

Aus dem Institut zur
wissenschaftlichen Evaluation naturheilkundlicher Verfahren
an der Universität zu Köln
Direktor: Professor Dr. med. H. J. Beuth

**Biochemische Charakterisierung sekundärmetabolischer Inhaltsstoffe
der Eberraute (*Artemisia abrotanum*) und experimentelle
Untersuchungen der immunologischen, antioxidativen und
cytotoxischen Eigenschaften**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Würde eines doctor rerum medicinalium
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von
Dipl. Biol. Hauke Karsten Schneider
aus Duisburg

Promoviert am: 18. Februar 2009

Gedruckt mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität zu Köln

2009

Dekan: Universitätsprofessor Dr. med. J. Klosterkötter

1. Berichterstatter: Professor Dr. med. H. J. Beuth

2. Berichterstatter: Universitätsprofessor Dr. med. G. Uhlenbruck

Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes habe ich Unterstützungsleistung von folgenden Personen erhalten:

Professor Dr. med. J. Beuth

Dr. rer. nat. Hong L. Ko

Weitere Personen waren an der geistigen Herstellung der vorliegenden Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich nicht die Hilfe eines Promotionsberaters in Anspruch genommen. Dritte haben von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde von mir bisher weder im Ausland noch im Inland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und ist auch noch nicht veröffentlicht.

Köln, 23.10.2008


Hauke Schneider

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. J. Beuth für die Überlassung des
Themas und die wertvolle Unterstützung während dieser Arbeit

und

Frau Dr. rer. nat. Hong L. Ko für die fachliche und wahrhaft phänomenale Hilfe.

Ganz besonders möchte ich mich bei meiner Ehefrau Anja Baldamus für ihre Geduld
und den Beistand während dieser ganzen Zeit und bei meiner Tochter für die ihr eigene
Art der Unterstützung bedanken.

Gewidmet
meiner kleinen Familie

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	- 5 -
2.	Material und Methoden	- 21 -
2.1.	Herstellung eines Lyophilisats aus dem Pflanzenmaterial.....	- 21 -
2.1.1.	Material	- 21 -
2.1.2.	Extraktion.....	- 21 -
2.1.3.	Herstellung des Lyophilisats	- 22 -
2.2.	Säulenchromatografische Analyse	- 23 -
2.3.	Fraktionierung in Abhängigkeit unterschiedlich polarer Eigenschaften der Inhaltsstoffe.....	- 24 -
2.3.1.	Extraktion des Crude-Extraktes	- 24 -
2.3.2.	Extraktion des aus 2.3.1 resultierenden Lyophilisats.....	- 24 -
2.3.3.	Redestillation des Lösemittels.....	- 25 -
2.4.	Chromatografische Analysen von xM, xE und HYD	- 26 -
2.4.1.	Säulenchromatografische Analysen	- 26 -
2.5.	Wirkungsbezogene Analysen	- 26 -
2.5.1.	Test auf cytotoxische Wirkung	- 26 -
2.5.2.	Stimulation von Makrophagen.....	- 27 -
2.5.3.	Stimulation von Monozyten.....	- 29 -
2.5.4.	Test auf antioxidative Wirkung mit dem TEAC-Assay (<i>Trolox Equivalent Antioxidant Capacity Assay</i>)	- 30 -
2.5.5.	Test auf antioxidative Wirkung mit dem DPPH-Assay	- 31 -
3.	Ergebnisse	- 33 -
3.1.	Untersuchungen des Gesamtextraktes.....	- 33 -
3.1.1.	Immunologische Untersuchung des Gesamtextraktes.....	- 33 -
3.1.2.	Untersuchung der cytotoxischen Wirkung des Gesamtextraktes.....	- 34 -
3.1.3.	Untersuchung der antioxidativen Kapazität des Gesamtextraktes	- 36 -
3.2.	Untersuchung der Fraktionen aus der Säulenchromatografie	- 38 -
3.2.1.	Ergebnisse der chromatografischen Auftrennung	- 38 -
3.2.2.	Untersuchung der immunologischen Wirkung der säulenchromatografisch ermittelten Fraktionen.	- 39 -
3.2.3.	Untersuchung der cytotoxischen Wirkung der säulenchromatografisch ermittelten Fraktionen.	- 40 -

3.2.4. Untersuchung der antioxidativen Kapazität der säulenchromatografisch ermittelten Fraktionen	- 41 -
3.3. Untersuchung der Fraktionen aus der alkoholischen Auftrennung in Abhängigkeit unterschiedlich polarer Eigenschaften der Inhaltsstoffe.....	- 42 -
3.3.1. Ergebnisse der alkoholischen Fraktionierung	- 42 -
3.3.2. Immunologische Untersuchung der alkoholischen Fraktionen.....	- 45 -
3.3.3. Untersuchung zur cytotoxischen Wirkung der alkoholischen Fraktionen	- 45 -
3.3.4. Untersuchung der antioxidativen Kapazität der alkoholischen Fraktionen ...	- 46 -
4. Diskussion	- 49 -
5. Zusammenfassung	- 53 -
6. Literaturverzeichnis	- 55 -

Abkürzungsverzeichnis

µL	= Mikroliter	rLF	= relative Luftfeuchtigkeit
mL	= Milliliter	PBS	= Phosphate buffered saline
L	= Liter	DMEM	= Dulbecco's Modified Eagle's Medium
h	= Stunde	MEM	= Minimum Essential Medium
min	= Minute	EDTA	= Ethylendiamintetraacetat (Bildner von Chelatkomplexen)
µg	= Mikrogramm	ABTS	= 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)Diazoniumsalz
mg	= Milligramm	DPPH	= 1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl
g	= Gramm	F_A	= Sammelfraktion A
nm	= Nanometer	F_B	= Sammelfraktion B
µm	= Mikrometer	F_C	= Sammelfraktion C
mm	= Millimeter	xE	= Ethanolische Fraktion
cm	= Zentimeter	xM	= Methanolische Fraktion
µmol	= Mikromol	Hyd	= Hydrophile Fraktion
UV/Vi	= Lichtspektrum d. ultravioletten und sichtbaren Bereiches		
s	= Extinktion		
E	= International Unit		
U	= Xfache Erdbeschleunigung (bei der Zentrifugation)		

1. Einleitung

Die aus dem östlichen Mittelmeerraum stammende Eberraute (*Artemisia abrotanum* L.) ist seit ca. 2500 Jahren als Heilpflanze schriftlich belegt. So findet sie in Schriften von Hippokrates und Dioskarides als Mittel Erwähnung, welches spasmolytische Wirkung zeigt (Björk et al., 2002). Sie zählt zur Pflanzengattung *Artemisia*, welcher etwa 500 über die ganze Nordhalbkugel verbreitete Arten angehören. In Mitteleuropa sind 21 Arten beheimatet.

Verwandt ist die Eberraute mit dem Wermut (*Artemisia absinthium*), welcher aromatischer Hauptbestandteil des namentlich abgeleiteten alkoholischen Getränkes ist, dem gewöhnlichen Beifuss (*Artemisia vulgaris*), welcher als Gewürz in der Küche zu finden ist und dem einjährigen Beifuss (*Artemisia annua*), der durch den Malariawirkstoff Artemisin in den letzten Jahrzehnten an Bekanntheit gewonnen hat.

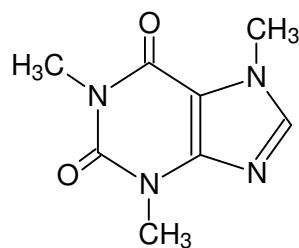
Reich:	<i>Plantae</i>
Unterreich:	<i>Trachaeobionta</i>
Überabteilung:	<i>Spermatophyta</i>
Abteilung:	<i>Magnoliophyta</i>
Klasse:	<i>Rosopsida</i>
Unterklasse:	<i>Asteridae</i>
Ordnung:	<i>Asterales</i>
Familie:	<i>Asteraceae</i>
Unterfamilie:	<i>Asteroideae</i>
Tribus:	<i>Anthemideae</i>
Gattung:	<i>Artemisia</i>
Art:	<i>Artemisia abrotanum</i>

Systematik der Eberraute (*Artemisia abrotanum*)

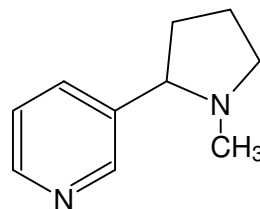
Die Pflanze wächst als Halbstrauch und trägt wechselständige, mehrfachfiederteilige Laubblätter. Die kugelförmigen gelben Blüten kommen in Mittel- und Nordeuropa nicht zur Samenreife.

Neben denen im Primärmetabolismus, wie der Photosynthese, der Atmungskette, der Proteinbiosynthese und dem Fettstoffwechsel gebildeten Aminosäuren, Fetten, Kohlenhydraten und Nukleotiden, welche essentiell für die Entwicklung der Pflanze sind, werden Substanzen gebildet, die keinerlei Funktion im anabolen und katabolen Stoffwechsel innehaben, obwohl sie über Schlüsselproteine in den Biosynthesewegen mit diesen verbunden sind. Man nennt diese Substanzen Sekundärmetabolite oder auch sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe. Während die primären Metabolite immer an gleicher Position im Stoffwechsel vorkommen, immer die gleichen Funktionen erfüllen und im gesamten Pflanzenreich ubiquitär vorkommen, sind die Sekundärmetabolite sehr spezifisch auf verschiedene Pflanzenspezies beschränkt. Meist kommen diesen Substanzen Funktionen zu, die sich aus ökologischen Entwicklungen heraus ergeben haben. Sie fungieren als Antibiotika, Pestizide, um Fraßfeinde fernzuhalten, als Fungizide und als Farb- und Lockstoffe für Nützlinge. Hauptsächlich existieren drei auf unterschiedlichen Biosynthesewegen produzierte Stoffgruppen. Es gibt die stickstoffhaltigen Sekundärmetabolite, zu denen die Alkaloide zählen, die Phenylpropanoide, zu denen die Flavonoide, Isoflavonoide, Phenolsäuren, Cumarine, Lignane und Stilbene gerechnet werden und es gibt die Terpenoide zu denen die Terpene, Carotinoide und Steroide gehören. Viele dieser Sekundärstoffe, aus der Gruppe der Alkaloide oder der Flavonoide etwa, sind auch für den Menschen toxisch, können aber richtig dosiert eine durchaus sinnvolle Wirkung entfalten (Barbosa-Filho et al., 2006; Piao et al., 2004).

Die **Alkaloide** leiten sich von der Aminosäuresynthese ab. Da der Synthese viele verschiedene Aminosäuren zugrunde liegen, bilden sie eine sehr komplexe Gruppe von Molekülen, mit Stickstoff assoziierten Heterozyklen, was ihnen einen basischen Charakter verleiht. Bekannte Beispiele sind das Koffein und das Nikotin.

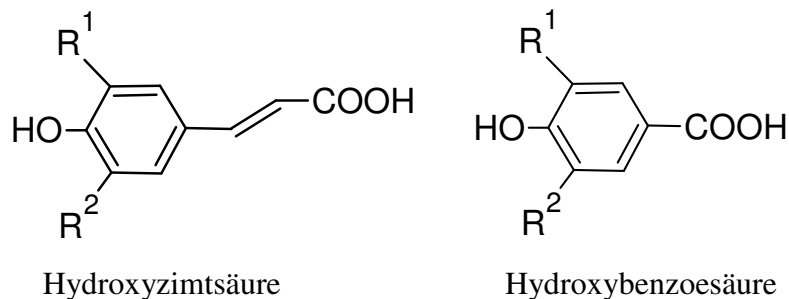


Coffein

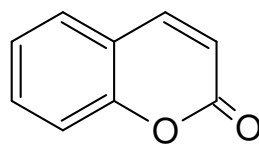


Nikotin

Die **Phenylpropanoide** haben ihren Ursprung ebenfalls in der Biosynthese der Aminosäuren. Zugrunde liegt bei allen Derivaten das Phenylalanin. Die Phenolsäuren, sind im Pflanzenreich weit verbreitet, sie liegen meist mit einem Kohlenhydrat verestert (glykosiliert) vor. Die Phenolsäuren umfassen zwei Gruppen, die Hydroxycimtsäuren und die Hydroxybenzoesäuren, zu denen die als Grundstoff für Aspirin dienende Salizylsäure gehört. Die Phenolsäuren zeigen einige pharmazeutische Eigenschaften. So konnte man bei den Hydroxycimtsäuren eine reduzierte Bildung von Nitrosaminen im Gastrointestinaltrakt feststellen. Nitrosamine wirken cancerogen und stehen im Verdacht Dickdarmkrebs auszulösen. Des Weiteren konnte man bei einigen Hydroxycimtsäurederivaten einen inhibierenden Einfluss auf die Entstehung von Magenkrebs beobachten (Clifford, 2000; Kroon et al., 1999).



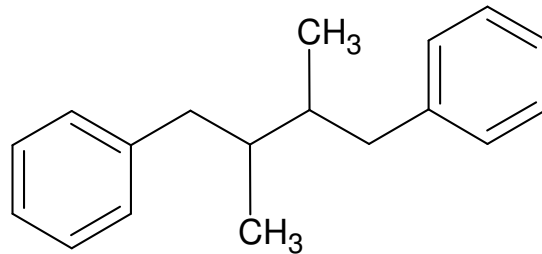
Das **Cumarin** ist der Grundbaustein für viele weitere Derivate. Bekannt ist das Cumarin als Aromastoff, zum Beispiel im Waldmeister. Einige seiner Derivate haben die Eigenschaft die Blutgerinnung zu hemmen und werden in der Medizin verwendet (Warfarin). Andere Abkömmlinge des Cumarins tragen choleretische-, spasmolytische- und Antimalaria- Wirkung (Tan et al. 1998).



Cumarin

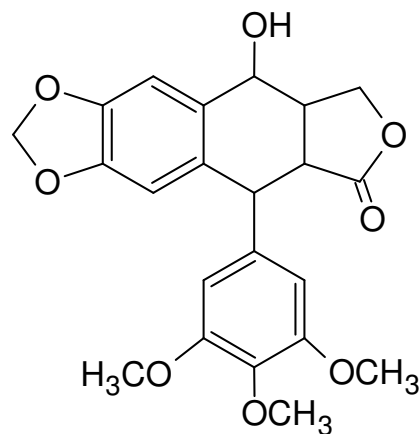
Lignane sind im Pflanzenreich weit verbreitete Sekundärmetabolite, die als Abwehrsubstanzen dienen. Lignane besitzen toxische Wirkung, des Weiteren gibt es fungizid und bakteriostatisch wirkende Derivate des Lignans. Die sehr starke Toxizität

reicht von der Inhibierung des cAMP's und somit der intrazellulären Signaltransduktion bis hin zur zytostatischen Wirkung indem der Spindelapparat während der Mitose blockiert wird.



Lignan (Grundgerüst)

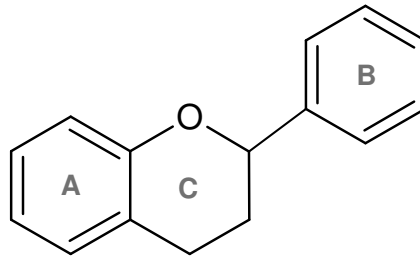
Ein sehr bekannter Vertreter der Lignane ist das Mitosegift Podophyllotoxin, welches in der Vergangenheit vor allem zur Bekämpfung von Feigwarzen verwendet wurde. In der zweiten Hälfte des 20. Jahrhunderts fanden Derivate des Podophyllotoxins zunehmend als Chemotherapeutika in der Onkologie Verwendung. In Pflanzen aus den tropischen Regionen Südamerikas fand man in der Vergangenheit zudem Lignanvertreter mit antiviraler Wirkung.



Podophyllotoxin

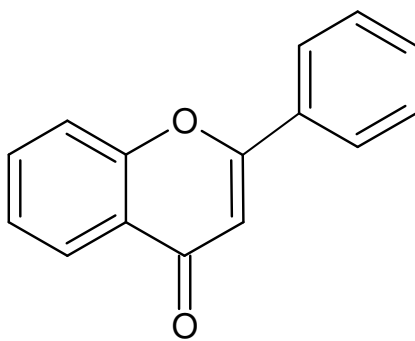
Die **Flavonoide** können in der Pflanze unterschiedliche Aufgaben besitzen. Sie sind in der Regel gelb bis orange gefärbt und dienen vor allem in Blüten und Früchten als

natürlicher Farbstoff. Hier tritt besonders die Untergruppe der Anthocyane hervor, die abhängig vom pH-Wert rot bis blau gefärbt sein können (Harborne, Williams, 2001). Alle Flavonoide bauen auf dem Flavan als Grundgerüst auf. Die Ausnahme bilden die Isoflavone, bei denen der B-Ring in para-Stellung am C-Ring substituiert ist.

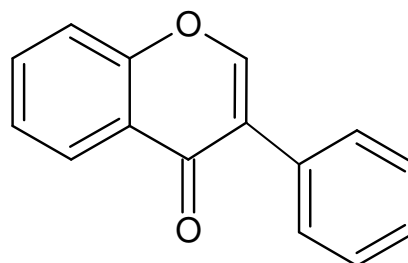


Flavan (Grundgerüst für alle Flavonoide)

Durch ihre Eigenschaft, Licht im UV-Spektrum zu absorbieren, können sie die Pflanze vor Schäden durch Bestrahlung im ultravioletten Bereich bewahren und durch ihre antioxidativen Eigenschaften schützen sie vor Schäden durch freie Radikale und reaktive Sauerstoffspezies, die im Verlauf der Zellatmung und Lichtreaktion der Photosynthese entstehen (Pannala et al., 2001).



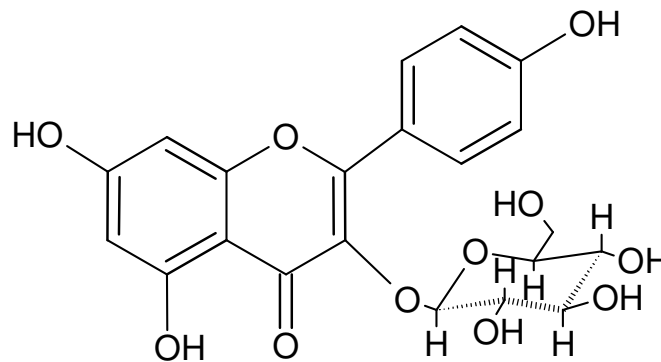
Flavon



Isoflavon

Die Qualität der antioxidativen Wirkung hängt dabei von der Anzahl der substituierten Hydroxygruppen an den aromatischen Ringen des Moleküls ab (Bors et al., 1990). Allerdings besitzen die Flavonoide auch eine prooxidative Wirkung, das heißt, sie sind in der Lage, über Redoxreaktionen die Menge an schädlichen Substanzen zu erhöhen und so Zellkompartimente zu schädigen (Sahu, Gray, 1996). Allerdings konnte diese Wirkung nur in Verbindung mit Metallionen (dann auch nur bei z. T. hoher

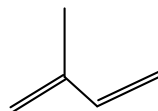
Konzentration) beobachtet werden (Hodnick W. F. et al., 1998). Außerdem sind die Flavonoide aufgrund ihrer Hydroxygruppen in der Lage, mit Metallionen einen Chelatkomplex zu bilden, was in der Regel mit einer Inaktivierung der antioxidativen Fähigkeiten einhergeht (Morel et al., 1998). Die Fähigkeit der Chelatbildung kann aber auch zum Nachweis der polyphenolen Substanzen genutzt werden, da die so gebildeten Komplexe eine grünliche Färbung annehmen. Die Flavonoide liegen in der Regel als Glykoside vor, das heißt an mindestens einer der Hydroxygruppen ist ein Mono-, Di-



Kaempferolglykosid (mit β -D-Glucose)

oder Polysaccharid substituiert, was einerseits die Wasserlöslichkeit erhöht andererseits die Möglichkeit bietet fest an Zellkompartimente gebunden zu werden. Zu den oben genannten Eigenschaften kommt einigen Isoflavonen noch eine Bedeutung als Phytoöstrogen zu, besonders zu benennen ist hier das Genistein, welches in der Sojabohne (*Glycine max*) vorkommt.

Vom Isopren als Grundbaustein leiten sich die **Terpenoide** ab. Sie bilden eine sehr heterogene Stoffgruppe, die abhängig von der Anzahl der Isopreneinheiten unterschiedliche Molekülgrößen haben können.



Isopren

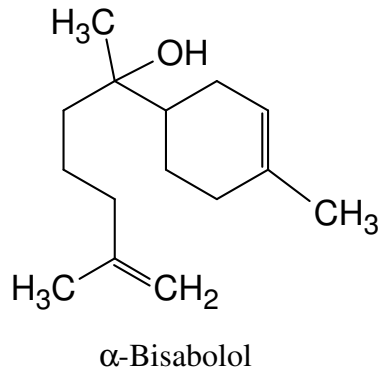
C-Atome	Isopreneinheiten	Bezeichnung
10	2	Monoterpen
15	3	Sesquiterpen
20	4	Diterpen
25	5	Sesterpen
30	6	Triterpen
40	8	Tetraterpen

Nomenklatur der Terpenoide

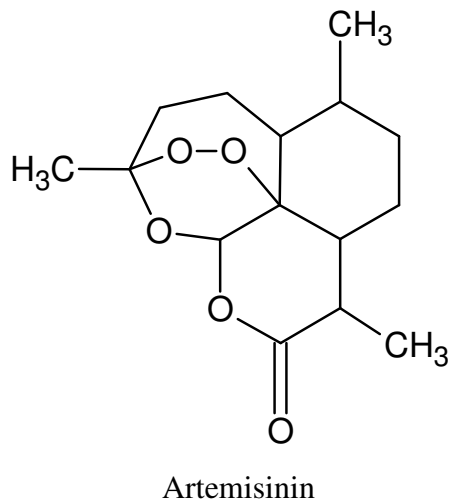
Die Terpenoide können als reine Kohlenwasserstoffe oder mit substituierten Alkohol-, Aldehyd- und Ketogruppen vorkommen. Es existieren offenkettige und zyklische Formen. Die Terpenoide erfüllen in der Pflanze

vielfältige Aufgaben, sie sind im Primärstoffwechsel am Aufbau der Membranen sowie der Photosynthesepigmente beteiligt und haben als Pflanzenhormone besondere regulatorische Bedeutung in der Pflanzenzelle. Im Sekundärstoffwechsel dienen sie als Fraßschutz und zeigen antibiotische und fungizide Wirkung. Als meist hydrophobe Substanzen kommen sie hauptsächlich im ätherischen Öl der Pflanzen vor. Terpene finden vor allem als Aroma- und Duftstoffe in der Küche und der Kosmetikherstellung Verwendung. Aus der Wermutpflanze ist das Monoterpen Thujon bekannt, welches in höheren Dosen nervenschädigend wirkt und dem die schädliche Wirkung des Absinths zugeschrieben wurde. Aber auch in medizinischer Hinsicht ist diese Stoffgruppe interessant: zum Beispiel die Monoterpene Menthol und 1,8-Cineol, welche bei Atemwegserkrankungen eingesetzt werden.

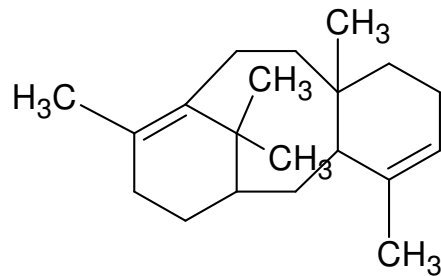
Die größte Gruppe der aus dem Isopren hervorgehenden Substanzen bilden die Sesquiterpene, von denen einige als Aromastoffe andere als natürliche Pestizide genutzt werden. Die Sesquiterpene bilden in Form und Substituenten eine sehr heterogene Gruppe. In der Pflanzenwelt weit verbreitet sind die α -Bisabolenderivate. Das α -Bisabolol beispielsweise kommt im Öl der Kamille vor und ist für die antiphlogistische Wirkung verantwortlich.



Eine nahezu eigenständige Gruppe unter den Sesquiterpenen bilden die Sesquiterpenlactone. Diese in der *Asteracea*-Familie weit verbreiteten Verbindungen bestehen aus einem Sesquiterpengrundgerüst, an dem zusätzlich ein Lactonring substituiert ist. Viele Derivate aus dieser Stoffgruppe sind sehr toxisch, zum Beispiel das Tutin aus *Cariaria sarmentosa*. Darüber hinaus zeigen Sesquiterpenlactone Antitumor-Wirkung, wie zum Beispiel das Vernoleptin aus *Veronica hymenolepis*, analeptische Wirkung, wie das Picrotoxin aus *Anamirta cocculus*. Das in den letzten Jahren vielleicht best erforschte Sesquiterpenlacton Artemisinin aus *Artemisia annua* weist Antimalaria-Wirkung auf.

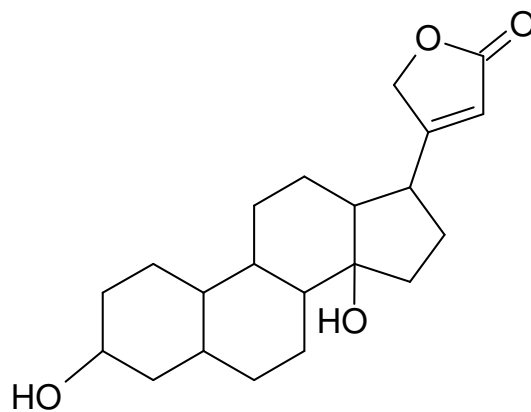


Unter den Diterpenen sind die Taxane, die als Grundbaustein das Taxadien beinhalten, als Cytostatika von Bedeutung, vor allem das aus *Taxus brevifolia* isolierte Taxan Paclitaxel, welches unter dem Namen Taxol[®] als Chemotherapeutikum eingesetzt wird.



Taxadien

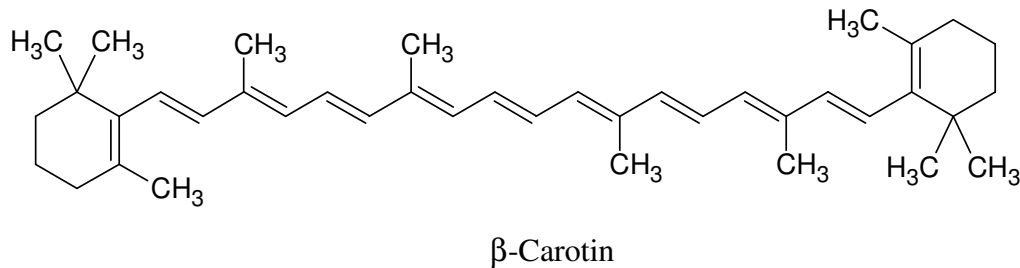
Die Triterpene umfassen mehrere Substanzklassen, wie die D-Vitamine und Pflanzensteroid, zu denen auch das Digitoxigenin, das Aglykon des in *Digitalis purpurea* vorkommenden Herzglykosids Digitoxin gehört.



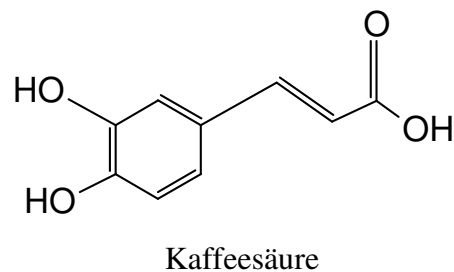
Digitoxigenin

Die Carotinoide zählen zu den Tetraterpenen und sind in der Regel sehr hydrophob, mit Ausnahme der mit Hydroxy- und Epoxygruppen substituierten Derivate (z. B.

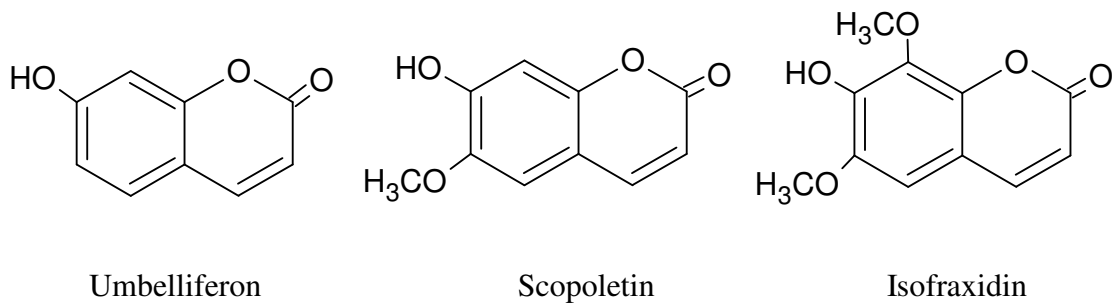
Xanthophylle). Als bekanntester Vertreter der Carotinoide ist das β -Carotin zu erwähnen. In der Pflanze dient es vor allem als Antioxidans und als Schutzpigment in den Chloroplasten, wo es auch Grundgerüst für diverse Carotinoide ist. Für den Menschen hat das β -Carotin eine wichtige Bedeutung als Antioxidans und ist essentiell als Vorstufe zum Vitamin A. Als weiteres bekanntes Carotinoid ist Lycopin zu nennen, dessen anticancerogene Wirkung (in Bezug auf Prostatakrebs) aber in neueren Studien nicht belegt werden konnte (Giovannucci et al., 2002; Peters et al., 2007).



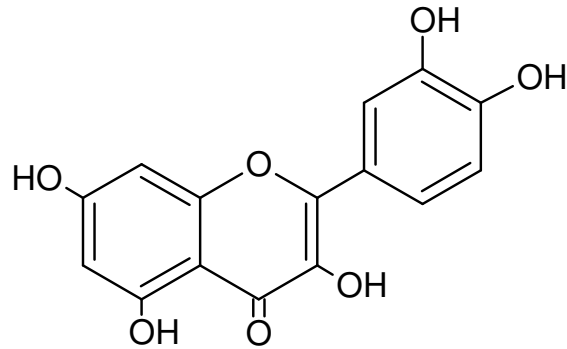
Die Eberraute besitzt eine ganze Reihe der oben erwähnten Substanzklassen. Es finden sich Alkaloide, wie das Abrotanin, Phenolsäuren, wie die im Pflanzenreich weit verbreitete Kaffeesäure, Cumarinderivate (Isofraxidin, Scopoletin, Umbelliferon),



Lignane (Sesamin), Flavonoide, wie das Quercitin, das in seiner glykosilierten Form Rutin genannt wird, Terpene (Davanon) und Sesquiterpenlactone (Absinthin) (Bergendorff et al., 1995; Tan et al., 1999; Vostrowsky et al., 1984; Tang et al., 2000).



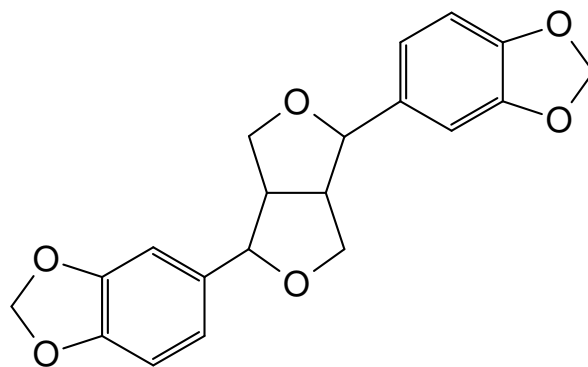
Aufgrund der Produktion dieser unterschiedlichen Inhaltsstoffe weist die Eberraute eine Fülle (natur-)heilkundlicher Eigenschaften auf, weshalb sie seit dem frühen Mittelalter vornehmlich in Bauern- und Klostergärten angepflanzt wurde. In der Neuzeit geriet die Pflanze dann zunehmend in Vergessenheit. Überliefert sind u. a. spasmolytische, antiinflammatorische, vermifuge und choleretische Effekte. In modernen Untersuchungen konnten viele dieser überlieferten Wirkweisen bestätigt werden und es wurden noch weitere aufgeklärt. So sind die choleretischen Effekte bei der Eberraute vor allen Dingen auf die Cumarinderivate Isofraxidin, Scopoletin und Umbelliferon zurückzuführen (Nieschulz and Schmersahl, 1968). Das Isofraxidin konnte zudem eine Antimalaria-Wirkung aufzeigen (Tan et al. 1998; Cubukcu et al., 1990). Verschiedenen Flavonoiden konnte in Untersuchungen eine antiinflammatorische Wirkung zugeordnet werden (Moscatelli et al., 2006). In Tierversuchen konnte das Quercetinglykosid Rutin wirkungsvoll Leberschäden durch Hepatotoxine reduzieren (Janbaz et al., 2002). Andere Untersuchungen legen eine antivirale Wirkung dieses Flavonoids nahe. Aus methanolischen Extrakten konnte man des weiteren Flavonoide mit spasmolytischer Wirkung isolieren (Bergendorff and Sterner, 1995).



Quercetin

Zudem gibt es Hinweise auf immunstimulierende und antiallergene Wirkungen (Remberg et al., 2004). Die immunmodulierenden Eigenschaften dieser Pflanze wurden bereits in Beobachtungsstudien belegt (Randerath et al., 1997). Durch einen hohen Anteil polyphenolischer Verbindungen wird die Neutralisierung radikalischer Substanzen begünstigt, was der Alterung und der malignen Veränderung von Zellen entgegenwirkt (Kähkönen et al., 1999).

In vielen *Artemisia* Arten wurden Lignane des Sesamin-Typs gefunden. Das Sesamin selber zeigte im Tierversuch eine Stimulierung der Lipidoxidation. Außerdem scheinen Derivate des Sesamins eine blutdrucksenkende Wirkung zu besitzen (Nakano et al., 2006).

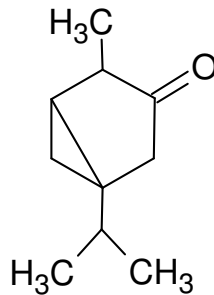


Sesamin

Allen *Artemisia* Arten gemein ist der Gehalt an verschiedenen Terpenoidspezies. Die Eberraute enthält mehrere bekannte sowie diverse noch nicht näher spezifizierte

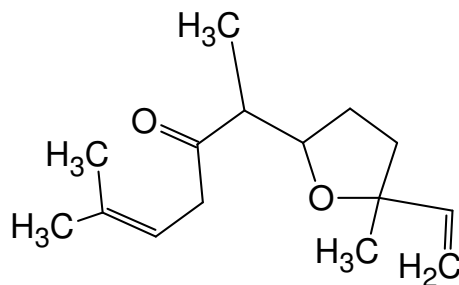
Terpene, viele davon sind flüchtige Substanzen im ätherischen Öl der Pflanze. Neuere Studien legen eine anticonvulsive Wirkung des ätherischen Öls der Eberraute nahe. Es wird vermutet, dass diese Wirkung auf terpenoide Inhaltsstoffe zurückzuführen ist (Dhanabal et al., 2007).

Das Monoterpen Thujon, welches als Nervengift bekannt ist, kommt in vielen *Artemisia* Arten vor, in der Eberraute ist es nur in geringem Masse zu finden (Mucciarelli et al. 1995).



Thujon

Das Davanon, ein Sesquiterpen, weist antimikrobielle Wirkungen auf. Derivate dieser Verbindung konnten fungizide Wirkung zeigen (Brodin et al., 2007).



Davanon

Neben den einfachen Terpenoiden existieren in der Eberraute Ester- und Etherverbindungen mit anderen Substanzen, außerdem sind Alkohol- und Säuregruppen assoziiert (α -Bisabolol, ein Sesquiterpenalkohol). Viele weitere Angehörige der Terpenklasse sind Gegenstand von Untersuchungen, weil auch hier pharmakologisch nutzbare Wirkungen vermutet werden oder bereits entdeckt sind. Die Verfahren zur

Extraktion und Isolation der einzelnen Inhaltsstoffe sind vielfältig und mitunter sehr kompliziert.

Verwendung für die Eberraute finden in der Regel wässrige Auszüge und Tees aus dem getrocknetem Kraut und den Blättern der Pflanze. Die Bandbreite an sekundären Inhaltsstoffen in diesen, auf Wasser als polares Lösemittel basierenden Extrakten, ist beschränkt. Wie bei einer Wasserdampfdestillation werden sich einige, auch unpolare Substanzen aus dem ätherischen Öl der Pflanze lösen. Des Weiteren werden Sekundärmetabolite zu finden sein, die aufgrund von polaren Elementen, wie Amino-, Hydroxy- oder Carboxygruppen in Wasser löslich sind oder durch substituierte Seitenketten polaren Charakter bekommen, beispielsweise durch eine glykosidische Bindung.

In dieser Arbeit sollen die wirksamen Bestandteile des Tees aus Eberrautenblättern in Hinsicht auf Zusammensetzung, Art und Wirkweise der Inhaltsstoffe charakterisiert werden.

Experimentelle Untersuchungen zu immunologischen, cytotoxischen und antioxidativen Basismechanismen von *Herba abrotanum* Extrakt sollen Auskunft über die Wirkweisen der Komponenten geben.

Ziele der Untersuchung sind:

- Testung von Gesamtextrakt auf antioxidative, immunmodulatorische und cytotoxische Aktivitäten.
- Auftrennung des Gesamtextraktes in unterschiedlich wirksame Grundfraktionen
- Testung der Grundfraktionen auf antioxidative, immunmodulatorische und cytotoxische Aktivitäten.

2. Material und Methoden

2.1. Herstellung eines Lyophilisats aus dem Pflanzenmaterial

2.1.1. Material

Grundlage sind getrocknete Blattspitzen der Eberraute (*Artemisia abrotanum*).

Das Material stammt ausschließlich aus biologisch kontrolliertem Anbau.

Bezogen wird das Material von der Firma

RNP Pharm GmbH

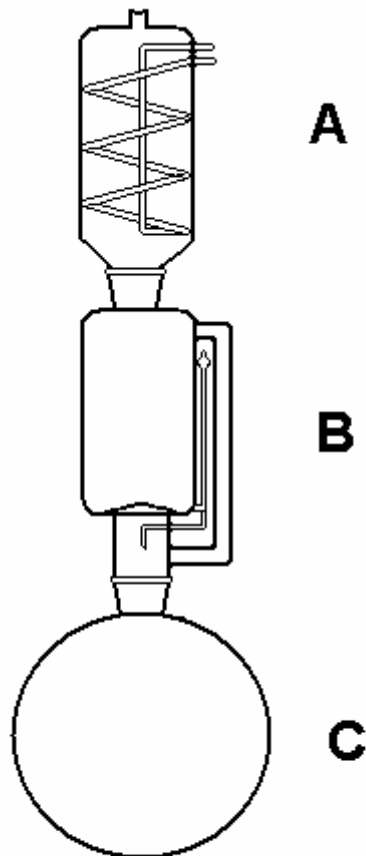
Rodenbacher Chaussee 6

63457 Hanau-Wolfgang

2.1.2. Extraktion

Die Extraktion findet mittels einer 250mL Soxhlet-Apparatur (Lenz) statt. Als Filtermaterial dienen Extraktionshülsen mit einem Volumen von 250mL (Sorte 603, DIN 12449) der Firma Schleicher & Schüll. Das in die Extraktionshülsen gefüllte Pflanzenmaterial wird mit Zellulosewatte abgeschlossen.

35g Pflanzenmaterial werden zunächst im Mörser zerrieben, um den Aufschluss der Inhaltsstoffe zu erleichtern und, da mehr Material eingesetzt werden kann, die Ausbeute zu erhöhen. Anschließend wird mit 750mL H₂O (Ultra pure water, Biochrom AG) in einem 1000mL Rundkolben über einem Heizpilz (Tyco Thermalcontrol Isopad G2) für ca. 10h extrahiert. Gekühlt wird mit Leitungswasser.



Darstellung einer Soxhlet-Apparatur mit:
A : Kühler, B : Extraktor, C : Auffangkolben

2.1.3. Herstellung des Lyophilisats

Der aus 2.1.2 resultierende Extrakt wird in ein 1000mL Becherglas überführt, mit einer luftdurchlässigen Schicht abgedeckt und stufenweise auf 4°C, -20°C und schließlich auf -80°C abgekühlt.

Der gefrorene Extrakt wird in einen Lyophilisator (Lyovac GT2, Steris) mit einem Trockenraum von 40L überführt und unter Vakuum bei 60°C bis zur vollständigen Trockenheit sublimiert (ca. 75h). Das nötige Vakuum wird mit einer Drehschieber-Vakuumpumpe (Trivac D10E, Leybold) hergestellt.

Anschließend wird das Lyophilisat (im Weiteren als Crude bezeichnet) in 50 mL Polypropylen-Röhrchen mit Schraubdeckel überführt und bei Raumtemperatur (21°C) dunkel gelagert.

Aus 35g Blattmaterial resultieren ca. 11g Lyophilisat.

2.2. Säulenchromatografische Analyse

Um eine spätere Standardisierung zu ermöglichen, müssen die Inhaltsstoffe näher analysiert werden. Dazu wird zunächst eine Säulenchromatografie durchgeführt. 0,4g Lyophilisat werden in 0,3ml H₂O (Ultra pure water, Biochrom AG) resuspendiert und 0,3mL dieser Lösung mit einer 1,0ml Kanüle auf die mit Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences) beladene Säule (XK 26/70, Amersham Biosciences) aufgetragen. Als Elutionsmittel dient H₂O (Ultra pure water, Biochrom AG). Die lineare Flussrate beträgt 4,8cm/h. Das Elutionsmittel wird mit einer Peristaltikpumpe (P-1, Amersham Biosciences) befördert. Zum Auffangen der Fraktionen wird ein Fraktionssammler (Frac 920, Amersham Biosciences) verwendet, die Fraktionsgröße beträgt 6mL. Um die Linearität der Säulenläufe zu gewährleisten, wird die Säulenchromatographie bei 4°C in einem Kühlschrank (Helkama Forste C8G) durchgeführt.

Die Fraktionen werden photometrisch bei 220nm in einem UV/Vis Spektralphotometer (UVmini 1240, Shimadzu) identifiziert. Nach Spektrogramm werden die relevanten Fraktionen in 50mL Erlenmeyerkolben vereinigt, luftdurchlässig abgedeckt und nach 2.1.3 lyophilisiert. Nach der Gefriertrocknung wird das Lyophilisat in geeignete Gefäße überführt und bei Raumtemperatur (21°C) dunkel gelagert.

2.3. Fraktionierung in Abhängigkeit unterschiedlich polarer Eigenschaften der Inhaltsstoffe

2.3.1. Extraktion des Crude-Extraktes

11g des Lyophilisats werden in eine leere Chromatografiesäule (Ø 20mm, Länge 300mm) gegeben und anschließend mit 10L Methanol (Polarität 0,95 in der elutropen Reihe nach Trappe) ausgewaschen. Das Methanol wird über eine Peristaltikpumpe (P-1, Amersham Biosciences) mit einer Flussrate von 120mL/h auf die Säule gegeben. Die in der Säule verbliebenen Bestandteile, welche in Methanol unlöslich sind, werden in ein 100mL Becherglas überführt und in einem Trockenschrank (ST6030, Heraeus) bei 60°C getrocknet. Das trockene, im Weiteren als Hyd (hydrophil) bezeichnete Material, wird in ein geeignetes, fest verschließbares Gefäß überführt und bei Raumtemperatur (21°C) lichtgeschützt gelagert.

Der methanolische Extrakt wird anschließend in einem Rotationsverdampfer bei 50°C unter Vakuum eingetrocknet. Der verbleibende Substanzfilm wird in 40mL H₂O (Ultra pure water, Biochrom AG) resuspendiert, in ein 100mL Becherglas überführt, luftdurchlässig abgedeckt und stufenweise auf 4°C, -20°C und -80°C heruntergekühlt. Anschließend wird die Lösung nach 2.1.3 lyophilisiert und das Produkt bis zur weiteren Verwendung entsprechend gelagert.

2.3.2. Extraktion des aus 2.3.1 resultierenden Lyophilisats

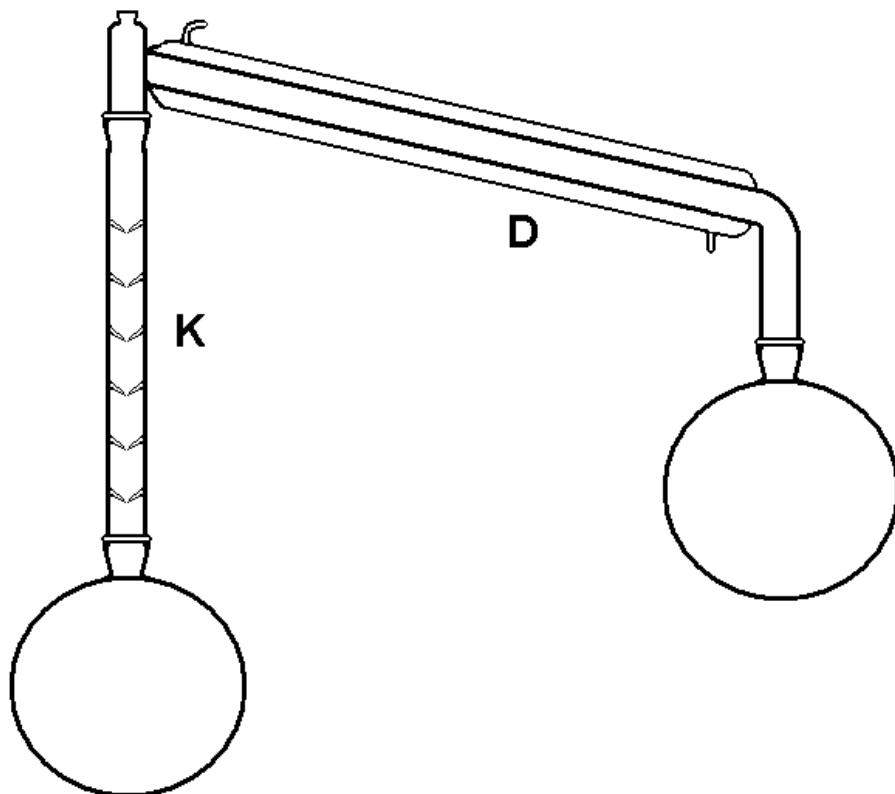
50mL des aus 2.3.1 resultierenden Lyophilisats werden in eine leere Chromatografiesäule (Ø 20mm, Länge 300mm) gegeben und anschließend mit 10L Ethanol (Polarität 0,88 in der elutropen Reihe nach Trappe) ausgewaschen. Das Ethanol wird über eine Peristaltikpumpe (P-1, Amersham Biosciences) mit einer Flussrate von 120mL/h durch die Säule geführt.

Die in Ethanol unlöslichen Bestandteile werden in ein 100mL Becherglas überführt und in einem Trockenschrank (ST6030, Heraeus) bei 80°C getrocknet. Das trockene, im Weiteren als xM (ex Methanol) bezeichnete Material wird in ein geeignetes, fest verschließbares Gefäß überführt und bei Raumtemperatur (21°C) lichtgeschützt gelagert. Der ethanolische Extrakt wird anschließend in einem Rotationsverdampfer bei 50°C unter Vakuum eingetrocknet. Der verbleibende Substanzfilm wird in 40mL H₂O

(Ultra pure water, Biochrom AG) resuspendiert, in ein 100mL Becherglas überführt, luftdurchlässig abgedeckt und stufenweise auf 4°C, -20°C und -80°C heruntergekühlt. Anschließend wird die Lösung nach 2.1.3 lyophilisiert. Das Produkt, im Weiteren als xE (ex Ethanol) bezeichnet, wird in ein geeignetes, fest verschließbares Gefäß überführt und bei 21°C lichtgeschützt gelagert.

2.3.3. Redestillation des Lösemittels

Die aus der Extraktion rückgewonnenen Lösemittel (Methanol, Ethanol) werden zur Wiederverwertung über eine Destillation aufgewertet. Um die Qualität der Lösemittel zu sichern, wird die Destillation rektifikativ, das heißt unter Rückfluss über eine Vigreuxkolonne (Lenz) vollzogen.



Darstellung einer Destillationsapparatur mit K:Kolonne, D: Destillierbrücke

2.4. Chromatografische Analysen von xM, xE und HYD

2.4.1. Säulenchromatografische Analysen

Zur weiteren Analyse wird eine Säulenchromatografie durchgeführt. 0,3g des Materials werden in 0,2mL H₂O (Ultra pure water, Biochrom AG) resuspendiert und 0,2mL dieser Lösung mit einer 1,0mL Kanüle auf die mit Sephadex LH-20 (Amersham Biosciences) beladene Säule (XK 26/70, Amersham Biosciences) aufgetragen. Als Elutionsmittel dient H₂O (Ultra pure water, Biochrom AG). Die lineare Flussrate beträgt 2,0cm/h. Das Elutionsmittel wird mit einer Peristaltikpumpe (P-1, Amersham Biosciences) befördert. Zum Auffangen der Fraktionen wird ein Fraktionssammler (Frac 920, Amersham Biosciences) verwendet, die Fraktionsgröße beträgt 3mL. Um die Linearität der Säulenläufe zu gewährleisten, wird die Säulenchromatographie bei 4°C in einem Kühltank (Helkama Forste C8G) durchgeführt.

Die aus der Säulenchromatografie resultierenden Fraktionen werden photometrisch bei 220nm in einem UV/Vis Spektralphotometer (UVmini 1240, Shimadzu) identifiziert. Nach Spektrogramm werden die relevanten Fraktionen in 50mL Erlenmeyerkolben vereinigt, luftdurchlässig abgedeckt und nach 2.1.3 lyophilisiert. Nach der Gefriertrocknung wird das Lyophilisat in geeignete Gefäße überführt und bei Raumtemperatur (21°C) dunkel gelagert.

2.5. Wirkungsbezogene Analysen

2.5.1. Test auf cytotoxische Wirkung

Um die cytotoxischen Eigenschaften von Agenzien zu testen, werden Zellen der Standardzelllinie L929 (Fibroblasten aus der Maus) verwendet.

Die Kultivierung der Zellen erfolgt in 75cm²-Zellkulturflaschen (Sarstedt) im Brutschrank (FDH Cell-Cult CO₂-Inkubator Mod. 311, Thermo Forma) bei 37°C, 95% rLF und 5% CO₂. Als Zellkulturmedium wird Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) von Sigma verwendet. Zusätzlich wird dem Medium 10% fötales

Rinderserum (Gibco), 2µmol/mL L-Glutamin (Biochrom), 100U/mL Penicillin (Biochrom) und 100µg/mL Streptomycin (Biochrom) zugesetzt.

Die Messung findet mit 2 Tage alten Zellen statt. Die Flaschen mit den Zellmonolayern werden 3x gründlich mit PBS-Puffer (Sigma) gewaschen, da das α- Globulin im Medium das Trypsin inhibiert.

Zum Lösen der Zellen werden in jede Flasche 5mL einer Trypsin(0,05%)-/EDTA(0,02%)-Lösung gegeben. Nach einer Inkubationszeit von ca. 3-5 min (bis sich die Zellen gelöst haben) bei 37°C wird das Trypsin mit 5mL DMEM inhibiert. Die Zellsuspension wird in 50mL Schraubröhren überführt und 10min mit 300xg zentrifugiert. Nach der Bestimmung der Zellzahl in einer Neubauerkammer wird die Suspension auf 2×10^5 Zellen/mL eingestellt. Die Suspension wird zu je 100µL/Well auf eine 96Well-Mikrotiterplatte (Sarstedt) gegeben und 24h bei 37°C, 95% rLF und 5% CO₂ inkubiert, damit sich ein Monolayer bilden kann.

Die zu testenden Substanzen werden mit einer DMEM-/Actinomycin-Lösung (2µg/mL) auf die gewünschten Konzentrationen verdünnt.

Das überstehende Medium wird aus den Platten dekantiert. Anschließend werden die Monolayer mit 100µL der entsprechenden Testsubstanz-Lösung überschichtet und weitere 24h bei 37°C, 95% rLF und 5% CO₂ inkubiert.

Für die colorimetrische Erfassung lebendiger Zellen wird der WST-1 Assay von Roche verwendet.

Nach Zugabe von 10µL des WST-1 Reagenz wird erneut für 2h inkubiert. Die Analyse findet in einem Platerreader bei einer Wellenlänge von 450nm und einer Referenzwellenlänge von 690nm statt.

Als Kontrolle wird TNF-α in den Konzentrationen (0,001 / 0,005 / 0,01 / 0,05 / 0,1 / 0,5)ng/mL verwendet.

2.5.2. Stimulation von Makrophagen

Grundlage sind fluorimetrische Messmethoden.

Die Versuche werden an Zellen der Zelllinie RAW 264.7 (Makrophagen aus der Maus) durchgeführt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgt in 75cm²-Zellkulturflaschen (Sarstedt) im Brutschrank (FDH Cell-Cult CO₂-Inkubator Mod. 311, Thermo Forma) bei 37°C,

95% rLF und 5% CO₂. Als Zellkulturmedium wird Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) von Sigma verwendet. Zusätzlich wird dem Medium 10% fötales Rinderserum (Gibco), 2µmol/mL L-Glutamin (Biochrom), 100U/mL Penicillin (Biochrom) und 100µg/mL Streptomycin (Biochrom) zugesetzt.

Die Messung findet mit 2 Tage alten Zellen statt. Dazu wird eine entsprechende Anzahl Zellkulturen (die Menge richtet sich nach der Anzahl der Versuchsansätze) zunächst mit HANK's-Lösung (Sigma) gewaschen, dann in NaHCO₃ gepuffertem (1,5%) Minimum Essential Medium mit Earl's Salzen (MEM-Earl o. Phenolrot von Biochrom) suspendiert. Die Suspension wird in 50mL Schraubröhrchen überführt und 10min bei 300xg zentrifugiert (Multifuge 1 L-R, Heraeus). Der Überstand wird verworfen und das Pellet in MEM-Earl resuspendiert. Die Menge richtet sich nach der Anzahl der Inkubationsansätze, wobei man 1mL MEM-Earl pro Ansatz rechnet. Anschließend wird in einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt.

Die Zellsuspension wird nun entsprechend der Inkubationsansätze in 5mL Rundbodenröhrchen mit Belüftungskappen (BD Falcon, BD Biosciences) aufgeteilt und mit jeweils 100µL der zu analysierenden Substanz-Lösungen bei 37°C, 95% rLF und 5% CO₂ in einem Brutschrank (FDH Cell-Cult CO₂-Inkubator Mod. 311, Thermo Forma) für 1 Stunde inkubiert.

Nach der Inkubation werden die Ansätze 5min bei 300xg zentrifugiert (Multifuge 1 L-R, Heraeus). Der Überstand wird verworfen. War die Zellzahl in den Inkubationsansätzen kleiner als 4×10^6 Zellen pro mL, werden die Pellets in 0,5mL MEM-Earl resuspendiert, war die Zellzahl größer als 4×10^6 Zellen pro mL wird 1mL MEM-Earl zugegeben.

Als Substrat für die Zellen dient Zymosan A aus *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma). Das Zymosan A wird zunächst mit Serum aus Mäuseblut (Charles River); (1:6 mit Hank's-Lösung verdünnt) opsonisiert. Dazu wird 2mg Zymosan A in 1mL verdünntem Serum gelöst und 30min bei 37°C im Brutschrank (FDH Cell-Cult CO₂-Inkubator Mod. 311, Thermo Forma) inkubiert. Anschließend wird das Serum vom Zymosan A durch Zentrifugation bei 300xg getrennt (Multifuge 1 L-R, Heraeus). Der Überstand mit dem Serum wird verworfen, das Zymosan-Pellet in 2mL MEM-Earl resuspendiert.

3mg Bis-N-Methylacridiniumnitrat (Luzigenin); (Sigma) wird in 25mL Hank's-Lösung gelöst und im Wasserbad (Thermomix, Braun) auf 37°C temperiert. Die Lösung muss vor Licht geschützt werden!

Für die Messung werden 250µL Zellsuspension und 450µL Luzigeninlösung in Rundküvetten (Sarstedt) pipettiert und in einem Luminometer (Luminoskan1251, Labsystems) gegeben. Gestartet wird die Reaktion, mit 50µL der Zymosan A-Lösung. Als Positivkontrolle dient ein Messansatz mit unbehandelten Zellen und Zymosan, als Negativkontrolle ein Messansatz mit unbehandelten Zellen und ohne Zymosan. Der Verlauf der Lumineszenz wird 50 Minuten lang aufgezeichnet.

2.5.3. Stimulation von Monozyten

Grundlage sind fluorimetrische Messmethoden.

Die Versuche werden an Zellen der Zelllinie MAC 6 (humane Monozyten) durchgeführt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgt in 75cm²-Zellkulturflaschen (Sarstedt) im Brutschrank (FDH Cell-Cult CO₂-Inkubator Mod. 311, Thermo Forma) bei 37°C, 95% rLF und 5% CO₂. Als Zellkulturmedium wird mit HEPES modifiziertes RPMI-1640 Medium (Sigma) verwendet. Zusätzlich wird dem Medium 10% fötales Rinderserum (Gibco), 2µmol/mL L-Glutamin (Biochrom), 100U/mL Penicillin (Biochrom) und 100µg/mL Streptomycin (Biochrom) zugesetzt.

Die Messung findet mit 2 Tage alten Zellen statt. Dazu wird eine entsprechende Anzahl Zellkulturen (die Menge richtet nach der Anzahl der Versuchsansätze) in 50mL Schraubröhren überführt und 10 min bei 300xg zentrifugiert (Multifuge 1 L-R, Heraeus). Der Überstand wird verworfen und das Zellpellet in MEM-Earl resuspendiert. Die Menge richtet sich nach der Anzahl der Inkubationsansätze, wobei man 1mL MEM-Earl pro Ansatz rechnet. Anschließend wird in einer Neubauer Zählkammer die Zellzahl bestimmt.

Die Zellsuspension wird nun entsprechend der Inkubationsansätze in 5mL Rundbodenröhrchen mit Belüftungskappen (BD Falcon, BD Biosciences) aufgeteilt und mit jeweils 100µL der zu analysierenden Substanz-Lösungen bei 37°C, 95% rLF und 5% CO₂ in einem Brutschrank (FDH Cell-Cult CO₂-Inkubator Mod. 311, Thermo Forma) für 1 Stunde inkubiert.

Nach der Inkubation werden die Ansätze 5min bei 300xg zentrifugiert (Multifuge 1 L-R, Heraeus). Der Überstand wird verworfen. War die Zellzahl in den Inkubationsansätzen kleiner als 4×10^6 Zellen pro mL, werden die Pellets in 0,5mL MEM-Earl resuspendiert, war die Zellzahl größer als 4×10^6 Zellen pro mL wird 1mL MEM-Earl zugegeben.

Als Substrat für die Zellen dient Zymosan A aus *Saccharomyces cerevisiae* (Sigma). Das Zymosan A wird zunächst mit Serum aus Mäuseblut (Charles River); (1:6 mit Hank's-Lösung verdünnt) opsonisiert. Dazu wird 2mg Zymosan A in 1mL verdünntem Serum gelöst und 30min bei 37°C im Brutschrank (FDH Cell-Cult CO₂-Inkubator Mod. 311, Thermo Forma) inkubiert. Anschließend wird das Serum vom Zymosan A durch Zentrifugation bei 300xg getrennt (Multifuge 1 L-R, Heraeus). Der Überstand mit dem Serum wird verworfen, das Zymosan-Pellet in 2mL MEM-Earl resuspendiert. 3mg Bis-N-Methylacridiniumnitrat (Luzigenin); (Sigma) wird in 25mL Hank's-Lösung gelöst und im Wasserbad (Thermomix, Braun) auf 37°C temperiert. Die Lösung muss vor Licht geschützt werden!

Für die Messung werden 250µL Zellsuspension und 450µL Luzigeninlösung in Rundküvetten (Sarstedt) pipettiert und in einem Luminometer (Luminoskan1251, Labsystems) gegeben. Gestartet wird die Reaktion, mit 50µL der Zymosan A-Lösung. Als Positivkontrolle dient ein Messansatz mit unbehandelten Zellen und Zymosan, als Negativkontrolle ein Messansatz mit unbehandelten Zellen und ohne Zymosan. Der Verlauf der Lumineszenz wird 50 Minuten lang aufgezeichnet.

2.5.4. Test auf antioxidative Wirkung mit dem TEAC-Assay (*Trolox Equivalent*

Antioxidant Capacity Assay)

Grundlage ist die Eigenschaft von 2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonsäure)Diazoniumsalz (ABTS) farbige, stabile freie Radikale zu bilden, die sich bei Löschung entfärben. Dies wird zu einer photometrischen Bestimmbarkeit von ABTS-Radikalen genutzt.

Gemessen wird eine von der Konzentration des Radikals abhängige Extinktionsabnahme.

Vor der eigentlichen Reaktion muss das ABTS-Radikal generiert werden. Dazu wird eine 2,0mM ABTS-Lösung mit einer 0,6mM Peroxidsulfatlösung über Nacht inkubiert. Für den Gebrauch wird anschließend eine Verdünnung mit einer Extinktion von etwa 1,0 – 1,2 hergestellt.

Die Reaktionsansätze mit je 6 Parallelproben werden auf 96Well-Mikrotiterplatten (Sarstedt) pipettiert, wobei 20µL Probenlösung vorgelegt werden. Der Reaktionsstart erfolgt durch die Zugabe von 200µL ABTS-Radikal-Lösung.

Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C wird die Extinktion mit einem Platerader

(Multiskan RC, Labsystems) bei einer Wellenlänge von 405nm ermittelt.

Parallel zu den aus der Eberraute extrahierten Proben werden Messungen mit einer antioxidativ wirkenden Kontrollsubstanz durchgeführt. Als Kontrolle dient das α -Tocopherolderivat Trolox[®].

Auch hier werden jeweils 6 Parallelproben gemessen. Die Messungen finden wie oben beschrieben auf Mikrotiterplatten statt.

Die Konzentrationen der Trolox[®]-Lösungen betragen (1 / 10 / 50 / 100 / 150 / 200 / 250)mM.

Die antioxidative Aktivität wird in % angegeben und errechnet sich wie folgt:

$$AA = 100 - (((E_{\text{sample}} - E_{\text{blank}}) \times 100) / E_{\text{control}})$$

E_{sample} : Extinktion der Probe

E_{blank} : Extinktion des Ansatzes ohne ABTS (ABTS durch gleiche Menge H₂O zu ersetzen)

E_{control} : Extinktion des Reaktionsansatzes ohne zu testender Substanz (Probenlösung durch gleiche Menge H₂O zu ersetzen)

2.5.5. Test auf antioxidative Wirkung mit dem DPPH-Assay

Ähnlich dem TEAC-Assay wird hier photometrisch die Löschung eines Radikals (1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH)) anhand von Farbveränderungen beobachtet.

Zunächst wird eine entsprechend große Menge einer 0,3mM DPPH/Ethanol-Lösung hergestellt. Die Lösung muss kühl und dunkel gelagert werden.

Der Reaktionsansatz setzt sich aus 60µL DPPH-Lösung und 150µL Probenlösung zusammen. Die Probenlösung wird in jeweils 6 Parallelproben auf Mikrotiterplatten (Tissue Culture Plate, Sarstedt) vorgelegt. Gestartet wird die Reaktion mit der Zugabe der DPPH-Lösung.

Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 21°C wird die Extinktion bei einer Wellenlänge von 515nm in einem Platereader (Multiskan RC, Labsystems) erfasst. Parallel zu den aus der Eberraute extrahierten Proben werden Messungen mit einer antioxidativ wirkenden Kontrollsubstanz durchgeführt. Als Kontrolle dient das α-Tocopherolderivat Trolox®.

Auch hier werden jeweils 6 Parallelproben gemessen. Die Messungen finden wie oben beschrieben auf Mikrotiterplatten statt.

Die Konzentrationen der Trolox®-Lösungen betragen (1 / 10 / 50 / 100 / 150 / 200 / 250)mM.

Die antioxidative Aktivität wird in % angegeben und errechnet sich wie folgt:

$$AA = 100 - (((E_{\text{sample}} - E_{\text{blank}}) \times 100) / E_{\text{control}})$$

E_{sample} : Extinktion der Probe

E_{blank} : Extinktion des Ansatzes ohne DPPH (DPPH durch gleiche Menge Ethanol zu ersetzen)

E_{control} : Extinktion des Reaktionsansatzes ohne zu testender Substanz (Probenlösung durch gleiche Menge Ethanol zu ersetzen)

Verhältnis des Molekulargewichtes von Trolox® (250,3g/Mol) zur Masse.

µmol	g
250	0,062575
200	0,05006
150	0,037545
100	0,02503
50	0,012515
10	0,002503
1	0,00025

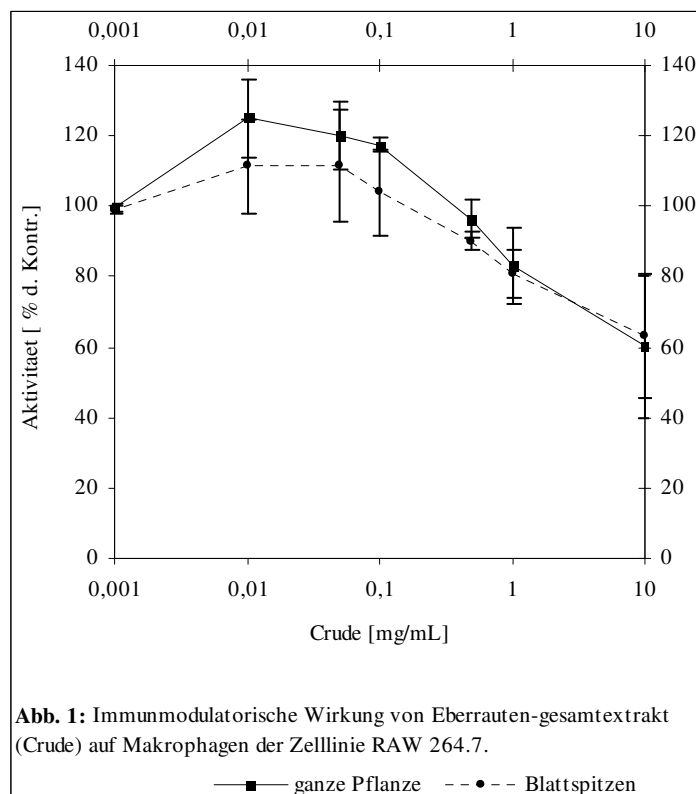
3. Ergebnisse

3.1. Untersuchungen des Gesamtextraktes

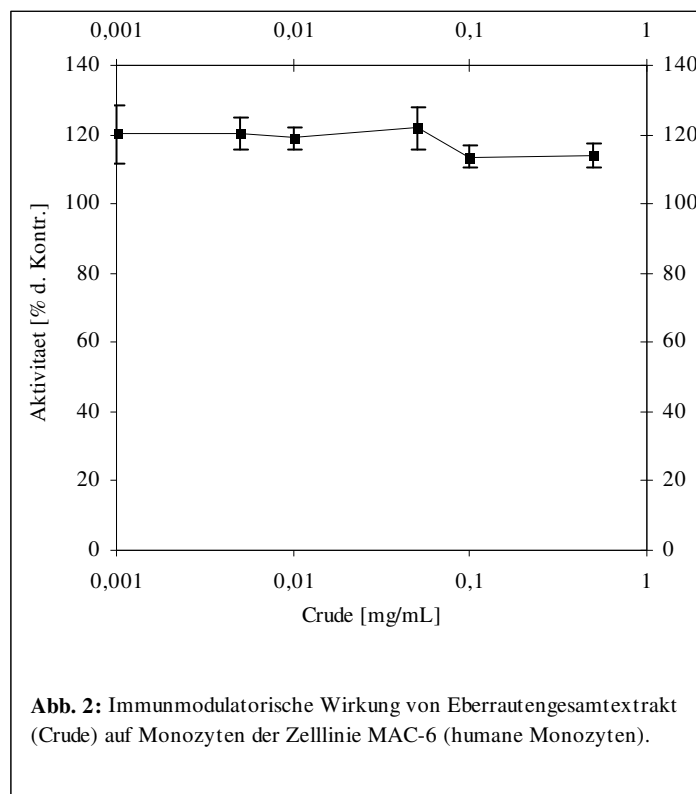
Aus 35g in der Soxhletapparatur eingesetzten Blattmaterials resultieren nach der Extraktion und der Trocknung ca. 11,5g Lyophilisat.

3.1.1. Immunologische Untersuchung des Gesamtextraktes

Die immunologische Untersuchung des Lyophilisats aus Gesamtextrakt (Crude) ergab eine um bis zu 20 Prozent erhöhte Aktivität der Makrophagen. Dabei markiert der Bereich zwischen 0,01mg/mL und 0,05mg/mL ein Optimum. Erhöht man die Konzentration des Lyophilisats weiter, kommt es zu einem Rückgang der Makrophagenaktivität, wobei es weitgehend unerheblich ist, ob Teile der gesamten Pflanze wie Blätter und Stiele oder nur Blattspitzen genutzt wurden (s. Abb. 1). Bei Konzentrationen die 0,2mg/mL bis 0,3mg/mL übersteigen führt die Reduktion der



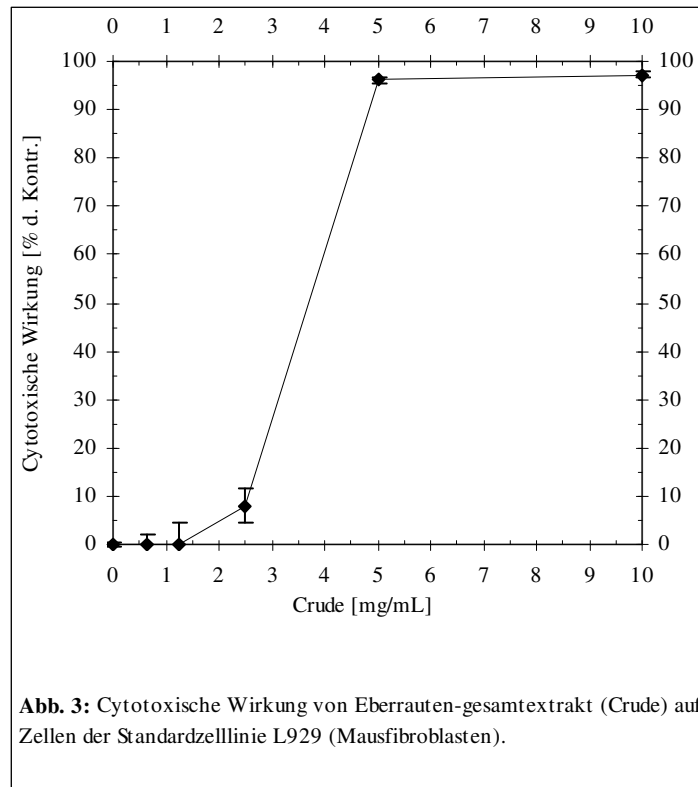
Makrophagenaktivität zu Werten, die unter dem Richtwert (100%) einer unbehandelten Probe liegen. Unter Berücksichtigung dieser Ergebnisse wurde anschließend die Wirkung des Gesamtextraktes auf Zellen der humanen Monozytenzelllinie MAC-6 getestet, um die Übertragbarkeit der ermittelten aktivierenden Wirkung von Eberraute auf Mausemakrophagen (RAW 264.7) auch auf andere Zellsysteme zu verifizieren. Getestet wurde der Extrakt über eine Spanne von 0,001mg/mL bis zu 0,5mg/mL. Auch hier zeigt sich eine durch den Eberrautenextrakt induzierte Aktivierung der Zellen. Die Messungen zeigen eine Steigerung der Monozytenaktivität um ca. 20%, was gut mit den in Abb. 1 dargestellten Daten korreliert. Abweichend kann hier allerdings kein Optimum in der Wirkung festgestellt werden (Abb.3).



3.1.2. Untersuchung der cytotoxischen Wirkung des Gesamtextraktes

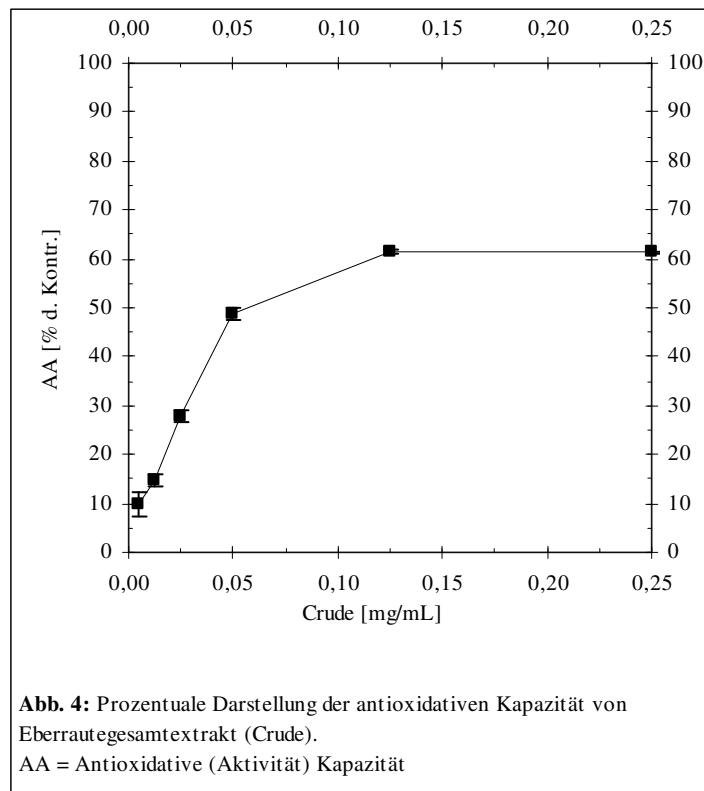
Grund für die Abnahme der Makrophagenaktivität ist vermutlich ein zunehmender cytotoxischer Effekt, der ab einer Konzentration von ca. 1,0mg Gesamtextrakt (Crude) pro mL deutlich wird (s. Abb.3). Mit einer Konzentration von 3,5mg/mL bis 4,0mg/mL

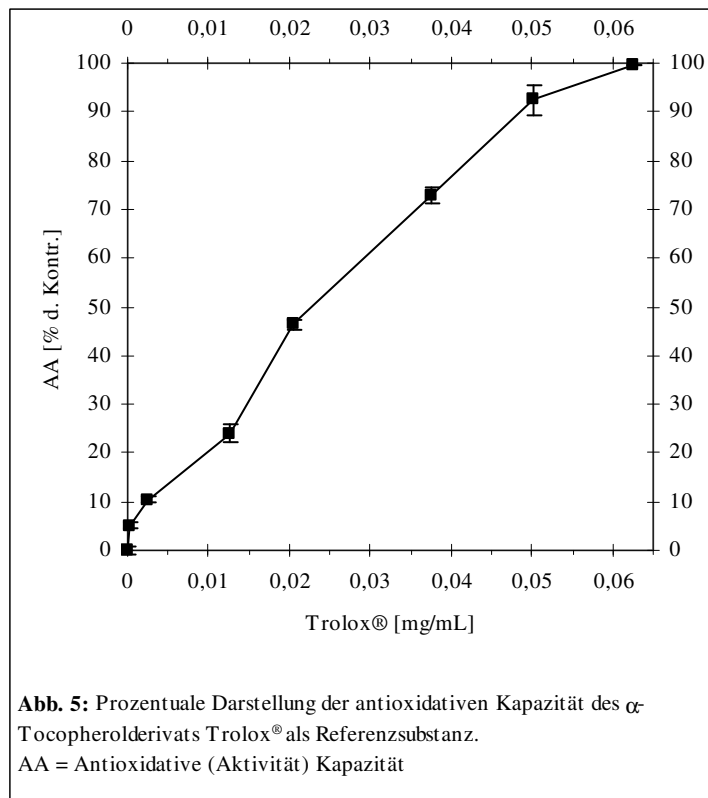
ist die halbmaximale zellabtötende Wirkung des Gesamtextraktes erreicht. Ab 5,0mg/mL waren keine lebenden Zellen mehr im Versuchsansatz vorhanden. Für die weiteren Untersuchungen ist es daher notwendig, deutlich unter einer Konzentration von 4,0mg/mL zu bleiben, um fehlerhafte Ergebnisse aufgrund cytotoxischer Nebeneffekte zu vermeiden.



3.1.3. Untersuchung der antioxidativen Kapazität des Gesamtextraktes

Der Gesamtextrakt weist konzentrationsabhängig eine zunehmende antioxidative Kapazität auf, die auf einen Maximalwert von 60% ansteigt (s. Abb. 4). Das heißt, die eingesetzte Menge ist in der Lage, 60% des vorhandenen Radikals zu löschen. Das entspricht der antioxidativen Kapazität einer äquivalenten Konzentration von 0,03mg des α -Tocopherolderivats Trolox[®] pro mL (s. Abb. 5).

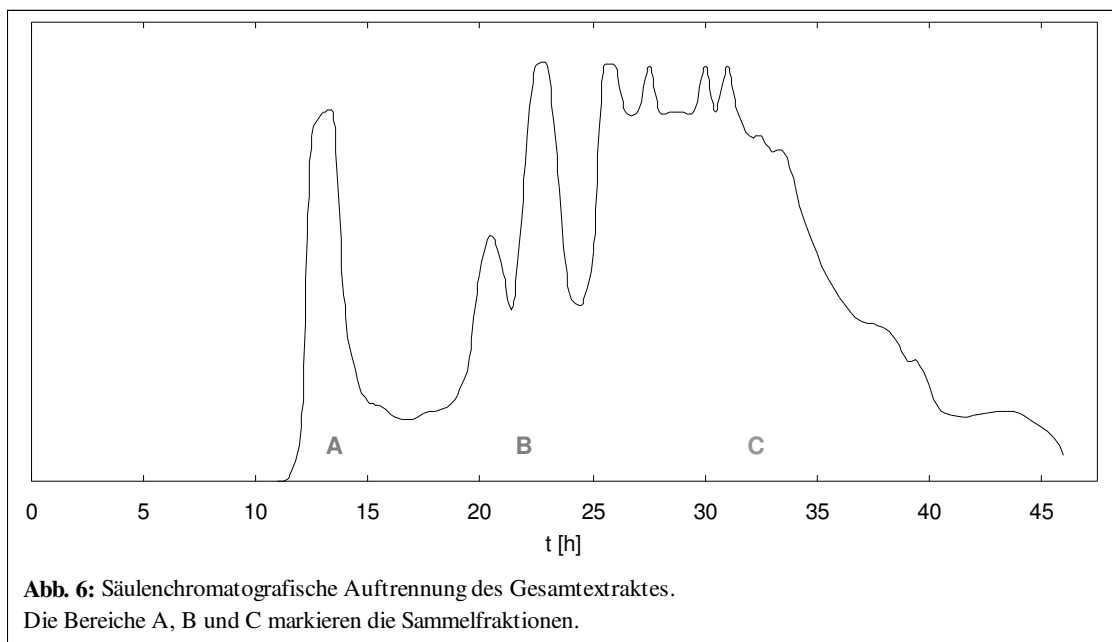




3.2. Untersuchung der Fraktionen aus der Säulenchromatografie

3.2.1. Ergebnisse der chromatografischen Auftrennung

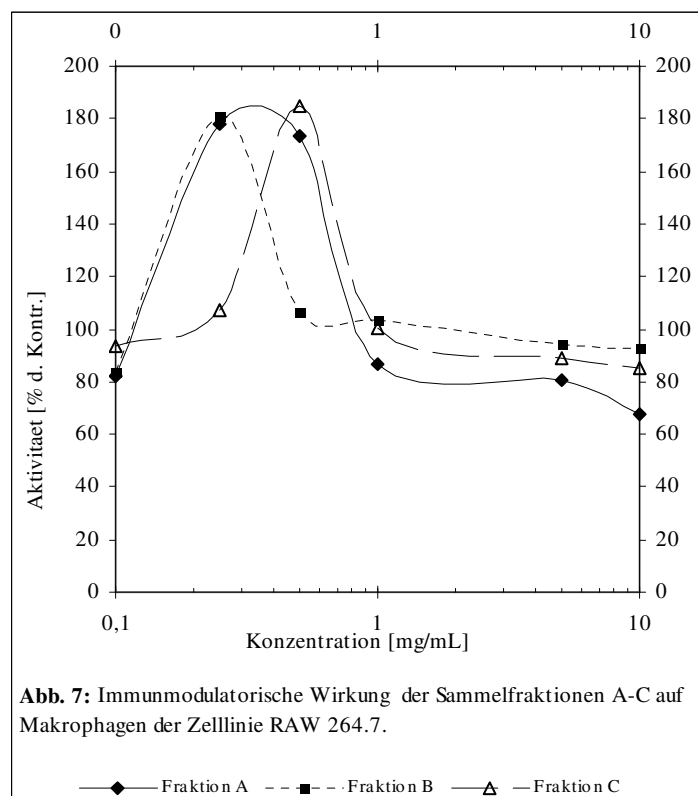
Die säulenchromatografische Auftrennung des Gesamtextraktes erfolgte in Form einer Gelfiltration. Die einzelnen Fraktionen wurden hinsichtlich der unter 3.1 aufgezeigten Wirkweisen getestet. Da die Säulenchromatografie in Form einer Gelfiltration durchgeführt wurde, liegt hier eine Trennung nach Molekülgröße vor, wobei die Elutionsgeschwindigkeit mit der Größe zunimmt. Die Auftrennung führte dabei zu einer Fülle von Signalen, die starke Überlappungen zeigten (s. Abb. 6). Die erhaltenen Fraktionen wurden zur weiteren Untersuchung in drei Sammelfraktionen vereinigt, die im Weiteren als **Fraktion A** (F_A), **Fraktion B** (F_B) und **Fraktion C** (F_C) bezeichnet wurden.



Die Fraktion A wird durch nur einen sichtbaren, breiten Peak gebildet, der die größten Moleküle enthält. Die Substanzen der Fraktion B weisen einen kleineren molekularen Bau auf und bilden zwei Peaks mit unterschiedlicher Höhe. Die Fraktion C nimmt den Größten Teil des Chromatogramms ein und besteht aus vielen ineinander laufenden Peaks. Die Moleküle sind insgesamt kleiner als in Fraktion A und B.

3.2.2. Untersuchung der immunologischen Wirkung der säulenchromatografisch ermittelten Fraktionen.

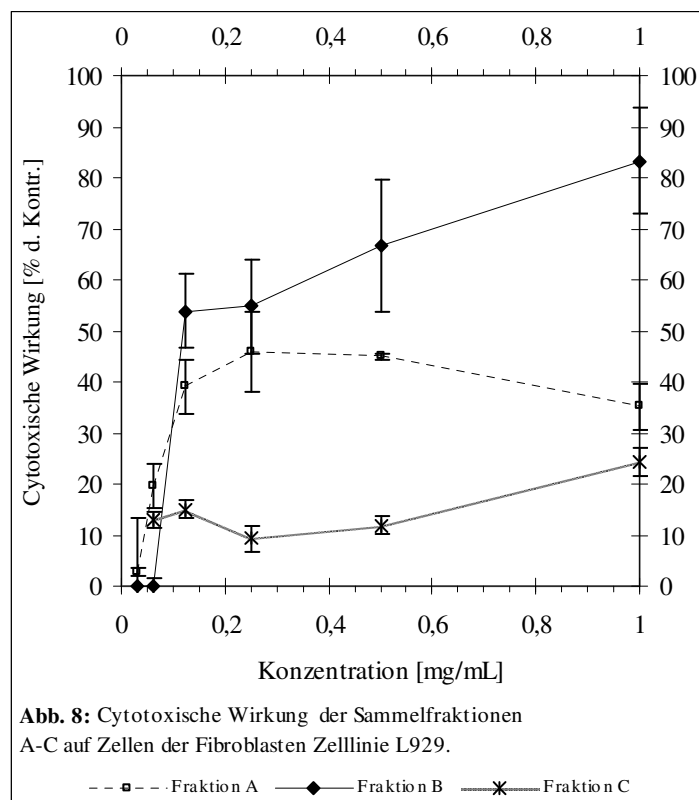
Lässt man die störenden Einflüsse anderer in den Fraktionen vorhandener Substanzen außer Acht, weisen alle Fraktionen in den Untersuchungen zur immunologischen Aktivierung eine Steigerung der Makrophagenaktivität von bis zu 80% gegenüber unbehandelten Zellen auf, wobei es geringe Unterschiede in den wirksamen



Konzentrationen gibt (s. Abb. 7). Alle drei Fraktionen weisen ein Aktivierungspotential bei Konzentrationen unter 1,0mg/mL auf. Der Einfluss der Fraktion A steigt rasch an und erreicht sein Maximum bei einer Konzentration zwischen 0,3mg/mL und 0,4mg/mL bei einer sehr breiten Basis. Die immunstimulierende Wirkung der Fraktion B steigt mit zunehmender Konzentration ebenso schnell an wie bei der Fraktion A. Allerdings ist bei einer Konzentration von 0,2mg/mL – 0,3mg/mL das Maximum erreicht. Die Basis ist schmal, das heißt, mit steigender Konzentration lässt die Wirkung sehr schnell nach. Bei der Fraktion C sind für eine adäquate aktivierende Wirkung höhere Konzentrationen nötig. Erst bei 0,5mg/mL wird ein Maximum der Makrophagenaktivität erreicht.

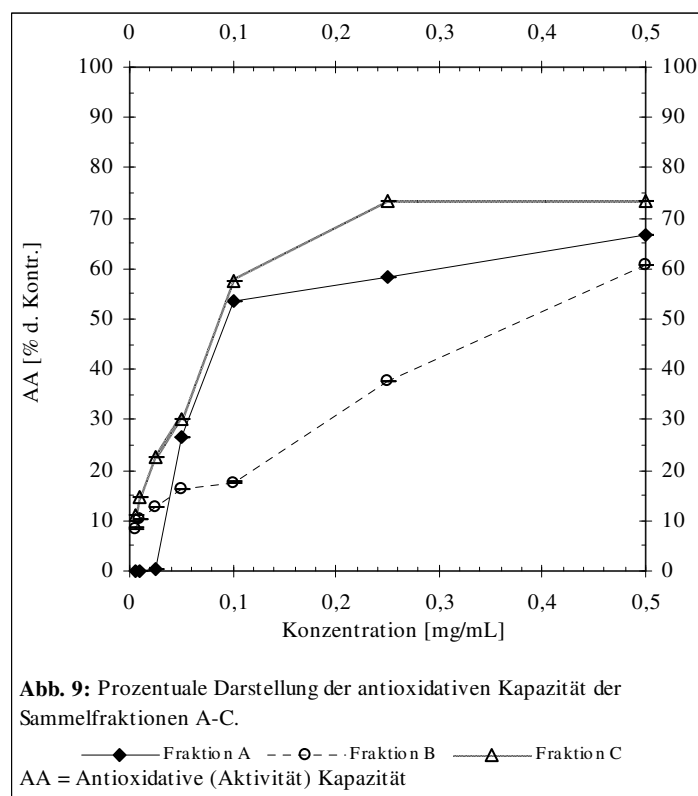
3.2.3. Untersuchung der cytotoxischen Wirkung der säulenchromatografisch ermittelten Fraktionen.

Deutlichere Unterschiede zwischen den Fraktionen zeigen sich bei der cytotoxischen Wirkung. Die stärkste Wirkung geht von der Fraktion B aus. Bei einer Konzentration von 100ng/mL wird bereits eine Cytotoxizität von über 50% erreicht, die im weiteren Verlauf Werte zwischen 80% und 90% bei einer eingesetzten Konzentration von 1,0mg/mL annehmen. Die geringste cytotoxische Wirkung entfaltet die Fraktion C. Die Werte liegen zwischen 10% und 20% cytotoxischer Wirkung und steigen erst bei einer Konzentration von 1,0mg/mL auf über 20% an. Diese verschieden starken cytotoxischen Eigenschaften können einen Einfluss auf das Verhalten der drei Sammelfraktionen in der Aktivierung von Makrophagen haben. Die Fraktion B weist die besten Makrophagen aktivierenden Eigenschaften auf, daher ist die Zellaktivierende Wirkung zu kleineren Konzentrationen hin verschoben. Durch die gegenüber den anderen Fraktionen starke cytotoxische Wirkung nimmt diese aber mit steigender Konzentration recht schnell ab. Die Fraktion C scheint eine schlechtere Makrophagen aktivierende Eigenschaft zu besitzen, durch die niedrigere cytotoxische Wirkung kann dies allerdings mit höheren Konzentrationen kompensiert werden.



3.2.4. Untersuchung der antioxidativen Kapazität der säulenchromatografisch ermittelten Fraktionen

Die Fraktion C zeigt die stärkste antioxidative Kapazität (Abb. 9). Ab einer Konzentration von 0,25mg/mL werden Werte von über 70% gelöschtem Radikal erreicht. Die Fraktion A weist zunächst eine ähnliche Steigungsrate auf, bleibt dann aber unter den Werten der Fraktion C. Es werden lediglich Werte von etwa 65% erreicht. Die Fraktion B weist ebenfalls eine antioxidative Kapazität auf, jedoch bleibt diese weit unter den Werten, die von den anderen Fraktionen erreicht werden. Da die Gelfiltration auf einer Auftrennung nach Molekülgröße basiert, werden die chemischen Eigenschaften der Inhaltsstoffe im Eberrautenextrakt, die für die entsprechenden Wirkungen verantwortlich sind, nicht berücksichtigt. Zudem sind die resultierenden Fraktionen nicht sehr ergiebig.



3.3. Untersuchung der Fraktionen aus der alkoholischen Auftrennung in Abhängigkeit unterschiedlich polarer Eigenschaften der Inhaltsstoffe

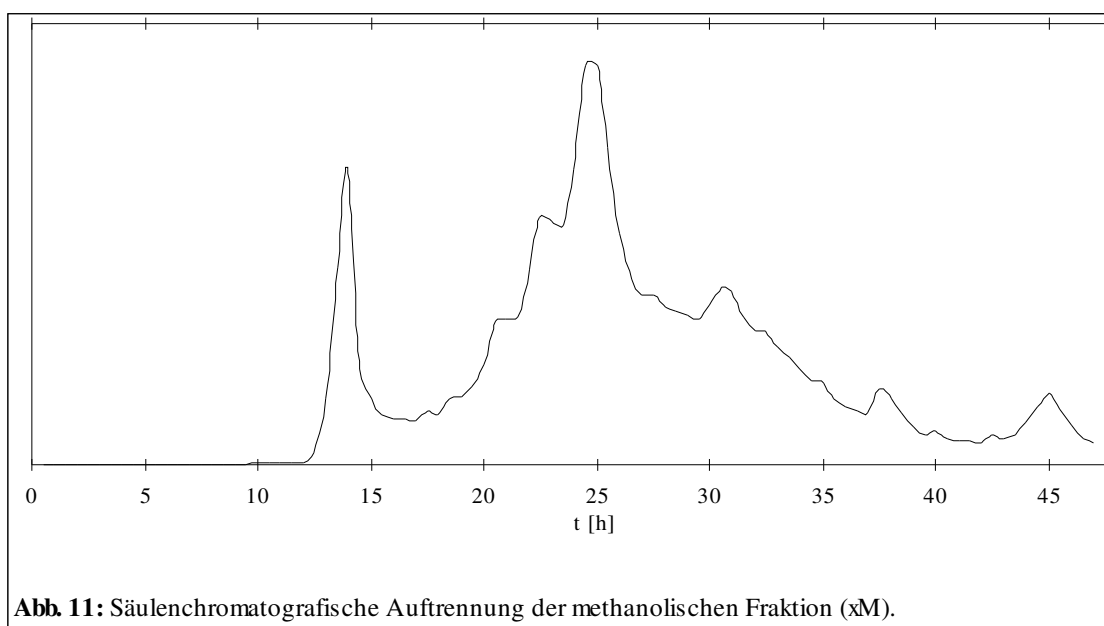
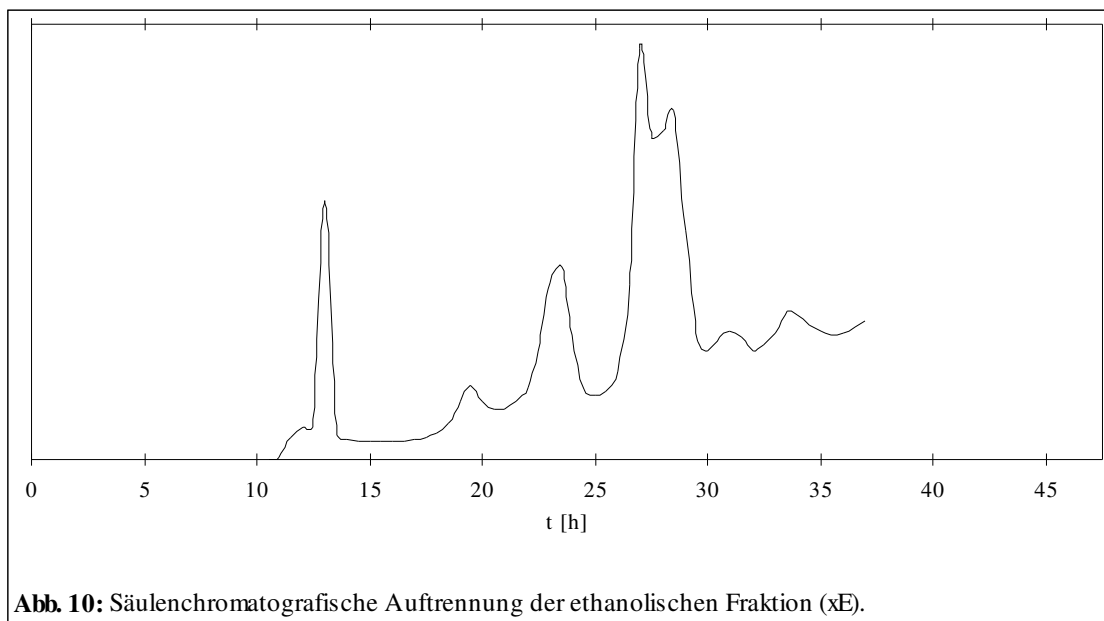
3.3.1. Ergebnisse der alkoholischen Fraktionierung

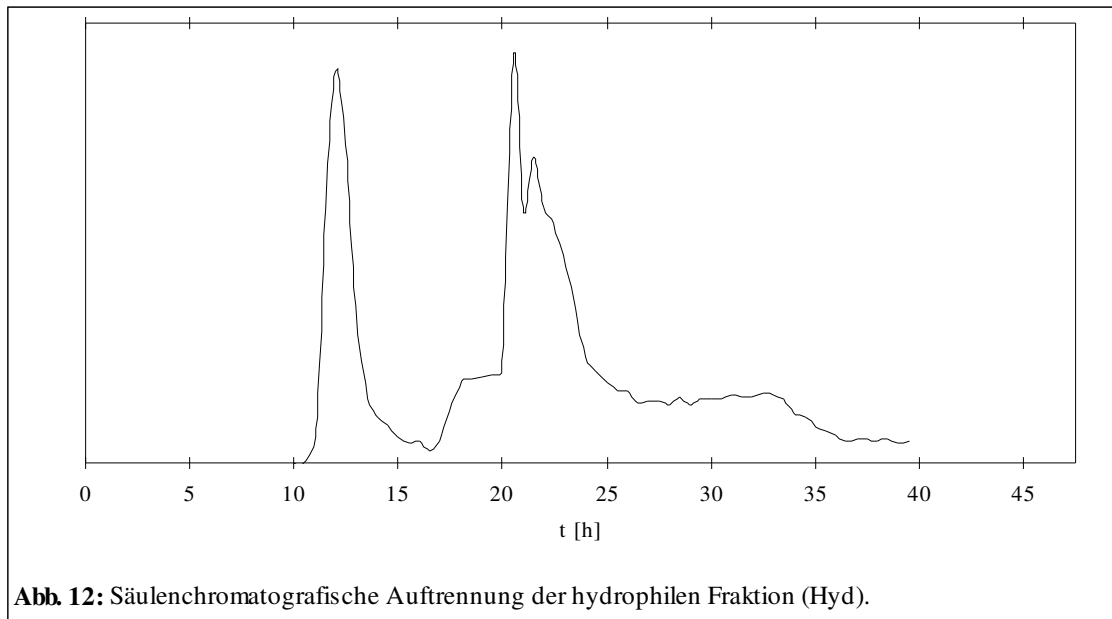
Zur weiteren Analyse wird eine Fraktionierung des getrocknetem Gesamtextraktes (Crude) gewählt, die sich die unterschiedlichen polaren Verhältnisse in der molekularen Struktur der Inhaltsstoffe zu Nutze macht und in den resultierenden Fraktionen wesentlich ergiebiger ist, da größere Mengen des Gesamtextraktes bearbeitet werden können. Aus 11,5g eingesetztem Crude erhält man etwa 6,0g Trockensubstanz der ethanolischen Fraktion (xE), 3,5g Trockensubstanz der methanolischen Fraktion (xM) und 2,0g Trockensubstanz der hydrophilen Fraktion (Hyd). Die Materialverluste während der Prozedur betragen zwischen 0,8g und 1,0g.

Die säulenchromatografische Auftrennung zeigt eindeutige Unterschiede in der Zusammensetzung der alkoholischen Fraktionen (Abb. 10-Abb.12). Die einzelnen Peaks können den entsprechenden Fraktionsbereichen A-C aus dem Chromatogramm des Gesamtextraktes zugeordnet werden (Abb.6). Der größte Anteil der F_A ist in der Alkohol unlöslichen Fraktion (Hyd) und in methanolischen Fraktion zu finden. Das heißt, dass die meisten Moleküle in dieser Fraktion ein großes Verhältnis von polaren zu apolaren Bestandteilen aufweisen. In der ethanolischen Fraktion sind deutlich geringere Mengen aus F_A zu finden, hier kommen in erster Linie große Moleküle vor mit einem nicht zu hohen Anteil an polaren Gruppen. Auch findet sich der größte Teil der F_B in der Hyd- und xM-Fraktion wieder. Der im Crude-Chromatogramm deutlich kleinere erste Peak der B-Fraktion tritt in der Hyd-Fraktion deutlich mehr in den Vordergrund. Dieser Peak scheint daher aus Molekülen mit einem großen Anteil an polaren Gruppen zu bestehen. Die Substanzen der F_C finden sich nur noch in den beiden alkoholischen Fraktionen zu relevanten Teilen wieder, in der hydrophilen Fraktion sind lediglich kleine Reste vorhanden.

Einen weiteren markanten Unterschied zwischen den alkoholischen Fraktionen bildet die Färbung. Die ethanolische Fraktion zeigt eine hellgelbe Färbung, die methanolische Fraktion ist dunkler gefärbt. Die hydrophile Fraktion ist von dunkel brauner Farbe. Ein Test mit $FeCl_3$ -Lösung zeigte bei wässrigen Lösungen der beiden alkoholischen Fraktionen eine intensive Grünfärbung, was auf ein reichliches Vorkommen an

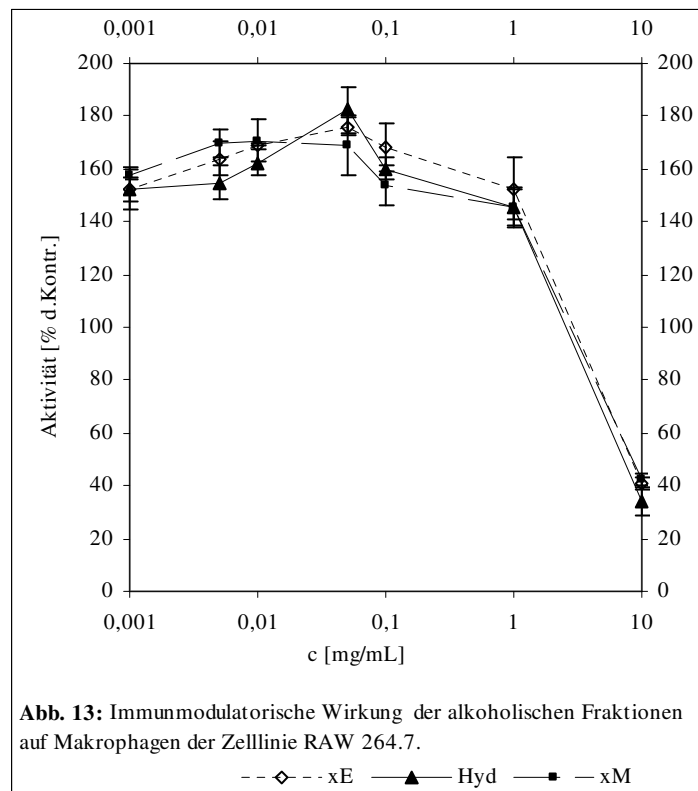
Substanzen mit polyphenolischem Charakter hindeutet. In der hydrophilen Fraktion konnten diese Substanzen nicht mehr nachgewiesen werden.





3.3.2. Immunologische Untersuchung der alkoholischen Fraktionen

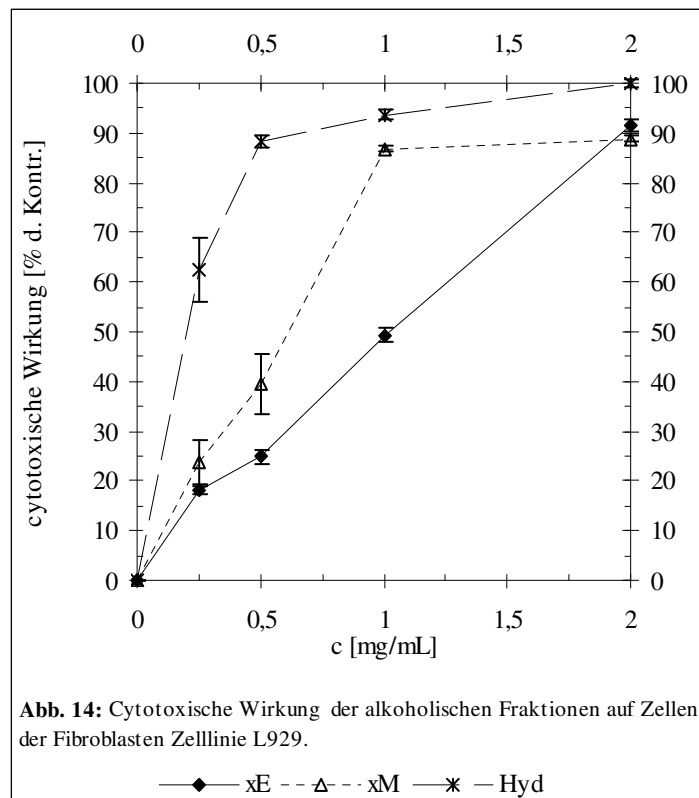
Alle drei alkoholischen Fraktionen weisen in der experimentellen Untersuchung eine starke immunmodulatorische Wirkung auf, wobei Werte erreicht werden, die bis zu 80% über der unbehandelten Kontrolle liegen (s. Abb. 10). In ihrer Wirkung zeigen die Fraktionen keine Abweichung. Die optimale Wirkkonzentration liegt zwischen 10µg/mL und 50µg/mL. Ab einer Konzentration von 100µg/mL geht die Wirkung deutlich zurück



3.3.3. Untersuchung zur cytotoxischen Wirkung der alkoholischen Fraktionen

Die Fraktionierung des Gesamtextraktes mittels unterschiedlicher Alkohole führt zu deutlichen Unterschieden in der cytotoxischen Wirkung. Hauptsächlich zeigt sich zellschädigende Wirkung in der hydrophilen Fraktion. Bereits bei einer Konzentration von 200µg/mL sind 50% der Zellen abgetötet. Für eine derartige Wirkung ist bei der methanolischen Fraktion etwa die dreifache, bei der ethanolischen Fraktion die

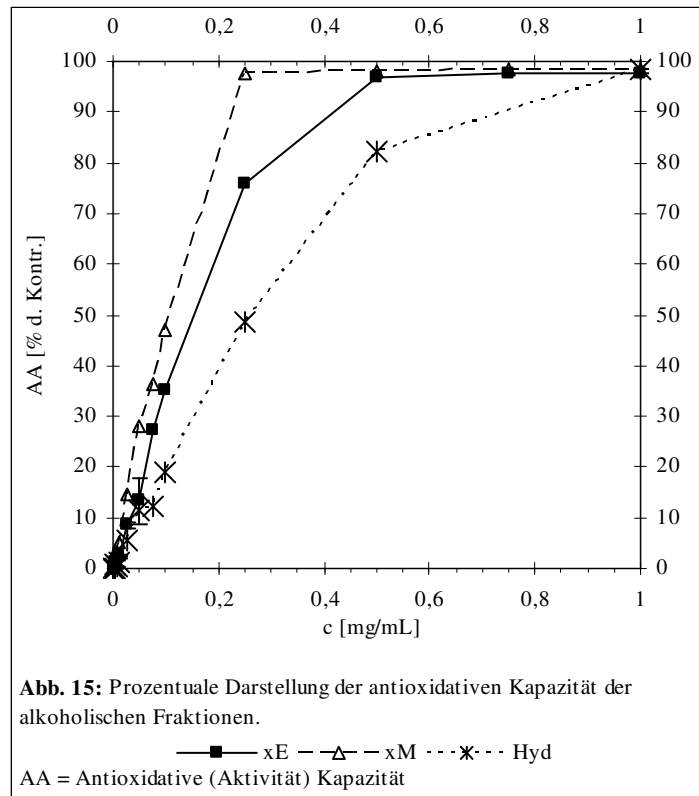
fünffache Menge nötig. Die cytotoxische Wirkung steigt insbesondere bei der hydrophilen Fraktion sehr schnell an. Bei einer Konzentration von 500µg/mL sind 90% der Zellen tot. Bis zu einer Konzentration von 2,0mg/mL steigt die Wirkung bis auf 100% getöteter Zellen an. Die Wirkung der methanolischen Fraktion steigt ebenfalls schnell an, erreicht aber erst bei einer Konzentration von 1,0mg/mL werte von 90%. Im weiteren Verlauf bis 2,0mg/mL ist kein deutlicher Anstieg mehr zu erkennen. Die cytotoxische Wirkung ist bei der ethanolischen Fraktion sehr viel schwächer als bei den anderen Fraktionen. Die Rate steigt kontinuierlich auf einen Wert von 90%, der bei einer Konzentration von 2,0mg/mL erreicht wird.



3.3.4. Untersuchung der antioxidativen Kapazität der alkoholischen Fraktionen

Alle drei Fraktionen zeigen antioxidative Kapazität. Die Wirkung ist bei den alkoholischen Fraktionen stärker als bei der hydrophilen Fraktion. Die methanolische Fraktion weist die stärkste Wirkung auf, bei 0,25mg/mL ist alles Radikal neutralisiert.

Bei der ethanolischen Fraktion ist etwa die doppelte Konzentration nötig, erst bei 0,5mg/mL ist eine antioxidative Kapazität von 100% erreicht. Von der hydrophilen Fraktion sind mindestens 1mg/mL für eine solche Wirkung notwendig.



4. Diskussion

Aus der Eberraute konnte bislang eine große Anzahl an unterschiedlichen Inhaltsstoffen isoliert und identifiziert werden, obgleich noch nicht alle bekannt oder hinreichend untersucht sind. Von einigen dieser Verbindungen sind bereits spezifische Wirkweisen bekannt. Die Extraktion dieser Substanzen aus dem Pflanzenmaterial erfolgte meist über unterschiedliche Lösemittel von Alkoholen, wie Ethanol und Methanol bis hin zu extrem apolaren Lösemitteln wie Petrolether und Ether.

Verwendung findet die Eberraute allerdings in Form von Tees und wässrigen Auszügen, sodass nur ein Teil der Inhaltsstoffe in Lösung geht, der entsprechende polare Eigenschaften zeigt. Die durch die Analyse des Grundextraktes erhaltenen Ergebnisse liegen im Bereich vergleichbarer Pflanzenprodukte. Eine immunstimulierende Wirkung konnte in Bezug auf eine Makrophagen- und eine Monozytenzelllinie als Modellsysteme bestätigt werden. Es zeigt sich aber auch, dass es nur einen begrenzten Konzentrationsbereich gibt, in dem eine optimale Wirkung zu sehen ist. Erst bei hohen Konzentrationen spielt eine cytotoxische Wirkung eine Rolle. Es sind vor allem die in der Eberraute enthaltenen Lignane, Flavonoide und Terpene, die mit steigender Konzentration einen zunehmend cytotoxischen Effekt auf die im Test verwendeten Zellen ausüben und so zu einer Abnahme der immunstimulierenden Wirkung führen. Gleichzeitig kann eine zunehmende antioxidative Wirkung beobachtet werden.

Da sich die Wirkungen der verschiedenen Substanzen gegenseitig beeinflussen und auch unerwünschte Effekte auf den Körper haben können, ist eine Trennung hinsichtlich dieser unterschiedlichen Eigenschaften sinnvoll. Zudem lassen sich erwünschte Wirkungen auf diese Weise identifizieren und testen.

Auch sind, je nach dem welche Wirkung als Ziel gesetzt ist, unterschiedliche Inhaltsstoffe von Interesse. Die größenabhängige Auftrennung durch die Säule führt zu drei Fraktionen. Die cytotoxischen Wirkungen sind in den drei resultierenden Fraktionen in unterschiedlichen Teilen vertreten, was sich deutlich in der schnell nachlassenden immunstimulierenden Wirkung der entsprechenden Fraktion mit der höchsten Cytotoxizität widerspiegelt. Allerdings liegt die Makrophagen aktivierende Wirkung der drei Fraktionen in einem zu engen Bereich, als dass die Aufreinigung über

eine Säule in diesem Fall sinnvoll ist. In Bezug auf die antioxidative Kapazität führt diese Auftrennung zu besseren Ergebnissen. So findet man die beste antioxidative Kapazität in den Fraktionen in denen auch die niedrigste cytotoxische Wirkung vorhanden ist. Dies ist interessant, wenn eine Wirkung gegen Oxidantien und freie Radikale angestrebt wird. Einen entscheidenden Nachteil bietet diese Methode allerdings. Aufgrund der geringen Durchsatzrate des Probenmaterials ist diese Art der Auftrennung sehr zeitintensiv und nur für den analytischen Maßstab geeignet. Für die Gewinnung von größeren Substanzmengen zum Beispiel für die Herstellung von Präparaten aus Teilextrakten mit einer gezielten Wirkrichtung ist diese Methode nicht geeignet. Sie ist aber ein Vorbereitungsschritt zur weiteren Identifizierung und Charakterisierung von Einzelsubstanzen.

Die Extraktion mit unterschiedlichen Alkoholen ermöglicht einen Umsatz von viel größeren Mengen. Es kann bei der Fraktionierung des Grundextraktes im Labormaßstab im zwei- bis dreistelligen Grammbereich gearbeitet werden. Die Komponenten des Tees mit immunmodulatorischer Wirkung konnten auf diese Weise nicht auf eine Fraktion zusammengefasst werden, wahrscheinlich sind es Substanzen mit unterschiedlichem chemischem Charakter, welche für diese Wirkung verantwortlich sind. Allerdings ließen sich die cytotoxischen Elemente isolieren. Die Hauptmenge der cytotoxischen Wirkung findet sich in der hydrophilen Fraktion, es handelt sich also durchweg um sehr polare Substanzen, die sich in Lösemitteln mit organischem Charakter nicht lösen lassen. Diese Wirkung darf nicht mit der cytotoxischen Wirkung verwechselt werden, die in allen Fraktionen zu beobachten war, erst bei hohen Konzentrationen effektiv wird und auf die schädliche Wirkung unterschiedlicher Substanzen bei extremen Konzentrationen deutlich oberhalb des physiologischen Bereiches zurückgeht. In diesem Fall tritt die Wirkung bereits bei niedrigen Konzentrationen auf und ist nur in einer spezifischen Fraktion zu finden, was auf eine einzige bestimmte Substanz hindeutet. Die entsprechende Fraktion ist von besonderem Interesse in Bezug auf eine mögliche Antitumorwirkung. Als vorteilhaft erweist sich hier die über diese Methode einfache Auftrennung. Aus anderen Pflanzenarten der Gattung *Artemisia* sind bereits Substanzen mit einer entsprechenden Wirkung gegen bösartig veränderte Zelltypen gefunden worden (Seo and Surh, 2001; Zheng, 1994).

Alles in allem aber ist die Auftrennung mit Methyl- und Ethylalkohol als polare, organische Lösemittel suboptimal. Untersuchungen mit weiteren Lösemitteln und auch Lösemittelkombinationen werden durchgeführt, die es ermöglichen eine deutlichere Trennung zu erhalten.

Die bereits erwähnte cytotoxische Wirkung in der hydrophilen Fraktion (Hyd) wird in Bezug auf eine mögliche Antitumorwirkung Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Zudem werden die Fraktionen weitere Tests hinsichtlich einer antiviralen und einer antiallergenen Wirkweise unterlaufen.

Ziel dieser Untersuchungen ist die Bereitstellung entsprechender Wirkstoffe zur Produktion von Arzneimitteln. Hierzu ist ein Vorgehen notwendig, das die Isolierung, Charakterisierung und Analyse von Einzelsubstanzen auf patentfähigem Weg ermöglicht.

5. Zusammenfassung

Die als Halbstrauch wachsende Eberraute (*Artemisia abrotanum* L.) ist bereits seit der Antike bekannt. Sie stammt ursprünglich aus dem östlichen Mittelmeerraum und ist seit dem Mittelalter auch in Mitteleuropa bekannt. Die Gattung *Artemisia* weist eine Reihe Pflanzenarten auf, die pharmakologische Bedeutung haben, so auch die Eberraute. Die ältesten Belege weisen auf choleretische, spasmolytische, vermifuge und antiinflammatorische Wirkungen hin. In modernen Untersuchungen konnten diese überlieferten Wirkungen bestätigt werden und es ließen sich weitere hinzufügen, unter anderem zeigten sich immunstimulierende, antivirale, antiallergene, antioxidative, anticonvulsive und Antimalaria-Wirkung.

Zu vielen dieser Wirkungen konnten entsprechende Inhaltsstoffe aus der Eberraute isoliert und identifiziert werden. Diese Inhaltsstoffe gehören den unterschiedlichsten Stoffklassen an und zeigen dementsprechende chemische Eigenschaften.

Die Eberraute wird in der Regel als Tee konsumiert, daher stellt sich die Frage, welche der Inhaltsstoffe lassen sich auf diese Weise aus dem Pflanzenmaterial lösen und welche Wirkungen sind daher in diesem Tee zu finden.

In dieser Arbeit konnte abhängig von der Konzentration eine immunstimulierende und antioxidative Wirkung festgestellt werden. Erst bei hohen Konzentrationen stellte sich eine cytotoxische Wirkung ein.

Über unterschiedliche Trennverfahren sollten die für die verschiedenen Wirkweisen verantwortlichen Inhaltsstoffe isoliert und aufkonzentriert werden.

Durch eine säulenchromatografische Auftrennung ließ sich die cytotoxische Wirkung in einer Fraktion isolieren. Dies führte zu einer deutlichen Erhöhung der immunstimulierenden Wirkung in den nicht cytotoxischen Fraktionen.

Die Fraktionierung über unterschiedliche Lösemittel hatte den Vorteil, dass größere Mengen umgesetzt werden konnten. Auch hier zeigte sich eine hohe immunstimulierende Wirkung in den nicht cytotoxischen Fraktionen durch das Einschränken der cytotoxischen Wirkung auf eine Fraktion. Das Gros der antioxidativen Wirkung befand sich ebenfalls in nur einer Fraktion.

Der Tee aus Eberraute wirkt immunstimulierend und antioxidativ. Die cytotoxische Wirkung als nachteilige Eigenschaft spielt in physiologischen Dosen keine Rolle, lässt

sich aber durch Fraktionierung auch isolieren. Ebenso können die vorteilhaften Wirkungen aufkonzentriert werden, um bestimmte Wirkrichtungen zu forcieren. Es werden weitere Untersuchungen folgen, die eine genaue Charakterisierung der Einzelsubstanzen erbringen. Auch werden weitere Wirkweisen untersucht werden.

6. Literaturverzeichnis

1. **Barbosa-Filho JM, Piuvezam MR, Moura MD, Silva MS, Batista Lima KV, Leitão da-Cunha EV, Fachine IM, Takemura OS** (2006) Anti-inflammatory activity of alkaloids: a twenty-century review. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* **16**: 109–139.
2. **Bergendorff O, Sterner O** (1995) Spasmolytic Flavonols from *Artemisia abrotanum*. *Planta Medica* **61**: 370–371.
3. **Björk L, Hedner T, Remberg P, Sterner O** (2002) Ethnobotanical use of Southernwood, *Artemisia abrotanum* L. in europe. A critical review of its therapeutic use from ancient to modern medicine. *Ethnopharmacologia* **29**: 26–43.
4. **Bors W, Heller W, Michael C, Saran M** (1990) Flavonoids as Antioxidants: Determination of Radical Scavenging. *Methods Enzymol.* **186**: 343–355.
5. **Brodin K, Alahyar H, Hedner T, Sterner O, Faergemann J** (2007) In vitro Activity of *Artemisia abrotanum* Extracts Against *Malassezia* Spp., *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*. *Acta Dermato-Venerologica* **87**: 540–542.
6. **Clifford MN** (2000) Chlorogenic acids and other cinnamates - nature, occurrence, dietary burden, absorption and metabolism. *J. Sci. Food Agric.* **80**: 1033–1043.
7. **Cubukcu B, Bray DH, Warhurst DC, Mericli AH, Ozhatay N, Sariyar G** (1990) In Vitro Antimalarial Activity of Crude Extracts and Compounds from *Artemisia abrotanum* L. *Phytotherapy Research* **4**: 203–204.
8. **Dhanabal SP, Paramakrishnan N, Manimaran SSB** (2007) Anticonvulsant Potential of Essential Oil of *Artemisia abrotanum*. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy* **1**: 112–116.
9. **Harborne, Jeffrey B.; Williams, Christine A.** (2001) Anthocyanins and other flavonoids. In: *Natural Produkt Reports***18**: S. 310–333.
10. **Hodnick W. F., Ahmad S., Pardini RS** (1998) Induction of oxidative stress by redox active flavonoids. *Adv. Exp. Med. Biol.* **439**: 131–150.
11. **Janbaz KH, Saeed S. A., Gilani AH** (2002) Protective effect of rutin on paracetamol- and CCL4-induced hepatotoxicity in rodents. *Fitoterapia* **73**: 557–563.
12. **Kähkönen MP, Hopia AI, Vourela HJ, Rauha J, Pihlaja K, Kujala TS, Heinonen M** (1999) Antioxidant Activity of Plant Extracts Containig Phenolic Compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 3954–3962.

13. **Kroon PA, Williamson G** (1999) Hydroxycinnamates in plants and food: current and future perspectives. *J. Sci. Food Agric.* **79**: 355–361.
14. **Morel I, Cillard P, Cillard J** (1998) Flavonoid-metal interaction in biological systems. In CA Rice-Evans, L Packer, eds, *Flavonoids in Health and disease*. Marcel Dekker, New York, pp. 163–177.
15. **Moscattelli V, Hnatyszyn O, Acevedo C, Megías J, Alcaraz MJ, Ferraro G** (2006) Flavonoids from *Artemisia copa* with anti-Inflammatory Activity. *Planta Medica* **72**.
16. **Nakano D, Kwak C, Fuji K, Ikemura K, Satake A, Ohkita M, Takaoka M., Ono Y, Nakai M, Tomimori N, Kiso Y, Matsumura Y** (2006) Sesamin Metabolites Induce an Endothelial Nitric Oxide-Dependent Vasorelaxation through Their Antioxidative Property-Independent Mechanisms: Possible Involvement of the Metabolites in the Antihypertensive Effect of Sesamin. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **318**: 328–335.
17. **Nieschulz O, Schmersahl P** (1968) Über choleretische Wirkstoffe aus *Artemisia abrotanum* L. *Arzneimittel-forschung* **18**: 1330–1336.
18. **Pannala AS, Chan TS, O'Brian PJ, Rice-Evans CA** (2001) Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics. *Biochem. Biophys. Res. Comm* **282**: 1161–1168.
19. **Piao BK, Wang YX, Xie GR, Mansmann U, Matthes H, Beuth J, Lin HS** (2004) Impact of Complementary Mistletoe Extract Treatment on Quality of Life in Breast, Ovarian and Non-small Cell Lung Cancer Patients. A Prospective Randomized Controlled Clinical Trial. *Anticancer Research* **24**: 303–310.
20. **Randerath O, Pottkämper M, Beuth J, Pulverer G** (1997) Immunmodulation mit *Herba-abrotani*-Tee und *Propionibacterium avidum* KP-40 bei professionellen Eishockeyspielern. *Biologische Medizin* **26**: 105–109.
21. **Remberg P, Björk L, Hedner T, Sterner O** (2004) Characteristics, clinical effect profile and tolerability of a nasal spray preparation of *Artemisia abrotanum* L. for allergic rhinitis. *Phytomedicine* **11**: 36–42.
22. **Sahu SC, Gray GC** (1996) Pro-oxidant activity of flavonoids: effect on glutathione and glutathione S-transferase in isolated rat liver nuclei. *Cancer Letters* **104**: 193–196.
23. **Tan, R.X.; Zheng, W. F.; Tang H. Q.** (1998): Biologically Active substances from the Genus *Artemisia*. In: *Planta Medica*, Jg. 64, S. 295–302.
24. **Tan R.X., Lu H., YU T.T., Zheng W.F., Yang L., Gafner S., Hostettmann K.** (1999) Mono- and Sesquiterpenes and Antifungal Constituents from *Artemisia* Species. *Planta Medica* **65**: 64–67.

- 25. Tang HQ, Hu J, Yang L, Tan RX** (2000) Terpenoids and Flavonoids from *Artemisia* Species. *Planta Medica* **66**: 391–393.
- 26. Vostrowsky O, Michaelis K, Ihm H, Knobloch K** (1984) Das ätherische Öl von *Artemisia abrotanum* L. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung* **179**: 125–128.
- 27. Giovannucci E, Rimm EB, Liu Y, Stampfer MJ, Willett WC** (2002) A Prospective Study of Tomato Products, Lycopene, and Prostate Cancer Risk. *Journal of the National Cancer Institut* **94**: 391–398.
- 28. Peters U, Leitzmann MF, Chatterjee N, Wang Y, Albanes D, Gelmann EP, Friesen MD, Riboli E, Hayes RB** (2007) serum Lycopene, Other Carotenoids, and Prostate Cancer Risk: a Nested Case-Control Study in the Prostate, Lung, Colorectal, and Ovarian Cancer Screening Trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* **16**: 962–968.
- 29. Seo H, Surh Y** (2001) Eupatilin, a pharmacologically active flavone derived from *Artemisia* plants, induces apoptosis in human promyelocytic leukemia cells. *Mut. Res. (Mutation Research)* **496**: 191–198.
- 30. Zheng G** (1994) Cytotoxic Terpenoids and Flavonoids from *Artemisia annua*. *Planta Medica* **60**: 54–57.

Mein Lebenslauf wird aus Gründen des Datenschutzes in der elektronischen Fassung meiner Arbeit nicht veröffentlicht.