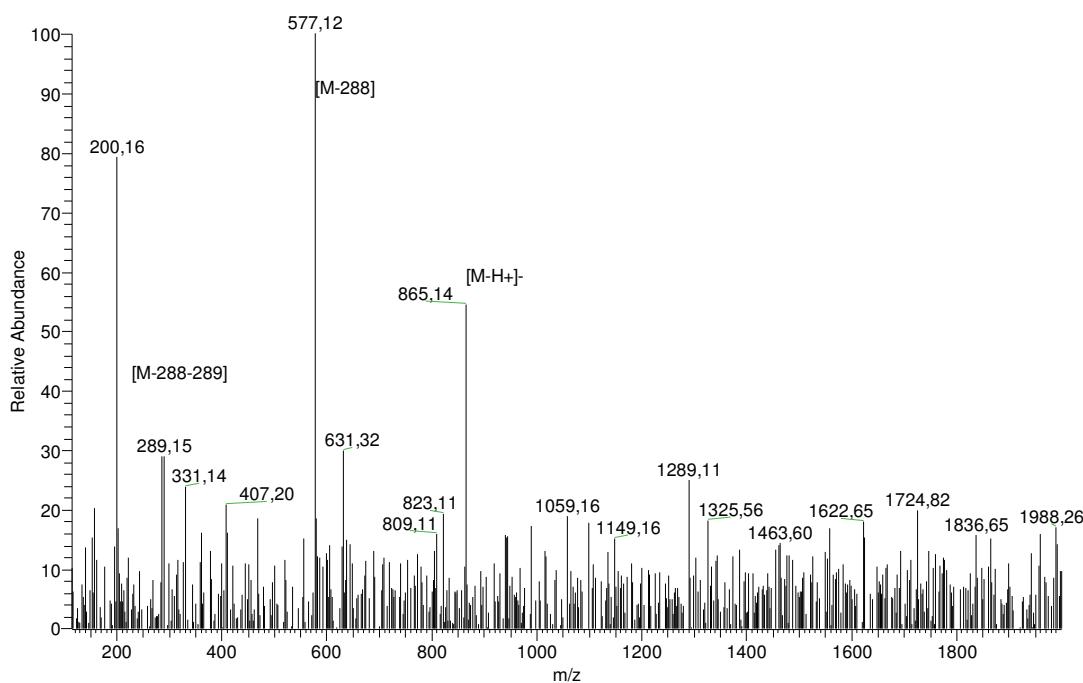


Abb. 5- 54: Massenspektrum des OPC in der Buchenrinde

Besonders die äußenen Pflanzenteile von Obst und Gemüse, wie z.B. in Schalen, Kernen oder Kerngehäusen können große Mengen dieser Verbindung enthalten, da sie hier hauptsächlich zum Schutz vor UV-Strahlung, klimatischen Bedingungen oder Frassfeinden dienen. So konnten diese Verbindungen bereits in Äpfeln, Erdbeeren, Erdnüssen, Zwiebeln und Orangen nachgewiesen werden [174]. Studien konnten eine dosisabhängige Wachstumshemmung bei Dickdarmkrebszellen beobachten [175]. Des Weiteren ist es bekannt dafür, dass es die Wirkung von Vitaminen verstärken kann [176],

177]. Diese Verbindungseigenschaften machen die Buchenrinde zu einem interessanten Ansatzpunkt für zellbiologische Untersuchungen an Mammakarzinomzellen.

Durch die LC-MS-Analyse der Buchenrinden konnten bisher noch weitere folgende sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe mit einer flavonoid-ähnlichen Struktur identifiziert werden:

Tab. 5- 12: Übersicht der bisher identifizierten Flavonoide und Flavonoidglycoside der Buchenrinde (Tab. A- 2, Abb. A- 14). [(Relative Häufigkeit in %)]

RT (min)	Substanz	ESI (positiv Mode), m/z	ESI (negativ Mode), m/z
8,47	Catechin	-	289 (100), 245 (23)
11,91	Glucodistylin	467 (100)	465 (100), 285 (88), 303 (14), 151 (24)
12,59	Taxifolin- <i>O</i> -pentose	-	435 (100), 285 (65), 151 (18), 303 (17)
13, 22	Isoconiferin	327 (100)	325 (100), 311 (18), 295 (11)
13,33	Taxifolin	-	606 (19), 303 (100), 285 (18), 177 (4)
14,35	Quercetin-pentose	435 (100)	433 (100), 300 (55)

Auffällig hierbei ist, das viele Flavonoide der Buchenrinde auf der Struktur von Taxifolin basieren. Taxifolin (Dihydroquercetin [DHQ]) ist dem Quercetin strukturell ähnlich (Abb. 5-55). Es fehlt ihm lediglich eine Doppelbindung am C-Ring.

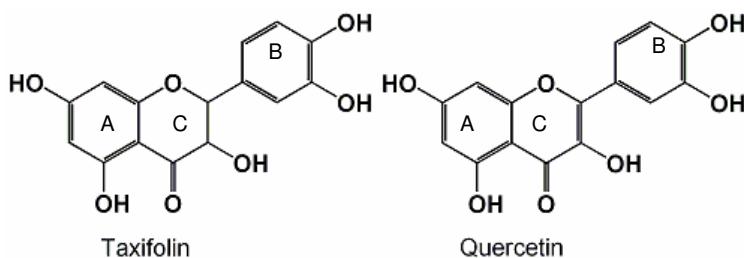


Abb. 5- 55: Struktur der Flavonoide Taxifolin und Quercetin

Untersuchungen haben ergeben, dass gerade diese fehlende Doppelbindung großen Einfluss auf die Eigenschaften des Taxifolins (DHQ) hat. So ist das Vorhandensein der Doppelbindung beim Quercetin gut für die antioxidative Wirkungskraft [178]. Allerdings wirkt sich diese schlechter auf die Mutagenität und Toxizität aus [179]. So könnte das Taxifolin (DHQ) bzw. seine glycosidisch gebundenen Metabolite gerade für die Krebsforschung von großen Interesse sein, da es weniger mutagen und toxisch ist als das Quercetin und ebenfalls eine antioxidative Wirkungskraft besitzt. Diese ist jedoch um ca. 50 % schlechter als die des Quercetins [178].

Solche Inhaltsstoffe können mit dem Stoffwechsel der Pflanze korreliert werden. So sind Taxifolin (DHQ) und Quercetin Metabolite der pflanzlichen Flavonoid-Biosynthese [180-184], (Abb. A- 13). Das Taxifolin ist hierbei eine der möglichen Vorstufen des Quercetins, welches dann durch das Enzym 'Flavonol Synthase', eine Oxidureduktase, in der folgenden chemischen Reaktion umgesetzt wird [185]:

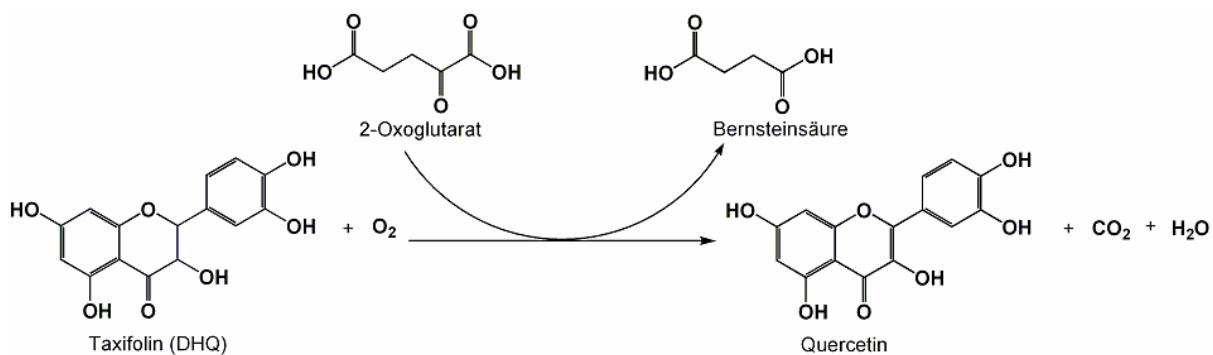


Abb. 5- 56: Synthese von Quercetin im pflanzlichen Stoffwechsel aus Taxifolin [185]

Bei der Analyse des Buchenrindenextraktes mit Hilfe der GC-MS konnten folgende Inhaltsstoffe sicher identifiziert werden:

Tab. 5- 13: Übersicht der mittels EI-GC-MS identifizierten Inhaltsstoffe des Buchenrindenextraktes (Tab. A- 2, Abb. A- 14). [(Relative Häufigkeit in %)]

RT (min)	Substanz	ESI (positiv Mode), m/z
57,22	Betulin	442 (100)
16,52	Vanillin	152 (100)
38,82	Linolensäure	278 (100)
55,74	Sitosterol	414 (34)

Gerade das Vorkommen von Betulin macht die Buchenrinde für weitere zellbiologische Untersuchungen mit Mammakarzinomzellen besonders interessant, da es ein sehr breites Wirkungsspektrum besitzt. So sind bis jetzt antientzündliche, antibakterielle und antivirale als auch antitumoral pharmakologische Wirkungen beschrieben worden [186, 187].

5.3.5.1. Zelluntersuchungen

Das Rindenextrakt der Buche wurde ebenfalls für Zellzyklusanalyse und BIONAS-Untersuchungen verwendet. Die daraus resultierenden Ergebnisse werden im Folgenden dargestellt und diskutiert.

Die Zellzyklusanalyse des Rindenextraktes hat gezeigt, dass das Extrakt ebenfalls in der Lage ist mit seinen gelösten Inhaltsstoffen die Proliferation der MCF-7 Mammakarzinomzellen herabzusetzen (Abb. 5- 57).

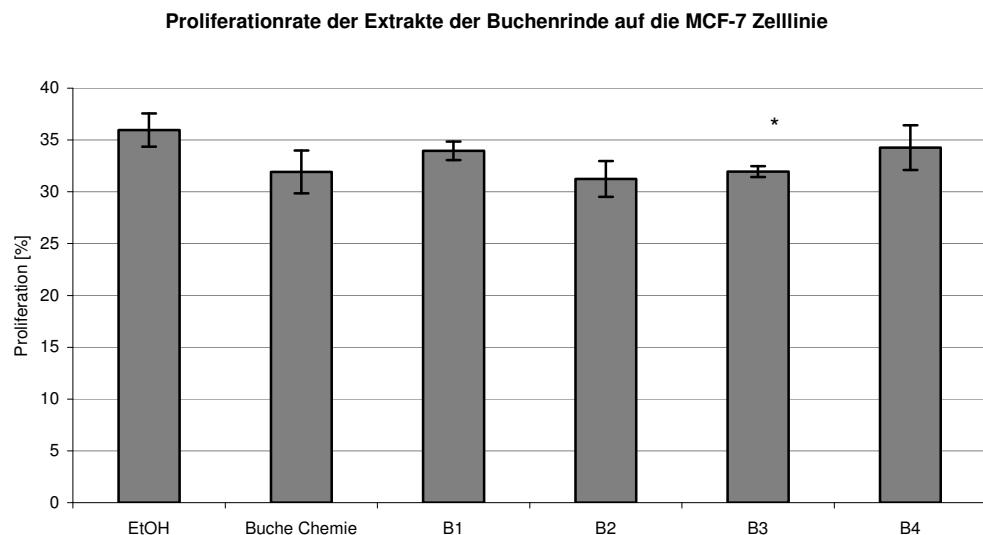


Abb. 5- 57: Proliferationsraten (%) der Zelllinie MCF-7 nach 48 h Behandlung mit den Fraktionen (B1-4) und dem Extrakt der Buchenrinde. Mittelwert \pm Standardabweichung (n=3) im Vergleich zur Kontrolle mit EtOH. Signifikanzermittlung mit ungepaarten t-Test: * = p<0,05

Allein durch die Zugabe von Ethanol als Lösungsmittel befinden sich immer noch ca. 37 % der Krebszellen im proliferierenden Zustand G₂+S. Durch den Einfluss des Buchenrindenextraktes nimmt die Anzahl der Krebszellen, die sich im proliferierenden Zustand befinden um ca. 5 % ab (Abb. 5- 57). Im Vergleich zur Kontrolle mit EtOH können sich nur noch ca. 32 % der Krebszellen teilen und somit wachsen (Abb. 5- 57).

Auch vom Extrakt der Buchenrinde sind mit Hilfe der präparativen HPLC Fraktionen geschnitten worden (Abb. A- 12). Diese sind ebenfalls hinsichtlich ihrer Wirkungsweise untersucht und analysiert wurden. Wie man es jedoch der Abbildung 5-57 entnehmen kann, unterscheiden sich die Proliferationsraten der einzelnen Fraktionen im Vergleich zum Vollextrakt nur minimal voneinander (Abb. 5- 57). Lediglich die Fraktion B3 ist mit einer Proliferationsrate von ca. 31-32 % signifikant zur Kontrolle mit EtOH. In dieser Fraktion befinden sich vor allem Taxifolin und die glycosidisch gebundenen Taxifoline, welche aus chemischer Sicht mit zu den Flavonoiden gehört. Taxifolin ist für eine mögliche Chemoprävention gegen Krebs bereits bekannt [188]. So konnte in einigen Studien bereits eine hemmende Wirkung auf das Zellwachstums von Eierstockkrebs- und Brustkrebszellen nachgewiesen werden [189, 190]. Die Fraktionen B1 und B4 sind in ihrer proliferationshemmenden Wirkung sogar schlechter als das Vollextrakt, was für einen synergistischen Effekt der Inhaltsstoffe sprechen könnte und somit wieder ein Hinweis für die Komplexität der gelösten Inhaltsstoffe und ihre daraus resultierende positive Wirkung ist.

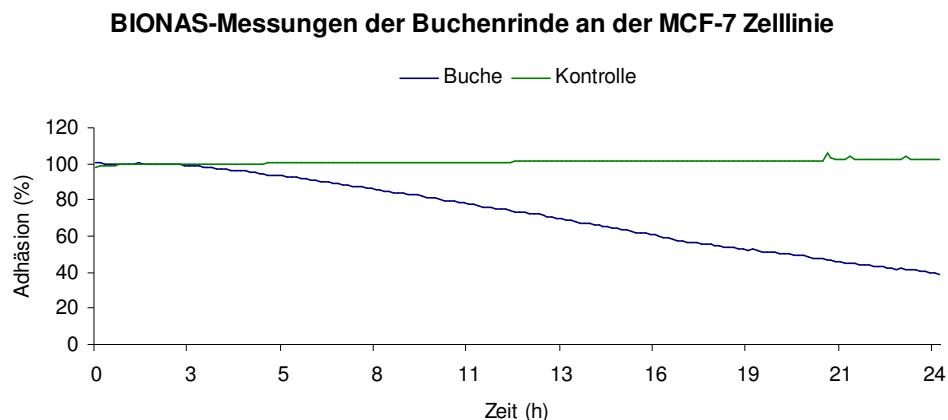


Abb. 5- 58: Darstellung der Standardadhäsionrate (%) der Mammarkarzinomzelllinie MCF-7 unter dem Einfluss des Rindenextraktes der Rotbuche. Als Kontrolle diente EtOH.

Auch die BIONAS-Untersuchung des Buchenrindenvollextraktes zeigt diesen positiven Einfluss aller Inhaltsstoffe auf die MCF-7 Zellen (Abb. 5- 58). Der Rindenextrakt verursacht eine starke Reduktion der Adhäsion der MCF-7 Zellen und überführt diese in einen apoptotischen Zustand. Im Vergleich zur Kontrolle verringert der Vollextrakt der Rinde die Standardadhäsionrate in den ersten 24 h kontinuierlich um ca. 60 %. Somit sind durch den Einfluss des Extraktes, gerade in den ersten Stunden, die meisten Zellen in ihrer Kontaktwechselwirkung mit der Materialoberfläche und mit anderen Zellen stark gestört. Dieses wiederum hat einen großen Einfluss auf das Apoptosverhalten der Krebszellen und viele Zellen lösen sich aus ihrem Zellverband und induzieren ihren eigenen Zelltod.

Zusammenfassung

Zusammenfassend kann auch hier gesagt werden, dass in den ethanolischen Extrakten der Buchenrinde ebenfalls verschiedene komplexe sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe mit Hilfe der LC-MS und GC-MS nachgewiesen werden konnten. Auch hier sind die identifizierten Pflanzeninhaltsstoffe überwiegend glycosidisch gebunden. Es konnten keine Anthocyane nachgewiesen werden, jedoch sind lignane Leitstrukturen wie bei der Leinwurzel im Vollextrakt der Buchenrinde nachweisbar. Diese können bis jetzt jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden. Des Weiteren besitzt der Rindenextrakt der Buche einen sehr starken Einfluss auf das Zellwachstum der MCF-7 Zellen, da dieser nicht nur die Proliferationsrate der Krebszellen senkt, sondern auch die Standardadhäsionsrate stark reduziert und die Brustkrebszellen in einen apoptotischen Zustand überführt.

5.4. Vergleich und Diskussion der Ergebnisse

Um die Inhaltsstoffanalyse der einzelnen Pflanzenextrakte in Zusammenhang mit einer Struktur-Wirkungsbeziehung zu bringen, sind alle erhaltenen Ergebnisse zusammengefasst und miteinander verglichen worden. Hierzu wurde die Übersicht der gefundenen Inhaltsstoffe vereinfacht, indem die Einteilung der verschiedenen Pflanzenextrakte nach den gefundenen Substanzklassen (Lignane, Flavonoide und

Athocyane) erfolgte. In der Tabelle 5-14 sind die untersuchten Pflanzenextrakte und die in Ihnen gefundenen Substanzklassen zusammen dargestellt. Eine ausführlichere Aufstellung mit den spezifisch gefundenen Inhaltsstoffen und deren Strukturen ist im Anhang enthalten (Tab. A- 1, Tab. A- 2, Abb. A- 14). In der Inhaltsstoffanalyse konnte gezeigt werden, dass in allen untersuchten Pflanzenteilen sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe nachgewiesen werden können. Besonders auffällig hierbei ist, dass in allen Extrakten die flavonoiden Systeme stark vertreten sind (Tab. 5-14).

Tab. 5- 14: Übersicht der gefundenen Substanzklassen in den einzelnen Pflanzenextrakten

Pflanze	Pflanzenteil	Lignane	Flavonoide	Anthocyane
Lein	Wurzel	X	X	
Holunder	Beeren		X	X
	Blüten		X	
Sanddorn	Beeren		X	X
Brennnessel	Blätter		X	X
Rotbuche	Rinde	X	X	

Dieses Resultat ist jedoch nicht sehr verwunderlich, da die Flavonoide eine Vielzahl von Funktionen in den Pflanzen übernehmen [191]. Vor allen in den Blüten und Beeren sind die Flavonoide sehr verbreitet. So dienen sie hier als Lockstoffe für Insekten [192], sind mit einer der wichtigsten Bestandteile zur Bildung von Blütenfarbstoffen [193], fungieren als Fraßschutz gegen Herbivoren [191] oder dienen als Schutz gegen UV-Strahlung oder kurzwelliges Licht [191]. Auch flavonähnliche Stoffe, wie die Anthocyane (Anthocyanine, Anthocyanidine), konnten nachgewiesen werden, diese jedoch hauptsächlich in den autotrophen Pflanzenteilen. Überwiegend dienen sie hier als Schutz vor UV-Strahlung und Fraßfeinden, sind Bestandteil vieler Pflanzenfarbstoffe und sind mit verantwortlich für die Anlockung von Insekten [194, 195]. Wie aus der Literatur bereits bekannt ist [193, 195], konnte auch in diesen Untersuchungen die Anthocyane nur im Zusammenhang mit den Flavonoiden gefunden werden. In keinem der Pflanzenextrakte konnten Anthocyane allein nachgewiesen werden. Die in den anthocyanhaltigen Pflanzenteilen vorhandenen Flavonoide werden zur Stabilisierung der Anthocyane benötigt, da diese positiv geladen sind [195]. Auch die Glykosilierung mit der sie häufig in den Pflanzenteilen gefunden worden sind, dienen der Stabilisierung des Anthocyanmoleküls [195]. In den Holunderblüten selbst konnten keine Anthocyane nachgewiesen werden. Eine Ursache könnte die verwendete Untersuchungsmethode sein, die für die Untersuchung dieser Substanzklasse wahrscheinlich nicht geeignet ist bzw. nicht die idealsten Analysenbedingungen besitzt. Aber auch die Pflanzenart an sich hat hierauf einen Einfluss, da die Holunderblüten eine weiße Blütenfarbe besitzen. Die Anthocyane hingegen verschieben die Blütenfarbe in das rot-blau-schwarze Farbspektrum [195]. Eine weiße Blütenfarbe würde somit eher für einen höheren Anteil von Flavonoiden (mind. 95 %) sprechen [193]. Die Substanzklasse der Lignane konnte in diesen Untersuchungen bisher nur in heterotrophen Pflanzenteilen, wie die Wurzel der Leinpflanze oder die Rinde der Rotbuche, nachgewiesen werden. Diese unterscheiden sich sehr vom Aufbau der

anderen sekundären Pflanzeninhaltsstoffe, da sie aus dimeren Phenylpropanoiden bestehen [196]. In der Pflanze übernehmen sie die Abwehrfunktion gegen Infektionen und haben auch einen Einfluss auf das Pflanzenwachstum [197]. Auch die Lignane konnten nicht nur frei gefunden werden, sondern waren ebenso wie die Flavonoide und Anthocyanide glycosidisch gebunden.

Ein zusammenfassender Vergleich der Zelluntersuchungen an der MCF-7 Zelllinie ist in der Abbildung 5- 59 zu entnehmen. Hier ist die Hemmung im Vergleich zur Kontrollmessung dargestellt. Somit kann die Wirkungsweise auf das Wachstum der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 der einzelnen Pflanzenextrakte direkt abgelesen und miteinander verglichen werden.

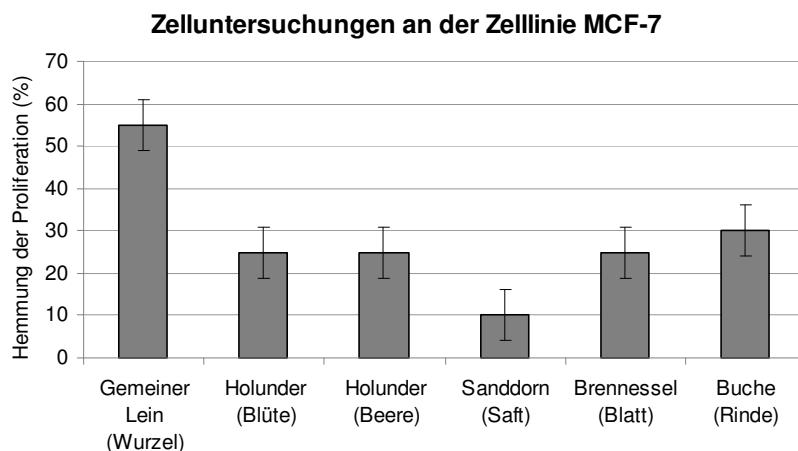


Abb. 5- 59: Vergleich der Proliferationshemmung (%) an der MCF-7 Zelllinie der untersuchten Pflanzenextrakte. Darstellung im Vergleich zur Kontrollmessung.

Der Vergleich aller Extrakte untereinander ergab, dass alle untersuchten Pflanzenextrakte in der Lage sind das Wachstum der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 zu hemmen. Die besten Ergebnisse hierbei lieferte das Extrakt der Leinwurzel, mit einer Proliferationshemmung von ca. 55 %. Der Sanddornsaft hingegen, hat mit einer Proliferationshemmung von nur ca. 10 %, den schwächsten Einfluss auf die Hemmung des Zellwachstums von MCF-7 gezeigt. Die Pflanzenextrakte aus der Blüte und der Frucht des Holunderstrauches haben beide eine ähnliche Wirkung auf die MCF-7 Zellen. Beide vermindern die Proliferation um ca. 25 %. Auch das Extrakt aus den Brennesselblättern ist in der Lage das Wachstum der MCF-7 Zellen genauso gut zu hemmen wie die der Holunderpflanze. Jedoch ist die Wirkung aller untersuchten Blatt-, Blüten- und Beeren/Fruchtextrakte im Vergleich zum Leinwurzelextrakt um ca. 30 % geringer. Das Buchenrindenextrakt hat ebenfalls eine Wirkung auf das Zellwachstum der MCF-7 Zellen und hemmt es um ca. 30 %. Somit ist die Wirkung des Buchenrindenextraktes besser als die der Blatt-, Blüten- und Beeren/Fruchtextrakte. Aber immer noch um 25 % schwächer als die des Leinwurzelextraktes.

Werden alle zellbiologischen und inhaltsstofflichen Untersuchungen nun in einen Zusammenhang gebracht, so kann gesagt werden, dass vor allem Extrakte heterotropher Pflanzenorgane, wie Rinden- und Wurzelmaterial, eine besonders gute Wirkung auf die

Proliferationshemmung der Mammakarzinomzellen MCF-7 haben. Die Extrakte autotropher Pflanzenorgane, wie Blätter, Blüten und Früchte der untersuchten Pflanzen besitzen zwar auch einen Einfluss auf das Mammakarzinomzellwachstum, jedoch ist diese bei weitem nicht so stark ausgeprägt wie bei den Extrakten heterotropher Pflanzenteile. Diese unterschiedlichen Ergebnisse sind vor allem mit den Inhaltsstoffanalysen in den Zusammenhang zu bringen. Gerade in den heterotrophen Pflanzenteilen sind besonders viele Lignane als sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe enthalten. In den autotrophen Pflanzenteilen konnten eher eine Vielzahl von Flavonoiden identifiziert werden. Diese Wirkungsunterschiede werden auch in den BIONAS-Messungen besonders deutlich (Abb. 5- 60).

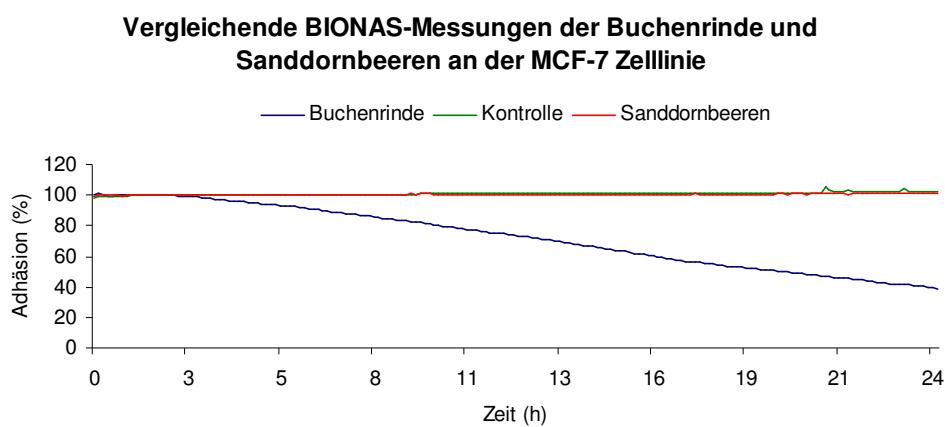


Abb. 5- 60: Darstellung der Standardadhäsionrate (%) der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 unter dem Einfluss der Extrakte von Sanddornbeeren und Buchenrinde. Als Kontrolle diente EtOH.

Während der Extrakt der Sanddornbeeren keinerlei Auswirkung auf die Adäsionrate der MCF-7 Zelllinien hat und so mit der Kontrollmessung fast identisch ist. Ist der Einfluss des Buchenrindenextraktes umso größer. Dieser reduziert die Adhäsionsraten um bis zu 60 % und ist somit in der Lage mehr Mammakarzinomzellen in die Apoptose zu drängen als der Beerenextrakt des Sanddorns. Auch hier wird wieder deutlich, dass ein lignanreicher Extrakt eine bessere Wirkung aufzeigt als ein flavonoidreicher Extrakt. Jedoch sind die Flavonoide an sich nicht zu unterschätzen. Vergleicht man die sehr wirksamen Sanddornbeerenfraktionen 8 und 10 mit der Wirkung des Buchenextraktes (Abb. 5- 61), so wird deutlich, dass auch sie in der Lage sind die Adhäsionsrate der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 reduzieren zu können. Allerdings beträgt ihre Reduktionsrate nur zwischen 43 bis 53 %.

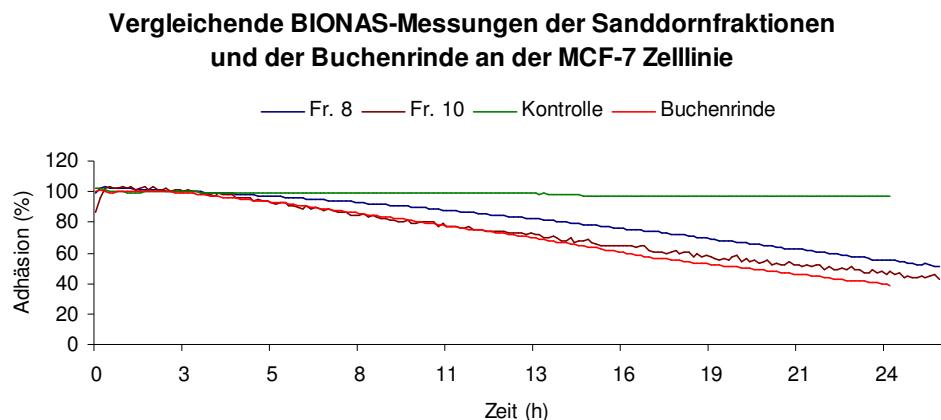


Abb. 5- 61: Darstellung der Standardadhäsionrate (%) der Mammarkarzinomzelllinie MCF-7 unter dem Einfluss der Fraktionen des Sanddornbeerenstraktes im Vergleich mit dem Vollextrakt der Buchenrinde. Als Kontrolle diente das Lösungsmittel EtOH.

Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass nicht nur Lignane eine gute hemmende Wirkung auf das Mammakarzinomwachstum haben, sondern auch mehrfach glycosidisch gebundene Flavonoide. Wie im Kapitel 5.3.3.2 schon ausführlich beschrieben wurde, befinden sich gerade in den Fraktion 8 und 10 des Sanddornbeerensaftes besonders viele triglycosidisch gebundene Flavonoide, wie Rhamnetin-trisaccharid, Isorhamnetin-trisaccharid oder Quercetin-trisaccharid.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in diesen Untersuchungen nicht eine einzelne Substanz bzw. Substanzklasse als singulärer hemmender Wirkfaktor auf die Proliferation der MCF-7 Zellen identifiziert werden konnte. Vielmehr ist die Kombination aus verschiedenen Lignanen und mehrfach glycosillierter flavonoider Systeme effektiv in der Proliferationshemmung der MCF-7 Zellen.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeiten sind fünf verschiedenen Pflanzenarten untersucht worden. Dabei sind aus insgesamt fünf verschiedenen Teilen der Pflanzen, wie z. B. Wurzel, Rinde, Blüte und Frucht mit Hilfe der Mikrowellenextraktion Extrakte hergestellt und für die analytische Auswertung mit HPLC-MS und GC-MS vermessen und auf ihre proliferationshemmende Wirkung an der MCF-7 Zelllinie untersucht worden (Tab. 6- 1).

Tab. 6- 1: Allgemeine Übersicht der Anzahl und Ergebnisse der untersuchten Extrakte bzw. Fraktionen (Proliferationshemmung: sehr gut: >50 %, gut: 50>x<20 %, befriedigend: <20 %). Signifikanz im Vergleich zur Kontrollmessung.

Pflanzenart	Anzahl der untersuchten Pflanzen-teile	Anzahl der unterschiedlichen Voll-extrakte	unter-suchte Frak-tionen	Proliferations-hemmung an MCF-7 der Vollextrakte	Proliferations-hemmung an MCF-7 der Fraktionen
Lein	1	1	3	sehr gut	keine Fraktion mit signifikanter Wirkung
Sanddorn	1	2	10	befriedigend	2 Fraktionen mit signifikanter Wirkung
Holunder	2	2	7	gut	keine Fraktion mit signifikanter Wirkung
Brennnessel	1	3	0	gut	-
Rotbuche	1	1	4	gut	1 Fraktion mit signifikanter Wirkung

Bei der analytischen Untersuchung der Extrakte sind verschiedene Ionenströmen sowohl chromatographisch als auch massenspektrometrisch aufgenommen worden, da durch die Elektronenspray-Ionisation je nach Größe und Gewicht der Moleküle einfach geladene Ionen der Sorte $[M+H]^+$ oder $[M-H]^+$ entstehen können. Diese Untersuchungen ergaben, dass die sekundären Pflanzeninhaltsstoffe mit ESI hauptsächlich negativ ionisiert werden. Es gibt aber hin und wieder Ausnahmen, wie z.B. Fisetin, welches beide Ionen ausbilden kann. Durch das gleichzeitige Aufzeichnen beider Ionenströme, konnten jedoch alle Ionen ohne Verluste registriert und analysiert werden. Des Weiteren sind die hergestellten Mikrowellenextrakte für ein Sprühtrocknungsverfahren geeignet, allerdings können bestimmte gelöste Inhaltsstoffe wie Kohlenhydrate und Fette die Qualität des Sprühtrocknungsproduktes entscheidend beeinflussen. Temperatur- und Lagerstabilitätsuntersuchungen ergaben, dass die untersuchten sekundären Pflanzeninhaltsstoffe sehr robust sind. Sowohl die Aglycone als auch die glycosidisch gebundenen Pflanzeninhaltsstoffe waren in der Lage die untersuchten höheren Temperaturen bei der Herstellung der Extrakte bzw. beim Sprühtrocknungsverfahren zu überstehen. Die Lagerungsfähigkeit der Extrakte bei -27 °C kann nur für eine Dauer von ein bis zwei Monaten gewährleisten werden, da die gelösten Inhaltsstoffe nicht stabil

genug sind und über einen längeren Zeitraum zerfallen. Diese strukturelle Veränderung der Extrakte übt sich negativ auf die Wirkungsweise der Extrakte gegenüber dem Wachstum von Mammakarzinomzellen aus. Die Wirkungsweise der Inhaltsstoffe wird zunehmend toxischer und ihre wachstumshemmenden Eigenschaften nehmen ab.

Mit den in dieser Arbeit verwendeten Untersuchungsmethoden konnten in allen Extrakten sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe nachgewiesen werden, die als „potentielle“ Phytoöstrogene bezeichnet werden können. Hauptsächlich jedoch wurden Substanzen mit einem flavonoiden Grundgerüst nachgewiesen. Dieses besteht aus zwei aromatischen Ringen, welche über einen Tetrahydropyran-Ring miteinander verbunden sind. Durch unterschiedliche Substitutionsmuster an beiden aromatischen Ringen kommt es zu einer Vielzahl von unterschiedlichen Verbindungen, wie z. B. Isoflavone, Flavanone, Flavone und Anthocyane [58]. Diese Substanzklassen wurden überwiegend in den Extrakten von Blüten und Früchten nachgewiesen (Tab. A- 1, Tab. A- 2). Da sie hier vor allem für die Farbgebung verantwortlich sind oder als Schutz gegen Fraßfeinde, UV-Strahlung sowie als Anlockung von Insekten für die Verbreitung von Pollen dienen [53, 191, 192]. In heterotrophen Pflanzenorganen, wie die Wurzeln der Leinpflanze oder die Rinde der Rotbuche, konnten Vertreter der Substanzklasse der Lignane isoliert werden. Diese Stoffgruppe besteht aus Phenylpropanoid-Körpern (dimere C₆C₃-Verknüpfungen), welche über das mittlere (β)-C-Atom miteinander verbunden sind. Hierbei ergaben sich die unterschiedlichen Strukturvarianten durch die verschiedene Anordnung und Verknüpfung der C₃-Seitenketten [55]. Mit Hilfe von MSⁿ-Messungen konnte in der Leinwurzel eine bis jetzt noch nicht in der Literatur beschriebene Struktur ermittelt werden. Sie basiert auf dem Grundkörper des Lignans Secoisolariciresinol, welcher 2-fach glycosidisch gebunden ist. Isolierungen dieser Substanz sind bis jetzt jedoch nicht geglückt, weswegen eine Bestätigung der Strukturzusammensetzung mit Hilfe von NMR Untersuchungen noch aussteht.

Eine weitere strukturelle Auffälligkeit ist, dass in vielen Pflanzenextrakten die meisten sekundären Pflanzeninhaltsstoffe selten als Aglyca (in reiner Form) vorlagen. Oftmals waren vor allem die flavonoiden Systeme über ihre Hydroxylgruppen an Mono- oder Disaccharide gebunden und bildeten dabei Formen wie z. B. Glycoside oder Desoxydiglycoside aus. Diese Glycosilierungen bestimmen vor allem die Polarität der Flavonoide, wodurch deren Löslichkeit beeinflusst wird. Somit ist es der Pflanze möglich die Flavonoide in ihren Vakuolen zu speichern [58, 66]. Solche Verbindungen konnten in allen untersuchten Pflanzenextrakten bzw. -fraktionen nachgewiesen werden. Eine Besonderheit in diesen Untersuchungen war jedoch das Auftreten von triglycosidisch gebundenen Flavonoiden, welche nur im Direktsaft der Sanddornbeeren nachgewiesen werden konnten.

Die zellbiologischen Untersuchungen aller Extrakte konnten zeigen, dass alle untersuchten Pflanzenextrakte in der Lage sind, das Wachstum der Mammakarzinomzellen MCF-7 positiv zu beeinflussen. Besonders die Extrakte der

heterotrophen Pflanzenorgane, wie Rinde- und Wurzelmaterial, zeigten eine sehr gute Wirkung auf die Proliferationshemmung der Mammakarzinomzellen MCF-7. Im Vergleich dazu ist die wachstumshemmende Wirkung aller untersuchten Blatt-, Blüten- und Beeren/Fruchtextrakte um ca. 30 % geringer. Im Zusammenhang mit den inhaltsstofflichen Analysen der Extrakte ergibt sich, dass die autotrophen Pflanzenextrakte, von Blättern, Blüten und Früchten der untersuchten Pflanzen, in denen überwiegend eine Vielzahl von verschiedenen Flavonoiden identifiziert werden konnten, zwar auch einen hemmenden Einfluss auf das Mammakarzinomzellwachstum besitzen, jedoch ist dieser bei weitem nicht so stark ausgeprägt wie bei den Extrakten von heterotrophen Pflanzenteilen, in denen besonders viele Lignane bzw. lignanähnliche Strukturen nachgewiesen werden konnten. Diese Extrakte haben auch besonders auf die Standradadhäsionsraten der MCF-7 Zellen einen starken Einfluss, da sie diese um bis zu 60 % reduzieren können. Durch Fraktionierung der untersuchten Extrakte konnte ebenfalls gezeigt werden, dass nicht wie vermutet einzelne Substanzen, sondern vielmehr die Gesamtheit des kompletten Extraktes für die wachstumshemmenden Einfluss auf das Wachstum der untersuchten Krebszellen, entscheidend ist. Ausnahmen hierbei konnten nur beim Sanddornbeerensaft festgestellt werden, welcher als Vollextrakt die Standradadhäsionsrate der Krebszelle minimal bzw. gar nicht beeinflusste. Seine isolierten Fraktionen hingegen, die vor allem triglycosidisch gebundene Flavonoide enthielten, zeigten eine ebenso gute Reduzierung der Adhäsion der untersuchten Krebszellen, wie mit der Behandlung durch Pflanzenextrakte heterotropher Pflanzenorgane.

Abschließend ist anzumerken, dass für die Prävention und Therapie in der Krebsforschung vor allem heterotrope Pflanzenmaterialen weiter untersucht werden sollten, da vor allem die hier enthaltenden Lignane einen vielversprechenden hemmenden Einfluss auf das Mammakarzinomwachstum haben. Jedoch sollte hierbei der Hauptfokus der Forschung nicht auf der Isolierung einzelner Leitsubstanzen der Lignane gestützt werden, sondern vielmehr auf eine Kombination von lingnanen Leitsubstanzen und triglycosidisch gebundenen flavonoiden Leitsubstanzen. Hier waren die Untersuchungen am vielversprechendsten, hinsichtlich der wachstumshemmenden Wirkung und des Einflusses auf das Apoptoseverhalten von Mammakarzinomzellen.

7. Ausblick

Neue Vorschläge für weiterführende Arbeiten bzw. Ansätze wurden bereits in Kapitel 5 an entsprechender Stelle gegeben. Dieses Kapitel soll nun noch mal einen Überblick bzw. weiterführende Ergänzungen liefern.

Das Sprühtrocknungsverfahren für die untersuchten Extrakte ist nur anfänglich getestet worden. Für bessere Ausbeuten bzw. eine bessere Qualität der Sprühtrocknungsprodukte können noch weitere Sprühtrocknungsverfahren untersucht werden. Unter anderem könnte hier ein Verfahren mit Hilfe eines Carrier-Systems zum Einsatz kommen, welche die Inhaltsstoffe des Extraktes beim Sprühtrocknungsprozess an eine Art Trägermolekül bindet. Als ein mögliches Carrier-System könnte Maltodextrin, ein wasserlösliches Kohlenhydratgemisch aus Monomeren, Dimeren, Oligomeren und Polymeren der Glucose, verwendet werden. Dieses Gemisch wird bereits heute erfolgreich als Trägersubstanz für empfindliche oder flüchtige Stoffe wie Aromen, Vitaminen oder Gewürzen in der Lebensmittelproduktion angewendet. Allerdings müsste hier der Einfluss der Maltodextrin-Wirkstoffpulver auf die Hemmung des Brustkrebswachstums für die *in vitro* Test ausführlich untersucht werden. Des Weiteren sind für viele der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe bis heute noch keine zuverlässigen bzw. aussagekräftigen Daten bezüglich ihrer Bioverfügbarkeit, Metabolisierung und den Abhängigkeiten der Wirkungsmechanismen bekannt. Eine Vielzahl von *in-vivo*-Studien verdeutlichen die zahlreichen biologischen Effekte von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen. Um diese Daten aber richtig interpretieren zu können muss die Bioverfügbarkeit beachtet werden. Gerade über die Bioverfügbarkeit von sekundären Pflanzeninhaltstoffen ist wenig bekannt. Man weiß allerdings, dass Carotinoide, Glucosinolate, Phytoöstrogene, Monoterpene und Sulfide vom menschlichen Körper relativ gut resorbiert werden können (> 15 %) [198]. Für einige Flavonoide, wie z.B. die Anthocyane ist die Bioverfügbarkeit mit weniger als einem Prozent sehr schlecht [198]. Die hier erhaltenen Ergebnisse werden oft mit für den menschlichen Körper untypischen Konzentrationen an sekundären Pflanzeninhaltsstoffen im Labor an Zelllinien untersucht. Sie haben kaum Aussagekraft, da die Pflanzenstoffe beim Menschen in solchen Konzentrationen und vor allem in dieser Struktur nicht vorliegen [51]. Daher sind weitere Kenntnisse zur Bioverfügbarkeit notwendig. Vor allem was die Einflüsse von Verarbeitung oder Probenvorbereitungsschritten auf die Struktur der Pflanzeninhaltsstoffe an sich betrifft. So kann die Bioverfügbarkeit für einige sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe gesteigert oder verringert werden, wenn die pflanzlichen Lebensmittel durch Verarbeitungsschritte erhitzt werden oder gleichzeitig Fett als Träger vorhanden ist [199, 200]. In diesem Zusammenhang sind auch die Struktur-Aufnahmewege der Pflanzenstoffe innerhalb des menschlichen Magens und Darms zu untersuchen. Hierbei müssten zunächst erst Standards von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen hinsichtlich ihrer enzymatischen Abspaltungs- und Oxidationsmöglichkeiten untersucht werden, um später die Zusammenhänge von Pflanzenvollextrakten bzw. Substanzgemischen sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe zu

betrachten. So wäre es möglich im Labormaßstab modellhaft die ersten Schritte des Verdauungsprozesses im Magen des Menschen zu simulieren.

Um die Wirkungsmechanismen eines potenziellen Antikrebsmittels noch genauer definieren zu können, sind vor allem weitere umfangreiche Untersuchungen zur Struktur-Wirkungsbeziehung von großer Bedeutung. Die schon beschriebenen Arbeiten konnten zeigen das bestimmte Substanzklassen eine spezifische Wirkung auf das Zellwachstum von Brustkrebszellen haben. Besonders die Stoffgruppe der Lignane stellte sich hier als potenzielles Antikrebsmittel mit der besten proliferationshemmenden Wirkung auf die Brustkrebszelllinien heraus. Ihre molekulare Struktur unterscheidet sich jedoch von den Flavonoiden Systemen entscheidend. Trotz alledem besitzen auch die Flavonoide eine Wirkung auf die Proliferation der Krebszellen, auch wenn ihre proliferationshemmende Wirkung bei weitem nicht so stark ist wie die der Lignane. Jedoch schreibt man den Flavonoiden eine große Bedeutung hinsichtlich ihrer Redoxeigenschaften zu. So besitzen sie wie viele andere sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe (Anthocyane, Phenolsäuren und -ester, Lignane, Hydroxyterpene u.a.) antioxidative Eigenschaften, mit denen sie in der Lage sind als Radikalfänger zu dienen. Vor allem die Untersuchung von bestimmten Substanzklassen hinsichtlich ihrer Redoxeigenschaften könnte einen weiteren Aufschluss über das Struktur-Wirkungsprinzip der potenziellen Antikrebsmittel liefern. Durch cyclovoltammetrische Untersuchungen ist es möglich rasch einen Überblick über verschiedene Elektrodenprozesse der unterschiedlichen Substanzgruppen zu gewinnen. Erste Untersuchungen zu diesen Zusammenhängen wurden zunächst an Phytostandards durchgeführt und geben bereits vielversprechende Aussagen [201].

Ein weiterer wichtiger Schritt wäre für eine spätere mögliche Nahrungsmittelempfehlung zur Prävention bzw. Therapie gegen Brustkrebs, die *in vivo* Testung der Extrakte bzw. Pulver an Versuchstieren sowie weiterführende Langzeitstudien. Erst dann kann die Möglichkeit einer Verbreitung eines potenziellen Antibrustkrebsmittels in Betracht gezogen werden.

8. Literaturverzeichnis

1. Greaves, M., *Krebs – der blinde Passagier der Evolution*. 2002, Berlin Heidelberg New York: Springer - Verlag.
2. Bariéty, M., *Histoire de la Médecine*. 1963: Librairie Arthème Fayard. pages 195-215.
3. Schmoll, H.-J., K. Höffken, and K. Possinger, *Kompendium Internistische Onkologie*. Herkunft und Entstehung von Tumoren. 2006: Springer - Verlag. 235-278.
4. WHO. *Cancer- Fact sheet N°297*. 2012 [cited 20.03.2012]; Available from: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html.
5. Ferlay, J., et al. *GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10*. 2010 [cited 20.03.2012]; Available from: <http://globocan.iarc.fr>.
6. Adlercreutz, H. and W. Mazur, *Phytoestrogens and Western diseases*. Annals of Medicine, 1997. 29: p. 95-120.
7. Andres, S., et al., *Risks and benefits of dietary isoflavones for cancer*. Critical Reviews in Toxicology, 2011. 41(6): p. 463-506.
8. Bosetti, C. and e. al., *Flavonoids and breast cancer risk in Italy*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2005. 14(4): p. 805-808.
9. World Cancer Research Fund, A.I.f.C.R., *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*. 2007, American Institute for Cancer Research: Washington DC.
10. Fink, N., S.E. Steck, and M.S. Wolff, *Dietary flavonoid intake and breast cancer survival among women on long island*. American Journal of Epidemiology, 2006. 163(11): p. 96-96.
11. Adlercreutz, H., *Dietary phytoestrogens and cancer: in vitro and in vivo studies*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1992. 41(3-8): p. 331-337.
12. *Havard Report on Cancer Prevention Volume 1: Causes of Human Cancer*. Cancer Causes and Control, 1996. 7: p. 3-4.
13. Zhang, J. and I. Dhakal, *Nutrition Transition and Cancer Mortality in East Asia*. American Journal of Epidemiology, 2010. 171(Supplement 11): p. 67-67.
14. Johnson, I.T., *Dietary fibre and cancer prevention*. Agro Food Industry Hi-Tech, 2009. 20(3): p. 9-12.
15. Boros, L.G., *Population thiamine status and varying cancer rates between Western, Asian and African countries*. Anticancer Research, 2000. 20(3B): p. 2245-2248.
16. Temple, N.J. and D.P. Burkitt, *The war on cancer-failure of therapy and research: discussion paper [see comments]*. The Royal Society of Medicine, 1991. 84: p. 95-98.
17. DGE, (Deutsch Gesellschaft für Ernährung): *Ernährungsbericht 1992*. Umschau. 1992, Frankfurt am Main: Druckerei Heinrich GmbH.
18. Kune, G.A. and S. Kune, *The nutritional causes of colorectal cancer: an introduction to the Melbourne study*. Nutr Cancer, 1987. 9: p. 1-4.
19. Wilett, W.C., et al., *Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women*. New Engl J Med, 1990. 323: p. 1664-1672.

20. Giovannucci, E., E.B. Rimm, and M.J. Stampfer, *Intake of fat, meat, and fiber in relation to risk of colon cancer in men*. *Cancer Res*, 1994. 54(2): p. 2390-2397.
21. Parkin, D.M., *Cancer of the breast, endometrium and ovary - geographic correlations*. *European Journal of Cancer & Clinical Oncology*, 1989. 25(12): p. 1917-1925.
22. Wu, A.H., *Adolescent and adult soy intake and risk of breast cancer in Asian-Americans*. *Carcinogenesis*, 2002. 23(9): p. 1491-1496.
23. Lee, H.P., *Dietary effects on breast-cancer risk in Singapore*. *Lancet*, 1991. 337(8751): p. 1197-1200.
24. Lindeisen, J., et al., *Dietary phytoestrogen intake and pre-menopausal breast cancer risk in a german case-control study*. *Int. J. Cancer*, 2004. 110: p. 284-290.
25. Foth, D., *Alternativen zur Hormonsubstitutionstherapie*. *Journal für Menopause*, 2003. 10(4): p. S.437-39.
26. Kunisue, T., *Profiles of phytoestrogens in human urine from several Asian countries*. *J Agric Food Chem*, 2010. 58(17): p. 9838-9846.
27. Shimizu, H., *Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles country*. *Br J Cancer*, 1991. 63(6): p. 963-966.
28. Thomas, D.B. and M.R. Karagas, *Cancer in first and second generation Americans*. *Cancer Res*, 1987. 47: p. 5771-5776.
29. Ziegler, R.G., *Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women*. *J Natl Cancer Inst*, 1993. 85(22): p. 1819-1827.
30. GEKID, *Der GEKID Atlas: Atlas der Krebsinzidenz und Krebsmortalität der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V.* 2011.
31. Abarzua, S., et al., *Online monitoring of cellular metabolism in the MCF-7 carcinoma cell line treated with phytoestrogen extracts*. *Anticancer Research*, 2010. 30: p. 1587-1592.
32. GEKID and RKI, *Krebs in Deutschland 2007/ 2008*. 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg.), Berlin, 2012.
33. Eicher, M. and S. Marquard, *Brustkrebs - Lehrbuch für Breast Care Nurses, Pflegende und Gesundheitsberufe*. 2008, Bern: Huber.
34. Lynch, P.J. and C.C. Jaffe. [cited 23.07.2012]; Available from: http://www.meingesundheitsnetz.com/medizin_extern/xplainit/images/picture/01251.jpg.
35. Schmoll, H.-J., K. Höffken, and K. Possinger, *Kompendium Internistische Onkologie*. 2006: Springer - Verlag. S. 307-339.
36. WHO, *Food, Nutrition, Physical Activity, and the Prevention of Cancer: a Global Perspective*., World Cancer Research Fund/ American Institute for Cancer Research.: Washington, DC: AICR 2007.
37. Trichopoulou, A., et al., *Cancer and Mediterranean dietary traditions*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2000. 9: p. 869-873.
38. Rock, C.L. and W. Demark-Wahnefried, *Nutrition and survival after the diagnosis of breast cancer: a review of the evidence*. *Clin Oncol*, 2002. 20: p. 3302-3316.
39. Aidelsburger, P., et al., *Alternative Methoden zur Behandlung postmenopausaler Beschwerden*., in *Schriftreihe Health Technology Assessment*. 2012: Köln.

40. Risikobewertung, B.f. *Isolierte Isoflavone sind nicht ohne Risiko*. Aktualisierte Stellungnahme* Nr. 039/ 2007 [cited 16.07.2012]; Available from: http://www.bfr.bund.de/cm/343/isolierte_isoflavone_sind_nicht_ohne_risiko.pdf.
41. Prien, P., N. Harbeck, and G. Emons, *Patientenratgeber: Brustkrebs*. 2009, Berliner Krebsgesellschaft e. V.: Berlin.
42. Andresh, J., *Moderne Krebstherapie - Wirkungen und Nebenwirkungen*. 2008, Berliner Krebsgesellschaft e. V.: Berlin.
43. Kreienberg, R., et al., *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. 2008, Deutsche Krebsgesellschaft e. V., Germering 1. Aktualisierung: Zuckerschwerdt Verlag.
44. Koubenec, H.-J. *Therapie von Brustkrebs*. 2007 [cited März 2012]; Available from: <http://www.brustkrebs-info.de>.
45. Krauth, M. and H.-J. Koubenec. *Operationsverfahren der Brust*. 2004 [cited März 2012]; Available from: <http://www.brustkrebs-info.de>.
46. Willamowski, H. *Strahlentherapie bei Brustkrebs*. 2004 [cited März 2012]; Available from: <http://www.brustkrebs-info.de>.
47. Dinges, M. *Die Homöopathie erobert die Welt*. Europäische Geschichte Online (EGO) 2010 [cited 27.07.2012]; Available from: <http://www.ieg-ego.eu/dingesm-2010-de>.
48. Hopff, W.H., *Homöopathie. Kritisch betrachtet*. 1991, Stuttgart: Thieme.
49. Rink, L., A. FKruse, and H. Haase, *Immunologie für Einsteiger*. 2011, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
50. Schütt, C. and B. Bröker, *Grundwissen Immunologie*. 2006, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
51. Watzl, B., *Fundort Pflanzenzelle: Einführung in Vorkommen, Eigenschaften und Wirkungsweise sekundärer Pflanzeninhaltsstoffe*. Aktuelle Ernährungsmedizin, 2011. 36: p. S. 2-5.
52. Schopfer, P. and A. Brennicke, *Pflanzenphysiologie*. Vol. 7. 2010, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
53. Watzl, B. and C. Leitzmann, *Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln*. Vol. 3. 2005, Stuttgart: Hippokrates.
54. Harborne, B., *Phytochemical Dictionary - A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. 1983, London: Verlag Taylor & Frost.
55. Kulling, S. and B. Watzl, *Phytoöstrogene*. Ernährungs-Umschau, 2003. 50(Heft 6).
56. Birchner-Benner, M., *Vegetabile Heilkost*. Neue Deutsche Klinik. Vol. 11. 1933.
57. Scalbert, A. and G. Williamson, *Dietary intake and bioavailability of polyphenols*. Journal of Nutrition, 2000. 130(8): p. 2073-2085.
58. Watzl, B. and G. Rechkemmer, *Flavonoide*. Ernährungs-Umschau, 2001. 48(Heft 12).
59. Williamson, G., et al., *Human metabolic pathways of dietary flavonoids and cinnamates*. Biochemical Society Transactions, 2002. 28: p. 16-22.
60. Cooper-Driver, G.A., *Contributions of Jeffrey Harborne and co-workers to the study of anthocyanins*. Phytochemistry, 2001. 56: p. 229-236.
61. Kuhnau, J., *The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition*. World Review of Nutrition and Dietetics, 1976. 24: p. 117-191.

62. Strasburger, E., et al., *Lehrbuch der Botanik*. 36. Auflage ed. 2008, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

63. Heldt, H.-W., *Pflanzenbiochemie*. 1996, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag. S. 423-437.

64. Kulling, S., *Wirkstoffprofile im Visier - Klassifizierung, Analytik und Metabolismus am Beispiel der Flavonoide*. Aktuelle Ernährungsmedizin, 2011. 36(Supplement 1): p. S. 6-9.

65. Harborne, J.B. and C.A. Williams, *Advances in flavonoid research since 1992*. Phytochemistry, 2000. 55(6): p. 481-504.

66. Aherne, S.A. and N.M. O'Brien, *Dietary flavonols: Chemistry, food content and metabolism*. Nutrition, 2002. 18(1): p. 75-81.

67. Schlee, D., *Ökologische Biochemie*. Vol. 2. Auflage. 1992, Jena: Gustav Fischer Verlag. S. 67f.

68. Arts, I.C. and P.C. Hollmann, *Polyphenols and disease risk in epidemiologic studies*. American Journal of Clinical Nutrition, 2005. 81(Supplement 1): p. 317-325.

69. Tang, N.P., B. Zhou, and B. Wang, *Flavonoids intake and risk of lung cancer: a meta-analysis*. Japanese Journal of Clinical Oncology, 2009. 39(6): p. 352-359.

70. Tang, N., et al., *Green tea, black tea consumption and risk of lung cancer: a meta-analysis*. Lung Cancer, 2009. 65(3): p. 274-283.

71. Rossi, M., C. Bosetti, and E. Negri, *Flavonoids, Proanthocyanidins and Cancer Risk: A Network of Case-Control Studies from Italy*. Nutrition and Cancer - an International Journal, 2010. 62(7): p. 871-877.

72. Hollmann, P.C., A. Geelen, and D. Kromhout, *Dietary flavonol intake may lower stroke risk in men and women*. Journal of Nutrition, 2010. 140: p. 600-604.

73. Lagiou, P., E. Samoli, and A. Lagiou, *Intake of specific flavonoid classes and coronary heart disease - a case-control study in Greece*. European Journal of Clinical Nutrition, 2004. 58(12): p. 1643-1648.

74. Umezawa, T., *Diversity in lignan biosynthesis*. Phytochemistry Reviews, 2003. 2: p. 371-390.

75. Cos, P., et al., *Phytoestrogens: recent developments*. Plant-Med., 2003. 69(7): p. 589-599.

76. Yildiz, F., *Phytoestrogens in Functional Foods*. 2005: CRC Press Inc.

77. Turner, J.V., S. Agatonovic-Kustrin, and B.D. Glass, *Molecular aspects of phytoestrogen selective binding at estrogen receptors*. J Pharm Sci, 2007. 96(8): p. 1879-1885.

78. Scarlata, S. and R. Miksicek, *Binding properties of coumestrol to expressed human estrogen receptor*. Mol Cell Endocrinol, 1995. 115: p. 65-72.

79. Bennetts, H.W. and E.J. Underwood, *The oestrogenic effects of subterranean clover (*trifolium subterraneum*); uterine maintenance in the ovariectomised ewe on clover grazing*. Australian Journal of Experimental Biology & Medical Science, 1951. 29(4): p. 249-253.

80. Lea, P.J. and R.C. Leegood, *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. 1998: WILEY.

81. Liggins, J. and e. al., *Daidzein and genistein content of fruits and nuts*. J Nutr Biochem, 2000. 11: p. 326-331.

82. Mazue, W. and H. Adlercreutz, *Overview of naturally occurring endocrine-active substances in the human diet in relation to human health*. Nutrition, 2000. 16: p. 654-658.

83. Omar, M.M., *Phenolic-compounds in Botanical extracts used in Foods, Flavors, Cosmetics, and Pharmaceuticals*. ACS Symposium Series, 1992. 506: p. 154-168.

84. Allaby, R.G., et al., *Evidence of the domestication history of flax (*Linum usitatissimum L.*) from genetic diversity of the *sad2* locus*. Theoretical and Applied Genetics, 2005. 112(1): p. 50-65.

85. Körber-Grohne, U., *Nutzpflanzen in Deutschland-Von der Vorgeschichte bis heute*. 2008: Nikol Verlag.

86. Arnold, W. *Fotographie einer Blüte der Leinpflanze*. [cited 22.03.2012]; Available from: www.awl.ch/heilpflanzen/linum_usitatissimum/index.htm.

87. Apotheken, U. *Leinsamen*. 2005 [cited 22.03.2012]; Available from: <http://www.apotheken-umschau.de/heilpflanzen/leinsamen>.

88. Cheers, G., *Botanica. Das ABC der Pflanzen. 10000 Arten in Text und Bild*. 2003, Köln: Könemann.

89. van Wyk, B.-E., *Handbuch der Arzneipflanzen*. 2004, Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft GmbH.

90. Hecker, U., *Bäume und Sträucher*. Vol. 2. durchgesehene Auflage. 1998, München: BLV Verlagsgesellschaft.

91. Heidböhmer, E., *Heilpflanze Holunder: Überlieferte Hausmittel-Anwendungen von A-Z-Rezepte*. 2007, München: F. A. Herbig Verlagsbuchhandlung GmbH.

92. Parlow, M., *Das große Buch der Heilpflanzen*. 1979, München: Gräfe und Unzer.

93. Arnold, W. *Fotographie eines Sanddornstrauches mit reifen Früchten*. [cited 23.03.2012]; Available from: www.awl.ch/heilpflanzen/hippophae_rhamnoides/index.htm.

94. Schweizer, S., *Munter mit der Zitrone des Nordens, in Neues Deutschland*. 22.03.2011: Berlin.

95. Arnold, W. *Fotographie einer Brennnessel*. [cited 23.03.2012]; Available from: www.awl.ch/heilpflanzen/urtica_dioica/index.htm.

96. Thyssen, M. *New beech leaves, Grib Forest in the northern part of Sealand, Denmark*. 2005 [cited 22.03.2012]; Available from: http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Grib_skov.jpg&filetimestamp=20070304082447.

97. Ohnesorg, D. *Querschnitt eines Rot-Buchenstamms mit ausgeprägtem Rotkern*. 2003 [cited 22.03.2012]; Available from: <http://de.wikipedia.org/wiki/Datei:Rotkern.jpg>.

98. Schmidt, O., *Die Buche*. Schutzgemeinschaft Deutscher Wald - Bundesverband e. V. (SDW). Nr. 1.

99. Gosser, D., *Buche-Einheimische Nutzhölzer (Loseblattsammlung)*. Vol. Nr. 7. 1998, Bonn: Arbeitsgemeinschaft Holz e. V.; Informationsdienst Holz, Holzabsatzfond-Absatzförderungsfonds der deutschen Forst- und Holzwirtschaft.

100. Strassmann, R.A., *Baumheilkunde. Mythos und Magie der Bäume*. 2003, Aarau/Schweiz: AT Verlag.

101. LGC/ATCC. *MCF-7, HTB-22™* 2012 [cited 04.10.2012]; Available from: <http://www.lgcstandards.com>

atcc.org/LGCAAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HTB-22&Template=cellBiology.

102. LGC/ATCC. *Human genomic DNA (T-47D), HTB-133™*. 2012 [cited 04.10.2012]; Available from: <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HTB-133D&Template=bioproducts>.

103. LGC/ATCC. *BT-20, HTB-19™* 2012 [cited 04.10.12]; Available from: <http://www.lgcstandards-atcc.org/LGCAAdvancedCatalogueSearch/ProductDescription/tabid/1068/Default.aspx?ATCCNum=HTB-19&Template=cellBiology>.

104. Kaufmann, B. and P. Christen, *Recent extraction techniques for natural products: Microwave-assisted extraction and pressurised solvent extraction*. *Phytochem. Anal.*, 2002. 13: p. 105-113.

105. Pare, J.R.J., J.M.R. Belanger, and S.S. Stafford, *Microwave-assisted process (MAP™): a new tool for the analytical laboratory*. *Trends Anal Chem*, 1994. 13: p. 176-184.

106. Smith, B.L. and M.-H. Carpentier, *The Microwave Engineering Handbook - Microwave Systems and Applications*. 1993, London: Chapman & Hall.

107. Zhang, F., et al., *Microwave-assisted Extraction of Rutin and Quercetin from the Stalks of Euonymus alatus (Thunb.) Sieb.* . *Phytochem. Anal.* , 2009. 20: p. 33-37.

108. Sharma, U.K., et al., *Microwave-Assisted Efficient Extraction of Different Parts of Hippophae rhamnoides for the Comparative Evaluation of Antioxidant Activity and Quantification of its Phenolic Constituents by Reverse-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)*. *J. Agric. Food Chem.*, 2008. 56: p. 374-379.

109. Desai, M., J. Parikh, and P.A. Parikh, *Extraction of Natural Products Using Microwaves as a Heat Source*. *Separation & Purification Reviews* 2010. 39: p. 1-32.

110. Proestos, C. and M. Komaitis, *Application of microwave-assisted extraction to the fast extraction of plant phenolic compounds*. . *Food Sci. Technol.* , 2008. 41 (4): p. 652-659.

111. Grey, M.H., *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik - Biosubstanzen, Trennmethoden, Strukturanalytik, Applikationen*. 2008, Berlin-Heidelberg: Springer.

112. Büchi. *Mini-Sprühtröckner B-290*. [cited 27.07.2012]; Available from: www.buechigmbh.de/Spruetrockner.3550.0.html.

113. Huber, C.G., *Kopplung von Chromatographie und Massenspektrometrie: Systemaufbau und Optimierung*, in *LC-MS Anwenderforum*. 2007: Marburg, Germany.

114. *Finnigan™ LTQ™-Hardware Manuel*, ed. R.A. 97055-97013, Sun Jones, California: Technical Publications, Thermo Electron Corporation.

115. Knapp, D.R., *Handbook of Derivatization Reactions*. 1979, New York: John Wiley & Sons.

116. Kitson, F.G., C.N. McEwen, and B.S. Larsen, *Gas chromatography and Mass Spectrometry-A Practical Guide*. 1996, San Diego, California: Academic Pr Inc.

117. Ruth, W., *Massenspektrometische Kopplungstechniken*, in *AG-Seminar*. 2005: Universität Rostock, Abt. Technischen Chemie.

118. Roche, *Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)*. Instruction Manual, 2007. Version August 2007(Cat. No. 11 647 229 001).

119. Frank, C., *Quervernetzte Hyaluronsäure als Glaskörperersatz*. Medizinische Fakultät der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen, Inaugural-Dissertation, 2010.
120. Hengst, L., *Regulation der Zellproliferation*. Max-Planck-Institut für Biochemie, Max-Planck-Gesellschaft, Tätigkeitsbericht, 2003.
121. BioLabs, N.E. *BrdU Cell Proliferation Assay Kit*. [cited 30.03.2012]; Available from: www.neb-online.de/de/cst-aktionen/19-brdu-cell-proliferation-assay-kit.
122. Chwalisz, M., *Der Einfluss von Phytoöstrogenen auf die Adhäsion von humanen Mammaepithelzellen*. Biomedizinisches Forschungszentrum, Abteilung Zellbiologie, Diplomarbeit., 2011.
123. Howard, A., *Synthesis of Desoxyribonuclein Acid in Normal and Irradiated Cells and its Relation to Chromosome Breakage*. Heredity, 1953. 6(Suppl. 261).
124. Brown, G., P.J. Hughes, and R.H. Michell, *Cell differentiation and proliferation--s simultaneous but Independent?* Exp. Cell. Res., 2003. 291: p. 282-288.
125. Tyson, J.J., A. Csikasz-Nagy, and B. Novak, *The dynamics of the cell cycle regulation*. Bioessays, 2002. 24: p. 1095-1109.
126. Alberts, B., et al., *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. Vol. 3. 2002, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
127. Burchard, H.J., et al. 5. *Krebs- Zellwachstum und Krebs*. [cited 04.07.2012]; Available from: www.planet-schule.de/tatort-Mensch/deutsch/kurse/kurs5/kurs5_2.html.
128. Nigg, E., *Der Zellzyklus im Fokus der Krebsforschung*, in *MaxPlanck Forschung*. 2002: Berlin. p. 66-67.
129. Sack, U., A. Tárnok, and G. Rothe, *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchfluszytometrie*. . 2007, Basel: Karger.
130. Roche, *Cytotoxicity Detection Kit (LDH)*. Instruction Manual, 2005. Version July 2005(Cat. No. 11 644 793 001).
131. Reichl, F.-X. *Etablierte Tests- Metabolische Untersuchungen-Laktat-Dehydrogenase (LDH) Test*. [cited 30.03.2012]; Available from: www.dent.med.uni-muenchen.de/exponent-0.96.4/index.php?section=73.
132. Hüble, W. *LDH (Laktatdehydrogenase)-Übersicht*. [cited 30.03.2012]; Available from: www.med4you.at/laborbefunde/lbef2/lbef_ldh.htm.
133. Roche, *Cell Proliferation Kit I (MTT)*. Instruction Manual, 2005. Version Sept. 2005(Cat. No. 11 465 007 001).
134. Witt, S. *Wirkungen, Bioaktivitäts-Prüfungen, MTT-basierter Proliferationsassay*. [cited 30.03.2012]; Available from: www.baltic-analytics.de/index.php?id=39.
135. Gareis, M., *Diagnostischer Zellkulturttest (MTT-Test) für den Nachweis von zytotoxischen Kontaminanten und Rückständen*. Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2006. 1: p. S. 354-363.
136. Molder, A. and T. Kiesslich. *In-vitro-Techniken und Zellkulturen*. 2006 [cited 30.03.2012]; Available from: www.uni-salzburg.at/pls/portal/docs/1/294257.PDF.
137. Theil, C.A., *Untersuchungen zum Einfluss eines Linum usitatissimum Wurzelextrakts auf zwei verschiedene Mammakarzinom-Zelllinien im Vergleich mit Genistein, Genistin, Daidzein, Daidzin, Secoisolariciresinol, Tamoxifen und Beta-Estradiol*. Universität Rostock, Dissertation, 2010.
138. Strater, N., *Der Einfluss von Leinwurzelextrakten der Pflanze Linum usitatissimum unterschiedlicher Alterstufen auf die Vitalität verschiedener Mammakarzinomzelllinien*. Universität Rostock; Dissertation 2011.

139. Szewczyk, M., *Untersuchungen zum Einfluß von Pflanzenextrakten aus der Leinpflanze Linum usitatissimum auf die Zellproliferation und Cytotoxizität humaner Karzinomzellen sowie Trophoblasten und Fibroblasten*. Universität Rostock, Diplomarbeit, 2007.
140. Abarzua, S., et al., *Effects of Phytoestrogen Extracts from Linum usitatissimum on the Jeg3 Human Trophoblast Tumour Cell Line*. Anticancer Research, 2007. 27: p. 2053-2058.
141. Falbe, J. and M. Regitz, *Römpf Lexikom Chemie*. Vol. 10. 1996-1999, Stuttgart u. New York: Thieme.
142. Stoll, A., J. Renz, and A.v. Wartburg, *Die Isolierung von Podophyllotoxin-glucosid aus dem indischen Podophyllum emodi Wall*. Helvetica Chimica Acta, 1954. 37(6): p. 1747-1762.
143. Kelly, M. and J. Hartwell, *The Biological Effects and the Chemical Composition of Podophyllin - A Review*. Journal of the National Cancer Institute, 1954. 14(4): p. 967-1010.
144. Vogel, B., *Medikamente aus der Natur*. Der informierte Arzt-Gazette Médicale, 1998. 19: p. 473-476.
145. Vogel, B., *Es ist doch ein Kraut gewachsen*. 1997, Zürich: Schweizerische Arbeitsgruppe Gentechnologie SAG.
146. Luyengi, L., et al., *A lignan and four terpenoids from Brucea javanica that induce differentiation with cultured HL-60 promyelocytic leukemia cells*. Phytochemistry, 1996. 43: p. 409-412.
147. Westcott, N.D. and A.D. Muir, *Chemical studies on the constituents of Linum spp*. In: Flax seed, the genus Linum. Westcott ND and Muir AD. Taylor and Francis Inc, London, 2003: p. 55-73.
148. Christensen, L.P., K. Kaack, and X.C. Fretté, *Selection of elderberry (Sambucus nigra L.) genotypes best suited for the preparation of elderflower extracts rich in flavonoids and phenolic acids*. Eur Food Res Technol, 2008. 227: p. 293-305.
149. Höhne, F. and I. Knölck, *Teil 1: Allgemein, Sanddorn und Holunder*, in *Jahresbericht Obstbau 2009* G. Landesforschungsanstalt für Landwirtschaft und Fischerei, Editor. 2009: Gülzow. p. 1-23.
150. Ebermann, R. and I. Elmada, *Lehrbuch Lebensmittelchemie und Ernährung*. Vol. 2. Auflage. 2011: Springer Wien New York.
151. Duke, J.A., *Handbook of phytochemical constituents of GRAS herbs and other economic plants*. 1992: Boca Raton, FL. CRC Press.
152. Stapel, J., *Der Einfluss des Holunderblüten und Holunderbeerenextraktes auf die Zelllinien MCF-7, BT-20 und Fibroblasten*. Universität Rostock, Diplomarbeit, 2010.
153. Franzien, B., et al., *Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions: down-regulation of cytokeratins*. Br J Cancer, 1996. 74(10): p. 1632-1638.
154. Klarwitter, J., et al., *Effects of lovastatin on breast cancer cells: a proteo-metabonomic study*. Breast Cancer Research, 2010. 12:R16(2).
155. Mense, S.M., T.K. Hei, and R.K. Ganju, *Phytoestrogens and breast cancer prevention: Possible mechanisms of action*. Environ Health Perspect, 2008. 116: p. 426-433.

156. Urbanek, M., M. Pospisllova, and M. Polasek, *On-Line coupling of capillary isotachophoresis and zone electrophoresis for the assay of phenolic compounds in plant extracts*. Electrophoresis, 2002. 23(7-8): p. 1045-1052.

157. Dawidowicz, A., et al., *Optimization of ASE conditions for HPLC determination of rutin and isoquercitrin in Sambucus nigra L.* Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2003. 26(14): p. 2381-2397.

158. Dawidowicz, A., D. Wianowska, and B. Baraniak, *The antioxidant properties of alcoholic extracts from Sambucus nigra L. (antioxidant properties of extracts)*. LWT-Food Sience and Technology, 2006. 39(3): p. 308-315.

159. Flaschenetikett, *Sanddorn Direktsaft 100%*. 2011, Storchenest GmbH: Ludwigslust, Germany.

160. Ortuno, A., *Citrus paradisi and Citrus sinensis flavonoids. Their influenz in the defence mechanism against Penicillium digitatum*. Food Chemistry, 2006. 98(2): p. 351-358.

161. Rösch, D., et al., *Structural Investigations of Flavonol Glycosides from Sea Buckthorn (Hippophae rhamnoides) Pomace by NMR Spectroscopy and HPLC-ESI-MSⁿ*. J. Agric. Food Chem., 2004. 52: p. 4039-4046.

162. Llorach, R., et al., *HPLC-DAD-MS/MS ESI characterization of unusual highly glycosylated acetylated flavonoids from cauliflower (Brassica oleracea L. var. botrytis) agroindustrial byproducts*. J Agric Food Chem, 2003. 51: p. 3895-3899.

163. Kang, N.H., et al., *Induced growth of BG-1 ovarian cancer cells by 17 beta-estradiol or various endocrine disrupting chemicals was reversed by resveratol via downregulation of cell cycle progression*. Molecular Medicine Reports, 2012. 6(1): p. 151-156.

164. Jaakkola, S., et al., *Postmenopausal estradiol-progestagen therapy and risk for uterine cervical cancer*. International journal of cancer, 2012. 131(4): p. E537-43.

165. Dixon, R.A. and D. Ferreira, *Genistein*. Phytochemistry, 2002. 60(3): p. 205-211.

166. Valentin-Blasini, L., et al., *HPLC-MS/MS method for the measurement of seven phytoestrogens in human serum and urine*. Journal of Exposure Analysis and Environmental Epidemiology, 2000. 10(6): p. 799-807.

167. Rösch, D., et al., *Structure-Antioxidant Efficiency Relationships of Phenolic Compounds and their Contribution to the Antioxidant Activity of Sea Buckthorn Juice*. J Agric Food Chem, 2003. 51: p. 4233-4239.

168. Olsson, M., et al., *Inhibition of Cancer Cell Proliferation in Vitro by Fruit and Berry Extracts and Correlations with Antioxidant Levels*. J Agric Food Chem, 2004. 52: p. 7264-7271.

169. Kim, J.-S., et al., *Isolation and Identification of Sea Buckthorn (Hippophae rhamnoides) Phenolics with Antioxidant Activity and α -Glucosidase Inhibitory Effect* J Agric Food Chem, 2011. 59: p. 138-144.

170. Dorbritz, S., *Methodenvergleich zur Extraktion von Phytoöstrogenen aus Pflanzenmaterial, dargestellt am Beispiel des Genisteins*. Universität Rostock, Diplomarbeit, 2002.

171. Kang, K., et al., *Enzymatic features of serotonin biosynthetic enzymes and serotonin biosynthesis in plants*. Plant Signaling & Behavior, 2008. 3(6): p. 389-390.

172. Lamartiniere, C.A., et al., *Genistein chemoprevention: timing and mechanisms of action in murine mammary and prostate*. J Nutr, 2002. 132: p. 552S-558S.

173. Michels, J., *Abschlussbericht Pilotprojekt "Lignocellulose-Bioraffinerie"*. DECHEMA e. V., 14.09.2009.
174. Simons, A., *Das OPC-Gesundheitsbuch. Das Geheimnis, durch Genuß gesund zu bleiben*. 1998, Bern, München, Frankfurt am Main: Scherz.
175. Kim, Y.J., *Anticancer effects of oligomeric proanthocyanidins on human colorectal cancer cell line, SNU-C4*. World j. Gastroenterol., 2005. 11(30): p. 4674-4678.
176. Simons, A. and A. Rucker, *Gesund länger leben durch OPC. Der natürliche Vitalstoff für das neue Jahrtausend*. 1999: MayaMedia-Verlag Dr. Andreas Gößling.
177. Lu, Y. and I. Yeap Foo, *Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace*. Food Chemistry, 2000. 68: p. 81-85.
178. Böhm, H. and H. Boeing, *Flavonole, Flavone und Anthocyane als natürliche Antioxidantien der Nahrung und ihre mögliche Rolle bei der Prävention chronischer Erkrankungen*. Zeitschrift für Ernährungswissenschaft, 1998. 37: p. 147-163.
179. Makena, P.S. and S.C. Pierce, *Comparative mutagenic effects of structurally similar flavonoids quercetin and taxifolin on tester strains Salmonella typhimurium TA102 and Escherichia WP-2 uvrA*. Environmental and molekular mutagensis, 2009. 50(6): p. 451-459.
180. Tsai, C., et al., *Genome-wide analysis of the structural genes regulating defense phenylpropanoid metabolism in Populus*. New Phytol, 2006. 172: p. 47-62.
181. Ono, E., et al., *Localization of a flavonoid biosynthetic polyphenol oxidase in vacuoles*. Plant J, 2006. 45: p. 133-143.
182. Ono, E., et al., *Yellow flowers generated by expression of the aurone biosynthetic pathway*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(11075-80).
183. Halbwirth, H., et al., *Biochemical formation of anthocyanins in silk tissue of Zea mays*. Plant Science, 2003. 164(4): p. 489-495.
184. Lewinsohn, E., et al., *Flavanone Glycoside Biosynthesis in Citrus: Chalcone Synthase, UDP-Glucose:Flavanone-7-O-Glucosyl-Transferase and -Rhamnosyl-Transferase Activities in Cell-Free Extracts*. Plant Physiol, 1989. 91: p. 1323-1328.
185. KEGG. *Reaction: dihydroflavonol,2-oxoglutarate:oxygen oxidoreductase*. [cited 04.10.2012]; Available from: http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?rn:R02160.
186. Alakurtti, S. and T. Makela, *Pharmacological properties of the ubiquitous natural product betulin*. Eur J Pharm Sci, 2006. 29(1): p. 1-13.
187. Laszczyk, M. and S. Jäger, *Physical, chemical and pharmacological characterization of a new oleogel-forming triterpene extract from outer bark of birch (betulae cortex)*. Planta Med, 2006. 72(15): p. 1389-1395.
188. Lee, S.B. and K.H. Cha, *The chemopreventive effect of taxifolin is exerted through ARE-dependent gene regulation*. Biological & pharmaceutical bulletin, 2007. 30(6): p. 1074-1079.
189. Luo, H. and B.H. Jiang, *Inhibition of cell growth and VEGF in ovarian cancer cells by flavonoids*. Nutrition and Cancer, 2008. 60(6): p. 800-809.
190. Rogovski, V.S. and A.I. Matiushin, *Antiproliferative and antioxidant activity of new dihydroquercetin derivatives*. Eksperimental'naia i klinicheskaiia farmakologiiia, 2010. 73(9): p. 39-42.

191. Luckner, M., *Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals*. Vol. 3. 1990, Jena: VEB Gustav Fischer Verlag.
192. Andersen, Q.M. and K.R. Markham, *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. 2006, Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis.
193. Harborne, J.B., *Introduction to Ecological Biochemistry*. Vol. 3. 1988, London: Academic Press.
194. Clifford, M.N., *Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden*. Journal of the Science of the Food and Agriculture, 2000. 80(7): p. 1063-1072.
195. Watzl, B., K. Briviba, and G. Rechkemmer, *Anthocyane*. Ernährungs-Umschau, 2002. 49(4): p. 148-150.
196. Larkin, T., W. Price, and L. Astheimer, *Analysis of phytoestrogens in food and biological samples*. Agro-food-industry hi-tech, 2000. 11: p. 24-27.
197. Bäumler, S., *Heilpflanzen Praxis Heute. Porträts, Rezepturen, Anwendungen*. 2007, München: Urban & Fischer.
198. Semmler, E., *Sekundäre Pflanzenstoffe: Die Vitamine des 21. Jahrhunderts?*, in *Leben ja natürlich - Zum Nachschlagen und Aufbewahren*. 2011: Satz & Grafik Infovita GmbH. p. 1-4.
199. Watzl, B. and G. Rechkemmer, *Einfluss sekundärer Pflanzenstoffe auf die Gesundheit*., in *Deutsche Gesellschaft für Ernährung. Ernährungsbericht 2004*. 2004: Bonn. p. 325-346.
200. Watzl, B., *Einfluss sekundärer Pflanzenstoffe auf die Gesundheit*., in *Deutsche Gesellschaft für Ernährung. Ernährungsbericht 2008*. 2008: Bonn. p. 335-346.
201. Kummer, S., *Redoxpotentiale von Pflanzeninhaltsstoffen*. Universität Rostock, Diplomarbeit, 2012.
202. KEGG. *Flavonoid Biosynthesis*. [cited 04.10.2012] Available from: http://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?ko00941+C00389

9. Anhang

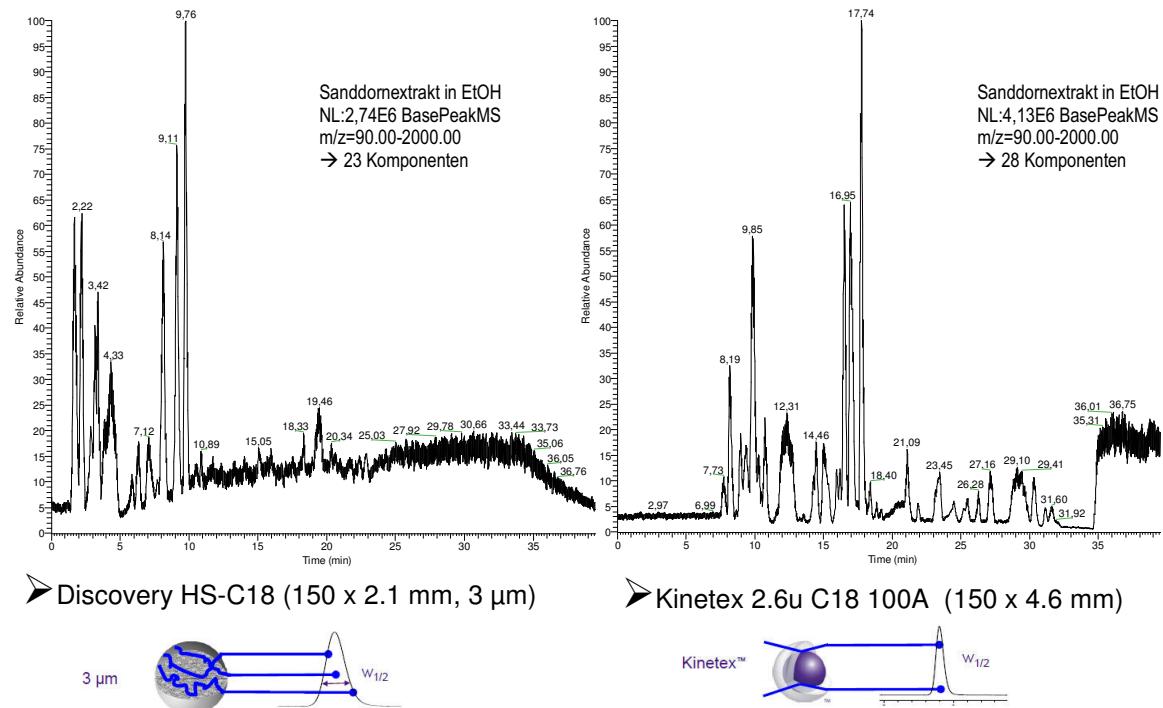
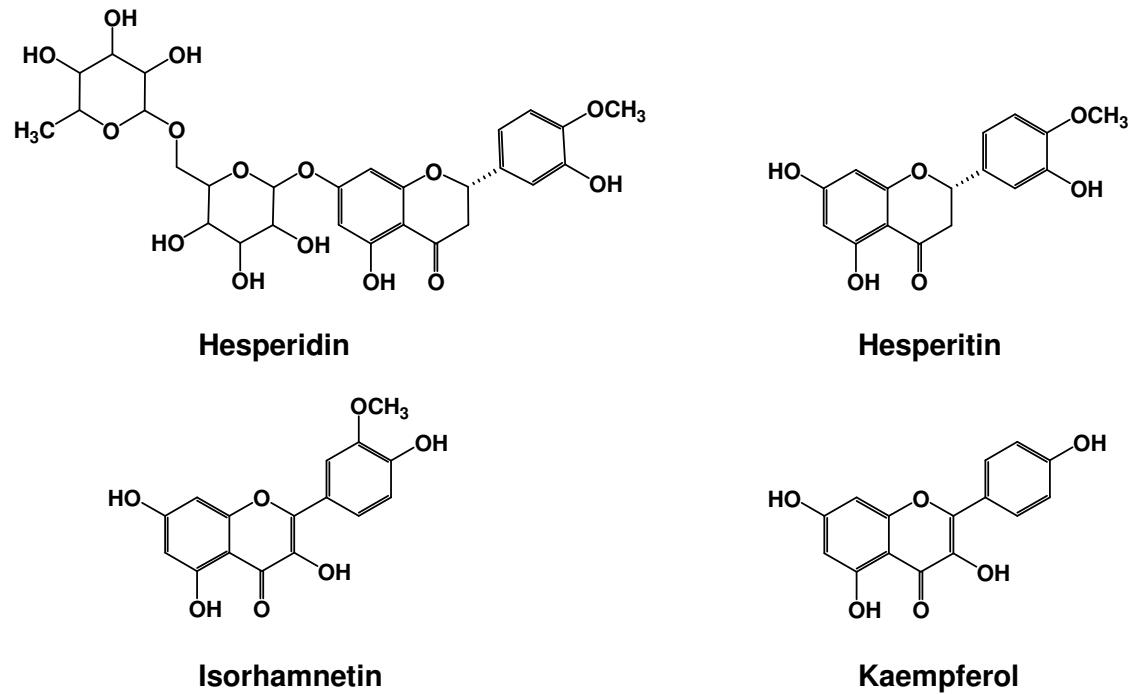
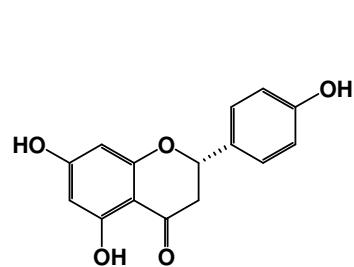


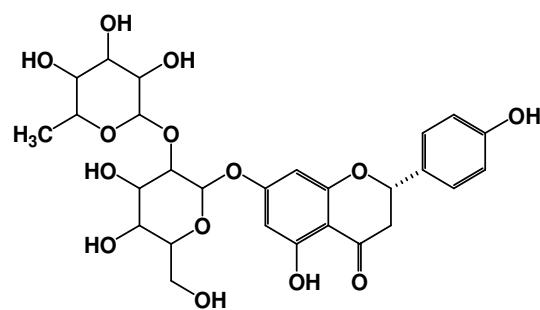
Abb. A- 1: Vergleich der verwendeten C18-Säulen am Beispiel des Sanddornextraktes

Abb. A- 2: Übersicht der auf ihre Temperaturstabilität hin untersuchten Standards

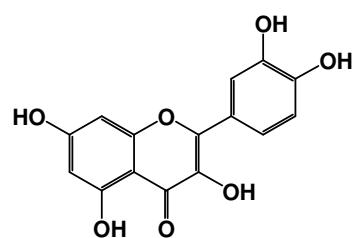




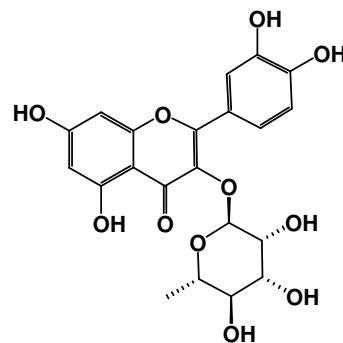
Naringenin



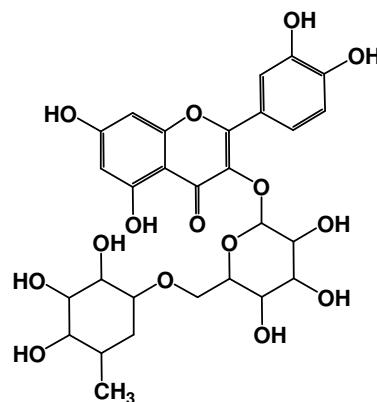
Naringin



Quercetin



Quercetrin



Rutin

Tab. A- 1: Übersicht der nachgewiesenen und identifizierten Substanzen in den einzelnen Pflanzenextrakten

Pflanzen	Substanzklassen		LC/MS			GC/MS
	Pflanzenteile	Lignane	Flavonoide	Anthocyane	Andere	
Gemeiner Lein	Wurzel	Secoisolariciresinol Matairesinol, Pinoresinol, Lariciresinol, Isolariciresinol, Arctigenin	Biochanin A, Genistein, Daidzein, Fisetin, Glycitein		Strukturkörper ähnlich Methoxysecoisolariciresinoldiglycosid	
Schwarzer Holunder	Blüten		Rutin, Isoquerçetin, Quercetin-3-O-6-acetylglucosid, Hesperidin, Fisetindiglucosid, Isorhamnetin-3-O-glucosid, Isorhamnetin-3-O-rutinosid, Quercetin, Naringenin, Kaempferol, Chrysin,	Malvidin	Caffeoylchinasäure, p-Coumaroylchinasäure	
	Beeren		Rutin, Isoquerçetin, Quercetin-3-O-6-acetylglucosid, Fisetindiglucosid, Isorhamnetin-3-O-rutinosid, Morin, Quercetin, Naringenin, Kaempferol, Chrysin	Kuromanin		
Sanddorn	Beeren		Isorhamnetin-3-sorborosid-7-rhamnosid, Vitexin, Quercetin-3-glucosid-7-rhamnosid, Isorhamnetin-3-coumarylglycosylglucosid-7-rhamnosid, Rutin, Isorhamnetin-3-glucosid-7-rhamnosid, Isoquerçetin, Hesperidin, Kaempferolrutinosid, Isorhamnetin-3-O-rutinosid, Isorhamnetin-3-O-glucosid, Isorhamnetin	Triglucoside: Quercetintriglucosid (glu-glu-rha), Quercetintriglucosid (glu-rha-rha), Xanthorhamnin Hydroxyzimtsäurederivate: Quercetindimethylether-3-hydroxyferulylglucosylglucosid-7-rhamnosid, Quercetindimethylether-3-cafferoylglucosylglucosid-7-rhamnosid	Tocopherol, β -Sitosterol	

Tab. A- 2: Fortsetzung der Übersicht der nachgewiesenen und identifizierten Substanzen in den einzelnen Pflanzenextrakten

Pflanzen	Substanzklassen		LC/MS			GC/MS	
	Pflanzenteile	Lignane	Flavonoide	Anthocyane	Andere	Andere	Andere
Brennnessel	Blätter		p-Cumarinsäure, Scopoletinoglucosid, Rutin, Quercetinoglucosid, Hesperidin, Fisetindiglucosid, Isorhamnetin-3-O-rutinosid, Methoxyisoflavan, Naringenin, Moringlucosid, Myricitin, Chrysin	Keracyanin			Stearinsäure, Serotonin, Tocopherol, Campesterol, Sitosterol
Rotbuche	Rinde	Hinweise auf lignane Strukturmöglichkeiten	Catechin, Glucodistylin, Taxifolin-O-pentose, Isoconiferin, Taxifolin, Quercetinpentose				Betulin, Vanillin, Linolensäure, Sitosterol

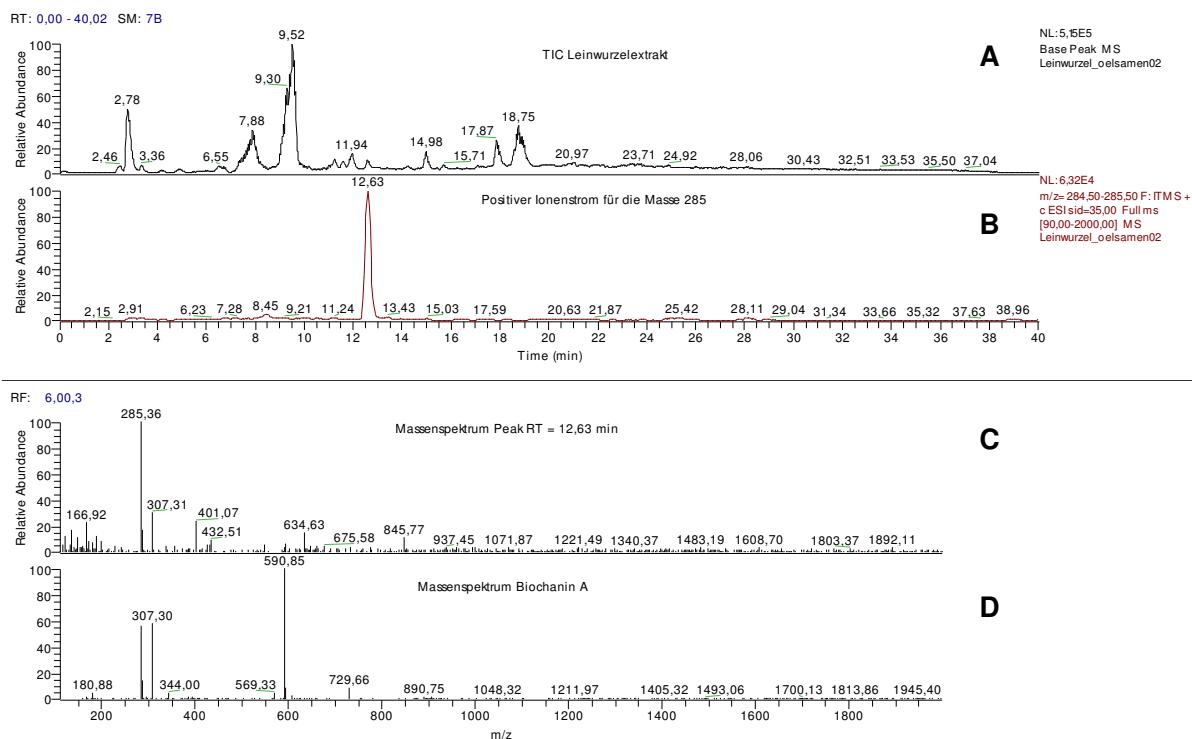


Abb. A- 3: Übersicht für die Komponente Biochanin A, welche im Leinwurzelextrakt nachgewiesen werden konnte. A: Totaler Ionenstrom des Leinwurzelextraktes, B: Chromatogramm der isolierten Massenspur $m/z = 285$. C: Massenspektrum des identifizierten Peaks mit $RT = 12,63$ min. D: Vergleichsmassenspektrum des Standards Biochanin A.

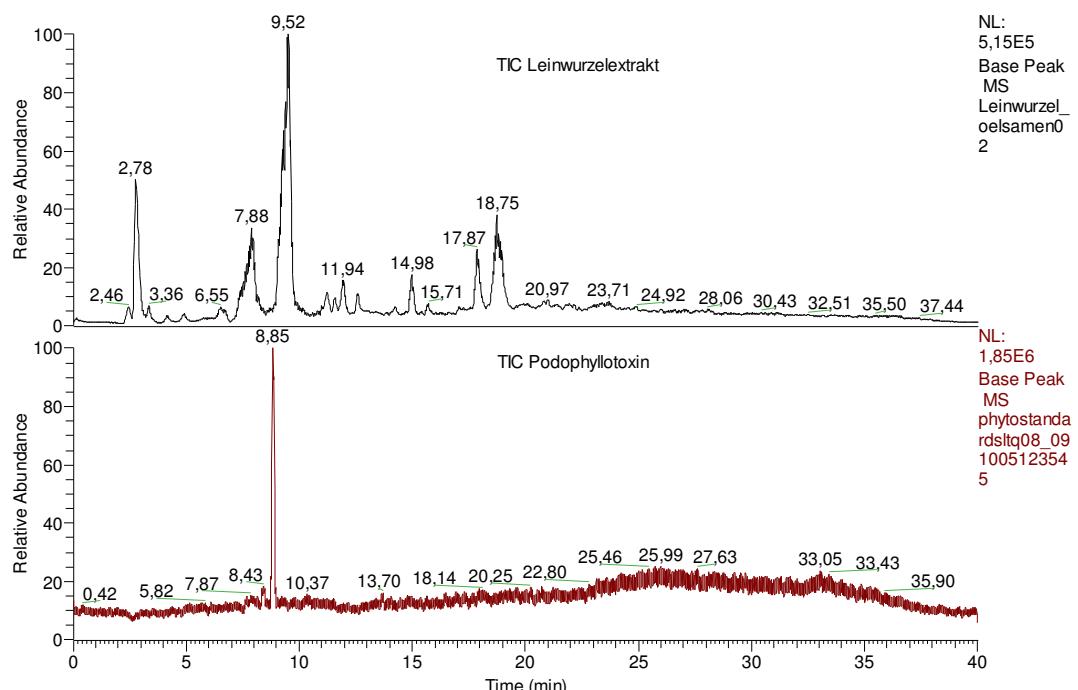


Abb. A- 4: Vergleich der Chromatogramme des Leinwurzelextraktes und des Standards Podophyllotoxin. Oben: Totaler Ionenstrom des Leinwurzelextraktes, Unten: Totaler Ionenstrom des Standards Podophyllotoxin. Durch den Vergleich der Chromatogramme und

der massenspektrometrischer Untersuchungen, konnte in den Mikrowellenextrakten der Leinwurzel kein Podophyllotoxin nachgewiesen werden.

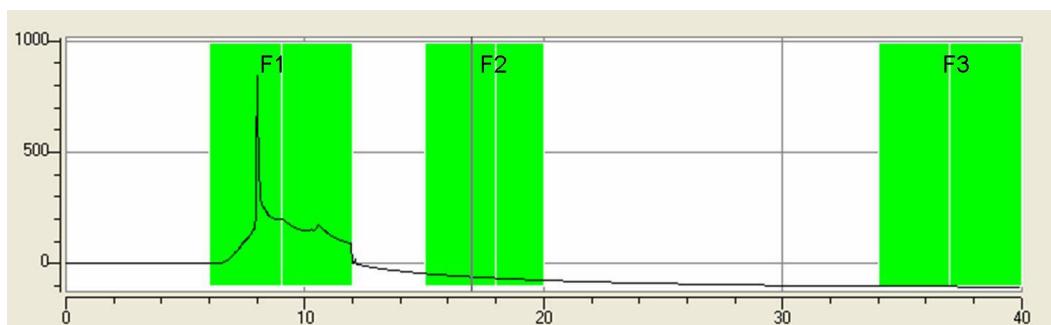


Abb. A- 5: Übersicht der geschnittenen Fraktionen des Leinwurzelextraktes in Abhängigkeit der Zeit. F1 (6-12 min), F2 (15-20 min), F3 (34-40 min)

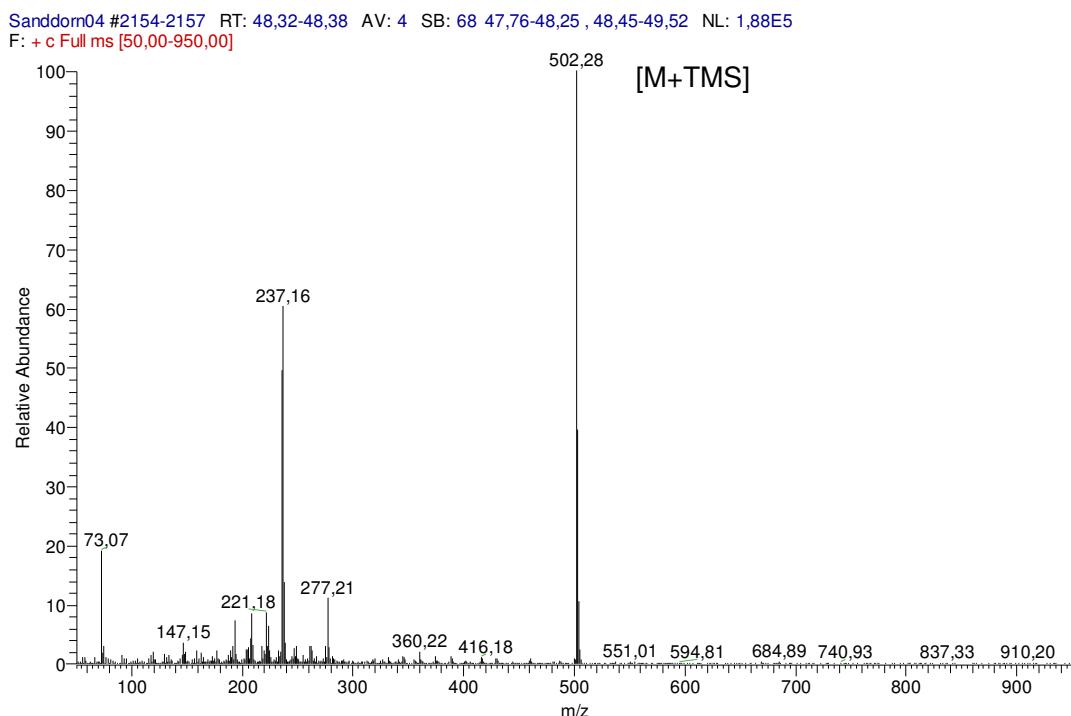
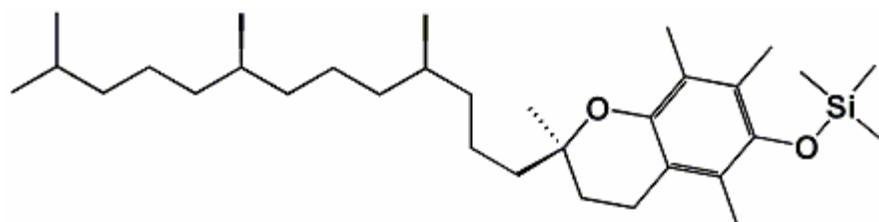


Abb. A- 6: Massenspektrum von Tocopherol-TMS, RT = 48,34 min, Molare Masse: 430,71 g/mol, Derivatisierte Masse ([M+TMS]): m/z = 502,28

Abb. A- 7: Struktur von Tocopherol-TMS



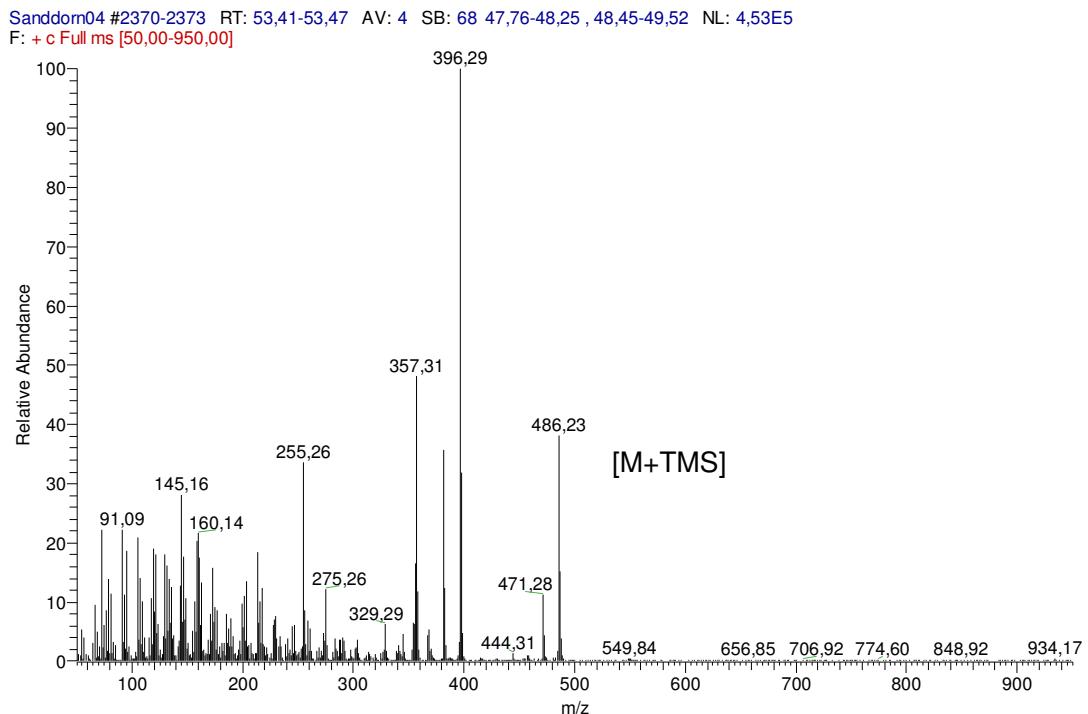


Abb. A- 8: Massenspektrum β -Sitosterol-TMS, RT =53,45 min. Molare Masse: 414,69 g/mol, Derivatisierte Masse ([M+TMS]): m/z = 486,23

Abb. A- 9: Struktur von β -Sitosterol-TMS

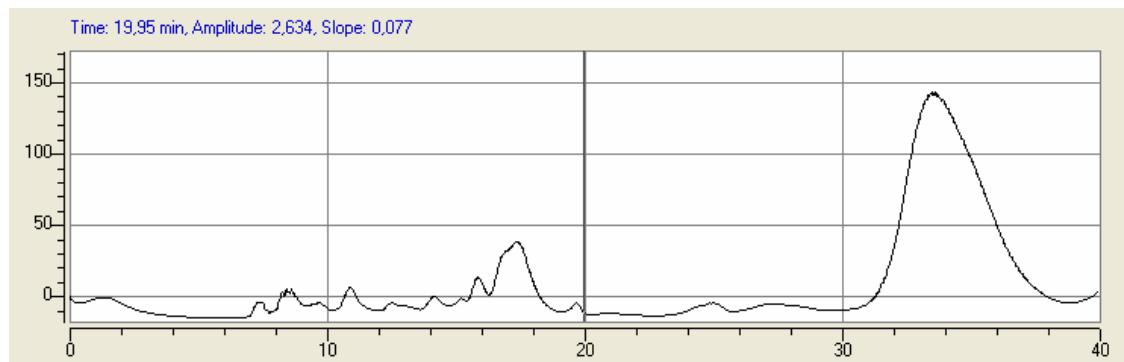
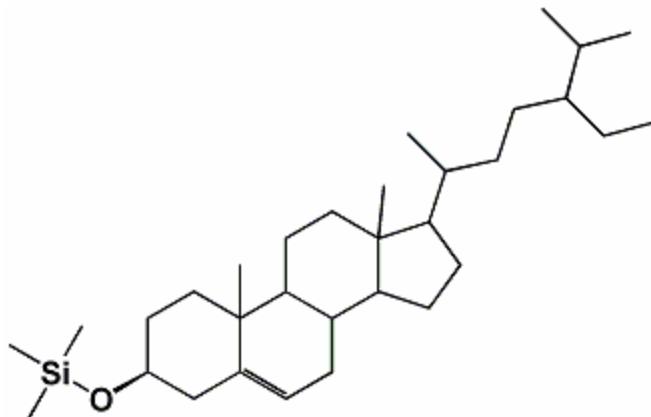


Abb. A- 10: Übersicht der geschnittenen Fraktionen des Sanddornbeerensaftes in Abhängigkeit der Zeit. F1 (7,3-8,3 min), F2 (8,5-9,6 min), F3 (9,8-10,6 min), F4 (11,0-12,2 min),

F5 (12,7-13,8 min), F6 (14,5-15,5 min), F7 (16,1-17,1 min), F8 (17,5-19,8 min), F9 (20,6-21,6 min), F10 (25,5-27,5 min), F11 (33,7-35,7 min), F12 (36,8-39,5 min)

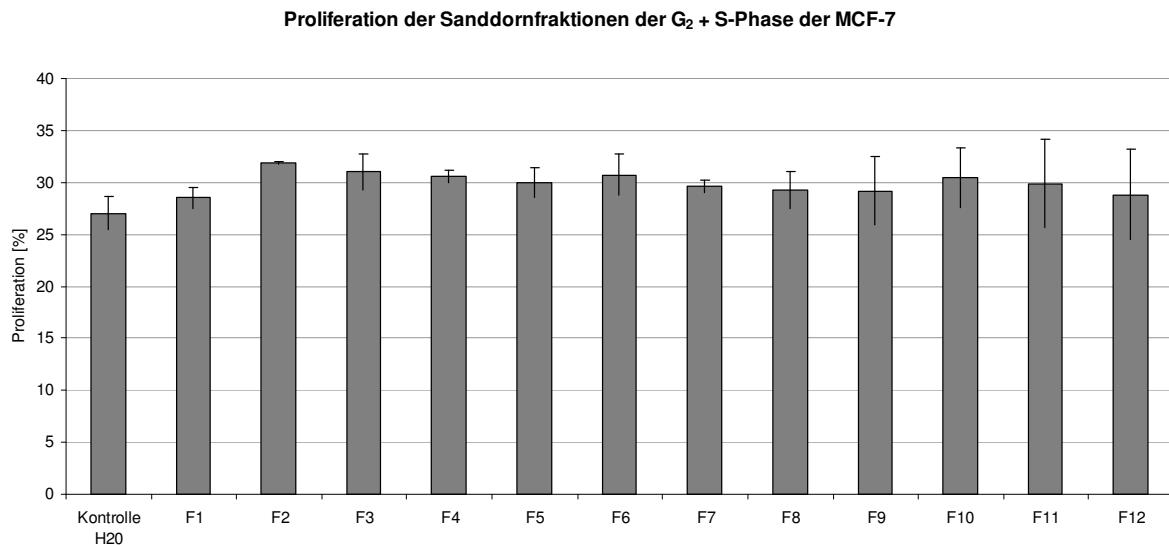


Abb. A- 11: Proliferationsraten (%) der Zelllinie MCF-7 nach 48 h Behandlung mit den einzelnen Sanddornfraktionen (F1-F12), Mittelwert \pm Standardabweichung (n=2-4) im Vergleich zur Kontrolle mit Wasser.

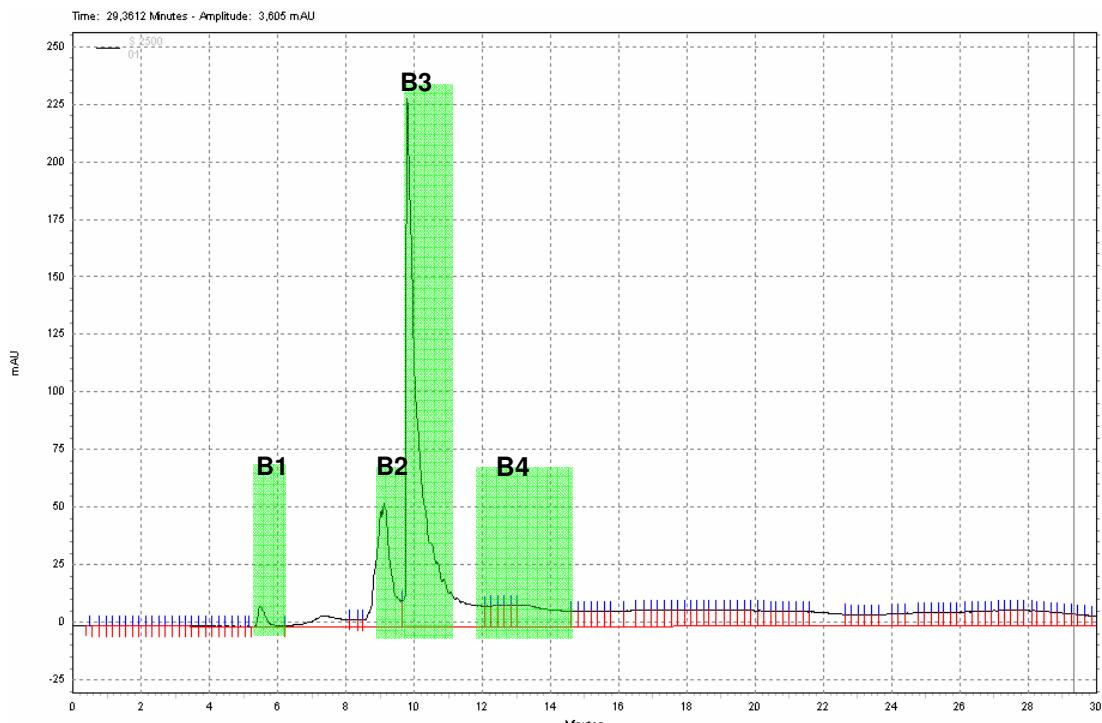


Abb. A- 12: Darstellung der geschnittenen Buchenrindenfraktionen an der präparativen HPLC. 280 nm. B1 (5,2-6,1 min), B2 (8,4-9,4 min), B3 (9,4-10,8 min), B4 (12,1-13,6 min)

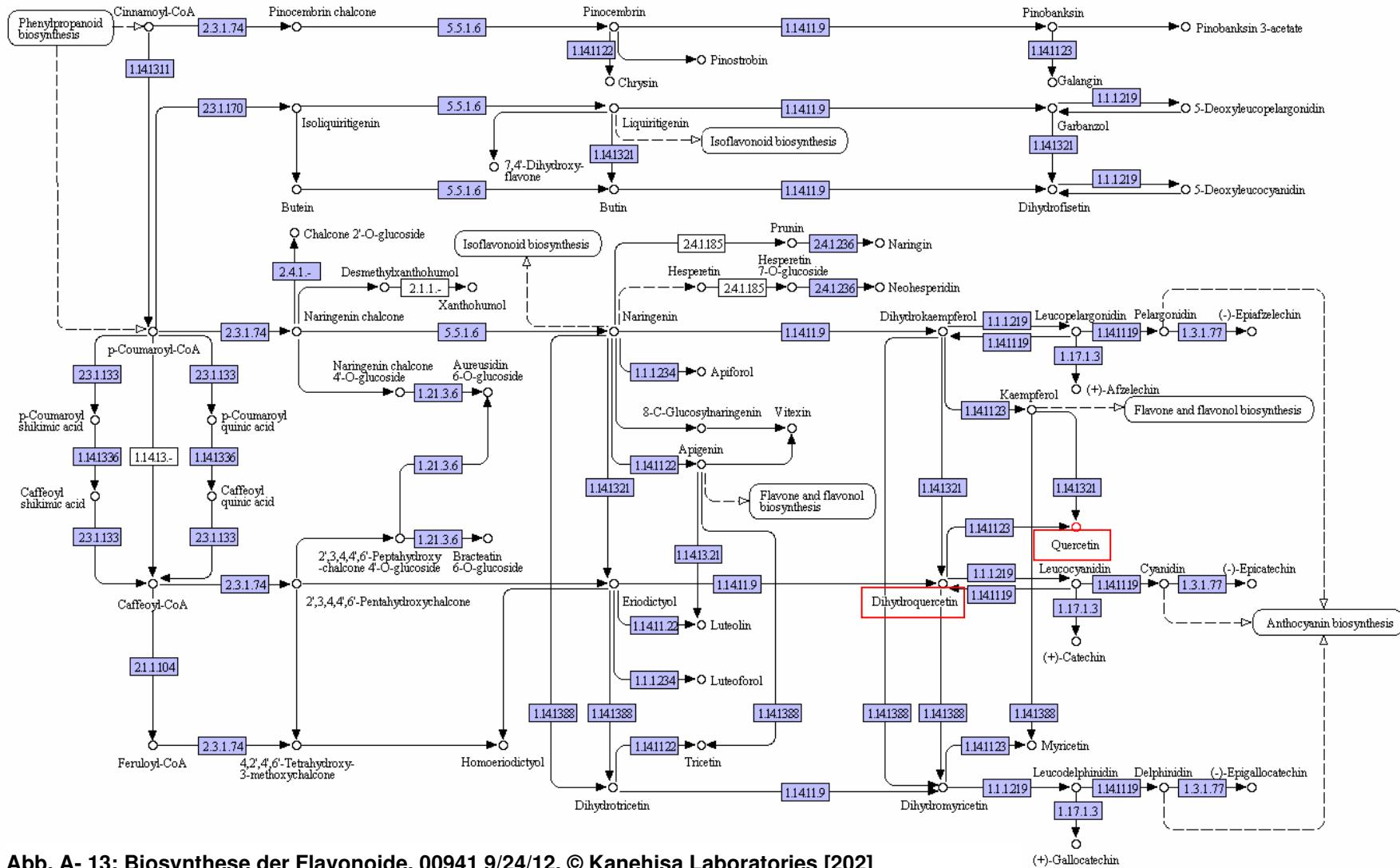
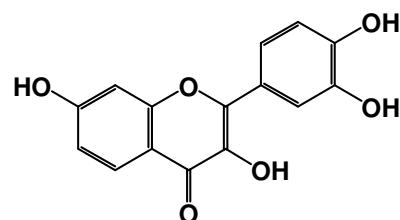
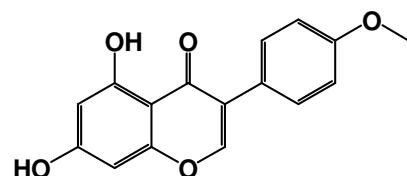


Abb. A-13: Biosynthese der Flavonoide, 00941 9/24/12, © Kanehisa Laboratories [202]

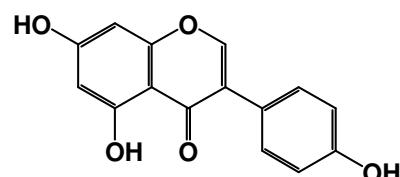
Abb. A-14: Übersicht der Strukturen der gefundenen Pflanzeninhaltsstoffe



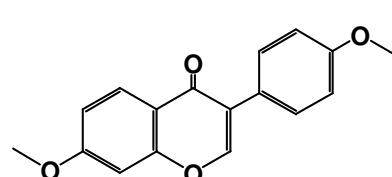
Fisetin



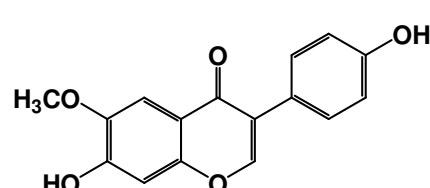
Biochanin A



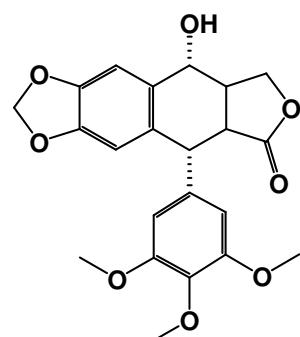
Genistein



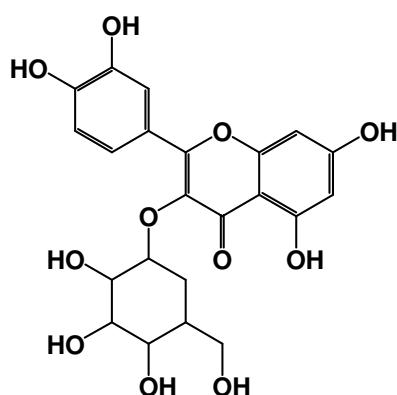
Daidzein



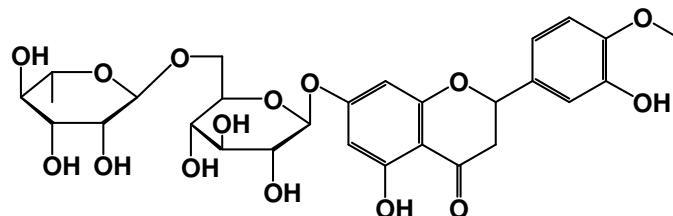
Glycitein



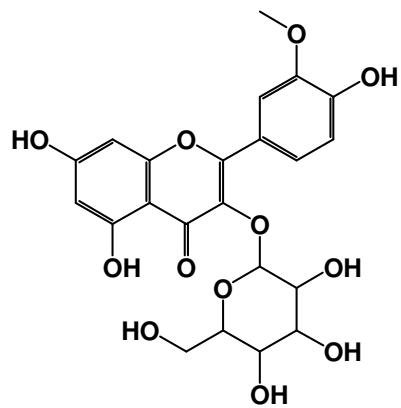
Podophyllotoxin



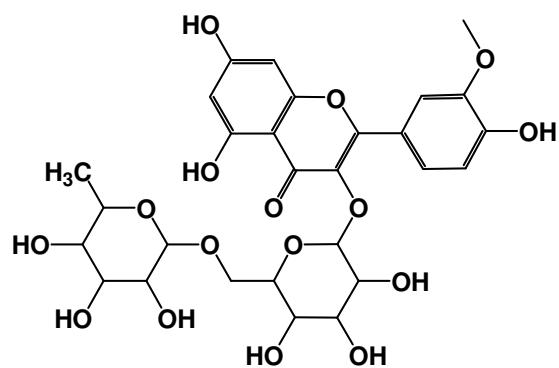
Isoquercetin



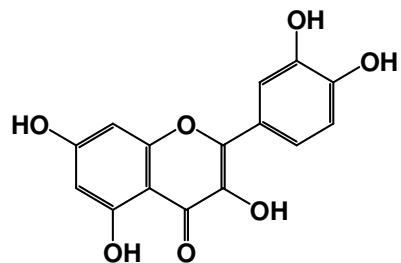
Hesperidin



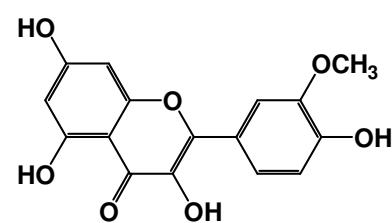
Isorhamnetin-3-O-glucosid



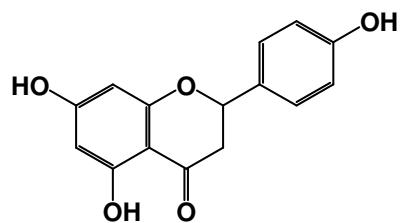
Isorhamnetin-3-O-rutinosid



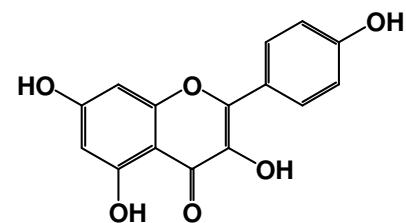
Quercetin



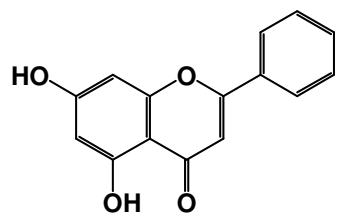
Isorhamnetin



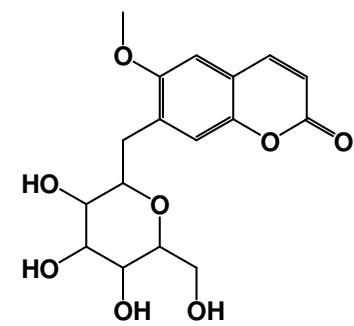
Naringenin



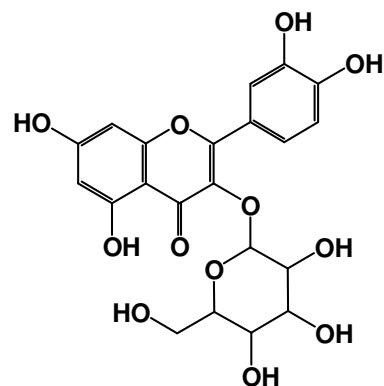
Kaempferol



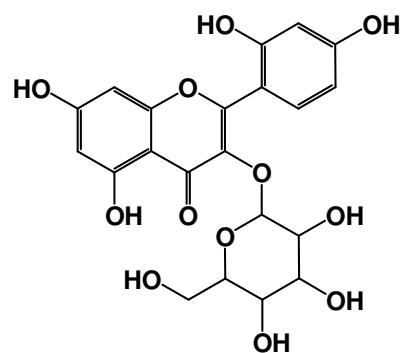
Chrysin



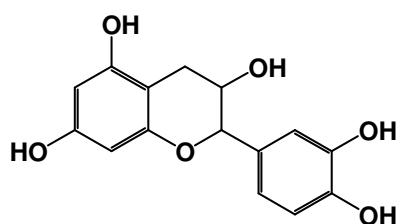
Scopoletin glucosid



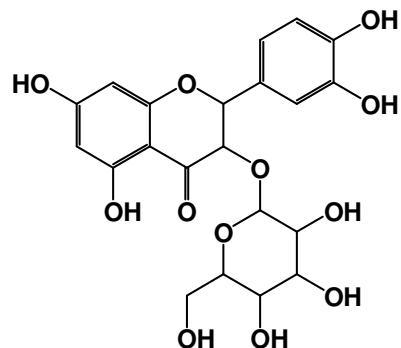
Quercetin glucosid



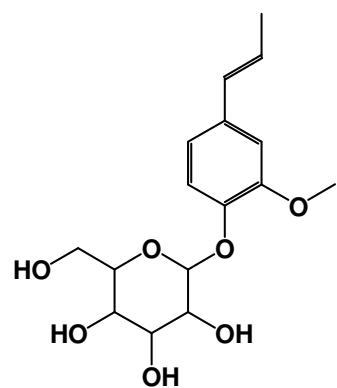
Moringa glucosid



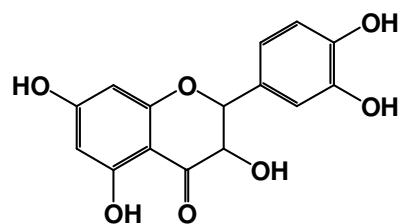
Catechin



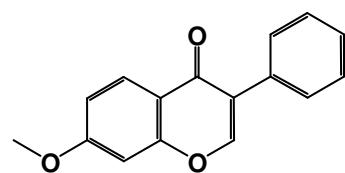
Glucodistylin



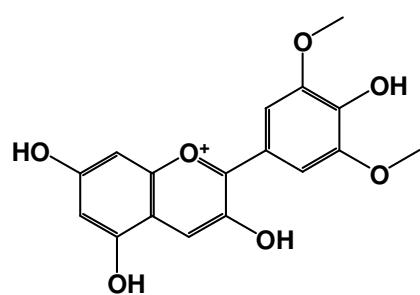
Isoconiferin



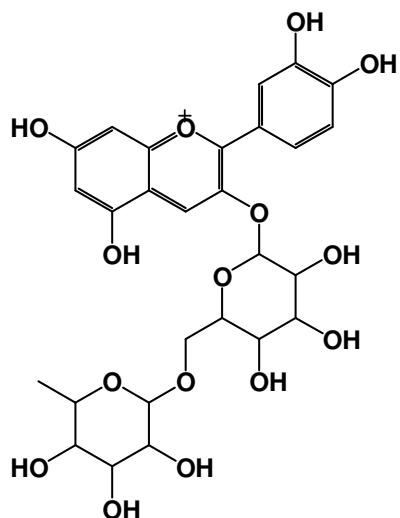
Taxifolin



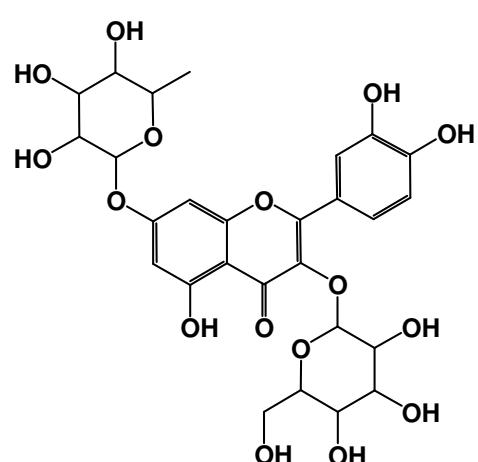
Methoxyisoflavanon



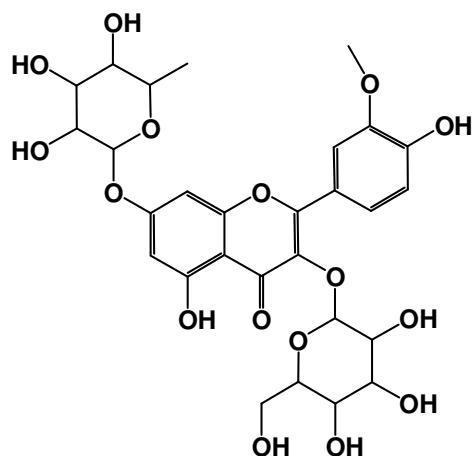
Malvidin



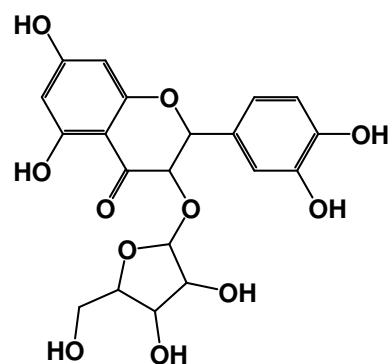
Keracyanin



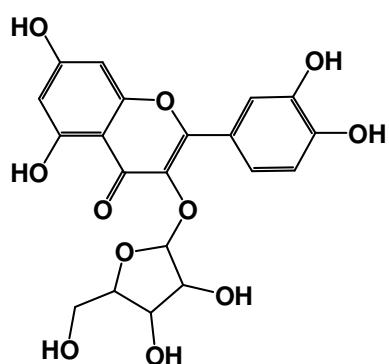
Quercetin-3-glucosid-7-rhamnosid



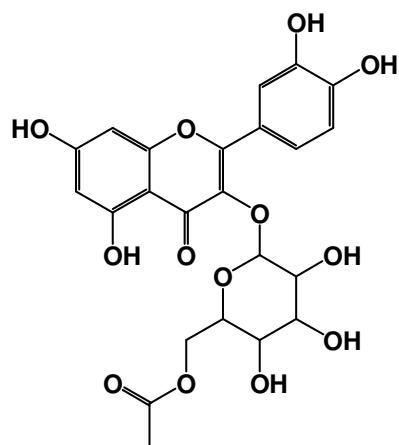
Isorhamnetin-3-glucosid-7-rhamnosid



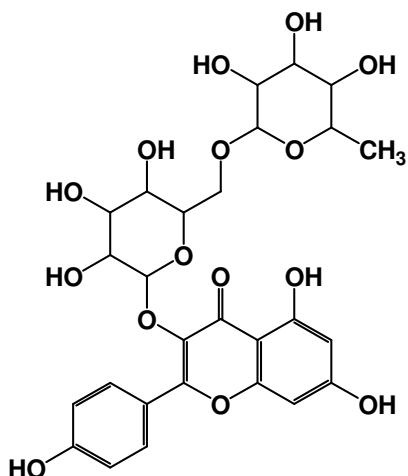
Taxifolin-O-pentose



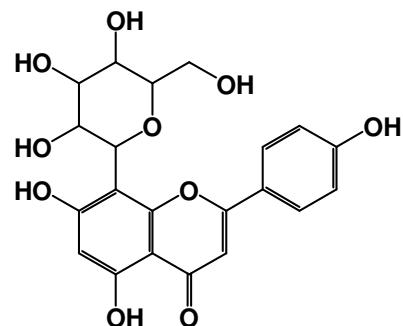
Quercetinpentose



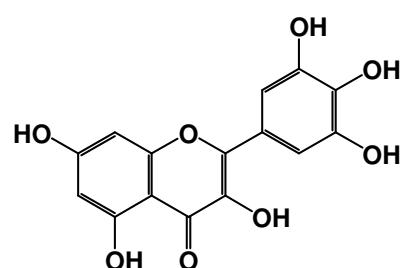
Quercetin-3-O-6''acetylglucosid



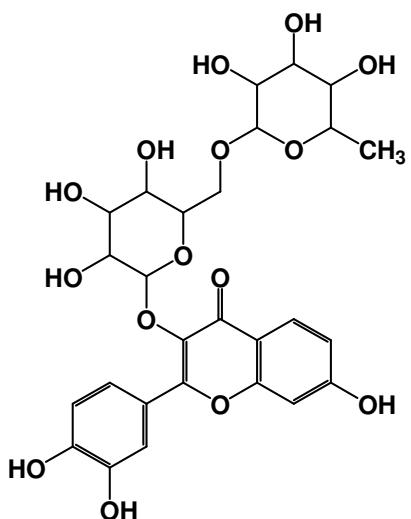
Kaempferolrutinosid



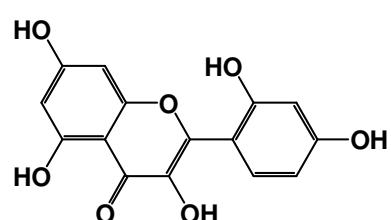
Vitexin



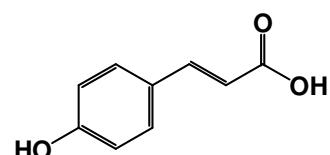
Myricitin



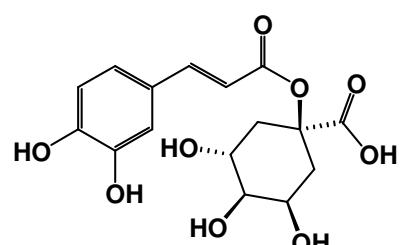
Fisetindiglucosid



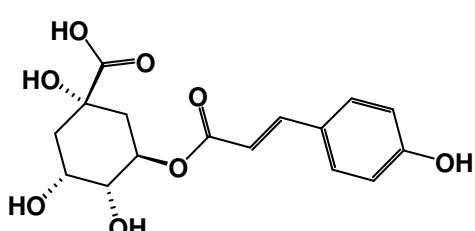
Morin



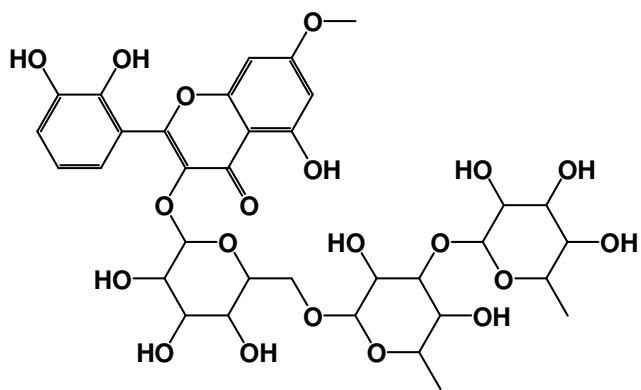
p-Cumarinsäure



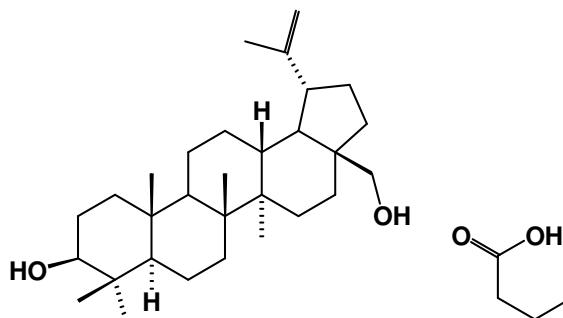
Caffeoylchinasäure



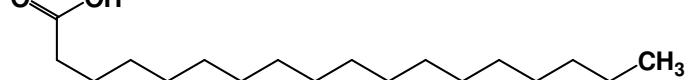
p-Coumaroylchinasäure



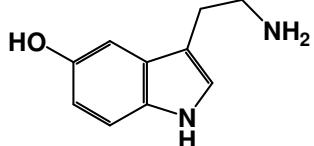
Xanthorhamnin



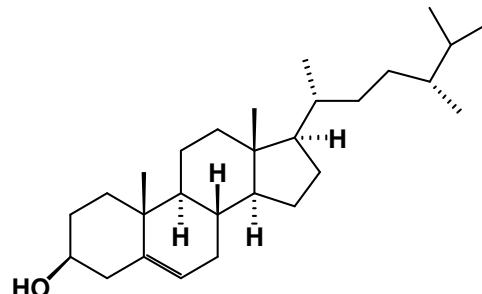
Betulin



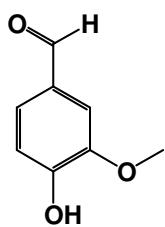
Stearinsäure



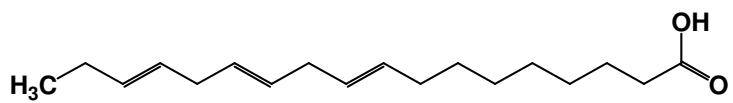
Serotonin



Campesterol



Vanillin



Linolensäure

9.1. Chemikalienliste für die Extraktion

Tab. A- 3: Chemikalienliste für die Extraktion

Chemikalie	Hersteller	Reinheit in %
Methanol	J. T. Baker	HPLC Gradient Grade
Ethanol	J. T. Baker	HPLC Gradient Grade
Ethanol absolut	Merck	Pro Analysis
Reinstwasser		

Die Quellen des für Extraktion verwendeten Pflanzenmaterials können den entsprechenden Kapiteln des Material und Methodenteils entnommen werden.

9.2. Chemikalienliste für die Analytik

Tab. A- 4: Chemikalienliste für die Analytik

Chemikalie	Hersteller	Reinheit in %
Methanol	J. T. Baker	HPLC Gradient Grade
Methanol	Flucka, Riedel-de Haën	LC-MS Chromasolv ®
Wasser mit 0,1% Ameisensäure	Flucka, Riedel-de Haën	LC-MS Chromasolv ®
Methanol mit 0,1 % Ameisensäure	Flucka, Riedel-de Haën	LC-MS Chromasolv ®
Isopropanol	Flucka	For HPLC, gradient grade
Acheton	Aldrich	HPLC analyzed
MSTFA	CS-Chromatographie Service GmbH	
BSTFA	Supelco	
Hexan	J. T. Baker	HPLC Gradient Grade
Argon		
Helium		
Stickstoff		
Reinstwasser		
Ethanol absolut	Merck	Pro Analysis

Die verwendeten Standards zu Erstellung der Bibliothek für den Vergleich von MS-Daten und Fragmentierungsmustern, können den Chemikalienlisten im Raum 008 der TC Kragl entnommen werden. Alle vermessenen Standards wurden von den Anbietern Sigma-Aldrich, ChromaDex, Supelco, Carl-Roth, AppliChem, Fluka, Alfa Aesar, ABCR, Acros, und HWI Analytik GmbH in der höchstmöglichen und besten Qualität für MS-Messungen käuflich erworben.

9.3. Geräteliste

Tab. A- 5: Geräteliste

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Vortex	VWR VV3 S40	VWR
Pipette	80-1000 µL, 2-200 µL, 100-5000 µL	Eppendorf Research
Pipettenspitzen	80-1000 µL, 2-200 µL, 100-5000 µL	Eppendorf Research
Ultraschallbad	Sonorex TK 52	Bandelin
Elektrische Mühle	MF 10 basic	IKA® Labortechnik
Siebe	8.0; 1.0 mm	
Schlagmühleneinsatz		
Festphasenexteaktionsanlage	VISIPREP™	Supelco, Sigmar-Aldrich
Kartuschen		
Zentrifuge	Mikro 22R	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge eppendorf	5810 R Centrifuge	Eppendorf AG
Abdampfblock	Reacti-Therm I #18821	Thermo Scientific
LC-MS	Baujahr 2005, LTQ	Thermo Finnigan
Pumpen	MS Pump Plus – Finnigan Surveyor	Thermo Finnigan
Autosampler	Plus – Finnigan Surveyor	Thermo Finnigan
UV-Detektor	PDA Plus – Finnigan Surveyor	Thermo Finnigan
MS-Detektor	Finnigan LTQ	Thermo Finnigan
Säulen		
	Discovery® HS-C18, 15 cm x 2.1 cm, 3µm	Supelco
	Kinetex 150 x 4.6 mm, 2,6 µ, C18, 100 Å	Phenomenex
Säulenofen		
Software	Xcalibure (Version 2.0 SR2)	Thermo Finnigan
	Mass Frontier	Thermo Finnigan
	NIST	
Reinstwasseranlage	Ultra Clear 2001	SG-Water Germany
SPE	VISIPREP™	Supelco
Festphasenkartuschen	Bond Eluent PPL, 1G 6mL	Varian

Tab. A- 6: Fortsetzung der Geräteliste

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
Präparative HPLC		Knauer HPLC system
Detector	S2500	Knauer HPLC system
Pump	K-1800	Knauer HPLC system
	K-120	Knauer HPLC system
	K-501	Knauer HPLC system
Säulen	Eurospher 100 C18, 10 μ	Knauer HPLC system
	Ascentis® Phenyl, 25 cm x 10 mm, 5 μ m	Supelco Analytik
FractionCollector	Foxy Jr. FC	ISCO
Sprühtrockner	Mini Spraydryer B-290	Büchi
Feinwaage	B121S	Sartorius
Thermoschrank	Serien-Nr.: 01-25125	Binder
Labormikrowelle	MarsXpress	CEM
Software	Mars5Xpress 194A04 1997, 2006	CEM Corporation (USA)
Membranfiltrationsanlage	Millipore Glass 47 mm Filter Holder	Millipore
Filter	Nr. : 389	Filtrak
Rotationsverdampfer	Laborota 4001	Heidolphz
Einmalspritzen	2mL (3mL) Norm Jet	Henke Sass Wolf Luer
Kanülen	100 Sterian 0.90 x 70 mm/ 20 G x 2 $\frac{3}{4}$	Braun
	100 Sterian 0.80 x 120 mm/ 21 G x 4 $\frac{3}{4}$	Braun
Glasvials	40 mL (braun/ klar), 95 x 27.5 mm	Fisherbrand
Glasvials	1.5 mL (braun/ klar)	Fisherbrand
MS-Glasvials	MS, CRT 2 mL (Clear-/ D Vial)	Thermo-Electron Manufacturing
MS-Glasvials	MS, CRT 2 mL (Amber)	Thermo-Electron Manufacturing
Microeinsätze	0.1 mL, Klarglas	Fisherbrand
GC-MS Anlage	ITQ 1100	Thermo Scientific
Trace GC Ultra		Thermo Scientific
Autosampler Tri Plus		Thermo Scientific
Säule	DB5 MS 30 m x 0.25 mm, 0,25 μ m	J & W Scientific