universität wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Safranextrakte im Ames-Test – Untersuchung anti-/oxidativer und anti-/mutagener Effekte“

Verfasser

Roland Holler

angestrebter akademischer Grad

Magister der Naturwissenschaften (Mag. rer. nat.)

Wien, Oktober 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:	A474
Studienrichtung lt. Studienblatt:	Ernährungswissenschaften
Betreuer:	Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner

Danksagung

Herzlich danken möchte ich hiermit meinem besonders geduldigen und aufmerksamen Diplomarbeitsbetreuer,

Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Wagner, der sich die Zeit dazu nahm, meinen Mutmaßungen und Argumenten mit Geduld zu lauschen und dieser Arbeit durch seinen Erfahrungsschatz wertvolle Denkanstöße gab. Weiters danke ich

Herrn Johannes Pinteritz für die großzügige Bereitstellung der zu analysierenden Proben, und seiner offenen und raschen Informationsbereitstellung sowie

Frau Mag. Christine Mölzer für eine fachkompetente Einschulung im Laborbereich und ihre fachliche Unterstützung im Verlauf meiner Diplomarbeit. Ebenso danke ich

Frau Mag. Andrea Steyrer für die Unterstützung und Durchführung des praktischen Teiles im Labor sowie für ihre nette, hilfsbereite Art, wenn es um Proble mlösungen am Computer ging.

Frau Mag. Gesa Ziesel danke ich für die kooperative Zusammenarbeit im Labor.

Auch ein herzliches Dankeschön an die komplette Spange E.

Roland Holler, Oktober 2012

Inhaltsverzeichnis

1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS VII

2 TABELLENVERZEICHNIS XI

3 ABKÜRZUNGEN XV

4 EINLEITUNG 1

5 LITERATURÜBERSICHT 2

5.1 Der Ames-Test 2

5.1.1 Allgemeines zum Ames-Test 2

5.1.1.1 Geschichtliches zum Ames-Test 2

5.1.2 *Salmonella typhimurium*-Stämme 3

5.1.2.1 Genotyp der verwendeten *Salmonella typhimurium*-Stämme 3

5.1.3 Metabolisches System 4

5.1.3.1 Oxidativer Metabolismus 4

5.1.3.2 Positiv- und Negativkontrolle 5

5.1.3.3 Positivkontrolle 5

5.1.3.4 Negativkontrolle (Spontanmutationsfrequenz) 5

5.2 Safran 5

5.2.1 Botanik und Anbau *Crocus sativus* 5

5.2.1.1 Trocknung der Narbenäste 8

5.2.2 Geschichte des Safrans 8

5.2.2.1 Geschichte des Safrans – Aktueller Stand der Wissenschaft 8

5.2.2.2 Toxizität 9

5.2.3 Inhaltsstoffe von Narbenästen und Tepalen des Safrans 9
5.2.3.1 Inhaltsstoffe der Narbenäste des Safrans 9
5.2.3.2 Qualitätskriterien des Handels 10
5.2.3.3 Konzentrations-Unterschiede der Safran-Narbenäste 11
5.2.3.4 Crocin und Crocetin 12
5.2.3.5 Pharmakokinetische Eigenschaften von Crocin *in-vivo* 13
5.2.3.6 Antikanzerogene Eigenschaften von Safran-Extrakten, Crocin und Crocetin 14
5.2.3.7 Antioxidative Eigenschaften von Crocin und Crocetin 15
5.2.3.8 Crocin und Crocetin im Ames-Test 16
5.2.3.9 Eigenschaften von Picrocrocin und Safranal 16
5.2.3.10 Antikanzerogene Eigenschaften von Picrocrocin und Safranal 17
5.2.3.11 Flavonoide und Phenolsäuren der Narbenäste 18
5.2.3.12 Antikanzerogene Eigenschaften von Flavonoiden und 18
Phenolsäuren 18
5.2.3.13 Hemmung der Phase-I-Enzyme 19
5.2.3.14 Wechselwirkung mit der DNA 19
5.2.3.15 Antioxidative Eigenschaften von Flavonoiden und Polyphenolsäuren der Narbenäste 20
5.2.3.16 Inhaltstoffe der Tepalen des Safrans 20
5.2.3.17 Mutagenität von Inhaltsstoffen im Ames-Test des Safrans 22
6 MATERIAL UND METHODEN 24
6.1 Prinzip des Ames-Test 24
6.2 Präparation der Lösungen für den Ames-Test 24
6.2.1 Ampicillin Lösung 24
6.2.2 Tetracyclin Lösung 25

6.2.3 Glucose Lösung (40%) 25
6.2.4 Glucose-6-Phosphat Lösung (304 mg/ml) 25
6.2.5 Histidin-Biotin Lösung 25
6.2.6 Histidin Lösung 25
6.2.7 Biotin Lösung 26
6.2.8 Nutrient Broth, Overnight Culture 26
6.2.8.1 Herstellung von zwei Master Plates 26
6.2.9 $MgCl_2$/KCl Lösung 27
6.2.10 Minimal Glucose Agar (Platten) 27
6.2.11 NADP Lösung 28
6.2.12 Herstellung des S9-Mix 28
6.2.13 Top Agar 29
6.2.14 Vogel-Bonner Lösung 29
6.3 Extraktherstellung der Narbenäste und Tepalen 31
6.3.1 Einwaage und Stockherstellung der Narbenäste und Tepalen 31
6.3.2 Bakterien-Stämme 32
6.3.3 Mutagene der Positivkontrolle 32
6.3.4 Negativkontrolle 35
6.4 Testverfahren 36
6.4.1 Herstellung der Verdünnungsreihe aus den Stocklösungen 36
6.4.2 Antimutagenitäts/Antioxidativitäts-Test 36
6.4.3 Mutagenitätstest 38
6.5 Auswertungsverfahren des Ames-Tests 39
6.5.1 Nicht statistische Auswertung 39
6.5.2 Statistische Auswertung 40

7 RESULTATE UND DISKUSSION.....41

7.1 Antimutagenitätstest TA98 Narbenäste 41

7.1.1 Mutagenität induziert durch TNFone, *TA98* Narbenäste.....41

7.1.2 Mutagenität induziert durch AFB1+S9, *TA98*, Narbenäste 43

7.1.3 Mutagenität induziert durch PhiP+S9, *TA98*, Narbenäste.....45

7.2 Antimutagenitätstest TA102 Narbenäste 47

7.2.1 Mutagenität induziert durch TNFone, *TA102*, Narbenäste.....47

7.2.2 Mutagenität induziert durch AFB1+S9, *TA102*, Narbenäste 49

7.3 Antimutagenitätstest TA98 Tepalen 52

7.3.1 Mutagenität induziert durch TNFone, *TA98*, Tepalen 52

7.3.2 Mutagenität induziert durch AFB1+S9, *TA98*, Tepalen.....55

7.3.3 Mutagenität induziert durch PhiP+S9, *TA98*, Tepalen 57

7.4 Antimutagenitätstest TA102 Tepalen 58

7.4.1 Mutagenität induziert durch TNFone, *TA102*, Tepalen 58

7.4.2 Mutagenität induziert durch AFB1+S9, *TA102*, Tepalen.....60

7.5 Mutagenitätstests 63

7.5.1 Mutagenitätstest *TA98* und *TA102* mit Narbenäste und Tepalen.....63

7.5.1.1 Mutagenitätstest *TA98* (TNFone) Narbenäste 64

7.5.1.2 Mutagenitätstest *TA98* (AFB1+S9, PhiP+S9) Narbenäste.....65

7.5.1.3 Mutagenitätstest *TA98* (TNFone) Tepalen.....66

7.5.1.4 Mutagenitätstest *TA98* (AFB1+S9, PhiP+S9) Tepalen 67

7.5.1.5 Mutagenitätstest *TA102* (TNFone) Narbenäste 68

7.5.1.6 Mutagenitätstest *TA102* (AFB1+S9) Narbenäste.....69

7.5.1.7 Mutagenitätstest *TA102* (TNFone) Tepalen.....70

7.5.1.8 Mutagenitätstest *TA102* (AFB1+S9) Tepalen 71

8 Schlussbetrachtung Narbenäste und Tepalenextrakte: 72
9 ZUSAMMENFASSUNG 75
10 SUMMARY 76
11 LITERATUR 77
12 ANHANG 84
12.1 Antimutagenitätstest TA98 84
12.1.1 Revertantenzahl für *TA98* Safranextrakt Narbenäste 84
12.1.2 Werte der Positivkontrolle für *TA98* Safranextrakt, Narbenäste 90
12.1.3 Werte der Negativkontrolle für *TA98* Safranextrakte, Narbenäste 90
12.1.4 Revertantenzahl für *TA98* Safranextrakt Tepalen 91
12.1.5 Werte der Positivkontrolle für *TA98* Tepalen 97
12.1.6 Werte der Negativkontrolle *TA98* Safranextrakt Tepalen 98
12.2 Antimutagenität/Antioxidativitäts-Test mit TA102 99
12.2.1 Revertantenzahl für *TA102* Safranextrakt Narbenäste 99
12.2.2 Werte der Positivkontrolle für *TA102* Safranextrakt Narbenäste 103
12.2.3 Werte der Negativkontrolle *TA102* Safranextrakt Narbenäste 103
12.2.4 Revertantenzahl für *TA102* Safranextrakt Tepalen 104
12.2.5 Werte der Positivkontrolle für *TA102* Safranextrakt Tepalen 108
12.2.6 Werte der Negativkontrolle *TA102* Safranextrakt Tepalen 109
12.3 Mutagenitätstests TA98 und TA102 110
12.3.1 Mutagenitätstests *TA98* Safranextrakt Narbenäste 110
12.3.2 Positivkontrolle für *TA98* Safranextrakt Narbenäste 111
12.3.3 Negativkontrolle für *TA98* Narbenäste 111
12.3.4 Mutagenitätstests *TA102* Safranextrakt Narbenäste 112
12.3.5 Positivkontrolle für *TA102* Safranextrakt Narbenäste 113

12.3.6 Negativkontrolle für *TA102* Safranextrakt Narbenäste 113
12.3.7 Mutagenitätstests *TA98* Safranextrakt Tepalen 113
12.3.8 Positivkontrolle für *TA98* Safranextrakt Tepalen 116
12.3.9 Negativkontrolle für *TA98* Safranextrakt Tepalen 116
12.3.10 Mutagenitätstests *TA102* Safranextrakt Tepalen 117
12.3.11 Positivkontrolle für *TA102* Safranextrakt Tepalen 119
12.3.12 Negativkontrolle für *TA102* Safranextrakt Tepalen 119
13 CURRICULUM VITAE 120

1 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: *Crocus Sativus L.* 7

Abbildung 2: Safran. A Griffel mit 3 Narbenästen, B Narbe zusammengerollt, C Narbe ausgebreitet, lb Leitbündel, pap Papillen [TEUSCHER, 2003] 7

Abbildung 3: Crocetin und Glykosylester des Crocetins (all-trans-) 12

Abbildung 4: Struktur von Picrocrocin, HTCC und Safranal [HÄNSEL, STICHER, 2010] 17

Abbildung 5: Flavonoide im Ames-Test [modifiziert: RESENDE *et al.,*2012] 23

Abbildung 6: Struktur von TNFone [MUNTEANU *et al*., 2004] 33

Abbildung 7: Metabolismusweg von PHiP [MARQUARDT, SCHÄFER, 2004] . 34

Abbildung 8: Metabolische Aktivierung von AFB1 sowie das gebildete DNA-Addukt 35

Abbildung 9: Überblick über die Durchführung, Standard-Platten-Inkorporationstest [MORTELMANS, ZEIGER, 2000] 38

Abbildung 10: Effekte von NÄ-Extrakten, RT = Raumtemperatur, °C = Grad Celsius, (Temperatur des Lösungsmittels H_2O) und H_2O:EtOH Lösungsmittel bei RT im Verhältnis 80:20) in *TA98 Salmonella typhimurium* gegenüber TNFone 42

Abbildung 11: Effekte von NÄ-Extrakten, RT = Raumtemperatur, °C = Grad Celsius, (Temperatur des Lösungsmittels H_2O) und H_2O:EtOH Lösungsmittel bei RT (im Verhältnis 80:20) in *TA98 Salmonella typhimurium* gegenüber AFB1+S9 44

Abbildung 12: Effekte von NÄ-Extrakten, RT = Raumtemperatur, °C = Grad Celsius, (Temperatur des Lösungsmittels H_2O) und H_2O:EtOH Lösungsmittel bei RT (im Verhältnis 80:20) in *TA98 Salmonella typhimurium* gegenüber PhiP+S9 46

Abbildung 13: Effekte von NÄ-Extrakten, RT = Raumtemperatur, °C = Grad Celsius, (Temperatur des Lösungsmittels H_2O) und H_2O:EtOH Lösungsmittel bei RT (im Verhältnis 80:20) in *TA102 Salmonella typhimurium* gegenüber TNFone.....48

Abbildung 14: Effekte von NÄ-Extrakten, RT = Raumtemperatur, °C = Grad Celsius, (Temperatur des Lösungsmittels H_2O) und H_2O:EtOH Lösungsmittel bei RT (im Verhältnis 80:20) in *TA102 Salmonella typhimurium* gegenüber AFB1+S9 50

Abbildung 15: Effekte von Tepalenextrakten gegenüber TNFone (*TA98*), RT = Raumtemperatur, °C = Grad Celsius, (Temperatur des Lösungsmittels H_2O), ED (H_2O:EtOH 80:20 bei RT, Extraktion im Dunkeln) und EL (H_2O:EtOH 80:20 bei RT, Extraktion bei Licht).....53

Abbildung 16: Effekte von Tepalenextrakten gegenüber AFB1+S9 (*TA98*), RT = Raumtemperatur, °C = Grad Celsius, (Temperatur des Lösungsmittels H_2O), ED (H_2O:EtOH 80:20 bei RT, Extraktion im Dunkeln) und EL (H_2O:EtOH 80:20 bei RT, Extraktion bei Licht).....56

Abbildung 17: Effekte von Tepalenextrakten gegenüber PHiP+S9 (*TA98*), RT = Raumtemperatur, °C = Grad Celsius, (Temperatur des Lösungsmittels H_2O), ED (H_2O:EtOH 80:20 bei RT, Extraktion im Dunkeln) und EL (H_2O:EtOH 80:20 bei RT, Extraktion bei Licht).....58

Abbildung 18: Effekte von Tepalenextrakten gegenüber TNFone (*TA102*), RT = Raumtemperatur, °C = Grad Celsius, (Temperatur des Lösungsmittels H_2O), ED (H_2O:EtOH 80:20 bei RT, Extraktion im Dunkeln) und EL (H_2O:EtOH 80:20 bei RT, Extraktion bei Licht).....59

Abbildung 19: Effekte von Tepalenextrakten gegenüber AFB1+S9 (*TA102*), RT = Raumtemperatur, °C = Grad Celsius, (Temperatur des Lösungsmittels H_2O), ED (H_2O:EtOH 80:20 bei RT, Extraktion im Dunkeln) und EL (H_2O:EtOH 80:20 bei RT, Extraktion bei Licht).....61

Abbildung 20: Nicht-Mutagenes-Potenzial von NÄ-Extrakten gegenüber TNFone als Positivkontrolle von Raumtemperatur-, °C- und H_2O:EtOH

Extrakten (80:20) im *Salmonella typhimurium* Stamm *TA98* (* signifikant unterschiedlich zur doppelten NK, p<0,05) 64

Abbildung 21: Nicht-Mutagenes-Potenzial von NÄ-Extrakten gegenüber AFB1+S9 und PhiP+S9 als Positivkontrolle von Raumtemperatur-, °C- und H_2O:EtOH -Extrakten (80:20) im *Salmonella typhimurium* Stamm *TA98* (* signifikant unterschiedlich zur doppelten NK, p<0,05) 65

Abbildung 22: Nicht-Mutagenes-Potenzial von Tepalenextrakten gegenüber TNFone als Positivkontrolle von, Raumtemperatur-, °C- und H_2O:EtOH Extrakten (80:20) im *Salmonella typhimurium* Stamm *TA98* (* signifikant unterschiedlich zur doppelten NK = 200%, NK = 100%, p<0,05).....66

Abbildung 23: Nicht-Mutagenes-Potenzial von Tepalenextrakten gegenüber AFB1+S9 und PhiP+S9 als Positivkontrolle von Raumtemperatur-, °C- und H_2O:EtOH Extrakten (80:20) im *Salmonella typhimurium* Stamm *TA98* (* signifikant unterschiedlich zur doppelten NK = 200%, NK = 100%, p<0,05).....67

Abbildung 24: Nicht-Mutagenes-Potenzial von NÄ-Extrakten gegen TNFone als Positivkontrolle von Raumtemperatur-, °C- und H_2O:EtOH Extrakten (80:20) im *Salmonella typhimurium* Stamm *TA102 TA98* (* signifikant unterschiedlich zur doppelten NK = 200%, NK = 100% p<0,05).....68

Abbildung 25: Nicht-Mutagenes-Potenzial von NÄ-Extrakten gegen AFB1+S9 als Positivkontrolle, von Raumtemperatur-, °C- und H_2O:EtOH Extrakten (80:20) im *Salmonella typhimurium* Stamm *TA102* (* signifikant unterschiedlich zur doppelten NK = 200%, NK = 100%, p<0,05).....69

Abbildung 26: Nicht-Mutagenes-Potenzial von Tepalenextrakten gegen TNFone als Positivkontrolle von Raumtemperatur-, °C- und H_2O:EtOH Extrakten (80:20) im *Salmonella typhimurium* Stamm *TA102* (* signifikant unterschiedlich zur doppelten NK = 200%, NK = 100%, p<0,05).....70

Abbildung 27: Nicht-Mutagenes-Potenzial von Tepalenextrakten gegen AFB1+S9 als Positivkontrolle, von Raumtemperatur-, °C- und H_2O:EtOH Extrakten (80:20) im *Salmonella typhimurium* Stamm *TA102* (* signifikant unterschiedlich zur doppelten NK = 200%, NK = 100%, p<0,05).....71

2 TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1: Zusammenfassung der genetischen Merkmale des *TA98* und *TA102* Stammes....4

Tabelle 2: Spontanrevertantenzahl im Ames-*Salmonella* Test....5

Tabelle 3: Einige Glykosylester des Crocetins [BLASCHEK *et al.,* 2007] 12

Tabelle 4: Antioxidative Wirkung von Crocetin und Crocetin-Ester im Dreifachansatz (p<0,05) [modifiziert: CHEN *et al.,* 2008]....16

Tabelle 5: Stammspezifische Antibiotika für die Herstellung....27

Tabelle 6: Chemikalien und Medien....30

Tabelle 7: Verwendete Mutagene im Ames-Test....35

Tabelle 8: Verdünnungsreihe NÄ-Extrakte und Tepalenextrakte....36

Tabelle 9: Signifikante Veränderung (*TA98*) zur PK (p<0,05) der NÄ-Extrakte im Ames-Test gegenüber TNFone, ihre his^+ Revertantenzahlen Mittelwerte (Ø) mit Standardabweichung (sd) von 6 Platten (2 Tests) und ihr Mutagenitäts-Index.42

Tabelle 10: Signifikante Veränderung (*TA98*) zur PK (p<0,05) der NÄ-Extrakte im Ames-Test gegenüber AFB1+S9, ihre his^+ Revertantenzahlen Mittelwerte (Ø) mit Standardabweichung (sd) von 6 Platten (2 Tests) und ihr Mutagenitäts-Index....44

Tabelle 11: Signifikante Veränderung (*TA98*) zur PK (p<0,05) der NÄ-Extrakte im Ames-Test gegenüber PhiP+S9, ihre his^+ Revertantenzahlen Mittelwerte (Ø) mit Standardabweichung (sd) von 6 Platten (2 Tests) und ihr Mutagenitäts-Index....46

Tabelle 12: Signifikante Veränderung (*TA102*) zur PK (p<0,05) der NÄ-Extrakte im Ames-Test gegenüber TNFone, ihre his^+ Revertantenzahlen Mittelwerte (Ø) mit Standardabweichung (sd) von 6 Platten (2 Tests) und ihr Mutagenitäts-Index....48

Tabelle 13: Signifikante Veränderung (*TA102*) zur PK (p<0,05) der NÄ-Extrakte im Ames-Test gegenüber AFB1+S9, ihre his^+ Revertantenzahlen Mittelwerte (Ø) mit Standardabweichung (sd) von 6 Platten (2 Tests) und ihr Mutagenitäts-Index 51

Tabelle 14: Signifikante Veränderung (*TA98*) zur PK (p <0,05) der Tepalenextrakte im Ames-Test gegenüber TNFone, ihre his^+ Revertantenzahlen Mittelwerte (Ø) mit Standardabweichung (sd) von 6 Platten (2 Tests) und ihr Mutagenitäts-Index 54

Tabelle 15: Signifikante Veränderung (*TA98*) zur PK (p <0,05) der Tepalenextrakte im Ames-Test gegenüber AFB1+S9, ihre his^+ Revertantenzahlen Mittelwerte (Ø) mit Standardabweichung (sd) von 6 Platten (2 Tests) und ihr Mutagenitäts-Index 56

Tabelle 16: Signifikante Veränderung (*TA102*) zur PK (p <0,05) der Tepalenextrakte im Ames-Test gegenüber TNFone, ihre his^+ Revertantenzahlen Mittelwerte (Ø) mit Standardabweichung (sd) von 6 Platten (2 Tests) und ihr Mutagenitäts-Index 60

Tabelle 17: Signifikante Veränderung (*TA102*) zur PK (p<0,05) der Tepalenextrakte im Ames-Test gegenüber AFB1+S9, ihre his^+ Revertantenzahlen Mittelwerte (Ø) mit Standardabweichung (sd) von 6 Platten (2 Tests) und ihr Mutagenitäts-Index 62

Tabelle 18: Singelrevertantenzahl *TA98*: TNFone, NÄ 85

Tabelle 19: Singelrevertantenzahl TA98: AFB1+S9, Narbenäste 87

Tabelle 20: Singelrevertantenzahl *TA98*: PHiP+S9, NÄ 89

Tabelle 21: Werte der Positivkontrolle für TNFone, PHiP+S9 und AFB1+S9 in *TA98*, NÄ 90

Tabelle 22: Werte der Negativkontrolle H_2O für TNFone, PHiP+S9, AFB1+S9 in *TA98*, NÄ 90

Tabelle 23: Werte der Negativkontrolle H_2O:EtOH für TNFone, PHiP+S9, AFB1+S9 in *TA98*, NÄ 91

Tabelle 24: Singelrevertantenzahl *TA98*: TNFone, Tepalen 93

Tabelle 25: Singelrevertantenzahl *TA98*: AFB1+S9, Tepalen.....95

Tabelle 26: Singelrevertantenzahl TA98: PHiP+S9, Tepalen.....97

Tabelle 27: Werte der Positivkontrolle für TNFone, PHiP+S9 und AFB1+S9 in *TA98* (Tepalen).....97

Tabelle 28: Werte der Negativkontrolle H_2O für TNFone, PHiP+S9, AFB1+S9 in *TA98* (Tepalen).....98

Tabelle 29: Werte der Negativkontrolle H_2O:EtOH für TNFone, PHiP+S9, AFB1+S9 in *TA98* (Tepalen).....98

Tabelle 30: Singelrevertantenzahl für *TA102*: TNFone NÄ.....100

Tabelle 31: Singelrevertantenzahl für *TA102*: AFB1+S9, NÄ.....102

Tabelle 32: Werte der Positivkontrolle für TNFone und AFB1+S9 in TA102, NÄ 103

Tabelle 33: Werte der Negativkontrolle H_2O für TNFone und AFB1+S9 in *TA98*, NÄ.....103

Tabelle 34: Werte der Negativkontrolle H_2O:EtOH für TNFone und AFB1+S9 in *TA98*, NÄ 104

Tabelle 35: Singelrevertantenzahl für *TA102*: TNFone Tepalen 106

Tabelle 36: Singelrevertantenzahl für TA102: AFB1 Tepalen 108

Tabelle 37: Werte der Positivkontrolle für TNFone und AFB1+S9 in *TA102,* Tepalen.....108

Tabelle 38: Werte der Negativkontrolle H_2O für TNFone und AFB1+S9 in *TA102*, Tepalen 109

Tabelle 39: Werte der Negativkontrolle H_2O:EtOH für TNFone und AFB1+S9 in *TA102*, Tepalen 109

Tabelle 40: Singelrevertantenzahl für *TA98,* NÄ, TNFone 110

Tabelle 41: Singelrevertantenzahl für *TA98,* NÄ, AFB1+S9, PHiP+S9 110

Tabelle 42: Positivkontrolle Mutagenitätstest *TA98* induziert mit TNFone, PHiP+S9, AFB1+S9, NÄ 111

Tabelle 43: Negativkontrolle *TA98*: H_2O und H_2O:EtOH gegenüber TNFone, PHiP+S9, AFB1+S9 111

Tabelle 44: Singelrevertantenzahl für *TA102*, NÄ, TNFone 112

Tabelle 45: Singelrevertantenzahl für *TA102,* NÄ, AFB1+S9 112

Tabelle 46: Positivkontrolle Mutagenitätstest *TA98* induziert mit TNFone und AFB1+S9, NÄ 113

Tabelle 47: Negativkontrolle *TA102*: H_2O und H_2O:EtOH gegenüber TNFone und AFB1+S9, NÄ 113

Tabelle 48: Singelrevertantenzahl für *TA98* Tepalen, TNFone 114

Tabelle 49: Singelrevertantenzahl für *TA98* Tepalen, AFB1+S9, PHiP+S9 115

Tabelle 50: Positivkontrolle Mutagenitätstest *TA98* induziert mit TNFone, PHiP+S9 und AFB1+S9, Tepalen 116

Tabelle 51: Negativkontrolle *TA98*: H_2O und H_2O:EtOH gegenüber TNFone, PHiP und AFB1+S9, NÄ 116

Tabelle 52: Singelrevertantenzahl für *TA102* Tepalen, TNFone 117

Tabelle 53: Singelrevertantenzahl für *TA102,* Tepalen, AFB1+S9..... 118

Tabelle 54: Positivkontrolle Mutagenitätstest *TA102* induziert mit TNFone und AFB1+S9, Tepalen 119

Tabelle 55: Negativkontrolle *TA102*: H_2O und H_2O:EtOH gegenüber TNFone und AFB1+S9, Tepalen ..... **Fehler! Textmarke nicht definiert.**

3 ABKÜRZUNGEN

2-AA	2-Aminoanthracen
AFB1	Aflatoxin B1
BHT	Butylhydroxytoluol
DC	Dünnschichtchromatographie
DMSO	Dimethylsulfoxid
DPPH	2,2-Diphenyl-1-pikrylhydrazyl
°C	Grad Celsius
ED	Wasser-Ethanol-Lösung 80:20, Dunkelinkubation des Extraktes
EDA	Enkephalin-Degrading-Aminopeptidase
EL	Wasser-Ethanol-Lösung 80:20, Inkubation des Extraktes im Tageslicht
EtOH	Ethanol
F	Flavonoide
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
his^+	Histidinunabhängigkeit
HTCC	4-Hydroxy-β-cyclocitral
IC_{50}	Mittlere inhibitorische Konzentration
L.	*Linnaeus*
LD_{50}	Mittlere letale Dosis

MI	Mutagenitäts-Index
NB	Nutrient Broth
NÄ	Narbenäste des *Crocus sativus L*.
NADP	Nicotinamidadenindinocleotidphosphat
NK	Negativkontrolle
OVNC	Overnight Culture
PhiP	2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5,-b] pyridine
PK	Positivkontrolle
PS	Polyphenolsäuren
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
S9	Rattenleber-Homogenisat
TA102	Histidin auxotropher *salmonella typhimurium* Stamm 102
TA98	Histidin auxotropher *salmonella typhimurium* Stamm 98
TNFone	2, 4, 7- Trinitro-9-Fluorenone

4 EINLEITUNG

Safran ist eines der ältesten dokumentierten Gewürze der Menschheit. Es diente im Laufe der Jahrtausende nicht nur als geschmackliche Komponente in vielen Speisen der Welt, sondern man war sich auch seiner heilenden Wirkung gegen so manches Gebrechen bewusst. Die zahlreichen sekundären Pflanzeninhaltsstoffe (Carotinoide, Flavonoide, Phenolsäuren …) dieser Krokus-Art, ihre bioaktiven Eigenschaften sowie der Wiederaufschwung des Safrananbaus in Österreich – der im Laufe der Geschichte immer wieder als qualitativ sehr hochwertig dokumentiert wurde – waren die Hauptgründe zur Durchführung dieser Studie. Das Ziel dieser *in-vitro*-Studie war, den anti-/mutagenen und anti-/oxidativen Effekt der lebensmittelrelevanten Pflanzenteile des „*Pannonischen Crocus sativus austriacus*“ (Klingenbach/Siegendorf, Bgld) im Ames-Test an zwei verschiedenen Salmonellen-Stämmen zu testen. Die Stämme sollten die möglichen anti-/mutagenen sowie anti-/oxidativen Effekte der Extrakte der Safranpflanze detektieren. Zwei im menschlichen Alltag vorkommende Mutagene, AFB1 und PHiP, wurden zur Induktion der Mutation durch externe metabolische Aktivierung in den jeweiligen Stämmen gegenüber den Extrakten eingesetzt. Als weiteres Mutagen kam TNFone zum Einsatz, ein bizyklisches Nitroaromat. Die Lösungsmittel sowie die Menge der in Lösung gebrachten Narbenäste des Safrans waren dem küchentechnischen Gebrauch angepasst. Mögliche Auswirkungen der Temperatur-Unterschiede der Lösungsmittel spielen im küchentechnischen Bereich auch eine Rolle und wurden bei der Herstellung der Extrakte berücksichtigt. Die Blütenblätter des Safrans, die Safrantepalen, sind ein in großen Mengen anfallendes Nebenprodukt der Narbenäste-Gewinnung. Diese sollten, aufgrund ihrer Verwendung als Färbemittel in der Lebensmittelindustrie, als weiterer Schwerpunkt in diese Studie mit einfließen. Ein wichtiger Hauptbestandteil der Safrantepalen sind die Flavonoide, die hier ebenfalls Beachtung finden. Der praktische Teil dieser Studie wurde in Kooperation mit einer Arbeitsgruppe durchgeführt, die sich im Zuge ihrer Diplomarbeit mit Gallenfarbstoffen beschäftigte.

5 LITERATURÜBERSICHT

5.1 Der Ames-Test

5.1.1 Allgemeines zum Ames-Test

Der Ames-Test oder *Salmonella*-Mikrosomentest wird als Kurzzeit-Bakterien-Reversions-Mutations-Test (short-term bacterial reverse mutation assay) definiert, dessen Basis sich international durchgesetzt hat (Standard Testprotokoll: Organisation for Economic Co-operation and Development). Testverfahren von Chemikalien auf ihre Mutagenität in *Salmonella typhimurium*-Stämmen basieren auf dem Wissen, dass mutagene Substanzen in Bakterien ihre Mutagenität wahrscheinlich auch in Tierversuchen zeigen, beziehungsweise im Menschen ein erhöhtes Krebsrisiko hervorrufen. Der Vorteil dieses Tests, der zur Abschätzung der Mutagenität eingesetzt wird, zeigt sich in der schnellen Vermehrung der Bakterien. Dies führt schließlich zu einer kurzen Versuchsdauer und der leichten Handhabung von Bakterien in sehr großer Zahl.

5.1.1.1 Geschichtliches zum Ames-Test

Der Ames-Test wurde nach seinem Entwickler Dr. Bruce Ames (University of California, Berkeley) benannt. Ames und Whitfield verwendeten 1966 den Spot-Ames-Test („Vorläufer“) zur Identifizierung von möglichen mutagenen Chemikalien. Dieser Test erfolgte mit Hilfe von kleinen Rundfiltern, auf die unterschiedliche Konzentrationen der möglicherweise mutagenen Substanz aufgetragen wurden. Diese Filter wurden dann auf die jeweiligen Agar-Platten (Petrischale) transferiert. Die rund um den Filter gebildete Mutantenanzahl wurde ermittelt, wobei man bei positiven Ergebnissen eine Dosis-Effekt-Kurve erhält.

1973 entwickelten Ames und Kollegen den Platten-Inkorporations-Test, der sich durch seine erhöhte Sensitivität und Quantität gegenüber dem Ames-Spot-Test auszeichnet. Der Platten-Inkorporations-Test wurde zur Grundlage dieser Studie,

um die möglichen anti-/mutagenen und anti-/oxidativen Effekte der Narbenäste- und Tepalenextrakte von Safran zu testen. [**MORTELMANS, ZEIGER**, 2000]

5.1.2 *Salmonella typhimurium*-Stämme

Im Ames-Test können spezifische *Salmonella typhimurium*-Stämme verwendet werden. Diese Stämme sind nicht pathogen und besitzen eine Deletion in einem Gen, das für die Synthese von Histidin notwendig ist. Diese Bakterienstämme können nur in einem mit Histidin angereicherten Medium wachsen. Induziert nun eine Testchemikalie eine Punktmutation, so besteht die Wahrscheinlichkeit, dass es zu einer Rückmutation in diesem Gen kommt und die Bakterien die Fähigkeit entwickeln, Histidin wieder zu synthetisieren und somit Kolonien zu bilden. Diese sichtbaren Kolonien können nur spontan oder chemisch induziert wachsen [**VOHR**, 2010].

5.1.2.1 Genotyp der verwendeten Salmonella typhimurium-Stämme

Um verschiedene Mutationen zu unterscheiden, kam es zum Einsatz von *TA98* und *TA102 Salmonella typhimurium*-Stämmen. *TA98* besitzt eine Mutation im *his*3052 und *TA102* im *his*G428 Allele.

Unter der *his*D3052-Mutation (*his*D3052 kodiert für die Histidinol-Dehydrogenase) versteht man eine -1-frameshift-Mutation, die Einfluss auf den Leseraster der nahegelegenen repetitiven GCGCGCGC-Sequenz hat. Frameshift-Mutagene wie TNFone sind zur Reversion des *his*D3052 Allele nötig [**ISONO, YOURNO**, 1974].

Rückmutationen am AT-Basenpaar des *TA102 Salmonella typhimurium*-Stammes werden durch Basenaustausch mit der Allele *his*G428 ermittelt. Die Reversion kann durch Mutagene mit Radikalcharakter und Oxidantien die Basenpaarsubstitutionen induzieren, oder durch kleinere Deletionen von drei oder sechs Basenpaaren erfolgen. *his*G428 (*TA102*) besitzt eine Ochre (Nonsens Codon)-Mutation auf dem Plasmid pAQ1, welcher zum Abbruch der RNA-Synthese führt [**LEVIN *et al*.**, 1982].

Das Plasmid pKM101 ist in den beiden Bakterienstämmen *TA98* und *TA102* vorhanden und trägt ein Ampicillin-Resistenz-Gen. Das pKM101-Plasmid erhöht durch Vermittlung der Fähigkeit, DNA Schäden in fehlerhafter Weise zu verarbeiten, die mutagene Empfindlichkeit [**MORTELMANS, ZEIGER**, 2000]. Zusätzlich besitzen die beiden Stämme zur Erhöhung der Sensitivität gegenüber Mutagenen eine *rfa*-Mutation (Steigerung der Zellpermeabilität) [**MORTELMANS, ZEIGER**, 2000]. Weiters weist der *TA98*-Stamm eine *Δuvr*B-Mutation auf, welche die Nukleotid-Exzisionsreparatur ausschaltet (führt zur vermehrten Mutagenese) [**AMES et al.**, 1973].

Stamm	Histidinmutation	andere genetische Merkmale	Art der Histidinmutation
TA98	hisD3052	rfa, ΔuvrB, pKM101	"frameshift"-Mutation
TA102	hisG428	rfa, ΔuvrB, pKM101	"nonsens" Mutation

Tabelle 1: Zusammenfassung der genetischen Merkmale des *TA98* und *TA102* Stammes

5.1.3 Metabolisches System

Der Nachteil dieser bakteriellen Methode ist, dass einige Chemikalien zur Aktivierung ihrer Mutagenität eine metabolische Aktivierung benötigen, die in den *Salmonella typhimurium*-Stämmen nicht vorhanden ist [**MORTELMANS, ZEIGER**, 2000]. Die biologische Aktivierung wurde bei dieser Studie durch Zugabe eines oxidativen Enzymsystems (S9) bewerkstelligt.

5.1.3.1 Oxidativer Metabolismus

Einige karzinogene Chemikalien, wie zum Beispiel aromatische Amine oder polyzyklische aromatische Amine müssen mit einem metabolischen System aktiviert werden, um Mutagenität aufweisen zu können. Dabei können ihre reaktiven Metaboliten direkt mit der DNA reagieren. Menschen und niedere Tiere besitzen das P450-System, welches enzymatische Aktivität aufweist und besonders in der Leber nachgewiesen wurde [**MORTELMANS, ZEIGER**, 2000].

5.1.3.2 Positiv- und Negativkontrolle

Bei jedem Test dieser Studie wurden die NK (H_2O und H_2O:EtOH-Gemisch 80:20) sowie die PK (mutagene Substanz des jeweiligen Tests) für jeden Stamm, mit oder ohne S9, durchgeführt [**MORTELMANS, ZEIGER**, 2000].

5.1.3.3 Positivkontrolle

Mutagene werden im Ames-Test bei der PK eingesetzt, um die Wirkung des S9 sowie die Effektivität der Teststämme sicherzustellen. Die Konzentration der PK sollte für jede S9-Charge ausgetestet werden, da es zu ungleichen metabolischen Aktivierungen kommen könnte [**MORTELSMANS, ZEIGER**, 2000].

5.1.3.4 Negativkontrolle (Spontanmutationsfrequenz)

Jeder *Salmonella typhimurium*-Stamm hat eine relativ konstante Anzahl an spontan gebildeten Revertanten. Geringe Unterschiede in der Anzahl sind tagesabhängig, aber auch von Labor zu Labor können Schwankungen auftreten. Die Spontanmutation kann auch bei Tests mit S9 beeinflusst werden, wie in Tabelle 2 ersichtlich ist [**MORTELMANS, ZEIGER**, 2000].

Revertantenzahl		
Stamm	ohne S9	mit S9
TA98	20-50	20-50
TA102	100-300	200-400

Tabelle 2: Spontanrevertantenzahl im Ames-*Salmonella* Test

[mod. nach: MORTELSMANS, ZEIGER, 2000]

5.2 Safran

5.2.1 Botanik und Anbau *Crocus sativus*

Laut einer Version der griechischen Mythologie wurde die Geburt des Safrans der Liebe eines wunderschönen Jünglings namens Krokus zur Nymphe Smylace

zugeschrieben. Krokus stand unter dem Schutz der Götter, jedoch war seine Angebetete die Geliebte des Götterboten Hermes. Hermes erfuhr von dieser Liebe und rächte sich an Krokus, indem er ihn in eine lila/violette Blume verwandelte, die dazu verdammt war, nur im späten Herbst zu blühen. Zu dieser Zeit gab es nä mlich keine anderen Blüten mehr, und Krokus wurde somit mit Einsamkeit bestraft [**HUNZIKER**, 2004].

Wie die griechische Mythologie schon berichtet, zählt der steril triploide *Crocus sativus* zu den typischen Herbstblühern. Die Artbezeichnung *sativus* bedeutet „angebaut“, was darauf schließen lässt, dass *Crocus sativus* nur in Kultur bekannt ist. Die Wildform des *Crocus sativus* ist vermutlich der in Griechenland beheimatete *Crocus cartwrightianus* **[TEUSCHER**, 2003]. Laut Theophrast von Eresos (370–285 v. Chr.) waren es die Griechen, die als erste den *Crocus* (*krokos* bedeutet auf Griechisch ursprünglich „Faden“) in Europa anbauten [**HUNZIKER**, 2004]. Der Safrankrokus ist eine Knollenpflanze und zählt zur Familie der *Iridaceae* (Schwertliliengewächse). Ausgepflanzt werden Tochterknollen, die im Winter an der Mutterknolle wachsen und danach abgetrennt werden [**TEUSCHER**, 2003]. Laut der Beschreibung eines österreichischen Safranbauern (Purbach am Neusiedlersee) werden die Knollen Anfang August in Reihen mit 20 bis 25 cm Abstand gesetzt und alle 10 cm eine Knolle 15 bis 17 cm tief in das aufgelockerte Erdreich eingebettet. Eine Düngung der Pflanzen wird nur in sehr geringem Maße empfohlen. Der beste Ertrag zeigte sich zwischen dem dritten und fünften Jahr nach dem Setzen. Alle sieben Jahre wird die Erde umgegraben, die Knollen müssen herausgenommen und neu gesetzt werden. Die Knollen zeigten sich nach sieben Jahren noch gesund. Unter 3000 Knollen war durchschnittlich eine angefault [**HUNZIKER**, 2004].

Die Safranpflanze – eine ausdauernde, acht bis 30 cm hohe Knollenpflanze – setzt sich aus sechs bis neun direkt aus der Knolle hervorgehenden Laubblättern, eine Blüte mit zwei Hochblättern, sechs blassvioletten Perigonblättern (Tepalen), drei Staubblättern, Griffel und drei rot-orange Narbenäste (Narbenschenkel) zusammen [**TEUSCHER**, 2003].

Ein eher selten angetroffener *Crocus sativus L.* zeigt sich auf Abbildung 1. Fünf Narbenäste und zehn Tepalen schmücken diese Safranpflanze. Im Safrandorf Mund nennt man sie „Safran-Prinzessin“.

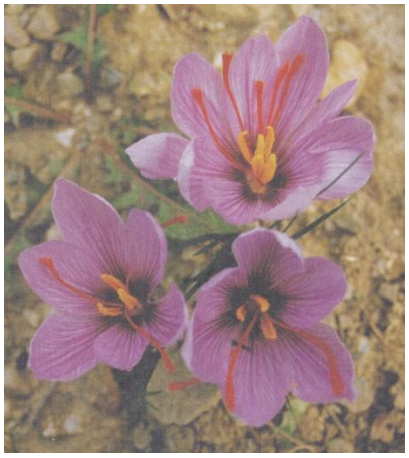

Abbildung 1: *Crocus Sativus L.*

[HUNZIKER, 2004]

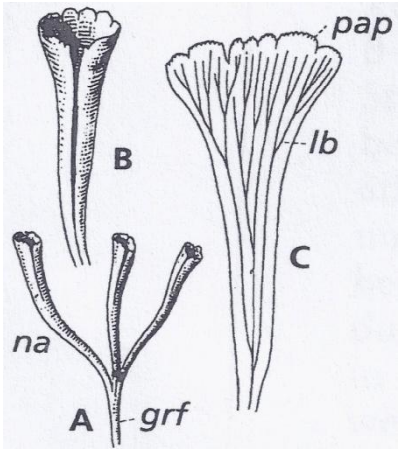

Abbildung 2: Safran. A Griffel mit 3 Narbenästen, B Narbe zusammengerollt, C Narbe ausgebreitet, lb Leitbündel, pap Papillen [TEUSCHER, 2003]

Safran ist der umgangssprachliche Begriff für die Narbenäste der Safranpflanze.

Die Ernte der Narbenäste kann nach zwei verschiedenen Methoden erfolgen:

1. Durch vorsichtiges Abdrücken des Safranpflanzenstängels und anschließender Entnahme der Narbenäste.
2. Durch direkte Entnahme der Narbenäste am Feld [**HUNZIKER**, 2004].

Die Erntezeit der Safrannarbenäste ist im Herbst, wenn sich die Blüten öffnen.

Die prozentuelle Zusammensetzung der frischen Safranpflanze lässt erahnen, dass Nebenprodukte in großem Ausmaße anfallen. Circa 80% der Safranpflanze konnten den Tepalen (Safranpflanze aus Kaschmir) zugeschrieben werden [**KAFI, SHOWKET**, 2007].

5.2.1.1 Trocknung der Narbenäste

Die sechs Hauptproduzenten von Safran verwenden drei unterschiedliche Methoden, um Safran mittels Wärmeeinwirkung zu trocknen. Iran, Indien und Marokko machen sich die Kraft der Sonne zu Nutze, bzw. trocknen bei Raumtemperatur unter belüfteten Konditionen (18–50°C). Griechenland und Italien trocknen bei Raumtemperaturen unter 45°C (relative Luftfeuchtigkeit: 45–50%), spanische Produkte werden bei 50–80°C getrocknet. Das Endresultat variiert in einem Feuchtigkeitsverlust von 80–95%.

Die unterschiedlichen Methoden der Trocknung von Safrannarbenästen (45 Proben der selben Herkunft wurden getestet) unter milden Bedingungen (18–20°C für 24 h, 40–50°C für 75 min, 55°C für 75 min), wurden auf die Gehalte der Inhaltsstoffe wie Crocetin-Ester, Picrocrocin und Safranal getestet. Es zeigte sich, dass die Crocetin-Ester bei den Proben, die mit höherer Temperatur (55°C) getrocknet wurden, nicht signifikant höhere Werte gegenüber den anderen Proben aufwiesen. Picrocrocin zeigte ähnliche Werte. Mehr flüchtige Substanzen (Safranal) entstanden auch bei 55°C, jedoch waren die Werte gegenüber den bei 40–50°C getrockneten Proben nicht signifikant unterschiedlich [**DEL CAMPO *et al.***, 2010]. Die Trocknungstemperatur/Zeit der verwendeten Proben in dieser Studie belief sich auf 50°C für 24 Stunden (Angabe von Johannes Pinteritz, Safranbauer Klingenbach).

5.2.2 Geschichte des Safrans

5.2.2.1 Geschichte des Safrans – Aktueller Stand der Wissenschaft

Ein kurzer Einblick in die medizinische Geschichte des Safrans:

Die lange Geschichte der Verwendung von Safran in der traditionellen Medizin ist in vielen Kulturen verankert. Schon im Papyrus Ebers wurde Safran als Heilmittel erwähnt. Seine regelmäßige Anwendung im medizinischen Bereich gegen Krebsleiden und depressive Verstimmungen lässt sich seit Jahrtausenden rückverfolgen [**SCHMIDT *et al*.**, 2007].

In der Traditionellen Chinesischen Medizin wurde Safran wegen seiner schmerzstillenden, beruhigenden und emetischen Eigenschaften eingesetzt. Er kam auch zum Einsatz bei menstrualen Beschwerden und Gefäßerkrankungen. Die Bedeutung als Heilmittel spiegelt sich in Yi-Lin-Ji-Yao, einem traditionellen chinesischen Medizinbuch aus dem sechzehnten Jahrhundert [**NEGBI**, 1999].

Volker Schier thematisiert in einem Bericht über die Zeit des Mittelalters den Gebrauch von Safran in Nonnenklöstern. Durch die Erforschung zahlreicher Korrespondenzen kam er zum Ergebnis, dass der Safran nicht nur in der Küche und als Färbemittel diente, sondern auch als Tonikum, Antidepressivum, stimmungssteigernde und halluzinogene Substanz zum Einsatz kam [**SCHIER**, 2010].

Diese Hypothesen wurden zum Anlass unzähliger Studien genommen.

5.2.2.2 Toxizität

Bei missbräuchlicher Verwendung als Abortivum traten Vergiftungen auf. Es wird angenommen, dass Picrocrocin oder seine Spaltprodukte dafür verantwortlich sind. Folgende Vergiftungssymptome stellen sich nach einer peroralen Aufnahme ein: Brechdurchfall, Schwindel, Hämorrhagien, besonders der Nieren als Hauptausscheidungsorgan, Schwellungen der Lippen, Lider und Gelenke und bei Schwangeren Abort. Die LD_{50} belief sich bei Mäusen bei peroraler Aufnahme bei 20 g/kg KG. Bei Menschen sind bei einer täglichen Aufnahme von 1,5 g Narbenäste keine unerwünschten Wirkungen bekannt [**TEUSCHER, LINDEQUIST**, 2009].

5.2.3 Inhaltsstoffe von Narbenästen und Tepalen des Safrans

5.2.3.1 Inhaltsstoffe der Narbenäste des Safrans

Folgende Inhaltsstoffe des Safrans sind bekannt: Ätherisches Öl, Terpene: α- und β-Pinen, 1,8 Cineol, Safranal, Picrocrocin, Hydroxysafranal, 2-Phenylethanol,

Naphthalin, Isophoron 3,5,5-Trimethylcyclohexenon und verschiedene andere Isophorone.

Carotinoide: cis- und trans-Crocine, Crocetin (α-Crocetin), Methylcrocetin (β-Crocetin), trans-Dimethylcrocetin (γ-Crocetins), α-, β-, γ-Carotin, Lycopin und Zeaxanthin.

Xanthon-Carotinoid-Konjugat, Magnicrocin (Magniferin-6`-O-(crocetyl-1```-O-β-D-glucosidester) [**TEUSCHER, LINDEQUIST**, 2009]

Sonstige Inhaltsstoffe: Riboflavin (ca. 0,01% des Trockengewichts), Thiamin (in unbedeutender Menge), 7% fettes Öl (Glycerolester der Palmitinsäure, Stearinsäure, Laurinsäure und Ölsäure), Heteropolysaccharide (ca. 5,2% Pentosane, ca. 6% Pektine) und Stärke (ca. 13%) [**BLASCHEK *et al***., 2007]

Anthocyane, Flavonoide, Phenole, Aminosäuren, Proteine, Mineralstoffe, und andere chemische Substanzen [**FERNANDEZ**, 2007].

Ungefähr 40 bis 50 Inhaltstoffe von schätzungsweise 150 flüchtigen und einigen nicht flüchtigen Komponenten der Narbenäste wurden bereits identifiziert [**CHERMAHINI *et al***., 2010].

5.2.3.2 Qualitätskriterien des Handels

Im Allgemeinen wird im Safranhandel die mit Griffelresten versehene Ware (*Crocus naturalis*) von der griffelfreien Ware unterschieden (*Crocus electus*). Bei Letzterer handelt es sich um „Safranspitzen“. [**BLASCHEK *et al***., 2007]. Die wichtigsten Qualitätskriterien im Handel beziehen sich auf die Identifizierung und Quantifizierung von Crocin-Derivaten und den Picrocrocin-Gehalt des Safrans, welcher hauptverantwortlich für seine Färbekraft ist. Aber auch die Länge der Narbenäste haben Bedeutung – eine Durchschnittslänge von 53 mm wird als hochwertig angesehen [**MADAN *et al.,*** 1966]. Die häufigsten analytischen qualitativen Nachweise der Safran-Inhaltsstoffe basieren auf kolorimetrischen Verfahren, DC Scanner, HPLC und/oder Gaschromatographie-Tests [**ZOUGAGH *et al*.**, 2005].

Im internationalen Handel wird die Definition der Qualität des Safrans hauptsächlich durch die Spezifikationen der ISO/TS 3632-2:2003 empfohlen. [**DEL CAMPO *et al*.**, 2010]. Ein hoher Griffelanteil, ausgebleichte Narbenäste, schlechte Färbekraft sowie falsch gelagerte Ware lassen Minderqualität der Safran-Narbenäste erkennen [**BLASCHEK *et al*.**, 2007].

5.2.3.3 Konzentrations-Unterschiede der Safran-Narbenäste

Elf zertifizierte Safran-Narbenäste-Proben (Ernte: 2003) aus zehn verschiedenen Ländern (Aserbaidschan, China, Griechenland, Frankreich, Indien, Iran, Italien, Neuseeland, Spanien, Türkei) und eine Probe von Sigma Chemical Company wurden in einer Studie von Caballero-Ortega *et al.* auf zehn Hauptkomponenten (Picrocrocin, HTCC, 3-Gentiobiosyl-Kaempferol, Safranal und 6 Crocetin-Ester) der getrockneten Narbenäste verglichen. Die Proben wurden mittels einer C_{18}-Umkehrphasen HPLC-Photodiodenarray-Detektor-Methode analysiert. Das Resultat brachte sehr unterschiedliche Konzentrationen zum Vorschein. Die Summe der zehn detektierten Substanzen zeigte beim griechischen Safran den höchsten Wert von 94,06 ± 0,07 mg/g NÄ. Bei dem Produkt von Sigma und dem chinesischen Safran waren Werte unter 12,5 mg/g anzutreffen. Diese Schwankungen sind sowohl auf Trocknungsprozess, Verpackungsform, Hitze und Lichteinwirkungen sowie auf die Herkunft zurückzuführen [**CABALLERO-ORTEGA *et al*.**, 2007].

In einer weiteren Studie wies der Crocetin-Ester-Gehalt von griechischen, getrockneten Safran-Narbenästen (Ernte: 2006) deutlich höhere Werte gegenüber der zuvor beschriebenen Studie (23.14 mg/100 mg Safran-NÄ) auf. Die Analyse erfolgte mittels C_{18}-Umkehrphasen HPLC [**MAGGI *et al*.**, 2011].

Ein Lagerungsversuch (Hitze, Luftfeuchtigkeit, Licht, Dunkelheit) von getrockneten Safran-Narbenästen in Bezug auf seine Färbekraft demonstrierte, dass bei höheren Temperaturen sowie erhöhter Wasseraktivität die Färbekraft des Safrans vermindert wird. Nach einer zwölfwöchigen Lagerung kam es zu einer be-

achtlichen Reduktion der Färbekraft wie auch des bitteren Geschmacks, das Aroma jedoch erhöhte sich [**BOLANDI *et al*.**, 2009].

Eine Studie über Konzentrations-Unterschiede von Safran-NÄ, geerntet auf 700 Metern und 1400 Metern Seehöhe von je drei- und sechsjährigen Pflanzen, zeigte, dass dreijährige Safran-NÄ von 1400 Metern die höchsten Konzentrationen an Crocin, Picrocrocin und Safranal aufweisen [**ZARINKAMAR *et al.*,** 2011].

5.2.3.4 Crocin und Crocetin

Farbgebende Bestandteile des Safrans sind die gelbroten, wasserlöslichen Verbindungen der cis- und trans-Carotinoide der Crocine [**WICHTL**, 2002]. Es handelt sich dabei um die β-D-Gentiobiose- bzw. β-D-Glucoseester der Polyendicarbonsäure Crocetin. [**CABALLERO-ORTEGA *et al*.**, 2007].

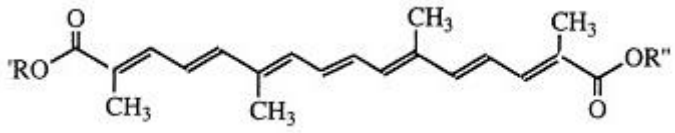

Abbildung 3: Crocetin und Glykosylester des Crocetins (all-trans-)

	R'	R''
A-Crocin	β-D-Gentibiose	β-D-Gentibiose
B-Crocin	β-D-Gentibiose	β-D-Glucose
C-Crocin	β-D-Gentibiose	-H
D-Crocin	β-D-Glucose	β-D-Glucose
E-Crocin	β-D-Glucose	-H
Dimethylcrocetin	$-CH_3$	$-CH_3$
Crocetin	-H	-H

Tabelle 3: Einige Glykosylester des Crocetins [BLASCHEK *et al.,* 2007]

Trans A-Crocin ist im Crocetin-Ester der getrockneten NÄ im Umfang von 48% enthalten und daher dominierend gegenüber den anderen Crocinen. In der Studie von Del Campo *et al*. wurden 345 Proben aus Allerwelt getestet [**DEL CAM-**

PO *et al*., 2010]. Konzentrationsunterschiede (1,9 bis 15% des Trockengewichtes) von A-Crocin und verwandte Acylglykoside werden in gelagerten Drogen (Safran-NÄ) von Lindequist und Teuscher beschrieben [**TEUSCHER, LINDEQUIST**, 2009]. In den oben angeführten Studien wurden NÄ getestet, die Crocetin-Ester-Werte um 23% des Trockengewichtes aufwiesen.

5.2.3.5 Pharmakokinetische Eigenschaften von Crocin in-vivo

Durch die einmalige orale Gabe von Crocin (A-Crocin) an Ratten (Sprague-Dawley Ratten) und gesunde Menschen (Daten nicht veröffentlicht) wurde nur dessen Metabolit Crocetin in geringen Mengen im Plasma nachgewiesen. Im Intestinaltrakt sowie in den Fäzes der Ratten konnten größere Mengen an Crocin innerhalb von 24 Stunden festgestellt werden. Durch eine weitere sechstägige Gabe von 40 mg/kg Körpergewicht pro Tag und darauffolgende Untersuchungen zeigte sich keine Veränderung im Plasma der Ratten gegenüber der einmaligen oralen Gabe. Die Resultate deuten darauf hin, dass es zu keiner Absorption von Crocin kam, weder bei einmaliger noch bei mehrmaliger Verabreichung. Die Akkumulation von Crocetin im Plasma konnte auch bei wiederholter Gabe von Crocin nicht gesteigert werden. Der Intestinaltrakt scheint dabei eine wichtige Rolle bei der Hydrolyse von Crocin zu spielen [**XI *et al*.**, 2007].

Durch eine neuntägige orale Gabe von Safran-Extrakten (100 mg/kg KG) bei Sarkom-180-tragenden Mäusen konnten erhöhte Vitamin A und β-Carotin-Serumspiegel beobachtet werden. Nach Absetzen der Safran-Extrakte waren diese Analyten rückläufig. Begründet wurde dieses Testergebnis durch den Provitamin A Charakter von Crocin [**BLASCHEK *et al*.**, 2007].

5.2.3.6 Antikanzerogene Eigenschaften von Safran-Extrakten, Crocin und Crocetin

Einige Studien belegen die krebspräventiven sowie therapeutischen Eigenschaften von Safran-Extrakten. Eine bedeutende Rolle wird dabei Crocin wie auch Crocetin zugesprochen. Die nachfolgenden Studien sollen diese Aussagen unterstützen.

Abdullaev *et al*. zeigte in einer Studie, dass sich die zytotoxische Wirkung von Safran gegen unterschiedliche tierische und menschliche maligne Zellen richtet. Zahlreiche Studien belegen diese Aussage [**ABDULLAEV *et al***., 2003].

In-vitro wurde ein Test durchgeführt, der sich mit dem zytotoxischen Effekt von ethanolisch extrahierten Inhaltsstoffen des Safrans auseinandersetzt. Die jeweiligen IC_{50}-Werte wurden an Sarkom-180 (28 µg/ml), P388-Leukämiezellen (20 µg/ml), Ehrlich-Ascites-Tumorzellen (17 µg/ml) und Daltons-Lymphomen (9 µg/ml) eruiert. Die zytotoxischen Eigenschaften höherer Safran-Extrakt-Dosen wiesen gegenüber Milzzellen aus Mäusen keine Schädigung in Form einer Zytotoxizität auf.

Tumortragende Mäuse (transplantierte Sarkom-180-, Ehrlich-Ascites- und Daltons-Lymphomzellen), die man mit Safran-Extrakten behandelte, zeigten gegenüber unbehandelten Mäusen eine etwa zwei- bis dreifach signifikant verlängerte Überlebenszeit. [**BLASCHEK *et al*.**, 2007].

In einer weiteren Studie zeigte sich, dass ethanolische Safran-Extrakte das Potenzial besitzen, Zytotoxizität in menschlichen Lungenkrebszellen (A549) zu induzieren. Um eine Zytotoxizität ausschließen zu können, wurden die Safran-Extrakte zur Kontrolle auch an gesunden Zellen (L929 Zellen) getestet. Bei zunehmend eingesetzter Extrakt-Konzentration gegenüber den malignen Zellen stieg auch die Zytotoxizität gegenüber Lungenkrebszellen. Dieser Effekt konnte an nicht malignen Zellen nicht festgestellt werden [**SAMARGHANDIAN *et al*.**, 2010].

Es gab auch Berichte über zytotoxische Effekte gegenüber Primärzellkulturen (Osteosarkom, Fibrosarkom, Ovarialkarzinom). Die inhibitorische Wirkung von Safran-Ethanol-Extrakten gegenüber dem in-vitro-Wachstum von HeLa-Zellen wurde hauptsächlich der Wirkung von Crocin zugeschrieben. Picrocrocin und Safranal spielten hierbei eine untergeordnete Rolle [**KUMAR *et al.*,** 2011].

Crocetin ist – dosis- und zeitabhängig – im Stande, Apoptose in menschlichen Magenkrebszellen einzuleiten. Eine in-vitro-Studie mit Magenkrebszellen erklärte diesen Effekt über die steigende Expression von Bax, einem pro-apoptotischen Molekül, welches als Tumorsuppressor agiert [**HOSHYAR *et al*.**, 2011].

Crocin, der Hauptinhaltsstoff von getrockneten Safran-NÄ, demonstriert Antitumor-Wirkung, besitzt inhibitorische Eigenschaften gegenüber Tumorwachstum und erhöht die Lebenserwartung von tumortragenden Tieren. Crocin wird gut vertragen und besitzt geringe bis keine Nebeneffekte. All diese Eigenschaften sowie die Wasserlöslichkeit dieser Substanz zeigen ein hohes Potenzial, um in der Krebsheilung eingesetzt zu werden [**SAMARGHANDIAN *et al*.**, 2010].

Ein großer Anteil an der protektiven Wirkung von Crocinen ist vermutlich auf ihre antioxidativen Eigenschaften zurückzuführen [**CHEN *et al*.**, 2008].

5.2.3.7 Antioxidative Eigenschaften von Crocin und Crocetin

Chen *et al.* ermittelten mittels vier verschiedenen Testformaten (Anti-Hämolyse-, DPPH·-Scavenging-, Lipidperoxidations- und Antioxidans-Aktivitätstest) die antioxidative Kapazität von A-Crocin (Crocin-1), B-Crocin (Crocin-2), C-Crocin (Crocin-3), Crocetin und Safran-Ethanol-Extrakt (SE). Crocetin und seine Ester wurden von Gardenia jasminoides ELLIS isoliert. Die Safran-NÄ-Proben stammten aus China (Chengdu, Sichuan). Die erwähnten Inhaltsstoffe offenbarten antioxidative Eigenschaften in den jeweiligen Tests [**CHEN *et al.*,** 2008].

Samples	Anti-hemolysis (equivalent ascorbic acid) mg/g	DPPH (equivalent α-tocopherol) mg/g	Lipid peroxidation (equivalent α-tocopherol) mg/g	Antioxidant activity (equivalent α-tocopherol) mg/g
Crocin-1	221	98.3	10.6	84.7
Crocin-2	452	90.8	9.65	78.2
Crocin-3	267	33.1	13.5	77.2
Crocetin	–	–	63.0	110
SE	259	107	18.1	116

Tabelle 4: Antioxidative Wirkung von Crocetin und Crocetin-Ester im Dreifachansatz (p<0,05) [modifiziert: CHEN *et al.,* 2008]

Crocin und Crocetin werden wegen ihrer Radikalfängereigenschaften zur Kryokonservierung von Spermien wegen ihrer Superoxid-Scavenger-Kapazität eingesetzt [**SAMUELSSON, BOHLEN**, 2010].

5.2.3.8 Crocin und Crocetin im Ames-Test

Testergebnisse zeigten, dass Crocin sowie Dimethyl-Crocetin, isoliert vom Safran, weder mutagene, comutagene noch antimutagene Eigenschaften im Ames-Test aufweisen [**ABDULLAEV *et al*.**, 2003].

5.2.3.9 Eigenschaften von Picrocrocin und Safranal

Durch die Abspaltung der Vorstufe Protocrocin entstehen vermutlich ein Molekül Crocin und zwei Moleküle Picrocrocin. Der bittere Geschmack des Safrans stammt vom Picrocrocin. Das deglykosylierte Derivat Safranal ist hingegen für den typischen Geschmack des Safrans verantwortlich [**SRIVASTAVA *et al*.**, 2010].

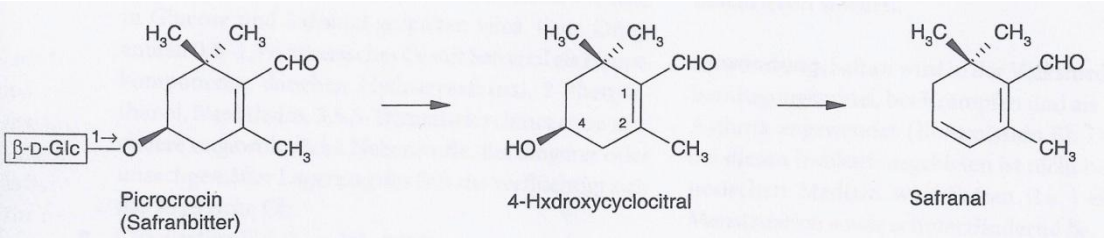

Abbildung 4: Struktur von Picrocrocin, HTCC und Safranal [HÄNSEL, STICHER, 2010]

Der Gehalt an wasserlöslichem Picrocrocin (4% beim frischen Safran, 0,4-1,3% ätherisches Öl mit Safranal – Safranal ist nur bedingt löslich in Wasser [**GONZALO *et al***., 1996] – als Hauptkomponente [**HÄNSEL, STICHER**, 2010]) nimmt ab dem Zeitpunkt der Trocknung und während der Lagerung kontinuierlich ab, der Safranal-Gehalt nimmt jedoch stetig zu. Weitere wesentliche, am Geruch des Safrans beteiligte Abbauprodukte des Picrocrocins, sind unter anderem 4-Hydroxy-β-cyclocitral bzw. 4,5-Dehydro-β-cyclocitral [**TEUSCHER, LINDEQUIST**, 2003]. Nach längerer Aufbewahrung von Safran-NÄ ist der Gehalt von Picrocrocin nicht mehr nachweisbar, weiteres verflüchtigt sich die Aroma-Komponente Safranal bei unsachgemäßer bzw. zu langer Lagerung. Der Abbau der Safran-Inhaltstoffe kann durch trockene, lichtgeschützte und kühle Lagerung stark eingeschränkt werden [**BOLANDI *et al.***, 2009].

5.2.3.10 Antikanzerogene Eigenschaften von Picrocrocin und Safranal

In einem Versuch an HeLa-Zellen gegenüber isolierten Bestandteilen von Safran (Crocetin, Crocin, Picrocrocin, Safranal) wurde die inhibitorische Dosis dieser Substanzen ermittelt, die 50% des Zellwachstums zurückhält. Bei Safranal und Picrocrocin wurden folgende Werte ermittelt: Safranal 0,8 mM, Picrocrocin 3 mM. Crocetin zeigte keine inhibitorische Wirkung. Crocin hingegen erwies sich als vielversprechendes krebstherapeutisches Mittel [**ESCRIBANO *et al*.**, 1996].

Enkephalin spielt womöglich nicht nur bezüglich Wachstum und Entwicklung von Brustkrebszellen eine Rolle, sondern auch im neuroendokrinen Bereich. Das Ziel

einer Studie war, die Auswirkungen von Picrocrocin gegenüber Ratten zu testen, denen durch N-Methyl-N-Nitrosoharnstoff Krebs induziert wurde. Bei den Wistar-Ratten, denen Picrocrocin verabreicht wurde, zeigte sich eine verminderte EDA-Aktivität gegenüber Ratten, denen diese Substanz nicht zugeführt wurde [**HEIDARZADEH *et al*.**, 2011].

Safranal, Crocetin, Dimethyl-Crocetin können durch Bindung an DNA und tRNA einen Schutz vor Reaktionen von schädlichen Chemikalien bewirken. Jedoch benötigen diese Ligand-Polynukleotid-Komplexe weitere Untersuchungen, um mögliche negative Auswirkungen der Substanzen ausschließen zu können [**KANAKIS *et al*.**, 2009]. Picrocrocin zeigte in einem Ames-Test (*TA98*) gegenüber 2-AA keine comutagenen Effekte, jedoch Safranal [**ABDULLAEV *et al.,*** 2003].

5.2.3.11 Flavonoide und Phenolsäuren der Narbenäste

Phenolsäuren der getrockneten NÄ von Safran sind: Gallussäure, Salicylsäure, Kaffeesäure, Vanillinsäure, Syringasäure. Flavonoide der getrockneten NÄ von Safran sind: Apigenin, Kaempferol, Myricetin, Naringin, Quercetin, Pyrogallol, Rutin [**KARIMI *et al*.**, 2010].

5.2.3.12 Antikanzerogene Eigenschaften von Flavonoiden (F) und Phenolsäuren (PS)

Die antikanzerogenen Effekte von Flavonoiden und Phenolsäuren wurden in-vitro und in-vivo festgestellt. Dies zeigt sich vermutlich in der hemmenden Wirkung der Kanzerogene in der Initiations- sowie in der Promotionsphase. Unterschiedliche Mechanismen der Hemmung werden diskutiert:

Hemmung der Phase-I-Enzyme (F und PS), Induktion von Phase-II-Enzymen (F und PS), Wechselwirkung mit der DNA (F und PS), Hemmung der Zellproliferation (F), Induktion des programmierten Zelltods (F), Modulation des Immunsys-

tems (F), antioxidative Wirkung (F und PS) und Wechselwirkung mit dem aktivierten Kanzerogen (PS) [**WATZL, LEITZMANN**, 2005].

Für diese Studie relevant sind die Eigenschaften von Flavonoiden und Polyphenolsäuren, die die Hemmung der Phase-I-Enzyme, die Wechselwirkung mit der DNA, die Wechselwirkung mit dem aktivierten Kanzerogen sowie die antioxidativen Eigenschaften der beiden Substanzen betreffen.

5.2.3.13 Hemmung der Phase-I-Enzyme

Bei Quercetin und Kaempferol wurde eine dosisabhängige Hemmung der Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen bei Ratten beobachtet. Jedoch hatten andere Flavonoide keine oder sogar eine aktivitätssteigernde Wirkung auf die Monooxygenasen. Kaffeesäure und Gallussäure verhinderten in einem Versuch von Stich *et al.* eine, die durch Cytochrom P450-abhängige Enzyme katalysierte, Umwandlung von AFB1 in seine kanzerogene Form [**WATZL, LEITZMANN**, 2005].

5.2.3.14 Wechselwirkung mit der DNA

Die strukturelle Ähnlichkeit der Flavonoide mit Nukleotiden ist wahrscheinlich für ihre kanzerogenen Eigenschaften verantwortlich, da sie in Wechselwirkung mit der DNA treten und so die Bindungsstelle für aktivierte Kanzerogene maskieren. Bei den Polyphenolsäuren beruht der antikanzerogene Effekt wahrscheinlich teilweise darauf, dass sie direkt mit dem aktivierten Kanzerogen eine kovalente Bindung eingehen und somit das Kanzerogen biologisch inaktiviert wird. In-vitro wurde dieser Effekt bei der Ellagsäure nachgewiesen [**WATZL, LEITZMANN**, 2005].

5.2.3.15 Antioxidative Eigenschaften von Flavonoiden und Polyphenolsäuren der Narbenäste

2010 wurde eine Studie ins Leben gerufen, die sich mit den antioxidativen Eigenschaften der getrockneten NÄ (Kashmar; Iran) sowie mit deren phenolen und flavonoiden Gehalten auseinandersetzte. Phenole und Flavonoide von Safran-NÄ wurden mittels einer Umkehrphasen-HPLC untersucht. Getrocknete NÄ, die in einer methanolischen Lösung extrahiert wurden, wiesen eine deutlich höhere antioxidative Wirkung auf, als die in Ethanol gelösten bzw. mit kochendem Wasser gewonnenen Extrakte. Jedoch verblieb die Wirkung unter den eingesetzten Standards von BHT und α-Tocopherol. Konzentrationen von Gallussäure und Pyrogallol haben laut dieser Studie eine Anteilnahme am antioxidativen Potenzial der NÄ [**KARIMI *et al*.**, 2010].

5.2.3.16 Inhaltstoffe der Tepalen des Safrans

Flavonoide: Naringenin, Naringenin-Glykoside, Quercetin, Quercetin-Glykoside, 3,3,4-Trimethoxy quercetin-7-O-di-Hex, Kaempferol, Kaempferol-Glykoside, Kaempferol-Ester, Dihydro-Kaempferol-Glykosid, Taxifolin-Glykosid, Isorhamnetin-Glykosid, Tamarixetin-caffeoyl-p-coumaroyl diester, Tamarixetin-O-kaempferol biflavonoid Hex, Myricetin-Glykosid, Rhamnetin [**BAZYLAK *et al*.**, 2011] sowie Anthocyane. Die Anthocyane in Kombination mit den Flavonoiden (Felavenoides) ergeben die violette Farbe der Safrantepalen [**KAFI M. et al.**, 2006] Monoterpen: Crocusatin, Steroide: Tribulsterin, Tribulsterin-Derivat, Phenolsäure: Sinapinsäure, Nukleosid: Adenosin und weitere Inhaltsstoffe.

Es zeigte sich in einer Studie eine starke antioxidative Kapazität der Safrantepalen, besonders in Diethylether-Extrakten. Verglichen zu den NÄ-Wasserextrakten wiesen sie ein deutlich stärkeres antioxidatives Potenzial auf. Die Tepalen sind besonders reich an Kaempferol-Aglykon, Glykoside und Ester. Alle Alkaloide der Tepalen wurden nur in der Dichlormethan-Fraktion gefunden [**TERMETZI, KOKKALOU**, 2008]. Eine erst kürzlich erschienene Studie zeigte ein extensives inhibitorisches Potenzial der Tepalenextrakte (Lösungsmittel: 70:30 Ethanol:Wasser)

gegenüber β-Carotin Oxidation (β-Carotin/Linoleat Model). Signifikante Radikalfänger-Eigenschafen der Tepalenextrakte gegenüber NO-Radikal sowie Cu^{2+}-Chelatbilder-Aktivität wurden in dieser Studie nachgewiesen.

NO agiert als zellulares Signalmolekül in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen im Körper. Im Menschen (bzw. in Säugetieren generell) hat NO einen bedeutenden Einfluss auf die Erweiterung von Blutgefäßen, Immunreaktionen, als Neurotransmitter, synaptische Plastizität und „Gedächtnis“ des Zentralnervensystems. Neben diesen Effekten spielt NO ein Rolle in pathologischen Prozessen wie Entzündungsreaktionen, Krebs, Diabetes, vaskuläre Erkrankungen, zerebraler Ischämie, Epilepsie und einigen neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer und Parkinson. NO-Scavenger stören diese pathologischen Prozesse durch die Depletion dieses Moleküls.

Redox-aktive Metalle wie Kupfer besitzen die Fähigkeit, Superoxidanion-Radikale sowie Stickstoffmonoxid in biologischen Systemen zu bilden. Diese führen, in erhöhten Mengen aufgenommen, zu oxidativem Stress, infolgedessen es zur Bildung von ROS kommt, was wiederum für DNA-Schäden, Lipidperoxidation, Proteinmodifikation und weitere Effekte verantwortlich ist [**SÁNCHEZ-VIOQUE *et al.***, 2012].

Quercetin, Kaempferol und Myricetin zeigten in einer Studie an intakten Zellen, denen ein Mutagen induziert wurde, ein dosisabhängiges, inhibitorisches Potenzial gegenüber der enzymatischen Aktivität von CYP1 [**MASTER *et al*.**, 2012]. Wichtige Substrate der Cytochrom-P450-Isoenzyme sind, z. B. für CYP1A2 (ein Isoenzym, das ausschließlich auf die Leber beschränkt ist), heterozyklische Amine (IQ, MeIQx) und AFB1 [**MARQUARDT, SCHÄFER**, 2004].

Melnyk *et al.* berichtet in seiner Studie über die Eigenschaften von Safran-Extrakten sowie ihren Inhaltstoffen in verschieden in-vivo- und in-vitro-Testsystemen. Die Auflistung beinhaltet folgende Hauptpunkte: Magen-Darm-Störungen (Ulcus-Prävention, verdauungsfördernde Eigenschaften), Anti-Krebs-Funktion (Antiproliferation und zytotoxische Eigenschaften gegenüber Tumorzellen, Tumor-Inhibition, DNA-Destabilisierung), kardiovaskuläre präventive Eigen-

schaften (Anti-Arteriosklerose-Eigenschaften, Insulin-Resistenz-Prävention), antidepressive Eigenschaften, prämenstruelles Syndrom, anxiolytische und hypnotische Effekte und nachteilige gesundheitliche Effekte (Übelkeit, Erbrechen, Uterus-Blutungen, Abort, allergische Reaktionen) [**MELNYK *et al*.**, 2010]. Es folgen laufend weitere Erkenntnisse über die Eigenschaften dieser Pflanze.

5.2.3.17 Mutagenität von Inhaltsstoffen im Ames-Test des Safrans

Quercetin und Kaempferol im Ames-Test:

In dieser Ames-Test-Studie wurden Quercetin, Kaempferol und weitere Flavonoide mit den Stämmen *TA98*, *TA100* und *TA102* auf ihr mutagenes Potenzial getestet. Es zeigten sich bei den Quercetin-Konzentrationen meist MI – Werte >2 mit S9 und ohne S9 sowie bei Kaempferol mit S9 im *TA98 Salmonella typhimurium*-Stamm. Beim *TA102*-Stamm zeigte sich eine Mutagenität bei der Konzentration von 147 nmol/Platte [**RESENDE *et al.*,**2012]. Kaempferol und Quercetin sind zwei Flavonoide, die in den Tepalen des Safrans auch anzutreffen sind [**TERMETZI, KOKKALOU**, 2008] [**BAZYLAK *et al*.**, 2011].

Table 1. Mutagenic activity expressed as the mean and standard deviation of the number of revertants/plate and the mutagenic index (MI), in bacterial strains TA98, TA100 and TA102 treated with flavonoids (quercetin, kaempferol, fisetin, luteolin, flavone, 3-hydroxyflavone, 5-hydroxyflavone, 7-hydroxyflavone, chrysin, galangin), at various doses, with (+S9) or without (−S9) metabolic activation.

Treatments		Number of revertants/plate in *S. typhimurium* strains (M ± SD) and (MI)					
		TA 98		TA 100		TA 102	
Quercetin	nmol/plate	−S9	+S9	−S9	+S9	−S9	+S9
	0.0 [a]	53 ± 8	39 ± 1	115 ± 3.5	206 ± 5	273 ± 15	248 ± 3
	12.1	81 ± 0.6 * (1.5)	136 ± 5 ** (**3.5**)	134 ± 8.5 (1.2)	320 ± 2 * (1.5)	279 ± 8 (1.0)	305 ± 1 (1.2)
	24.5	115 ± 6 ** (**2.2**)	196 ± 4 ** (**5.0**)	178 ± 6.1 (1.5)	389 ± 4 ** (1.9)	302 ± 4 (1.1)	351 ± 13 (1.4)
	49.1	172 ± 1 ** (**3.3**)	393 ± 7 ** (**10.0**)	202 ± 3.2 ** (1.7)	492 ± 5 ** (**2.4**)	331 ± 6 (1.2)	446 ± 11 ** (1.8)
	98.4	135 ± 11 ** (**2.6**)	658 ± 10 ** (**16.9**)	227 ± 2.5 ** (**2.0**)	651 ± 4 ** (**3.2**)	324 ± 3 (1.2)	471 ± 1 ** (1.9)
	147.8	197 ± 4 ** (**3.8**)	794 ± 5 ** (**20.4**)	212 ± 5.0 ** (1.8)	642 ± 5 ** (**3.1**)	310 ± 6 (1.1)	524 ± 6 ** (**2.1**)
	Ctrol+	1347 ± 51 [b]	1567 ± 47 [e]	1582 ± 102 [c]	1456 ± 67 [e]	1656 ± 89 [d]	1932 ± 93 [f]
Kaempferol	0.0 [a]	58 ± 2	39 ± 1	106 ± 4	206 ± 53	235 ± 4	248 ± 3
	14.3	54 ± 5 (0.9)	141 ± 7** (**3.6**)	131 ± 1 (1.2)	286 ± 15 (1.4)	287 ± 4 (1.2)	336 ± 8 (1.3)
	29.0	56 ± 4 (1.0)	172 ± 3** (**4.4**)	146 ± 2 (1.4)	313 ± 5 (1.5)	258 ± 6 (1.1)	367 ± 7 (1.5)
	58.0	53 ± 1 (0.9)	199 ± 8** (**5.1**)	143 ± 4 (1.3)	369 ± 4 ** (1.8)	301 ± 9 (1.3)	430 ± 5 ** (1.7)
	116.4	58 ± 2 (1.0)	205 ± 3** (**5.3**)	130 ± 6 (1.2)	384 ± 12 ** (1.9)	305 ± 9 (1.3)	418 ± 8 (1.4)
	174.7	62 ± 3 (1.1)	177 ± 4** (**4.5**)	138 ± 3 (1.3)	400 ± 18 ** (1.9)	242 ± 9 (1.0)	473 ± 13 ** (1.9)
	Ctrol+	1324 ± 61 [b]	1567 ± 47 [e]	1457 ± 53 [c]	1456 ± 67 [e]	1473 ± 119 [d]	1932 ± 93 [f]

Abbildung 5: Flavonoide im Ames-Test [modifiziert: RESENDE *et al.*,2012]

Die Ames-Studie von Abdullaev *et al*. zeigte eine Co-Mutagenität gegenüber 2-Amino-Antracen. Es wurde beobachtet, dass der Safranalgehalt beim *TA98*-Stamm für diesen Effekt verantwortlich war [**ABDULLAEV *et al*.** 2003].

6 MATERIAL UND METHODEN

6.1 Prinzip des Ames-Test

Der Ames-Test ist ein bakterieller Schnelltest, der zur Mutagenitätsuntersuchung durchgeführt wird. Verwendet werden *Salmonella typhimurium*-Stämme, die aufgrund einer Mutation in einem an der Histidinbiosynthese beteiligten Gens nicht in der Lage sind, ohne Histidin zu wachsen. Durch die Zugabe von bestimmten Mutagenen (in dieser Studie: TNFone, PhiP+S9, AFB1+S9) kommt es zu einer Rückmutation der verwendeten histidinauxotrophen *Salmonellen typhimurium*-Stämmen, die in der erhöhten Anzahl der Revertanten ersichtlich war.

Dieses Testsystem wurde ausgewählt, um die antimutagenen Effekte von Safran-Extrakten zu ermitteln. Für die Analysen kamen die Bakterienstämme *TA98* sowie *TA102* zur Verwendung. Die Vorlage zur Durchführung der Tests lehnte sich an den Platten-Inkorporationstest an, der von Bruce Ames 1973 entwickelt wurde [**MARON, AMES**, 1973]. Zur Sicherstellung, dass die Safran-Extrakte kein mutagenes Potenzial zeigen, wurde zusätzlich ein Mutagenitätstest durchgeführt.

6.2 Präparation der Lösungen für den Ames-Test

6.2.1 Ampicillin Lösung

0,2 g Ampicillin wurde in ein verschließbares Plastikröhrchen eingewogen und mit 25 ml 0,2N Natriumhydroxid durchmischt. Danach wurde die Lösung mit einem aseptischen Filter filtriert. Die Haltbarkeit der Ampicillin Lösung war auf zwei Wochen bei 4°C definiert.

6.2.2 Tetracyclin Lösung

80 mg Tetracyclin wurde in einem verschließbaren, 10 ml Plastikröhrchen mit 0,2N HCl gut gemischt und danach aseptisch filtriert. Die Haltbarkeit der Lösung betrug zwei Wochen bei 4°C.

6.2.3 Glucose Lösung (40%)

400 g Glucose wurde in 1000 ml kochendem, deionisiertem H_2O gelöst. Vor jeder Anwendung erfolgte das Autoklavieren dieser Lösung. Diese Glucose-Lösung (40%) lagerte bei 4ºC.

6.2.4 Glucose-6-Phosphat Lösung (304 mg/ml)

Es folgte die Lösung von 1 g Glucose-6-Phosphat in 3.289 ml deionisiertem H_2O. Diese Lösung wurde mittels eines aseptischen Filters sterilisiert und in 1 ml Portionsgrößen bei -20°C aufbewahrt.

6.2.5 Histidin-Biotin Lösung

30,9 mg D-Biotin sowie 24 mg L-Histidin wurden jeweils separat mittels Wägeschiffchen eingewogen und danach in eine 250 ml Pyrex-Flasche transferiert. Diese wurde mit 250 ml deionisiertem H_2O aufgefüllt. Vor jeder Benutzung wurde die Lösung sterilisiert. Lagerungstemperatur war bei 4°C

6.2.6 Histidin Lösung

250 mg Histidin wurde in 50 ml deionisiertem H_2O gelöst. Nach aseptischer Filtration fand die Lagerung dieser Lösung bei 4°C statt.

6.2.7 Biotin Lösung

6,1 mg D-Biotin wurden mit 50 ml deionisiertem Wasser vermischt. Die Lagerung erfolgte nach aseptischer Filtration bei 4°C.

6.2.8 Nutrient Broth, Overnight Culture

In eine 250 ml Pyrex-Flasche mit Schraubverschlusskappe wurden 5 g NB No.2 eingewogen und anschließend auf 200 ml mit deionisiertem H_2O aufgefüllt. Nach Verschließen der Pyrex-Flasche wurde der Schraubverschluss mit Aluminiumfolie (+ Indikatorpapier) versehen und autoklaviert. Nach Abschluss des Sterilisationsprozesses wurde die NB unter dem Laminar mit den dafür nötigen Antibiotika versetzt. Folgende Technik fand Anwendung:

Man überführte mittels einer Messpipette je 12 ml NB in zwei sterile 100 ml Erlenmeyerkolben. Die Beisetzung der Antibiotika war für jeden Stamm unterschiedlich. *TA 98* Stamm erfordert 625 µl Ampicillin, *TA 102* Stamm 625 µl Ampicillin und 156 µl Tetracyclin. Die jeweiligen Salmonellen-Stämme wurden mit einer Plastiköse in die dafür vorgesehenen Erlenmeyerkolben transferiert, die zum Abschluss mit Watte und Aluminiumfolie verschlossen wurden. Die NB wurde für zwölf Stunden bei 37°C auf einer Rüttelplatte inkubiert.

6.2.8.1 Herstellung von zwei Master Plates

3,2 g Oxoid Agar wurden in eine 250 ml Pyrex-Flasche eingewogen und mit deionisiertem H_2O aufgefüllt. Nach Autoklavierung der Lösung kamen unter sterilen Bedingungen (Laminar Flow) 4,3 ml Vogel-Bonner- als auch 10,8 ml Glucose-Lösung hinzu. Weiters wurden 2,17 ml Histidin- und 1,3 ml Biotin-Lösung zugesetzt. Um die Komponenten gut zu lösen, war ein Schwenken der Pyrex-Flaschen nötig. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt war, wurde die erforderliche Menge an Antibiotika für die jeweiligen Salmonellen-Stämme hinzu pipettiert.

Salmonellen Stamm	Antibiotika
TA98	625 µl Ampicillin
TA102	625 µl Ampicillin
	156 µl Tetracycline

Tabelle 5: Stammspezifische Antibiotika für die Herstellung

Die zugesetzten Antibiotika verteilte man mittels Schwenken dieser Lösung; anschließend kam es zur Abfüllung in sterile Petrischalen. Die Füllhöhe der Petrischalen betrug circa 1 cm. Nach 24-stündiger Lagerung wurde der Bakterienstamm aus der OVNC mittels Plastikösen gitterförmig auf die Petrischalen aufgetragen. Nach Abdeckung der Petrischalen musste eine Inkubationszeit von 48 Stunden bei 37ºC berücksichtigt werden. 48 Stunden später wurden die Master Plates mit einem Klebeband versiegelt und lagerten bei 4ºC.

Haltbarkeit der Master Plates: *TA98* bis zu 2 Monate

TA102 bis zu 2 Wochen

6.2.9 $MgCl_2$/KCl Lösung

40,7 g $MgCl_2$ sowie 61,5 g KCl wurde in 500 ml deionisiertem H_2O gelöst. Anschließend erfolgte die Sterilisation im Autoklaven.

6.2.10 Minimal Glucose Agar (Platten)

In je einen 1000 ml Erlenmeyerkolben kamen 11,25 g Agar No.1 (Oxoid). Danach wurde auf 700 ml mit deionisiertem H_2O aufgefüllt. Die Öffnungen der Erlenmeyerkolben wurden mit Watte und Aluminiumfolien verschlossen. Ein Kolben wurde stets mit einem Autoklavierband mit Indikatorfunktion versehen. Die Lösungen wurden zusammen mit der Vogel-Bonner- und der Glucose-Lösung autoklaviert. In der Zwischenzeit wurden sterile Petrischalen in 5er Stapeln, mit dem Deckel nach oben, auf die desinfizierte Laborarbeitsfläche platziert.

Nach Beendigung des Autoklaviervorgangs folgte das Überprüfen des Autoklavierbandes mit Indikatorfunktion. Danach kamen die Lösungen so rasch wie möglich unter den Lamina Flow, wo 15 ml Vogel-Bonner hinzugegeben wurde und nach gutem Schütteln 37,5 ml Glucose-Lösung in den mit Agar No. 1 (Oxoid) und H_20 gefüllten Kolben überführt. Die Lösungen in den Erlenmeyerkolben wurden vor dem Eingießen in die vorbereiteten Petrischalen noch einmal gut durchgeschüttelt. Nach dem Anheben des Deckels der Petrischale konnte deren Boden etwa 0,5 cm hoch angefüllt werden. Der Deckel wurde so rasch wie möglich wieder aufgesetzt. Dieser Vorgang erfolgte mit allen Petrischalen. Nach einer Trocknungsperiode von zwölf Stunden wurden die Petrischalen in saubere Plastiktüten verpackt, nach Möglichkeit luftdicht verschlossen und bei 4°C aufbewahrt.

6.2.11 NADP Lösung

1 g NADP wurde in 14,814 ml deionisiertem H_2O gelöst. Anschließend folgte die Sterilisation dieser Lösung mittels eines aseptischen Filters. Die Aufbewahrung zu jeweils 1 ml dieser Lösung erfolgte in Kryoröhrchen bei -20°C.

6.2.12 Herstellung des S9-Mix

Da zwei der eingesetzten Mutagene (Aflatoxin, PhiP) ihre mutagene Wirkung erst durch Zugabe fremdstoffmetabolisierender Säugerenzyme erlangen, wurde ein in der Regel häufig angewendetes metabolisierendes System, der S9-Mix, eingesetzt:

19,75 ml steriles, deionisiertes H_2O, 25 ml PBS Puffer (ohne Ca und Mg), 1 ml MgCl2/KCl Lösung, 2 ml NADP Lösung, sowie 250 µl Glucose-6-Phosphat-Lösung wurden im Zuge der Herstellung in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Das Rattenleber-Homogenisat (S9) wurde der Lösung als Letztes zugegeben. Die Lösung erfuhr danach in einem Behälter mit Crushed-Ice Abkühlung. Aufgrund der Empfindlichkeit der Enzyme beschränkte sich die Verwen-

dungsdauer des frisch hergestellten S9-Mixes auf maximal 60 Minuten. Ein hergestellter S9-Mix konnte für circa 100 Platten eingesetzt werden.

6.2.13 Top Agar

1,2 g Oxoid Agar ebenso wie 1 g NaCl wurden in eine 250 ml Pyrex-Flasche eingewogen. Vor jedem Test wurde diese Pyrex-Flasche mit 200 ml deionisiertem H_2O aufgefüllt und im Autoklaven sterilisiert. Bevor der Top Agar eingesetzt wurde, kamen 20 ml Histidin-Biotin-Lösung (ebenfalls steril) hinzu. Um das vorzeitige Stocken der Agar-Lösung zu verhindern, wurde die Pyrex-Flasche mit der Lösung in ein 55°C vorgeheiztes Wasserbad überführt.

6.2.14 Vogel-Bonner Lösung

Folgende Chemikalien wurden der Reihe nach in 45°C deionisiertem H_2O gelöst:

10 g Magnesiumsulfat, 100 g Citronensäuremonohydrat, 500 g Kaliumphosphat dibasisch und 175 g Natrium-Ammonium-Phosphat. Vor jeder Anwendung war diese Lösung zu autoklavieren und bei 4°C zu lagern.

Substanz	Abkürzung	Hersteller	Bestellnr.	Verwendung
2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazol [4,5,-b] pyridine	PhiP	Toronto Research Chemicals	A617000	Positiv Kontrolle
Aflatoxin B1	AFB1	Sigma	A6636	Positiv Kontrolle
2,4,7,-Trinitro-9-fluorenone	TNFone			Positiv Kontrolle
Agar No I		Oxoid	LP011P	Platten,Top Agar
L-Histidine	$C_6H_9N_3O_2$	Sigma	H8125	MP, Top Agar
Ampicillin Trihydrate		Sigma	A6140	MP, OVNC
D-Biotin	$C_{10}H_{16}N_2O_3S$	Sigma	B4639	MP

Dimethylsulfoxide	DMSO	Sigma	D5879	Ausgleichsvolumen
D-Glucose	$C_6H_{12}O_6$	Sigma	G8270	MG Agar
Glucose-6-Phosphat	Glu-6-P	Sigma	G7250	S9-Mix
Kalium Chlorid	KCl	Sigma	P5405	S9-Mix
Kalium Phosphat dibasisch	K_2HPO_4	Sigma	P3786	Vogel-Bonner Lösung
Magnesium Chlorid	$MgCl_2. 6H_2O$	Sigma	M9272	S9-Mix
Magnesiumsulfat	$MgSO_4. H_2O$	Sigma	M 9397	Vogel-Bonner Lösung
Nutrient Broth No.2		Oxoid/ Bertoni	CM067B	OVNC
Natrium Ammoniumphosphat	$Na_2NH_2PO_4$ $4H_2O$	Sigma	S9638	Vogel-Bonner Lösung
Natrium Chlorid	NaCl	Sigma	S5886	Top Agar
Nicotinamidadenin dinucleotid	NADP	Sigma	N0505	S9-Mix
Natrium Hydroxid	NaOH	Sigma	O6203	Ampicillin Lösung
Dulbecco´s Phosphate buffered Saline	PBS	PAA Laboratories	H15002	Preinkubation, S9-Mix
Rattenleber-Homogenat	S9	Biomedical/ICN	50412	Inkorporationstest mit S9-Mix
Tetracyclinhydrochlorid		Sigma	T3383	MP, OVNC
Citronensäuremonohydrat	$C_6H_8O_7. H_2O$	Sigma	C1909	Vogel-Bonner Lösung

Tabelle 6: Chemikalien und Medien

6.3 Extraktherstellung der Narbenäste und Tepalen

Als Proben wurden NÄ sowie Tepalen einer dreijährigen Pflanze (2009) des österreichischen Safrans („*Crocus sativus austriacus"*) verwendet. Aufgrund der schlechten Ernteverhältnisse und der dadurch verzögerten Ernte wurden für den *TA98* gegenüber TNFone NÄ des Jahres 2008 (gelagert bei -18°C im Dunkeln) verwendet. Als Lösungsmittel kamen deionisiertes Wasser sowie eine Mischung aus deionisiertem Wasser und Ethanol (99,8%) im Verhältnis von 80:20 zum Einsatz. Die Lösungsmittel wurden gewählt, um den küchentechnisch gebräuchlichen Einsatz nachzustellen. Bei den Wasserextrakten wurde H_2O in unterschiedlichen Temperaturen verwendet: Raumtemperatur, 40°C, 70°C, 90°C. Bei allen Ethanol-Extrakten belief sich die Temperatur des Lösungsmittels im Raumtemperaturbereich.

6.3.1 Einwaage und Stockherstellung der Narbenäste und Tepalen

Einwaage NÄ:

20,01 mg der getrockneten (50°C, 24 Stunden mit Umluft) NÄ wurden mittels Mikrowaage in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen. In einen kleinen Kochtopf mit Leitungswasser wurde ein Becherglas mit deionisiertem Wasser gegeben. Zunächst folgte die Entnahme von 3 ml dieses Wassers mit einer Pipette und die Hinzufügung zum Röhrchen RT. Der Kochtopf kam danach auf eine kleine Herdplatte. Die Temperatur im Becherglas wurde mittels eines Thermometers überprüft. Beim Erreichen der jeweiligen Temperaturen (40°C, 70°C, 90°C) wurden je 3 ml des deionisierten Wassers in die dazugehörigen beschrifteten 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Bei der EtOH-Probe wurde das Wasser-Ethanol-Gemisch (80:20) hinzugefügt. Anschließend wurden die Röhrchen verschlossen und 24 Stunden im Dunkeln inkubiert.

Einwaage Tepalen:

Je 150 mg der 48 Stunden gefriergetrockneten Tepalen wurden in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Einwaage erfolgte wie bei den Narbenästen mittels einer Mikrowaage. Die jeweiligen Lösungsmittel (6 ml) wurden gleich wie die NÄ-Extrakte transferiert. Die Temperatur des deionisierten Wassers belief sich auf Raumtemperatur, 40°C, 70°C und 90°C. Von den beiden Röhrchen, die für das Wasser-Ethanol-Gemisch (80:20) vorgesehen waren, wurde eines im Tageslicht für 24 Stunden inkubiert. Das zweite Röhrchen wurde wie die übrigen Wasserextrakte behandelt und für 24 Stunden im Dunkeln inkubiert.

Nach Inkubation wurden die Röhrchen nach einem Schwenkvorgang sterilfiltriert (45 µm-Filter). Dieser Vorgang geschah mit je einer sterilen Kunststoffspritze, in die die Lösung aufgezogen und durch einen sterilen Filter in ein braun gefärbtes Eppendorf-Cup gepresst wurde. Die Aufbewahrung der Stocklösungen erfolgte bei 4°C im Kühlschrank.

6.3.2 Bakterien-Stämme

Durch den Einsatz von zwei unterschiedlichen *Salmonella typhimurium*-Stämmen – *TA98* und *TA102* – sollten die anti-/mutagenen und anti-/oxidativen Eigenschaften der NÄ- und Tepalenextrakte getestet werden. Der Grund für die Anwendung zweier verschiedener Stämme war die unterschiedliche Reaktion auf die Proben. Rückmutationen des *TA102* Stammes können von Mutagenen mit Radikalcharakter und Oxidantien verursacht werden. Der *TA98*-Stamm gibt über Mutagene Auskunft, die Frameshifts erzeugen [**MARON, AMES** 1983].

6.3.3 Mutagene der Positivkontrolle

Um die mutagenen Eigenschaften der eingesetzten Substanzen auf die *Salmonella typhimurium*-Stämme (Revertantenzahl) zu ermitteln [**MORTELMANS ZEIGER**, 2000], wurden bei jedem Test drei (Proben wurden hier nicht zugesetzt) Positivkontrollplatten im Ames-Test eingesetzt. 2, 4, 7-Trinitrofluorenon

(TNFone), 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4,5.-b] Pyridine (PhiP) und Aflatoxin B1 (AFB1) kamen als PK sowie bei den Antimutagenitätstests zur Anwendung. PhiP und AFB1 wurden mit S9 (Rattenleber-Homogenisat) getestet, da sie sonst keine mutagene Aktivität aufweisen würden.

TNFone ist ein nichtplanares, polyzyklisches Nitrosamin, das als Druckereichemikalie eingesetzt wird. Im Ames-Salmonella-Test zeigt es Mutagenität mit und ohne metabolische Aktivierung [**KARI**, 1992].

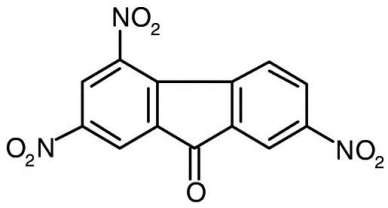

Abbildung 6: Struktur von TNFone [MUNTEANU *et al*., 2004]

PhiP ist ein heterocyclisches Amin, zu finden in gegartem Fleisch, Fisch und Geflügel, unter Kondensation von Kreatinine mit Aminosäuren, das sich während der Zubereitung bei hohen Temperaturen bildet. PhiP ist das am häufigsten vorkommende heterocyclische Amin in Nahrungsmitteln und erhöht vermutlich das Risiko, an Brust- oder Magenkrebs zu erkranken [**Report on Carcinogens**, 2011]. Die spontan als Zerfallsprodukte entstehenden Nitreniumionen gelten als die eigentlichen, reaktiven elektrophilen Spezies (Abb. 7) [**MARQUARDT, SCHÄFER**, 2004].

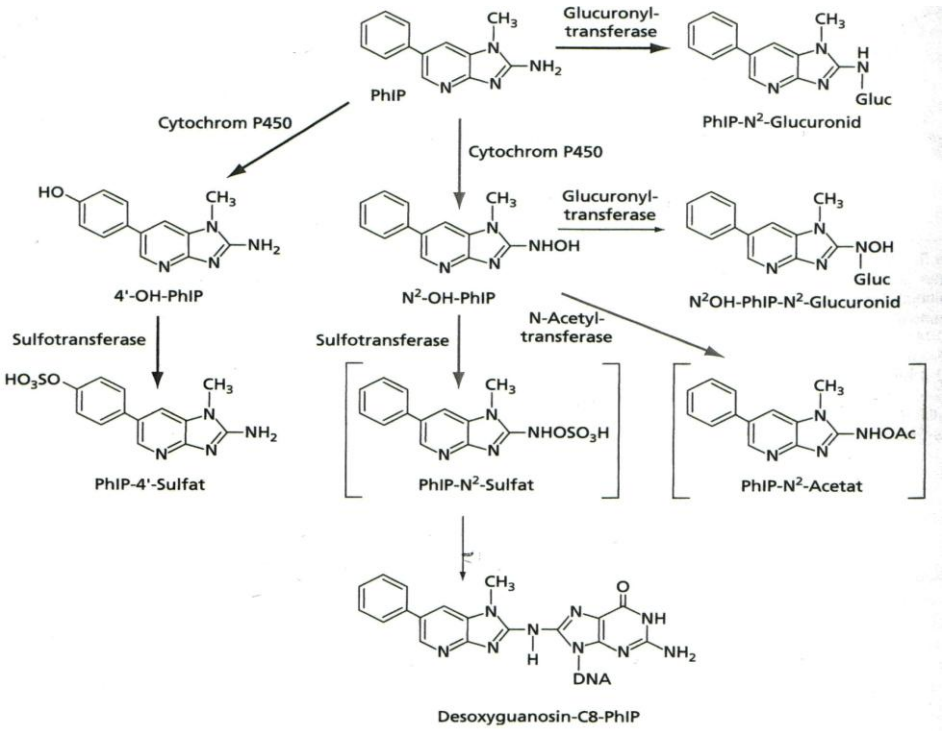

Abbildung 7: Metabolismusweg von PHiP [MARQUARDT, SCHÄFER, 2004]

Aflatoxine sind Substanzen, die zur Klasse der Mykotoxine zählen. Sie werden in einigen Lebens- und Futtermitteln gefunden. Gebildet werden diese sekundären Metaboliten vor allem von Schimmelpilzen der Gattung *Aspergillus flavus* und *Aspergillus parasiticus* [**STROKA**, 2000]. Diese Verbindungen sind toxisch, mutagen und karzinogen. Unterschiedliche Typen von Aflatoxinen mit unterschiedlichen karzinogenen Potenzialen sind bekannt. Zahlreiche weitere entstehen durch die Biotransformation im menschlichen bzw. tierischen Organismus [**TEUSCHER, LINDEQUIST**, 2009], wobei AFB1 als das für den Menschen Potenteste gilt [**DIEKMAN, GREEN**, 1992].

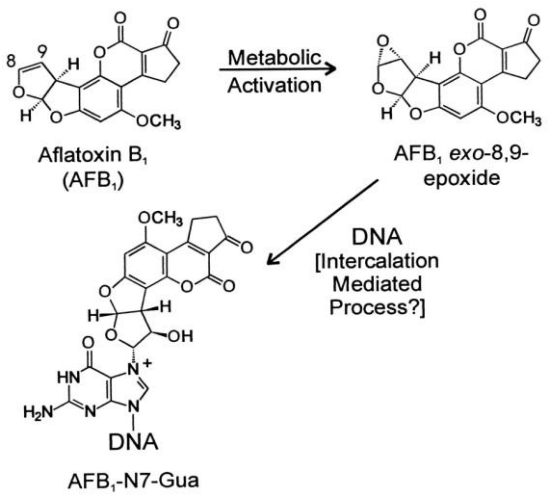

Abbildung 8: Metabolische Aktivierung von AFB1 sowie das gebildete DNA-Addukt [KOBERTZ et al. 1997]

Um den Effekt der Safranextrakte gegen die Genotoxizität von TNFone, PhiP+S9, AFB1+S9 zu untersuchen, wurden diese in den jeweiligen Tests induziert.

Salmonellen Stamm	ohne S9	mit S9
TA98	TNFone [0,0001 mg/ml]	PhiP [0,1 µmol/ml]
		AFB1 [5 µg/ml]
TA102	TNFone [0,07 mg/ml]	AFB1 [120 µg/ml]

Tabelle 7: Verwendete Mutagene im Ames-Test

6.3.4 Negativkontrolle

Bei allen Tests liefen zwölf Negativkontrollplatten mit. Sechs Platten überprüften die spontane Mutation von *TA98* und *TA102* mit dem Zusatz von deionisiertem Wasser. Bei den anderen sechs Platten folgte, um die spontane Mutation der *Salmonella typhimurium* zu dokumentieren, die Einsetzung eines Gemisches aus deionisiertem Wasser und Ethanol (99,8%) im Verhältnis 80:20.

6.4 Testverfahren

Der durchgeführte Antimutagenitätstest diente dazu, die möglichen antimutagenen Effekte von NÄ- und Tepalenextrakten gegenüber TNFone, PhiP+S9 und AFB1+S9 zu testen.

6.4.1 Herstellung der Verdünnungsreihe aus den Stocklösungen

Zur Verdünnung der Stocklösungen (NÄ: RT, 40°C, 70°C, 90°C, EtOH; Tepalen: RT, 40°C, 70°C, 90°C ED, und EL) beziehungsweise zur Herstellung der Verdünnungsreihe wurde deionisiertes Wasser verwendet. Folgende in den Tabellen Nr. 8 und 9 ersichtlichen Konzentrationen (NÄ: 6,667 mg/ml, 3,335 mg/ml, 1,667 mg/ml, 0,352 mg/ml, Tepalen: 25 mg/ml, 12,5 mg/ml, 6,25 mg/ml) wurden für den Einsatz im Ames-Test für Tepalen und NÄ hergestellt.

Verdünnungsreihen:

Verdünnungsreihe Tepalen-Extrakte			
[mg/ml]	Stocklösung	H_2O dest.	[mg/Platte]
25	1,5 ml	-	5
12,5	0,75 ml	0,75 ml	2,5
6,25	0,375 ml	1,125 ml	1,25

Verdünnungsreihe Narbenäste-Extrakte			
[mg/ml]	Stocklösung	H_2O dest.	[mg/Platte]
6,667	1,5 ml	-	1,33
3,333	0,75 ml	0,75 ml	0,67
1,666	0,375 ml	1,125 ml	0,33
0,346	0,078 ml	1,422 ml	0,07

Tabelle 8: Verdünnungsreihe NÄ-Extrakte und Tepalenextrakte

6.4.2 Antimutagenitäts/Antioxidativitäts-Test

Eine wichtige Voraussetzung unseres Testsystems war die Arbeit unter sterilen Bedingungen. Dies war nur im Bereich des desinfizierten Laminar Flow gegeben. Die für den Test notwendigen Utensilien wurden vor dem Einbringen in den Laminar Flow mit einer 70% Ethanollösung besprüht.

Der Ablauf des Tests erfolgte folgendermaßen: 500 µl PBS-Puffer oder 500 µl S9-Mix, 100 µl OVNC, 100 µl der mutagenen Lösung für alle Positivkontrollen sowie Proberöhrchen als auch 100 µl der Negativkontrolllösung für die Negativ-

kontrollen, ebenso ein Ausgleichsvolumen von 200 µl PBS-Puffer für Positiv- und Negativkontrolle wurden in ein steriles Reagenzglas pipettiert. Der letzte Schritt war die Zugabe von 200 µl der Probe (dies erfolgte nicht in den NK und PK Röhrchen). Ab der ersten Zugabe der Probe wurde ein Countdown von 25 Minuten mittels einer Stoppuhr gestartet. Nach Abschluss der Beigabe aller Proben stellte man die Eprouvettenständer plus Röhrchen bei 37ºC auf einen Rüttler (55 rpm), für die restliche Zeit in den Inkubator.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Proben unter den Laminar Flow überführt und mit 2 ml Top Agar, Biotin- und Histidinlösung versetzt. Bevor deren Inhalt auf die Oberfläche des Minimal-Glucose-Agar der jeweiligen, beschrifteten Platte kam, wurden die Röhrchen im Vortex durchgemischt. Nach gleichmäßiger Verteilung (leichtes Schwenken der Petrischale) der Flüssigkeit wurden die Platten verschlossen. Die Platten trockneten 20 bis 25 Minuten unter sterilen Bedingungen, bevor sie 48 Stunden bei 37°C mit der Agar-Oberfläche nach oben inkubiert wurden.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Platten mittels einer Lichtquelle manuell ausgezählt. Die Zählung erfolgte mittels eines feinen Stifts, mit dem man die Bakterien auf der Deckeloberseite markierte. Als Hilfsmittel kam ein Zähler zum Einsatz. Die ermittelten Daten wurden dokumentiert und in späterer Folge für die statistischen Berechnungen verwendet. Jede Platte wurde auf Anzeichen möglicher Toxizität überprüft, wie Wegfall beziehungsweise die Verkleinerung des Hintergrundrasens oder Reduktion der Spontanrevertantenzahl. Im Zuge dieser Studie konnte keines dieser Anzeichen dokumentiert werden. [**MORTELMANS, ZEIGER**, 2000].

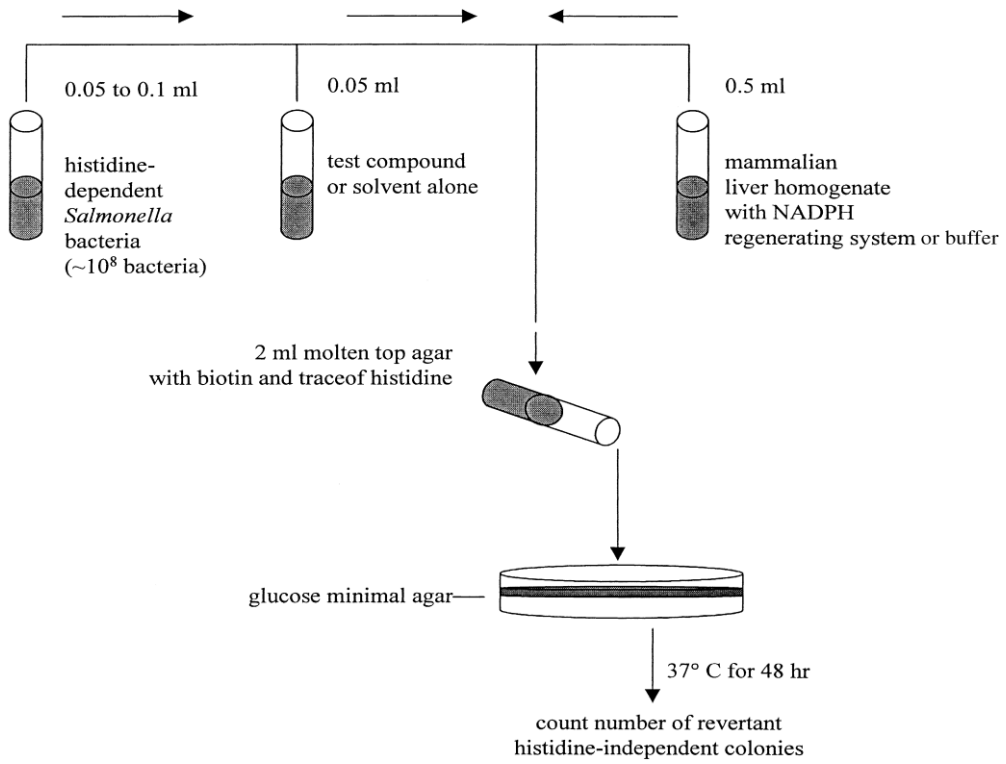

Abbildung 9: Überblick über die Durchführung, Standard-Platten-Inkorporationstest [MORTELMANS, ZEIGER, 2000]

6.4.3 Mutagenitätstest

Dieser Test sollte die Mutagenität der getesteten Safranextrakte ausschließen. Jeweils die höchste und die niedrigste Konzentration der Extrakte wurden eingesetzt. Bei den NÄ-Extrakten kamen folgende Konzentrationen zum Einsatz: 1,33 mg/Platte, 0,07 mg/Platte, bei den Tepalenextrakten verwendeten wir die Konzentrationen 5 mg/Platte sowie 1,25 mg/Platte. Jeder der Tests inkludierte drei Positivkontrollen und sechs Negativkontrollen. Die Tests wurden mit und ohne metabolische Aktivierung durchgeführt.

Positivkontroll-Röhrchen

Folgende Substanzen wurden zusammengemischt:

- 500 µl PBS Puffer oder S9-Mix
- 100 µl Histidin-abhängige Overnight-Culture-Bakterien

- 100 µl der entsprechenden mutagenen Substanz
- 200 µl PBS Puffer

Negativkontroll-Röhrchen

Folgende Substanzen wurden zusammengemischt:

- 500 µl PBS Puffer oder S9-Mix
- 100 µl Histidin-abhängige Overnight-Culture-Bakterien
- 100 µl deionisiertes H_2O oder deionisiertes H_2O-Ethanol-Gemisch
- 200 µl PBS Puffer

Proben-Röhrchen

Folgende Substanzen wurden zusammengemischt:

- 500 µl PBS Puffer oder S9-Mix
- 200 µl Safran-Extrakt

6.5 Auswertungsverfahren des Ames-Tests

6.5.1 Nicht statistische Auswertung

Die nicht statistische Auswertung erfolgte über den Mutagenitäts-Index (MI), der folgendermaßen berechnet wurde:

$$MI = x_1/x_0$$

x_1 ist die Revertantenzahl beim Einsatz der jeweiligen Extrakte sowie der Positivkontrolle.

x_0 ist die Revertantenzahl der jeweiligen, korrespondierenden Kontrolle.

Eine Testsubstanz wurde als mutagen bzw. comutagen bezeichnet, wenn die Anzahl der his^+ Revertanten zumindest doppelt so hoch wie die Werte der kor-

respondierenden Kontrolle (PK) war (MI>2), und ebenfalls eine Dosisabhängigkeit demonstrierte [**ABDULLAEV FI *et. al.*,** 2003].

6.5.2 Statistische Auswertung

Die Auswertung der Testergebnisse erfolgte mittels Microsoft Excel 2007 und SPSS 17.0. In den Excel-Tabellen wurden alle Daten der Auswertungen dokumentiert. Die Mittelwerte von zwei unabhängigen Tests pro Konzentration und unterschiedlicher Extraktherstellung wurden mit den jeweiligen PK (100%) verglichen und in Verhältnis zu dieser gesetzt. In den Mutagenitätstests kam es zum Einsatz der Negativkontrolle (100%), welche in Relation zu den jeweiligen, getesteten Extrakten gesetzt wurde. Diese zuvor beschriebenen Daten dienten zur grafischen Darstellung, Erstellung einer Trendlinie (Trend-/Regressionstyp: linear) und Ermittlung des R^2 (Bestimmtheitsmaß), das die Stärke der Korrelation aufzeigt.

Um die verschiedenen Extrakt-Fraktionen miteinander vergleichen zu können, folgte die Eruierung über die Regressionsgerade bei der Konzentration 0,7 mg/Platte bei den NÄ und 3 mg/Platte bei den Tepalen in Relation zu der PK (100%).

Zur Analyse der statistischen Signifikanz der Daten kam SPSS 17.0 zur Anwendung. Das Signifikanz-Niveau wurde mit $p<0,05$ festgesetzt. Weiters folgte die Überprüfung der Daten auf Normalverteilung mittels K-S-Test (Kolmogorov-Smirnov-Test). Damit konnte sichergestellt werden, dass alle Daten normalverteilt waren. Um zu ermitteln, ob es signifikante Unterschiede der Positivkontrollen bzw. Negativkontrollen zu den getesteten Safranextrakten gab, wurde die ANOVA mit dem Post-Hoc-Test Scheffe verwendet.

7 RESULTATE UND DISKUSSION

7.1 Antimutagenitätstest TA98 Narbenäste

7.1.1 Mutagenität induziert durch TNFone, *TA98* Narbenäste

Die NÄ wurden auf ihr antimutagenes Potenzial gegenüber TNFone getestet. Die TNFone-Konzentration belief sich auf 0,0001 mg/ml. Zum Einsatz kamen folgende Konzentrationen der NÄ-Extrakte: 0,07, 0,33, 0,67 und 1,33 mg/Platte. Unterschiedliche Temperaturen bei der Extrakt-Herstellung sowie ein Extrakt mit EtOH-H_2O-Gemisch (siehe Probenherstellung) wurden verwendet: RT, 40°C, 70°C, 90°C, EtOH.

Auf der Abbildung Nr. 10 ist zu erkennen, dass sich bei den Wasserextrakten (R^2: 0,8504 – 0,9900) eine Steigerung der Revertantenzahlen gegenüber der PK zeigte. Signifikant höhere Werte gegenüber der PK (p<0.05) wies die Konzentration 1,33 mg/Platte bei RT, 40°C, 70°C und 90°C sowie die Konzentration von 0,67 mg/ml bei RT, 70°C und 90°C auf. Die Revertantenzahl beim EtOH-Extrakt befand sich im Bereich der PK. Eine signifikante Abnahme (p<0.05) zeigte sich hier bei der höchsten Konzentration. Alle signifikante Veränderungen zur PK sind in Tabelle 9 ersichtlich.

Um die verschiedenen Extrakte miteinander vergleichen zu können, wurden über die lineare Regressionsgerade bei einer Konzentration von 0,7 mg/Platte mittels der Regressionsgleichung die Prozente der PK interpoliert. Alle getesteten NÄ-Extrakte zeigten keinen doppelten Wert gegenüber der korrespondierenden Kontrolle (PK) auf (MI<2). Die EtOH-Fraktion zeigte das höchste antimutagene Potenzial mit 90,5% der PK bei dem interpolierten Wert von 0,7 mg/Platte.

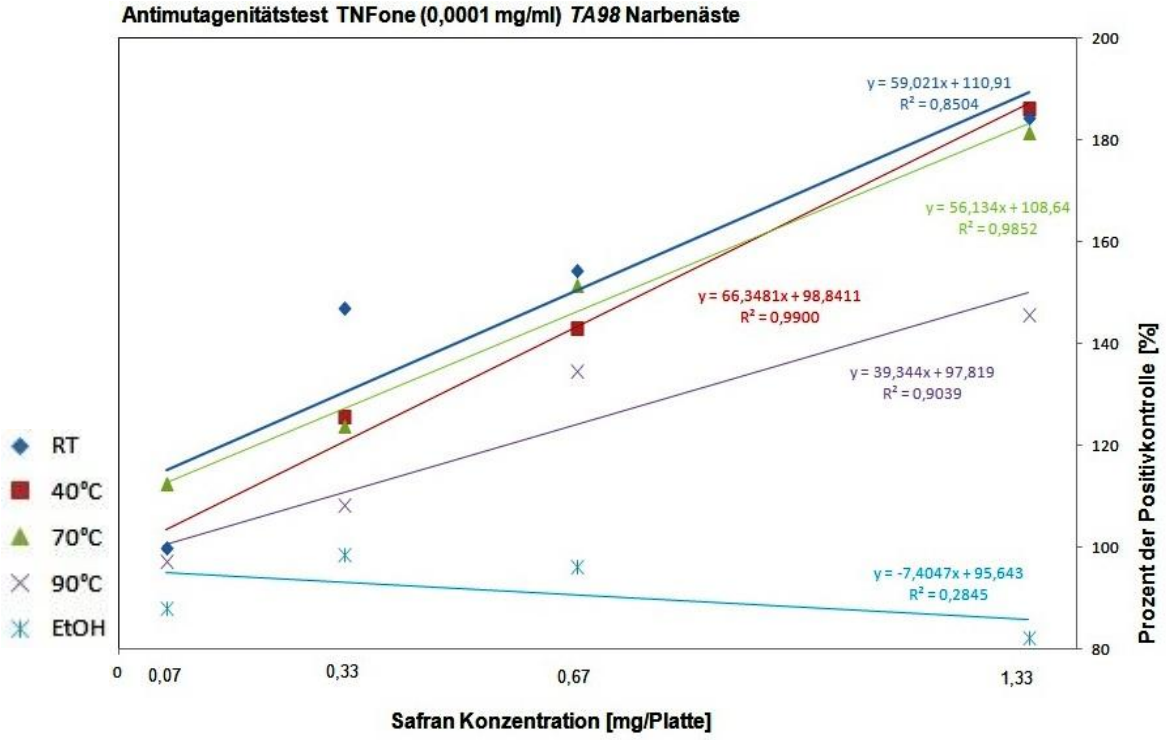

Abbildung 10: Effekte von NÄ-Extrakten, RT = Raumtemperatur, °C = Grad Celsius, (Temperatur des Lösungsmittels H_2O) und H_2O:EtOH Lösungsmittel bei RT im Verhältnis 80:20) in *TA98 Salmonella typhimurium* gegenüber TNFone

Mutagenitäts-Index (MI)			
Test: TNFone, *TA98*, NÄ, $p<0,05$			
TNFone: [0,3*10^{-6} mol/Platte]	ø His$^+$ Revertantenzahl/Platte	sd	MI
NK: H_2O	52,7	±18,0	-
NK: H_2O:EtOH (80:20)	69	±12,0	-
Extrakt [mg/Platte]+TNFone:			
RT: 0,67	543	±66,1	10,3
RT: 1,33	648	±138,7	12,3
70°C: 0,67	533	±80,6	10,1
70°C: 1,33	639	±120,0	12,1
90°C: 0,67	474	±74,8	9,0
90°C: 1,33	513	±14,5	9,7
EtOH: 1,33	289	±15,1	4,2
PK: TNFone, H_2O	352	±18,2	6,7
PK: TNFone, H_2O:EtOH (80:20)	352	±18,2	5,1

Tabelle 9: Signifikante Veränderung (*TA98*) zur PK ($p<0,05$) der NÄ-Extrakte im Ames-Test gegenüber TNFone, ihre his$^+$ Revertantenzahlen Mittelwerte (Ø) mit Standardabweichung (sd) von 6 Platten (2 Tests) und ihr Mutagenitäts-Index

Aufgrund des Nichtaufblühens der Safranpflanzen (die Ernte erfolgte erst im November) und der zur Folge späten Ernte der NÄ wurden beim ersten Test (*TA98* gegenüber TNFone) Safran-NÄ vom Vorjahr (2008) verwendet. Laut den erwähnten Lagerungsstudien steigt in solchen Proben der Safranalgehalt, während Crocingehalt und Picrocrocingehalt sinken. In einer Studie von Abdullaev *et al.* zeigte sich, dass Safranal für die Co-Mutagenität im *TA98*-Stamm gegenüber 2-AA verantwortlich war. Die erhöhte dosisabhängige Revertantenzahl im *TA98*-Stamm gegenüber TNFone in den Wasserextrakten könnte möglicherweise auf den erhöhten Safranalgehalt bzw. Flavonoidgehalt (Kaempferol, Quercetin) zurückzuführen sein. Laut einer Studie von Kanakis *et al*. (2009) kann Safranal an die DNA binden, jedoch benötigt dieser Ligand-Polynukleotid-Komplex weitere Untersuchungen. Die Temperaturunterschiede der verwendeten Lösungsmittel zeigten bei den Proben der Wasserextrakt-Fraktion bei verschiedenen Konzentrationen ähnliche Werte auf. Vermutlich war die Einwirkungszeit der eingesetzten Temperaturen zu gering, um mögliche größere Unterschiede zum Vorschein zu bringen.

7.1.2 Mutagenität induziert durch AFB1+S9, *TA98,* Narbenäste

Bei diesem Test wurden NÄ unter metabolischer Aktivierung (S9) auf ihr antimutagenes Potenzial gegenüber AFB1+S9 getestet. Die AFB1-Konzentration belief sich auf 5 µg/ml. Die eingesetzten Extrakt-Konzentrationen glichen den oben beschriebenen. Die Ergebnisse zeigten, dass die meisten eingesetzten Extrakte sich um die PK ansiedelten. Signifikanz (p<0.05) gegenüber der PK zeigte sich bei den Wasserextrakt-Konzentrationen 0,07 mg/Platte RT (Revertantenzahl: 81,2%) und 0,07 mg/Platte 90°C (Revertantenzahl: 82,1%). Die niedrigste Ethanolfraktion 0,07 mg/Platte zeigt eine signifikante Verringerung von 21,7% gegenüber der PK.

Bei den intrapolierten Werten der Konzentration 0,7 mg, die sich alle um die PK ansiedelten, zeigte sich das Extrakt 90°C bei 91,8% der PK als Substanz mit

der höchsten antimutagenen Eigenschaft. Der MI der signifikanten Proben befindet sich im Bereich unterhalb der PK.

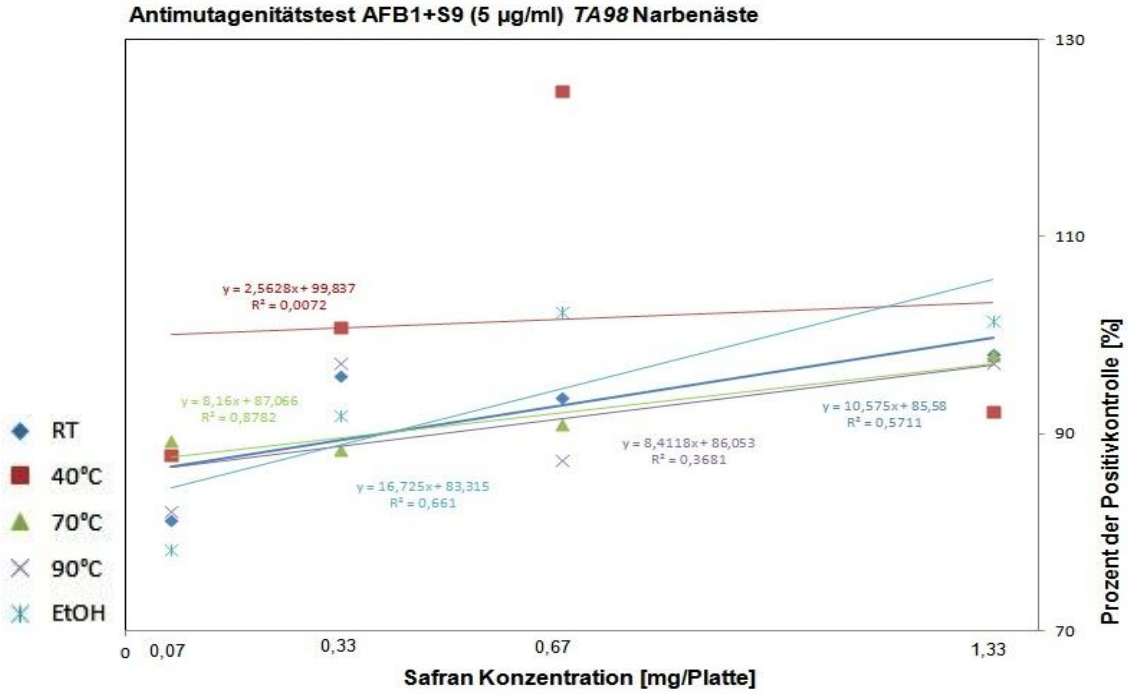

Abbildung 11: Effekte von NÄ-Extrakten, RT = Raumtemperatur, °C = Grad Celsius, (Temperatur des Lösungsmittels H_2O) und H_2O:EtOH Lösungsmittel bei RT (im Verhältnis 80:20) in *TA98 Salmonella typhimurium* gegenüber AFB1+S9

Mutagenitäts-Index (MI)			
Test: AFB1+S9, *TA98*, NÄ, *p<0,05*			
AFB1: [1,2*10^{-8} mol/Platte]	ø His$^+$ Revertantenzahl/Platte	sd	MI
NK: H_2O	58	±6,2	–
NK: H_2O:EtOH (80:20)	60	±7,9	–
Extrakt [mg/Platte]+AFB1+S9:			
RT: 0,07	138	±16,0	2,4
90°C: 0,07	140	±19,3	2,4
EtOH: 0,07	133	±14,8	2,2
PK: AFB1+S9, H_2O	170	±14,8	2,9
PK: AFB1+S9, H_2O:EtOH (80:20)	170	±14,8	2,8

Tabelle 10: Signifikante Veränderung (*TA98*) zur PK (p<0,05) der NÄ-Extrakte im Ames-Test gegenüber AFB1+S9, ihre his$^+$ Revertantenzahlen Mittelwerte (Ø) mit Standardabweichung (sd) von 6 Platten (2 Tests) und ihr Mutagenitäts-Index

In diesem Test zeigten sich keine bzw. nur geringe Abweichungen zur Revertantenzahl der PK. Dies lässt darauf schließen, dass die NÄ des Safrans keine antimutagene Wirkung gegenüber AFB1+S9 aufweisen. Weiters zeigte sich bei keiner der eingesetzten Konzentrationen eine Dosisabhängigkeit.

7.1.3 Mutagenität induziert durch PhiP+S9, *TA98*, Narbenäste

Unter metabolischer Aktivierung (+S9) wurden die NÄ gegenüber PhiP+S9 (c=0,1µmol/ml) auf ihr antimutagenes Potenzial getestet. Die Abbildung Nr**.** 12 zeigt, dass das Extrakt bei 40°C die stärkste antimutagene Wirkung bei der niedrigsten Konzentration aufweist. 27,5% der PK wurden inhibiert. Die 40°C Extrakte (R^2: 0,9953) wiesen alle signifikante Werte (p<0.05) auf. Die Revertantenzahl der restlichen Wasserextrakte positionierte sich um die PK. Signifikanz ist hier nur bei 0,33 mg/Platte bei 70°C gegeben. Die signifikante Revertantenzahl der Ethanolfraktion (R^2: 0,6160) lag zwischen 77,4% und 84,9%.

Die extrapolierten Werte bei 0,7 mg/Platte wiesen drauf hin, dass die Fraktion bei 40°C das höchste antimutagene Potenzial (77,9% der PK) belegte, gefolgt von der Ethanolfraktion (80,6%). Der MI demonstrierte bei den signifikanten Proben Werte unterhalb der PK.

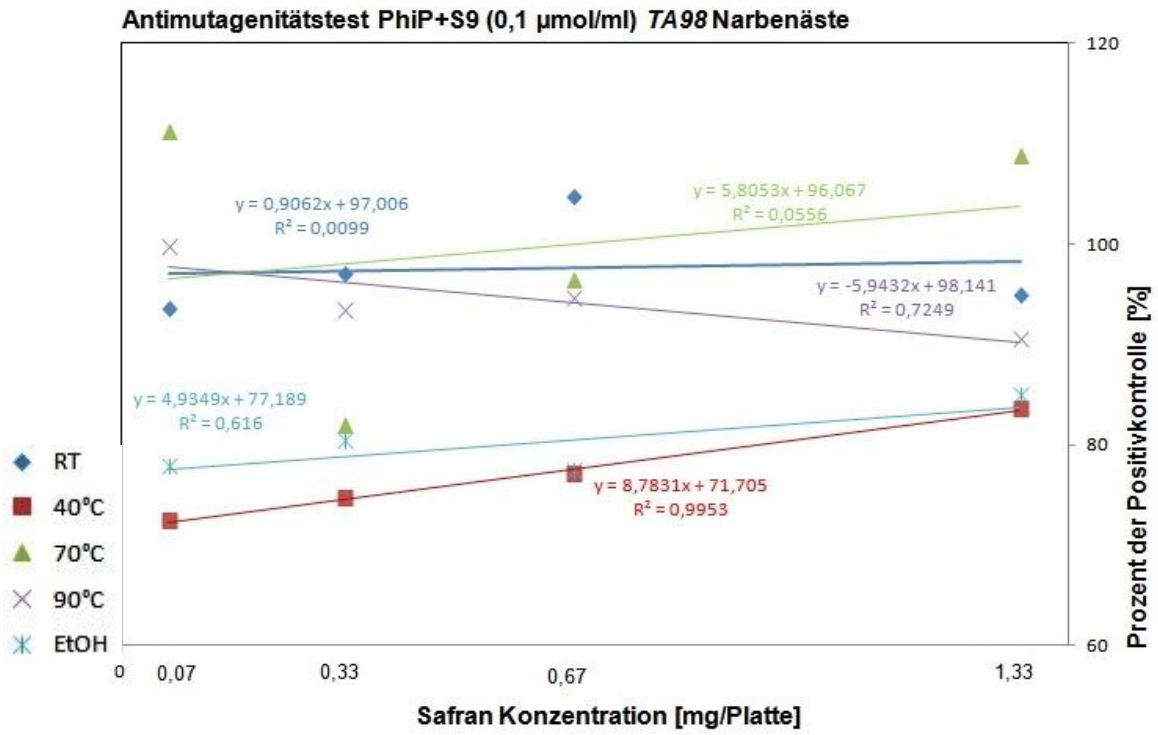

Abbildung 12: Effekte von NÄ-Extrakten, RT = Raumtemperatur, °C = Grad Celsius, (Temperatur des Lösungsmittels H_2O) und H_2O:EtOH Lösungsmittel bei RT (im Verhältnis 80:20) in *TA98 Salmonella typhimurium* gegenüber PhiP+S9

Mutagenitäts-Index (MI)			
Test: PhiP+S9, *TA98*, NÄ, *p<0,05*			
PhiP: [0,1*10^{-8} mol/Platte]	ø His$^+$ Revertantenzahl/Platte	sd	MI
NK: H_2O	54	±7,4	–
NK: H_2O:EtOH (80:20)	68	±9,6	–
Extrakt [mg/Platte]+PhiP+S9			
40°C: 0,07	447	±28,0	8,3
40°C: 0,33	460	±18,3	8,5
40°C: 0,67	475	±21,3	8,8
40°C: 1,33	516	±37,9	9,6
70°C: 0,33	505	±50,4	9,4
EtOH: 0,07	480	±14,8	7,1
EtOH: 0,33	496	±38,0	7,3
EtOH: 0,67	477	±55,5	7,0
EtOH: 1,33	523	±35,6	7,7
PK: PhiP+S9, H_2O	616	±45,5	11,4
PK: PhiP+S9, H_2O:EtOH (80:20)	616	±45,5	9,1

Tabelle 11: Signifikante Veränderung (*TA98*) zur PK (p<0,05) der NÄ-Extrakte im Ames-Test gegenüber PhiP+S9, ihre his$^+$ Revertantenzahlen Mittelwerte (Ø) mit Standardabweichung (sd) von 6 Platten (2 Tests) und ihr Mutagenitäts-Index

Auch hier zeigten sich keine comutagenen bzw. antimutagenen Eigenschaften. Die Revertantenzahlen der getesteten Proben lagen im Bereich der PK. Das 40°C-Extrakt zeigte als einziges eine Dosisabhängigkeit, die restlichen Werte der unterschiedlichen Extrakt-Konzentrationen waren um die PK gestreut. Aufgrund der Streuung um die PK scheinen die NÄ-Extrakte gegenüber PHiP+S9 keine antimutagene Wirkung aufzuweisen.

7.2 Antimutagenitätstest TA102 Narbenäste

7.2.1 Mutagenität induziert durch TNFone, *TA102,* Narbenäste

Die NÄ des Safrans wurden in den üblichen Konzentrationen auf ihr antimutagenes Potenzial gegenüber TNFone (0,07 mg/ml) getestet. Die Wasserextrakte zeigten alle Werte unter der PK mit unterschiedlicher Dosisabhängigkeit. Eine Signifikanz (p>0.05) zur PK wurde jedoch nur beim Wasserextrakt 0,33 mg/Platte, bei Raumtemperatur sowie beim Extrakt 1,33 mg/Platte bei 70°C sichtbar. Der letztgenannte Wert legte eine Reduktion der PK um 24,1% dar. Das höchste signifikante antioxidative/antimutagene Potenzial zeigte sich bei den Ethanolfraktionen 0,67 mg/Platte und 1,33 mg/Platte. 31,9% (1,33 mg/Platte) sowie 25,6% (0,67 mg/Platte) der PK konnten hier reduziert werden. Die extrapolierten Werte bei 0,7 mg/Platte zeigten, dass die Ethanol-Fraktion das höchste antioxidative Potenzial aufweist. 22,9% konnten hier inhibiert werden. Der MI bei den signifikanten Proben wies auf eine Verminderung zur korrespondierenden Kontrolle hin.

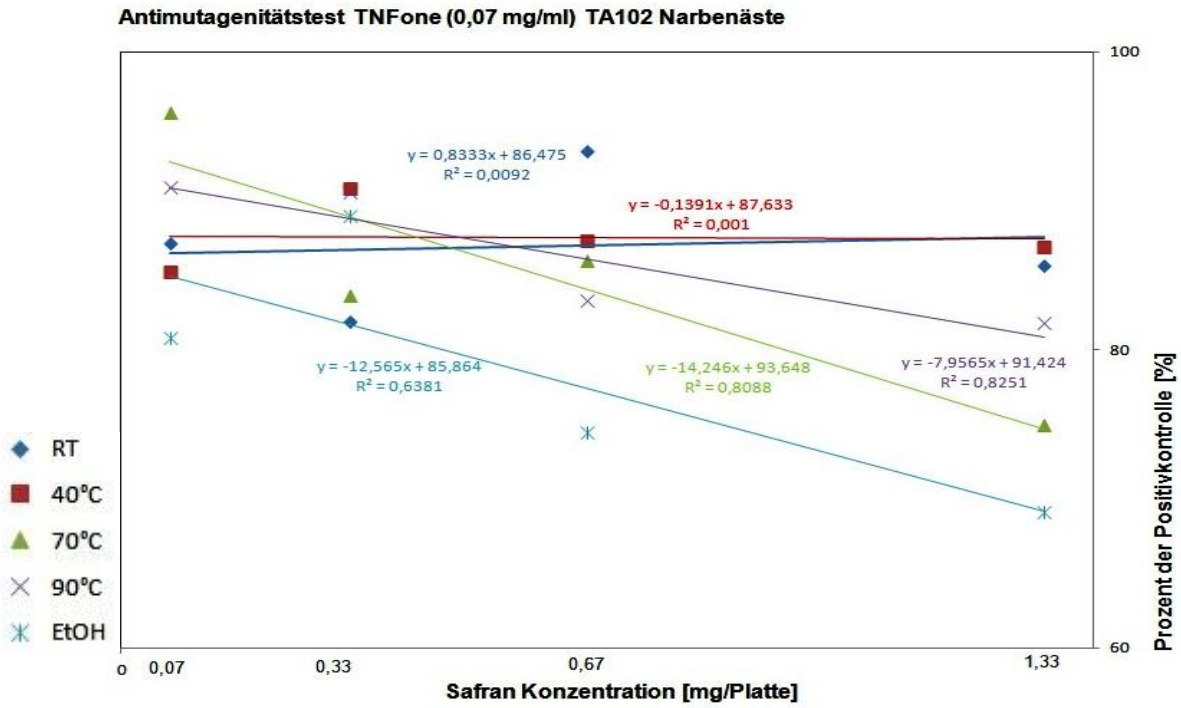

Abbildung 13: Effekte von NÄ-Extrakten, RT = Raumtemperatur, °C = Grad Celsius, (Temperatur des Lösungsmittels H_2O) und H_2O:EtOH Lösungsmittel bei RT (im Verhältnis 80:20) in *TA102 Salmonella typhimurium* gegenüber TNFone

Mutagenitäts-Index (MI)			
Test: TNFone, *TA102*, NÄ, $p<0,05$			
TNFone: [0,2*10^{-7} mol/Platte]	ø His$^+$ Revertantenzahl/Platte	sd	MI
NK: H_2O	308	±35,8	-
NK: H_2O:EtOH (80:20)	341	±28,9	-
Extrakt [mg/Platte]+TNFone:			
RT: 0,33	966	±160,8	3,1
70°C: 1,33	883	±109,6	2,9
EtOH: 0,67	877	±105,2	2,6
EtOH: 1,33	815	±123,2	2,4
PK: TNFone, H_2O	1179	±67,4	3,8
PK: TNFone, H_2O:EtOH (80:20)	1179	±67,4	3,5

Tabelle 12: Signifikante Veränderung (*TA102*) zur PK (p<0,05) der NÄ-Extrakte im Ames-Test gegenüber TNFone, ihre his$^+$ Revertantenzahlen Mittelwerte (Ø) mit Standardabweichung (sd) von 6 Platten (2 Tests) und ihr Mutagenitäts-Index

Die mögliche antimutagene/antioxidative Wirkung beim *TA102*-Stamm (gegenüber TNFone), der besonders auf oxidative Schädigungen reagiert, lässt sich aufgrund der hohen Standardabweichungen nur ansatzweise diskutieren. Die niedrigsten Revertantenzahlen zeigten sich bei der Ethanolfraktion, was darauf hinweist, dass sich antimutagene/antioxidative Substanzen gegenüber TNFone besser in einem Ethanol-Wasser-Gemisch lösen. Mögliche Mechanismen für diesen antimutagenen/antioxidativen Effekt von Safranextrakten könnte anteilsweise auf die Radikalfängereigenschaften bzw. antioxidativen Eigenschaften der NÄ-Extrakte zurückzuführen sein, und somit die antioxidative Kapazität der Safranextrakte unterstreichen. Weitere Tests zur Analyse, inwiefern die antioxidativen Eigenschaften beteiligt sind, müssten zur Abklärung noch durchgeführt werden. Auch Safranal, Crocetin, Dimethylcrocetin können durch Bindung an DNA und tRNA einen Schutz vor Reaktionen von schädlichen Chemikalien bewirken. Jedoch benötigen diese Ligand-Polynukleotid-Komplexe weitere Untersuchungen, um mögliche negative Auswirkungen der Substanzen ausschließen zu können.

7.2.2 Mutagenität induziert durch AFB1+S9, *TA102,* Narbenäste

In diesem Test wurde die antimutagene Wirkung der NÄ-Extrakte gegenüber AFB1 (120 µg/ml) mit metabolischer Aktivierung (+S9) getestet. Die niedrigen Konzentrationen (0,07 und 0,33 mg/Platte) der jeweiligen Extrakt-Fraktionen zeigten hier Werte um 80% der PK (Ausnahme: 0,33 mg/Platte bei 70°C). Die Wasserextrakte RT bei einem R^2 von 0,9633 wiesen bis auf die Konzentration 1,33 mg/Platte alle signifikant geringere Werte (p>0.05) als die PK auf. Die NÄ-Extrakte 0,07 und 0,33 mg/Platte der 40°C- und 90°C-Fraktionen waren ebenfalls signifikant niedriger. Die Ethanol-Extrakte (Dosisabhängigkeit: 0,8506) näherten sich bei der höchsten Konzentration dem Wert der PK, dessen Wert aber zum Gegenteil der niedrigen Konzentrationen keine Signifikanz zur PK zeigte.

Alle extrapolierten Werte bei 0,7 mg/Platte sind im Bereich zwischen 83,7–90,5% der PK. Das höchste antimutagene/antioxidative Potenzial präsentiert

sich bei RT mit 83,7%. Ethanol zeigt sich bei dieser Konzentration bei 87,6% der PK. Der MI war etwas unterhalb des MI-Wertes der PK.

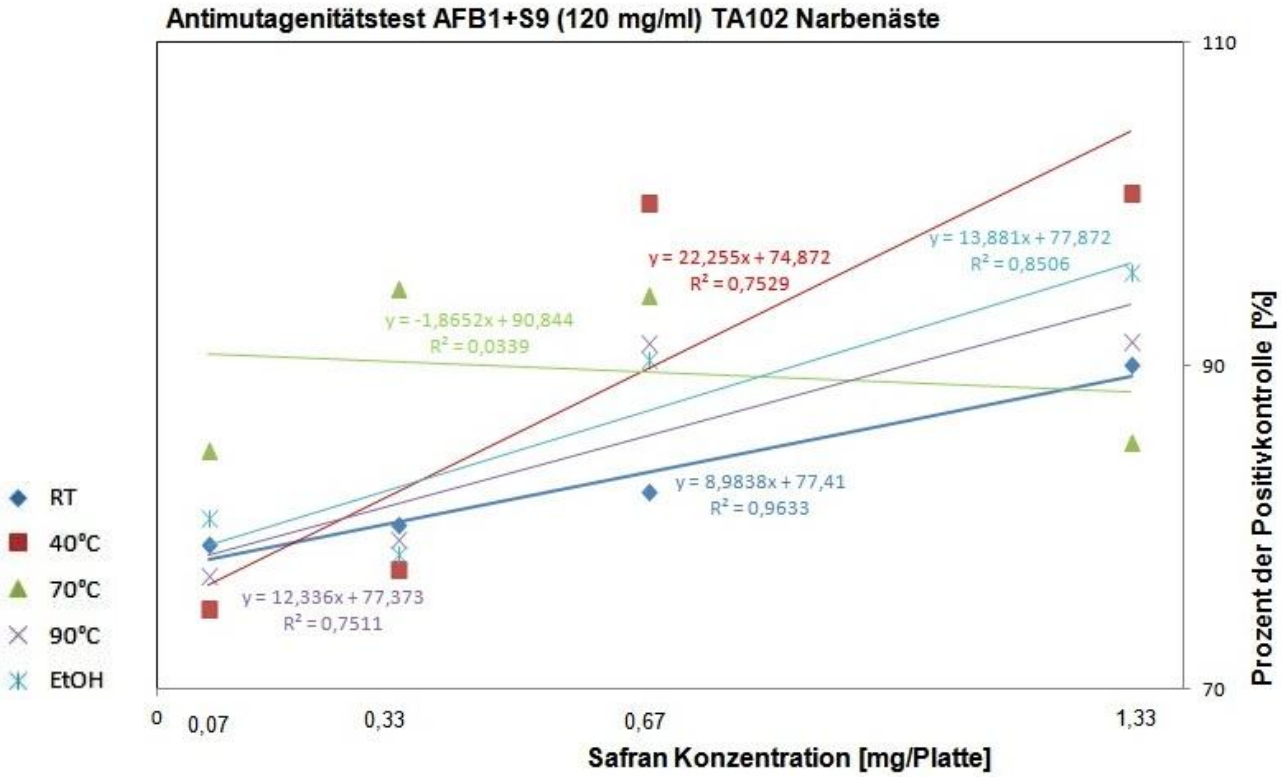

Abbildung 14: Effekte von NÄ-Extrakten, RT = Raumtemperatur, °C = Grad Celsius, (Temperatur des Lösungsmittels H_2O) und H_2O:EtOH Lösungsmittel bei RT (im Verhältnis 80:20) in *TA102 Salmonella typhimurium* gegenüber AFB1+S9

Mutagenitäts-Index (MI)			
Test: AFB1+S9, *TA102*, NÄ, $p<0,05$			
AFB1: [$2,9*10^{-7}$ mol/Platte]	ø His^+ Revertantenzahl/Platte	sd	MI
NK: H_2O	390	±49,6	-
NK: H_2O:EtOH (80:20)	389	±40,4	-
Extrakt [mg/Platte]+AFB1+S9:			
RT: 0,07	704	±25,9	1,8
RT: 0,33	714	±88,5	1,8
RT: 0,67	733	±74,9	1,9
40°C: 0,07	667	±110,7	1,7
40°C: 0,33	690	±120,2	1,8
90°C: 0,07	686	±76,0	1,8
90°C: 0,33	706	±86,7	1,8
EtOH: 0,07	717	±47,1	1,8
EtOH: 0,33	698	±40,0	1,8
EtOH: 0,67	805	±48,7	2,1
PK: AFB1+S9, H_2O	891	±33,1	2,3
PK: AFB1+S9, H_2O:EtOH (80:20)	891	±33,1	2,3

Tabelle 13: Signifikante Veränderung (*TA102*) zur PK (p<0,05) der NÄ-Extrakte im Ames-Test gegenüber AFB1+S9, ihre his^+ Revertantenzahlen Mittelwerte (Ø) mit Standardabweichung (sd) von 6 Platten (2 Tests) und ihr Mutagenitäts-Index

Die niedrigen Narbenäste-Konzentrationen (0,07 und 0,33 mg/Platte) zeigten hier die geringsten Revertantenzahlen. Eine mögliche Erklärung läge in den unterschiedlichen Verhältnissen, wie die Narbenäste-Inhaltstoffe (in den Lösungen) zueinander stehen. Auch hier zeigten sich hohe Standardabweichungen, die vielleicht in der unterschiedlichen, zeitlichen Testdurchführung begründet liegen. Eine mögliche Erklärung der verminderten Revertantenzahlen könnten im Safranal, Crocetin und Dimethylcrocetin-Gehalt der NÄ-Extrakte liegen, die durch Bindung an DNA und tRNA einen möglichen Schutz vor Reaktionen von schädlichen Chemikalien bzw. ihres antioxidativen Potenzials bewirken. Flavonoidgehalt sowie Phenolsäuregehalt der NÄ sind an der Beteiligung dieses Effektes auch nicht auszuschließen.

7.3 Antimutagenitätstest TA98 Tepalen

7.3.1 Mutagenität induziert durch TNFone, *TA98,* Tepalen

Die Tepalen des Safrans wurden auf ihr antimutagenes Potenzial gegenüber TNFone getestet. Die TNFone-Konzentration belief sich auf 0,0001 mg/ml. Folgende Konzentrationen der Tepalenextrakte kamen zum Einsatz: 1,25, 2,5 und 5 mg/Platte. Zusätzlich wurden unterschiedliche Temperaturen bei der Extraktherstellung sowie Extrakte mit Ethanol-H_2O-Gemisch (ED und EL) gewählt: RT, 40°C, 70°C, 90°C. Um die Einflüsse des Lichts zu erfassen, wurde im Dunkeln (ED) und bei Tageslicht (EL) inkubiert. In Abbildung 15 ist erkennbar, dass die Wasserextrakt-Proben im Bereich 224,7–324,7% der PK lagen. Die EL-Extrakte zeigten bei einem R^2 von 0,9991 eine dosisabhängige Steigerung der Revertantenzahlen und wiesen signifikante Werte auf. Die niedrigste Revertantenzahl zeigte sich bei der 5 mg/Platte ED-Extrakt, dieser Wert deutet auch auf eine 65,1%-Steigerung der PK hin. Alle oben beschriebenen Werte bis auf 5 mg/Platte und 1,25 mg/Platte ED-Extrakte sind signifikant (p<0.05).

Zusammenfassend kann man sagen, dass sich bei diesem Test eine erhöht signifikante Comutagenität vor allem im Bereich der Wasser-Extrakte gezeigt hat. Die Dosisabhängigkeit war bei den Tepalenextrakten RT, 70°C, 90°C sowie bei EL gegeben. Der MI der zuvor erwähnten Extrakte überstieg um das doppelte die der korrespondierenden Kontrolle (MI>2). Bei 90°C kam es bei den interpolierten Werten bei 3 mg/Platte zu einem Anstieg der PK von 204,9% der PK. Der niedrigste interpolierte Wert (3 mg/Platte) von 77,4% über der PK wies die ED-Fraktion auf.

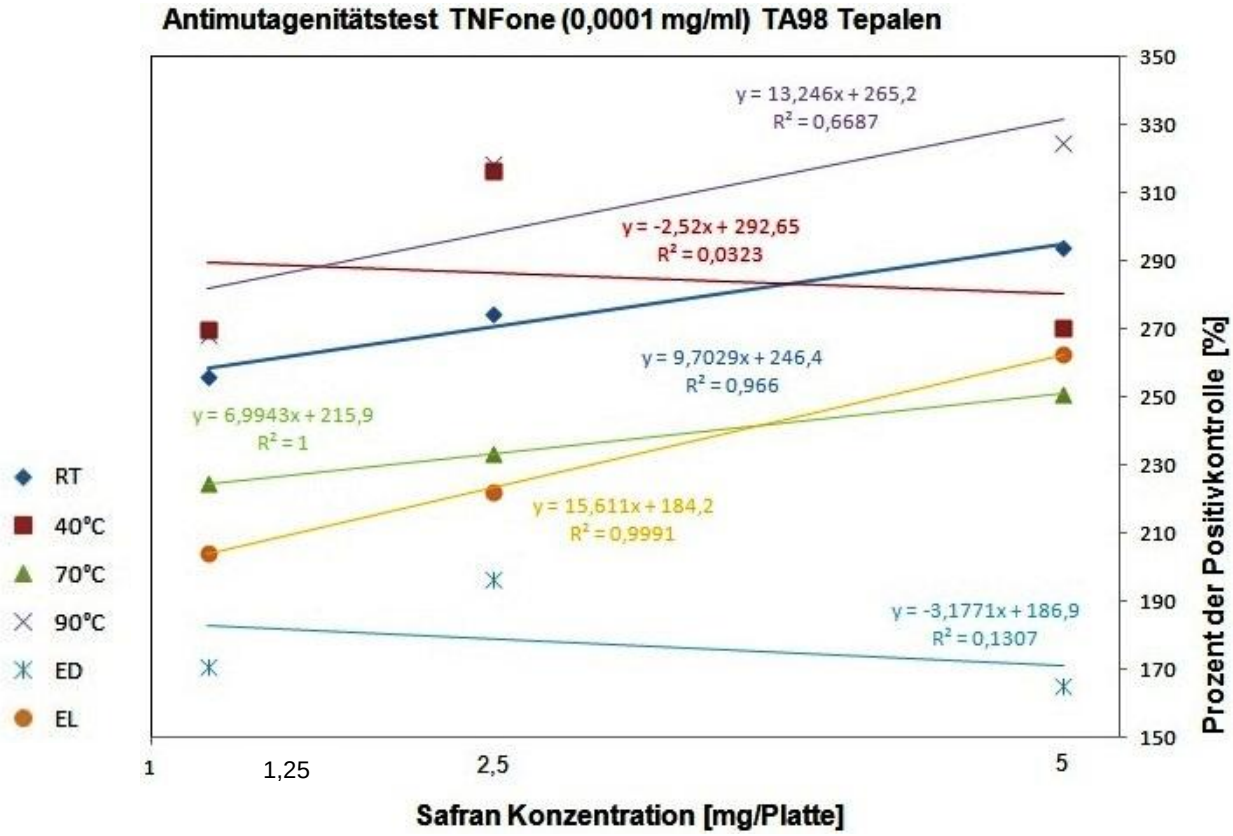

Abbildung 15: Effekte von Tepalenextrakten gegenüber TNFone (*TA98*), RT = Raumtemperatur, °C = Grad Celsius, (Temperatur des Lösungsmittels H_2O), ED (H_2O:EtOH 80:20 bei RT, Extraktion im Dunkeln) und EL (H_2O:EtOH 80:20 bei RT, Extraktion bei Licht)

Mutagenitäts-Index (MI)			
Test: TNFone, *TA98*, Tepalen, $p<0,05$			
TNFone: [0,3*10^{-6} mol/Platte]	ø His^{+} Revertantenzahl/Platte	sd	MI
NK: H_2O	42	±7,8	-
NK: H_2O:EtOH (80:20)	39	±5,0	-
Extrakt [mg/Platte]+TNFone			
RT: 1,25	744	±194,1	17,7
RT: 2,5	793	±171,0	18,9
RT: 5	848	±306,0	20,2
40°C: 1,25	778	±291,7	18,5
40°C: 2,5	913	±223,6	21,7
40°C: 5	780	±224,3	18,6
70°C: 1,25	649	±148,3	15,5
70°C: 2,5	674	±82,5	16,0
70°C: 5	724	±204,2	17,2
90°C: 1,25	775	±216,3	18,5
90°C: 5	920	±85,5	21,9
ED: 2,5	568	±160,6	14,6
EL: 1,25	590	±53,6	15,1
EL: 2,5	641	±52,6	16,4
EL: 5	758	±147,0	19,4
PK: TNFone, H_2O	289	±59,2	6,9
PK: TNFone, H_2O:EtOH (80:20)	289	±59,2	7,4

Tabelle 14: Signifikante Veränderung (*TA98*) zur PK (p <0,05) der Tepalenextrakte im Ames-Test gegenüber TNFone, ihre his^{+} Revertantenzahlen Mittelwerte (Ø) mit Standardabweichung (sd) von 6 Platten (2 Tests) und ihr Mutagenitäts-Index

Comutagenität zeigte sich hier vor allem im Bereich der Wasserextrakte. In einer Studie von Resende *et al.* – die Quercetin und Kaempferol im Ames-Test auf ihr mutagenes Potenzial testeten – zeigte sich, dass Quercetin ohne und mit S9 sowie Kaempferol mit S9 getestet, am *TA98*-Stamm mutagenes Potenzial bewies. Quercetin und Kaempferol sowie ihre Derivate, die auch in Safrantepalen vorkommen, könnten auch in diesem Versuch für das erhöhte mutagene Potenzial der Tepalen des Safrans gegenüber TNF mitverantwortlich sein. Die Testversuche zeigten jedoch sehr hohe Standardabweichungen. Die gestreuten Werte der unterschiedlich eingesetzten Lösungsmittel-Temperaturen zeigten

keine Regelmäßigkeit. Die Ethanol-Extrakte zeigten die niedrigsten bzw. keine comutagenen (laut Definition MI <2) Werte.

7.3.2 Mutagenität induziert durch AFB1+S9, *TA98,* Tepalen

Bei diesem Test wurden die Tepalen des Safrans mit metabolischer Aktivierung (+S9) auf ihr antimutagenes Potenzial gegenüber AFB1 getestet. Die AFB1-Konzentration belief sich auf 5 µg/ml. Es wurden die schon oben beschriebenen Extrakte eingesetzt. Die Wasserextrakte sowie die EL-Extrakte zeigen Werte um die PK auf. Diese Extrakte weisen bis auf 5 mg/Platte RT keine Signifikanz auf. Die Revertantenzahlen lagen zwischen 77,9% und 109,9% der PK. Das ED-Extrakt weist bei der Konzentration von 5 mg/Platte das stärkste antimutagene Potenzial gegenüber AFB1 auf. Bei dieser Probe konnten 35,4% der PK signifikant inhibiert werden.

Das höchste antimutagene Potenzial innerhalb der unterschiedlichen Fraktionen zeigt sich bei den ED-Extrakten, mit einem interpolierten Wert von 66,5% bei der Konzentration von 3 mg/Platte.

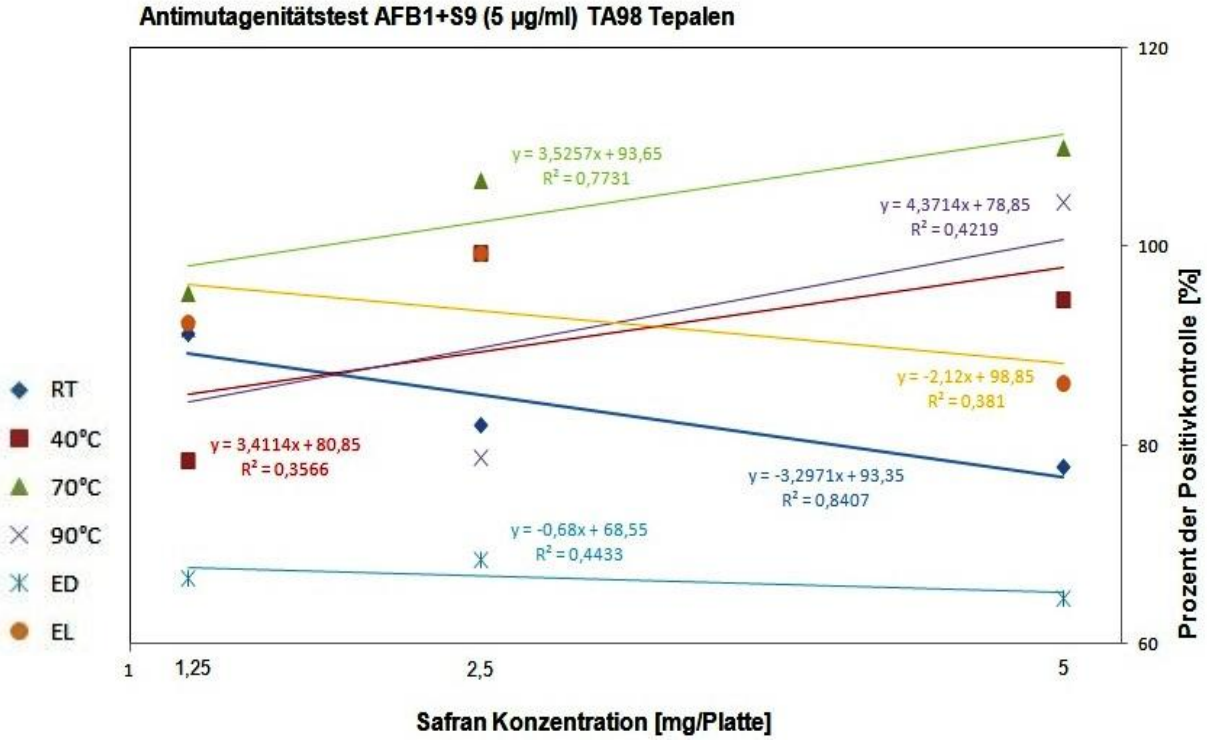

Abbildung 16: Effekte von Tepalenextrakten gegenüber AFB1+S9 (*TA98*), RT = Raumtemperatur, °C = Grad Celsius, (Temperatur des Lösungsmittels H_2O), ED (H_2O:EtOH 80:20 bei RT, Extraktion im Dunkeln) und EL (H_2O:EtOH 80:20 bei RT, Extraktion bei Licht)

Mutagenitäts-Index (MI)			
Test: AFB1+S9, *TA98*, Tepalen, *p<0,05*			
AFB1: [1,2*10^{-8} mol/Platte]	ø His$^+$ Revertantenzahl/Platte	sd	MI
NK: H_2O	42	±9,3	-
NK: H_2O:EtOH (80:20)	56	±8,2	-
Extrakt [mg/Platte]+AFB1+S9:			
RT: 5	151	±31,2	3,6
ED: 1,25	129	±25,2	2,3
ED: 2,5	133	±20,9	3,2
ED: 5	125	±35,3	3,0
PK: AFB1+S9, H_2O	194	±21,8	4,6
PK: AFB1+S9, H_2O:EtOH (80:20)	194	±21,8	3,5

Tabelle 15: Signifikante Veränderung (*TA98*) zur PK (p <0,05) der Tepalenextrakte im Ames-Test gegenüber AFB1+S9, ihre his$^+$ Revertantenzahlen Mittelwerte (Ø) mit Standardabweichung (sd) von 6 Platten (2 Tests) und ihr Mutagenitäts-Index

Die mögliche antimutagene Wirkung der Tepalen könnte darauf beruhen, dass sich Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen durch Kaempferol und Quercetin im Versuch an Ratten inhibieren lassen, und somit Einfluss auf die AFB1-Kanzerogenität besitzen. Die potenteste Wirkung der Inhibierung zeigt sich hier bei den ED-Extrakten, was vermuten lässt, dass die Löslichkeit von Quercetin, Kaempferol und ihre Derivate im eingesetzten Ethanol:Wasser-extrakt am höchsten war. Eine Maskierung der DNA-Bindungsstelle-Interaktion mit den Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen sowie eine kovalente Bindung mit dem aktivierten Kanzerogen aufgrund von phenolischen Bestand-teilen der Safrantepalen bzw. antioxidative Effekte können auch nicht ausge-schlossen werden.

7.3.3 Mutagenität induziert durch PhiP+S9, *TA98,* Tepalen

Die Tepalenextrakte wurden gegenüber PhiP (0,1 µmol/ml) mit metabolischer Aktivierung (+S9) auf ihr antimutagenes Potenzial getestet. Die Auswertung zeigte, dass sich die Mehrheit der Tepalenextrakte im Bereich 80–90% der PK befanden. Das stärkste antimutagene Potenzial wurde bei dem Wasserextrakt 70°C sichtbar. 29% von der PK wurden inhibiert. Das höchste antimutagene Potenzial wies die 90°C Fraktion auf. Bei einer Konzentration von 3 mg/Platte zeigte sich ein extrapolierter Wert von 82,9%.

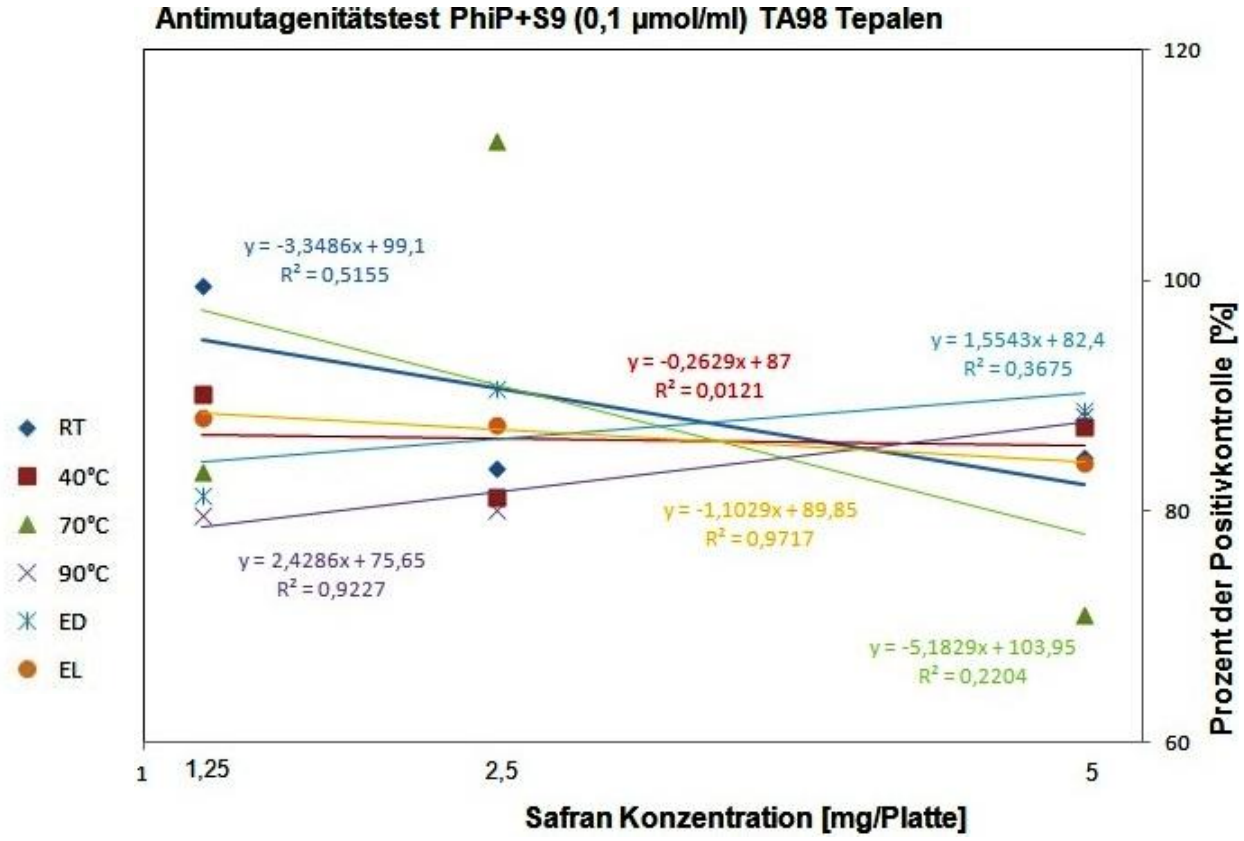

Abbildung 17: Effekte von Tepalenextrakten gegenüber PHiP+S9 (*TA98*), RT = Raumtemperatur, °C = Grad Celsius, (Temperatur des Lösungsmittels H_2O), ED (H_2O:EtOH 80:20 bei RT, Extraktion im Dunkeln) und EL (H_2O:EtOH 80:20 bei RT, Extraktion bei Licht)

Kein Wert zeigte einen signifikanten Unterschied zur PK auf. Vermutliche Ursache der verminderten Revertantenzahl gegenüber der PK könnten in der Metabolisierung durch das S9-Rattenleber-Homogenisat sowie der Maskierung der Bindungsstelle für Kanzerogene liegen.

7.4 Antimutagenitätstest TA102 Tepalen

7.4.1 Mutagenität induziert durch TNFone, TA102, Tepalen

Die Tepalenextrakte wurden gegenüber TNFone (0,07 mg/ml) auf ihr antimutagenes Potenzial mit dem *Salmonella typhimurium*-Stamm *TA102* getestet. Die Ergebnisse zeigten bei den meisten Wasserextrakten Werte über der PK im

Bereich von 114,9–141,2%. Die Werte 2,5 und 5 mg/Platte Raumtemperatur (R^2: 0,6434), 1,25 und 5 mg/Platte bei 70°C (R^2: 0,7082) zeigten signifikante Veränderungen. Die 90°C Wasserfraktion zeigte eine dosisabhängige Abnahme der Revertantenzahlen (R^2: 0,9886), jedoch ohne Signifikanz. Das ED-Extrakt zeigte bei der höchsten Konzentration von 5 mg/Platte eine signifikante Erhöhung der PK von 31,4%.

Die Werte bei 3 mg/Platte (interpoliert) zeigten die höchste antimutagene Wirkung bei den Extrakten 90°C. Ein Wert von 88,6% der PK war hier beobachtbar. Alle anderen Werte lagen über der PK (108,2–128,3%). Werte des MI (signifikant) zeigten eine Erhöhung zur PK.

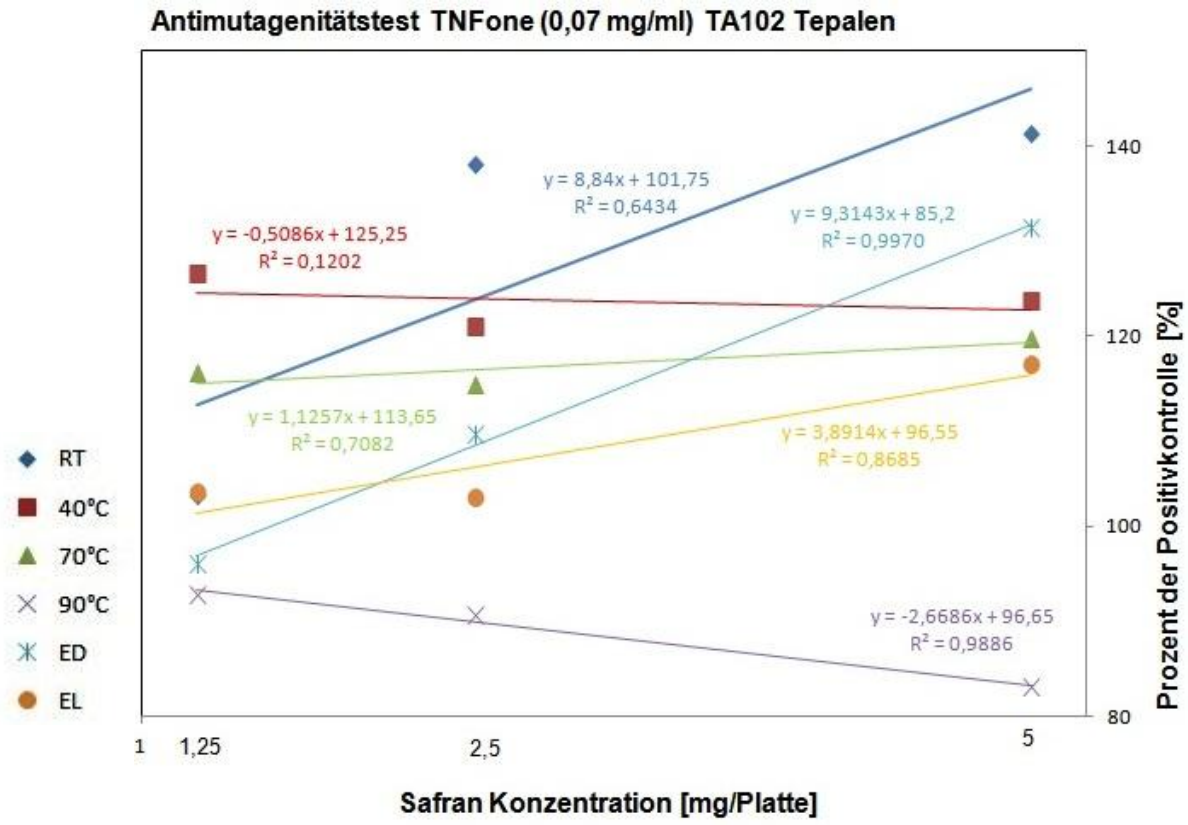

Abbildung 18: Effekte von Tepalenextrakten gegenüber TNFone (*TA102*), RT = Raumtemperatur, °C = Grad Celsius, (Temperatur des Lösungsmittels H_2O), ED (H_2O:EtOH 80:20 bei RT, Extraktion im Dunkeln) und EL (H_2O:EtOH 80:20 bei RT, Extraktion bei Licht)

Mutagenitäts-Index (MI)			
Test: TNFone, *TA102*, Tepalen, $p<0,05$			
TNFone: [0,2*10^{-7} mol/Platte]	ø His$^+$ Revertantenzahl/Platte	sd	MI
NK: H_2O	352	±41,2	-
NK: H_2O:EtOH (80:20)	343	±64,8	-
Extrakt [mg/Platte]+TNFone			
RT: 2,5	1686	±168,0	4,8
RT: 5	1725	±181,5	4,9
70°C: 1,25	1419	±92,3	4,0
70°C: 5	1464	±101,6	4,2
EtOH Dunkel: 5	1605	±118,4	4,6
PK: TNFone, H_2O	1222	±97,4	3,5
PK: TNFone, H_2O:EtOH (80:20)	1222	±97,4	3,6

Tabelle 16: Signifikante Veränderung (*TA102*) zur PK (p <0,05) der Tepalenextrakte im Ames-Test gegenüber TNFone, ihre his$^+$ Revertantenzahlen Mittelwerte (Ø) mit Standardabweichung (sd) von 6 Platten (2 Tests) und ihr Mutagenitäts-Index

In diesem Test zeigten sich hohe Standardabweichungen. Die Mehrheit der getesteten Proben befand sich im Bereich von ± 20% der PK. Ein antimutagenes/antioxidatives Potenzial konnte hier nicht festgestellt werden. Comutagene Eigenschaften, die sich im *TA98*-Stamm zeigten, wurden hier nicht detektiert. Die Tepalen zeigten in dieser Studie keine antimutagenen/antioxidativen Funktionen.

7.4.2 Mutagenität induziert durch AFB1+S9, *TA102,* Tepalen

Die Tepalenextrakte wurden gegenüber AFB1 (120 µg/ml) + S9 auf ihr antimutagenes/antioxidatives Potenzial getestet. Alle Extrakte zeigen Werte unter 85%, somit konnten mindestens 15% der PK inhibiert werden. Alle Werte bis auf die Tepalenextrakte 1,25 mg/ml bei 70°C zeigten Signifikanz auf. Das stärkste antimutagene Potenzial zeigte sich bei den EL-Extrakten. Bei der niedrigsten sowie der höchsten EL-Extrakt-Konzentration konnten 33% der PK inhibiert werden.

Die EL-Extrakte hatten bei den interpolierten Werten (3mg/Platte) das antimutagen/antioxidativ höchste Potenzial. Das EL-Extrakt wies dabei einen Wert von 65,8% der Positivkontrolle auf. Im MI-Wert war erkenntlich, dass es zu Reduktionen der his^+-Revertantenzahl gegenüber des MI-Wertes der PK kam.

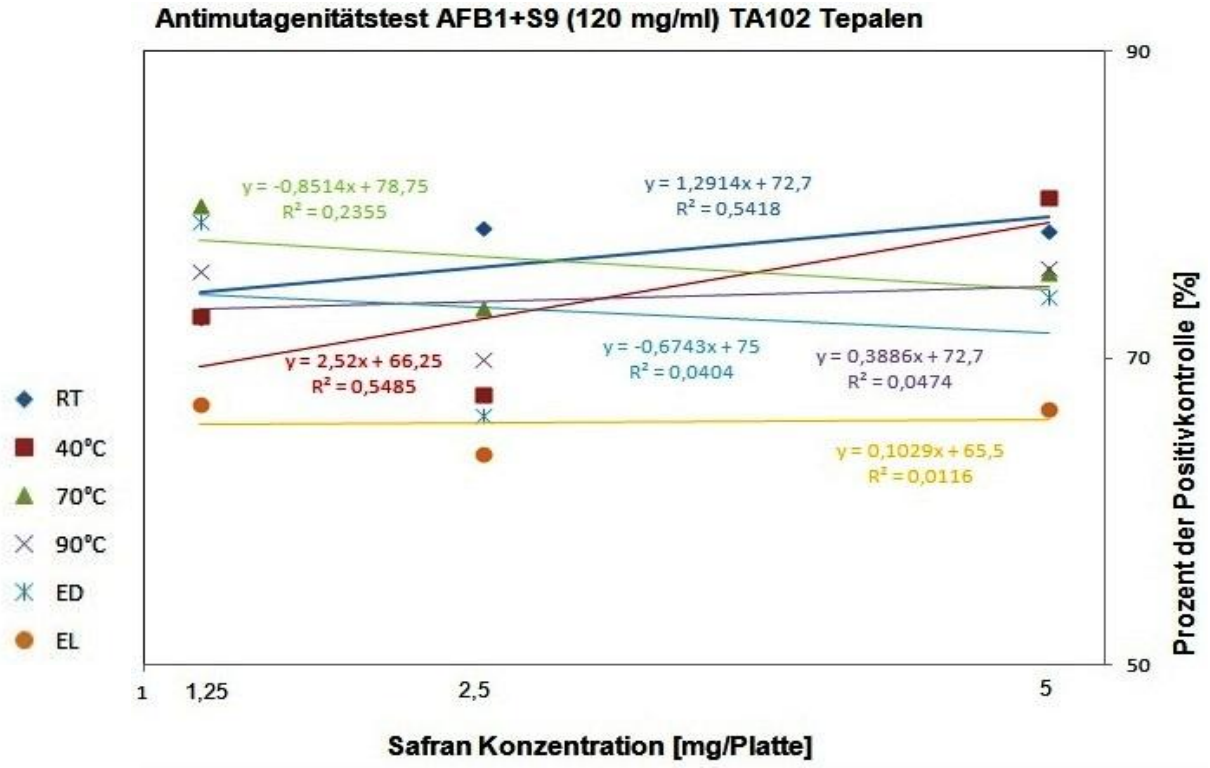

Abbildung 19: Effekte von Tepalenextrakten gegenüber AFB1+S9 (*TA102*), RT = Raumtemperatur, °C = Grad Celsius, (Temperatur des Lösungsmittels H_2O), ED (H_2O:EtOH 80:20 bei RT, Extraktion im Dunkeln) und EL (H_2O:EtOH 80:20 bei RT, Extraktion bei Licht)

Mutagenitäts-Index (MI)			
Test: AFB1+S9, *TA102*, Tepalen, $p<0,05$			
AFB1: [2,9*10^{-7} mol/Platte]	ø His$^+$ Revertantenzahl/Platte	sd	MI
NK: H_2O	347	±37,4	–
NK: H_2O:EtOH (80:20)	430	±45,3	–
Extrakt [mg/Platte]+AFB1+S9:			
RT: 1,25	666	±62,3	1,9
RT: 2,5	719	±69,5	2,1
RT: 5	718	±67,8	2,1
40°C: 1,25	666	±36,6	1,9
40°C: 2,5	620	±122,8	1,8
40°C: 5	738	±94,8	2,1
70°C: 2,5	672	±69,5	1,9
70°C: 5	694	±113,6	2,0
90°C: 1,25	694	±68,6	2,0
90°C: 2,5	641	±141,2	1,8
90°C: 5	696	±38,2	2,0
ED: 1,25	723	±134,5	1,7
ED: 2,5	607	±108,1	1,4
ED: 5	679	±68,2	1,6
EL: 1,25	614	±102,0	1,4
EL: 2,5	584	±72,3	1,4
EL: 5	612	±66,7	1,4
PK: AFB1+S9, H_2O	917	±83,8	2,6
PK: AFB1+S9, H_2O:EtOH (80:20)	917	±83,6	2,1

Tabelle 17: Signifikante Veränderung (*TA102*) zur PK (p<0,05) der Tepalenextrakte im Ames-Test gegenüber AFB1+S9, ihre his$^+$ Revertantenzahlen Mittelwerte (Ø) mit Standardabweichung (sd) von 6 Platten (2 Tests) und ihr Mutagenitäts-Index

Die Revertantenzahlen zeigten sich im Bereich von ca. 65–75% der PK. *TA102* verglichen mit *TA98* gegenüber AFB1 zeigt bei den Tepalenextrakten niedrige Werte der his$^+$ Revertantenzahlen vor allem im Bereich der Wasserextrakte. Dieser Effekt könnte nicht nur auf die Inaktivierung durch kovalente Bindung von AFB1 und Hemmung der Phase 1 Enzyme zurückgeführt werden, sondern auch auf ihre antioxidativen Eigenschaften. Jedoch zeigten sich hier die ED-Extrakte am wirksamsten gegenüber AFB1+S9. Effekte der Temperaturunterschiede der Lösungsmittel waren auch hier nicht zu erkennen.

7.5 Mutagenitätstests

Die folgenden Tests dienten zur Ausschließung der Mutagenität der getesteten Safranextrakte. Die getesteten Substanzen wurden als mutagen betrachtet, wenn sie die doppelte Negativkontrolle überschritten und zugleich dosisabhängig sind. Signifikante Werte der Safranextrakte zur doppelten Negativkontrolle, die mittels Post-Hoc-Test Scheffe ermittelt wurden, sind unter den Balkendiagrammen in den Tabellen ersichtlich. Als signifikant beurteilt wurden Werte $p<0,05$.

7.5.1 Mutagenitätstest *TA98* und *TA102* mit Narbenäste und Tepalen

Der durchgeführte Mutagenitätstest sollte versichern, dass die getesteten Substanzen keinen mutagenen Effekt in den *Salmonella typhimurium*-Stämmen *TA98* und *TA102* aufweisen. Zum Testeinsatz kamen die niedrigste sowie die höchste Konzentration (NÄ: 0,07 und 1,33 mg/Platte, Tepalen: 1,25 und 5 mg/Platte) welche mit (+S9) und ohne (-S9) metabolische Aktivierung getestet wurden. Insgesamt wurden acht Tests zur Mutagenität durchgeführt: NÄ *TA98*: TNFone, PhiP+S9 und AFB1+S9, Tepalen *TA98*: TNFone, PhiP+S9 und AFB1+S9, NÄ *TA102*: TNFone, AFB1+S9, Tepalen *TA102*: TNFone, AFB1+S9. Den Testergebnissen dieser Studie zufolge, gestützt durch die angegebene Literatur, weist Safran keine mutagenen Effekte im *Salmonella typhimurium*-Stamm *TA98* und *TA102* auf [**ABDULLAEV FI *et al.*,** 2003].

7.5.1.1 Mutagenitätstest TA98 *(TNFone) Narbenäste*

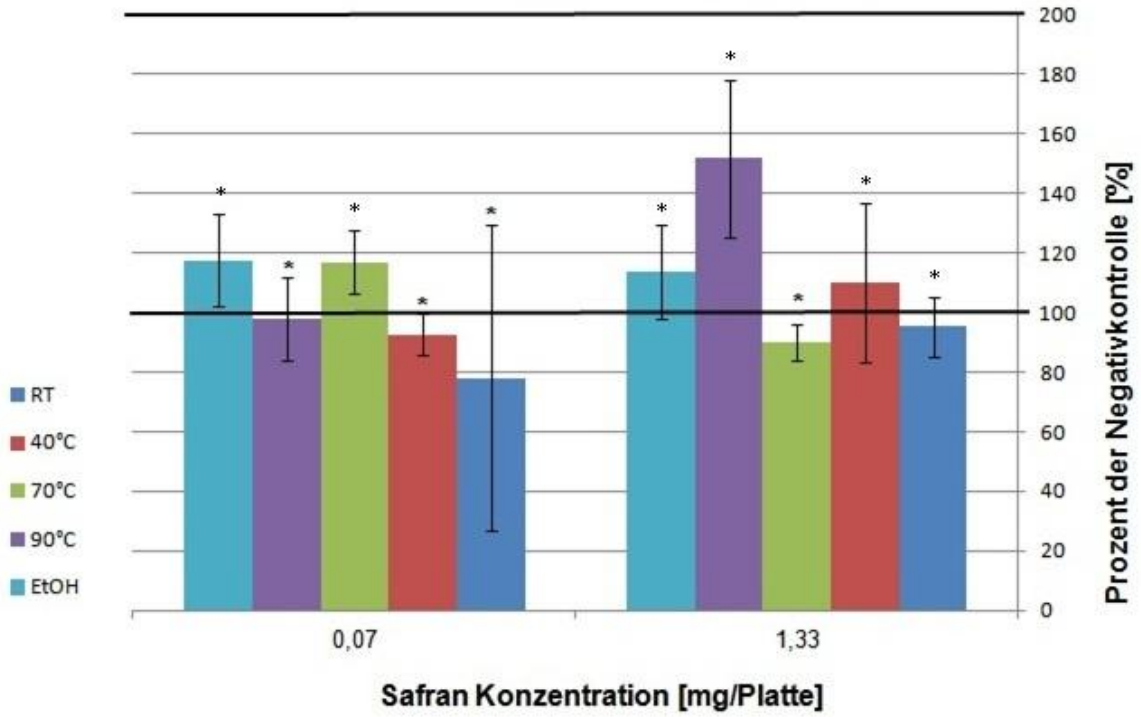

Abbildung 20: Nicht-Mutagenes-Potenzial von NÄ-Extrakten gegenüber TNFone als Positivkontrolle von Raumtemperatur-, °C- und H_2O:EtOH Extrakten (80:20) im *Salmonella typhimurium* Stamm *TA98* (* signifikant unterschiedlich zur doppelten NK, p<0,05)

7.5.1.2 Mutagenitätstest TA98 *(AFB1+S9, PhiP+S9) Narbenäste*

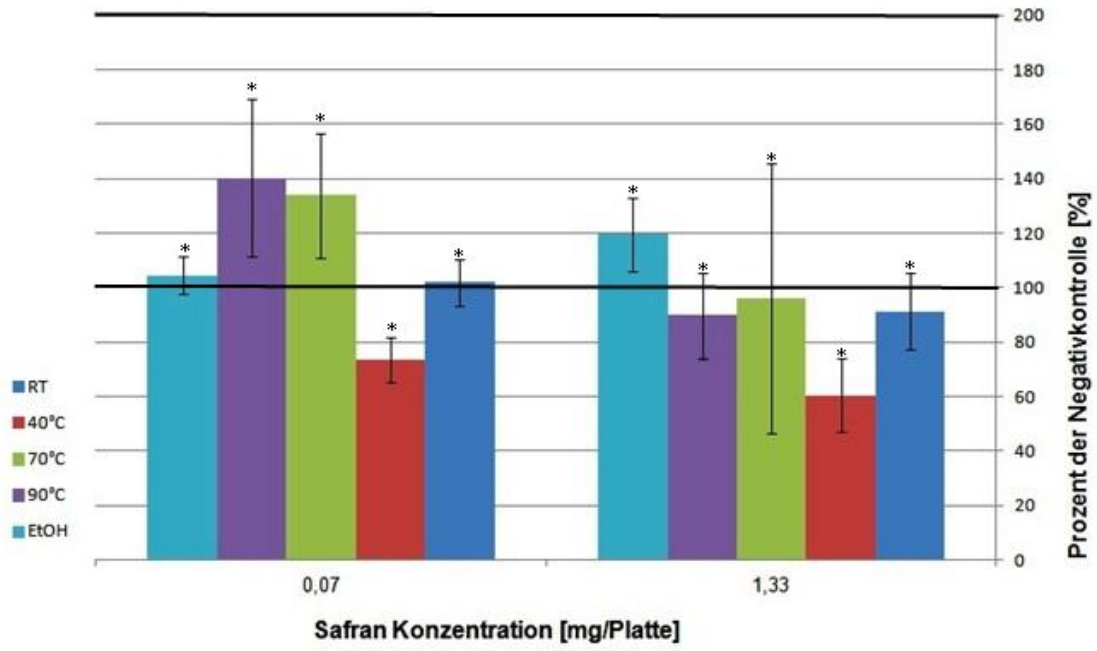

Abbildung 21: Nicht-Mutagenes-Potenzial von NÄ-Extrakten gegenüber AFB1+S9 und PhiP+S9 als Positivkontrolle von Raumtemperatur-, °C- und H_2O:EtOH -Extrakten (80:20) im *Salmonella typhimurium* Stamm *TA98* (* signifikant unterschiedlich zur doppelten NK, p<0,05)

7.5.1.3 Mutagenitätstest TA98 *(TNFone) Tepalen*

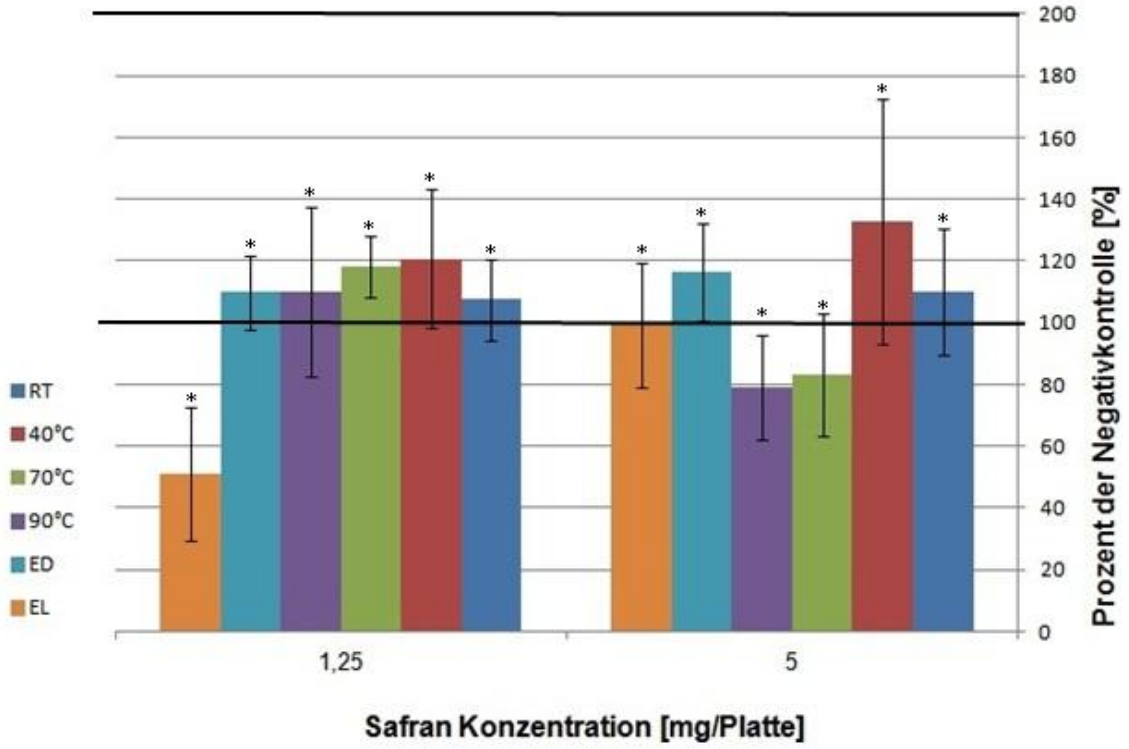

Abbildung 22: Nicht-Mutagenes-Potenzial von Tepalenextrakten gegenüber TNFone als Positivkontrolle von, Raumtemperatur-, °C- und H_2O:EtOH Extrakten (80:20) im *Salmonella typhimurium* Stamm *TA98* (* signifikant unterschiedlich zur doppelten NK = 200%, NK = 100%, p<0,05)

7.5.1.4 Mutagenitätstest TA98 *(AFB1+S9, PhiP+S9) Tepalen*

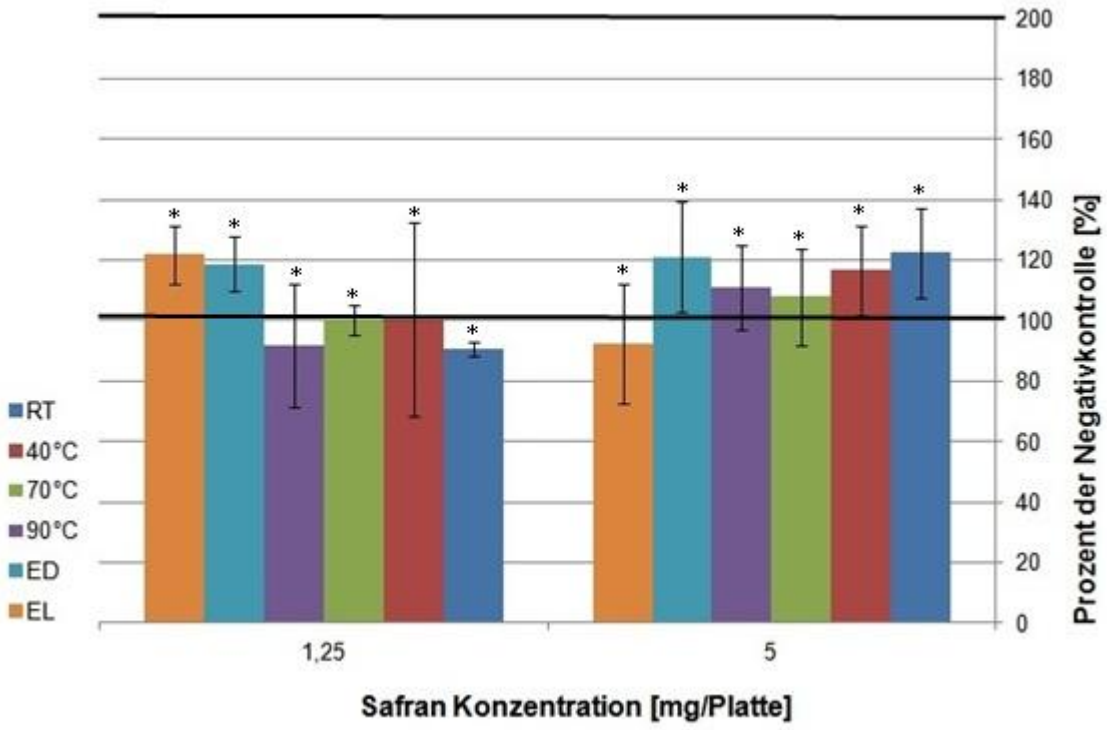

Abbildung 23: Nicht-Mutagenes-Potenzial von Tepalenextrakten gegenüber AFB1+S9 und PhiP+S9 als Positivkontrolle von Raumtemperatur-, °C- und H_2O:EtOH Extrakten (80:20) im *Salmonella typhimurium* Stamm *TA98* (* signifikant unterschiedlich zur doppelten NK = 200%, NK = 100%, p<0,05)

7.5.1.5 Mutagenitätstest TA102 *(TNFone) Narbenäste*

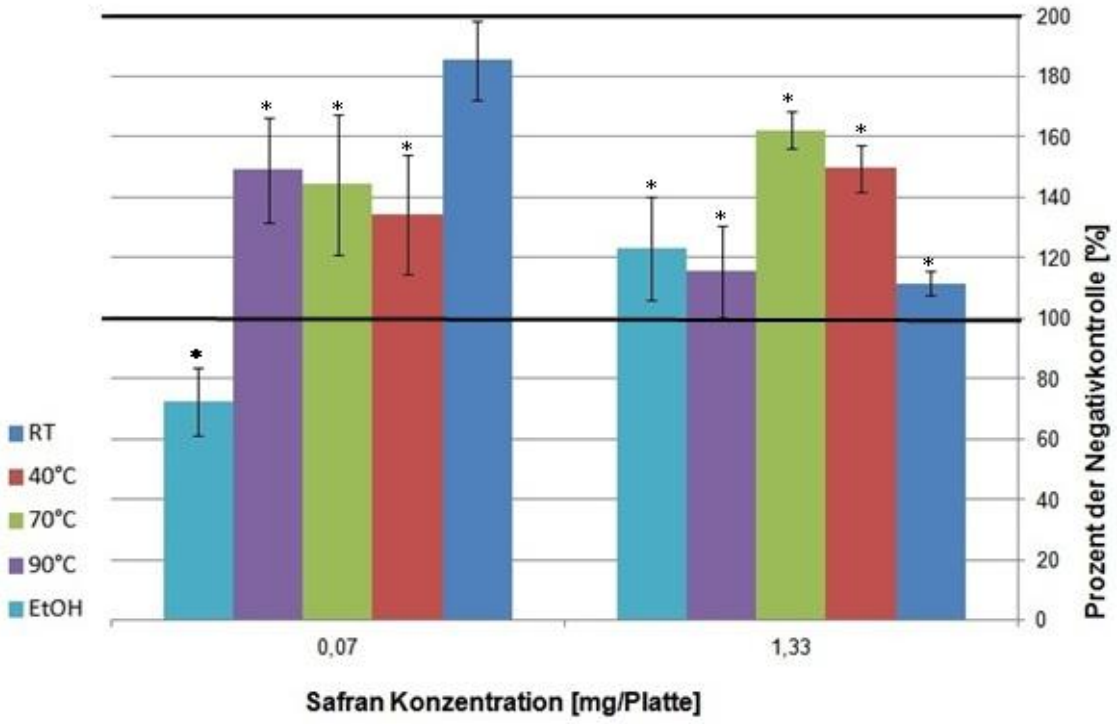

Abbildung 24: Nicht-Mutagenes-Potenzial von NÄ-Extrakten gegen TNFone als Positivkontrolle von Raumtemperatur-, °C- und H_2O:EtOH Extrakten (80:20) im *Salmonella typhimurium* Stamm *TA102 TA98* (* signifikant unterschiedlich zur doppelten NK = 200%, NK = 100% p<0,05)

7.5.1.6 Mutagenitätstest TA102 *(AFB1+S9) Narbenäste*

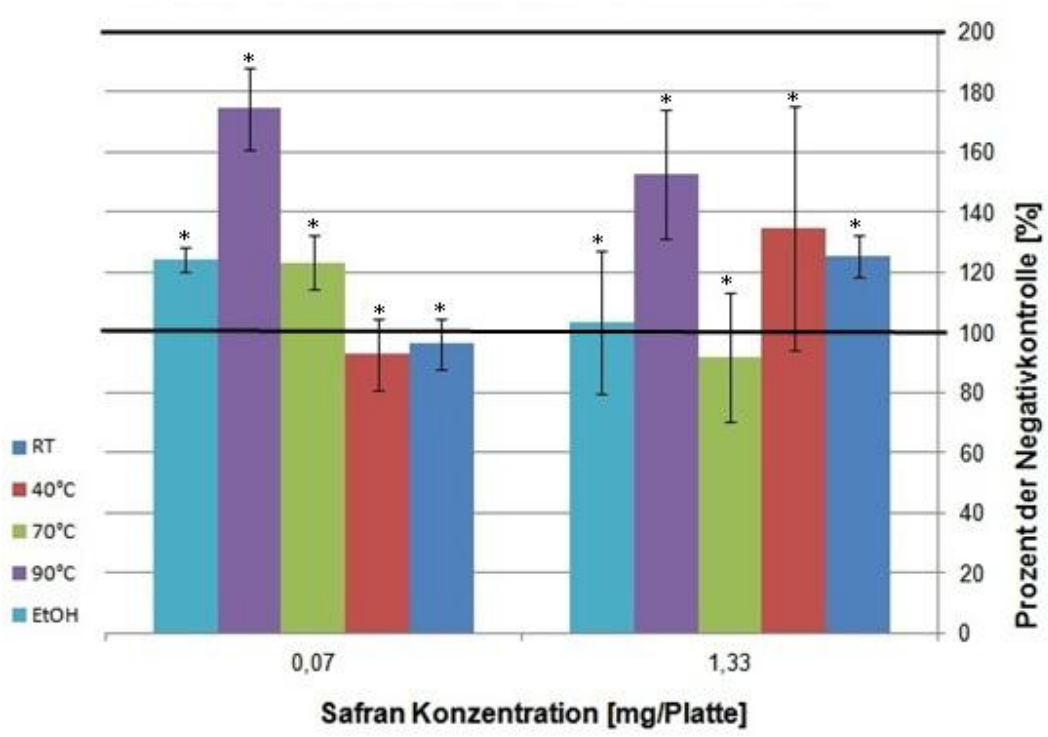

Abbildung 25: Nicht-Mutagenes-Potenzial von NÄ-Extrakten gegen AFB1+S9 als Positivkontrolle, von Raumtemperatur-, °C- und H_2O:EtOH Extrakten (80:20) im *Salmonella typhimurium* Stamm *TA102* (* signifikant unterschiedlich zur doppelten NK = 200%, NK = 100%, p<0,05)

7.5.1.7 Mutagenitätstest TA102 *(TNFone) Tepalen*

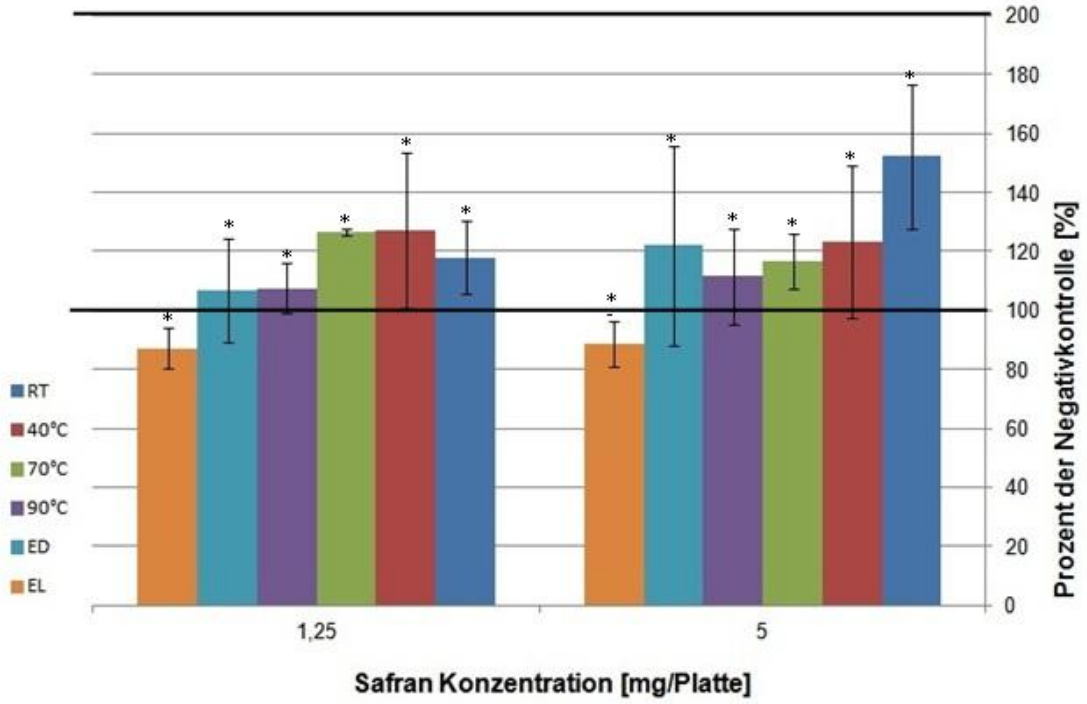

Abbildung 26: Nicht-Mutagenes-Potenzial von Tepalenextrakten gegen TNFone als Positivkontrolle von Raumtemperatur-, °C- und H_2O:EtOH Extrakten (80:20) im *Salmonella typhimurium* Stamm *TA102* (* signifikant unterschiedlich zur doppelten NK = 200%, NK = 100%, p<0,05)

7.5.1.8 Mutagenitätstest TA102 *(AFB1+S9) Tepalen*

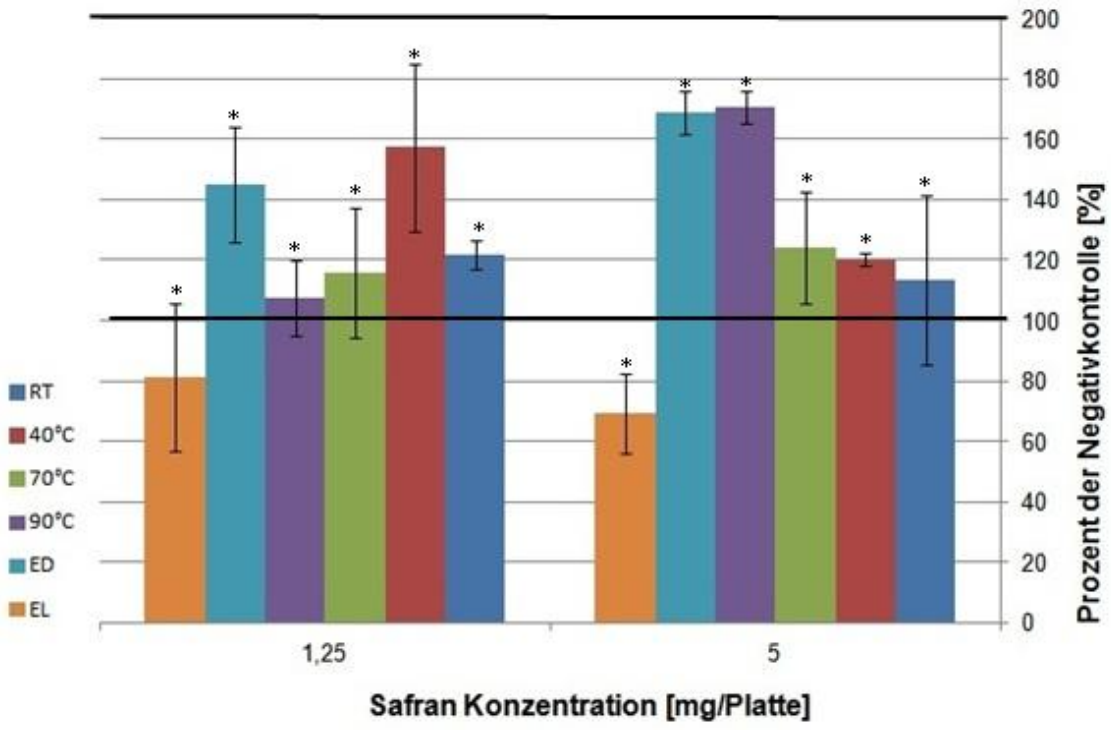

Abbildung 27: Nicht-Mutagenes-Potenzial von Tepalenextrakten gegen AFB1+S9 als Positivkontrolle, von Raumtemperatur-, °C- und H_2O:EtOH Extrakten (80:20) im *Salmonella typhimurium* Stamm *TA102* (* signifikant unterschiedlich zur doppelten NK = 200%, NK = 100%, p<0,05)

8 SCHLUSSBETRACHTUNG NARBENÄSTE UND TEPALENEXTRAKTE:

Das Ziel dieser Studie war, den anti-/mutagenen und anti-/oxidativen Effekt der lebensmittelrelevanten Pflanzenteile des „*Pannonischen Crocus sativus austriacus*“ (Klingenbach/Siegendorf, Bgld) im Ames-Test an zwei verschiedenen Salmonellen-Stämmen (*TA98*, *TA102*) gegenüber den Mutagenen TNFone, AFB+S9 und PHiP+S9 zu testen. Als nicht statistisches Bewertungssystem wurde der Mutagenitäts-Index (MI) eingesetzt. Die Konzentration sowie die Lagerung bei den Narbenästen waren dem Einsatz im küchentechnischen Bereich möglichst ident gestaltet.

Die Tepalen wurden zunächst gefriergetrocknet. Aufgrund der Ernteverzögerung im Jahr 2009 wurden für den ersten durchgeführten Test getrocknete NÄ des Jahres 2008 verwendet. Laut diverser Studien kann es bei der Lagerung von getrockneten NÄ zu einer Erhöhung von Safranal kommen [**BOLANDI *et al*.**, 2009]. Safranal hat die Fähigkeit, sich an die DNA zu binden. Mögliche positive sowie negative Wirkungen gegenüber Kanzerogenen müssten noch genauer eruiert werden [**KANAKIS *et al*.**, 2009]. Safranal zeigte sich in einem Ames-Salmonella-Test gegenüber 2-AA im *TA98*-Stamm als comutagen [**ABDULLAEV *et al*.**, 2003]. Die erhöhten Revertantenzahlen mit NÄ-Extrakten von 2008 könnten vermutlich auf die erhöhte Konzentration von Safranal zurückzuführen sein. Es zeigten sich jedoch bei den eingesetzten Konzentrationen keine Werte über MI<2 gegenüber der PK und ist aus diesem Grund nicht comutagen.

Zusammengefasst zeigten die NÄ-Extrakte gegenüber TNFone, AFB1+S9 und PHiP+S9 weder Anti-/Mutagenität noch Comutagenität. Unterschiede aufgrund der verschiedenen Lösungsmittel sowie Temperaturunterschiede zwischen den Wasserextrakten konnten keine festgestellt werden. Mögliche antimutagene/antioxidative Effekte des durchgeführten Tests mit NÄ-Extrakten gegenüber TNFone im *TA102*-Stamm könnten anteilsweise auf die Radikalfängereigenschaften bzw. das antioxidative Potenzial der NÄ-Extrakte zurückzuführen sein, und somit die antioxidative Kapazität der Safranextrakte unterstreichen. Weitere

Tests zur Analyse, inwiefern die antioxidativen Eigenschaften beteiligt sind, müssten zur Abklärung noch durchgeführt werden. Auch Safranal, Crocetin und Dimethylcrocetin können durch Bindung an DNA und tRNA einen Schutz vor Reaktionen von schädlichen Chemikalien bewirken [**KANAKIS *et al*.**, 2009]. Es zeigten sich jedoch in nur wenigen Proben signifikante Werte gegenüber der PK, die Standardabweichungen waren relativ hoch.

Die niedrigen NÄ-Konzentrationen (0,07 und 0,33 mg/Platte) zeigten im Test der NÄ-Extrakte gegenüber AFB1+S9 die geringsten Revertantenzahlen. Eine mögliche Erklärung liegt in den unterschiedlichen Verhältnissen, wie die NÄ-Inhaltstoffe (in den Lösungen) zueinander stehen. Auch hier zeigten sich hohe Standardabweichungen, die vielleicht in der zeitlich unterschiedlichen Testdurchführung begründet liegen. Temperaturunterschiede sowie Lösungsmittelunterschiede zeigten hier keine Auswirkungen.

Die Tepalenextrakte zeigten gegenüber TNFone im *TA98*-Stamm signifikante comutagene Eigenschaften. Diese lassen sich vermutlich durch den Gehalt an Kaempferol und Quercetin sowie ihren Derivaten anteilsweise erklären. In einer Ames-Test-Studie von Resende [**RESENDE *et al.*** 2012] zeigten Quercetin ohne S9 sowie Kaempferol mit S9 gegenüber dem *TA98*-Stamm mutagene Eigenschaften. Die Extrakte gegenüber Phip+S9 und AFB1+S9 zeigten im *TA98*-Test in etwa ähnliche his^+ Revertantenzahlen wie die PK, und somit keine anti-/mutagene, anti-/oxidative Eigenschaft.

Tepalenextrakte im *TA102* gegenüber TNFone zeigten eine leichte Erhöhung bei den Wasserextrakten, der his^+ Revertantenzahl gegenüber der PK. *TA102,* verglichen mit *TA98* gegenüber AFB1, zeigt bei den Tepalenextrakten niedrige Werte der his^+ Revertantenzahlen vor allem im Bereich der Wasserextrakte. Dieser Effekt könnte vermutlich nicht nur auf die Inaktivierung durch kovalente Bindung (PS) von AFB1, der Hemmung der Phase 1 Enzyme (PS, F) und der Maskierung der Bindungsstelle der DNA für Kanzerogene zurückgeführt werden, sondern auch auf ihre antioxidativen Eigenschaften. Tendenzen aufgrund

der Temperaturunterschiede und unterschiedlichen Lösungsmittel waren bei den Tepalenextrakten nicht gegeben.

9 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel dieser Studie war, den anti-/mutagenen und anti-/oxidativen Effekt der lebensmittelrelevanten Pflanzenteile des „*Pannonischen Crocus sativus austriacus*“ (Klingenbach/Siegendorf, Bgld) im Ames-Test an zwei verschiedenen Salmonellen-Stämmen (*TA98*, *TA102*) gegenüber den Mutagenen TNFone, AFB+S9 und PHiP+S9 zu testen. Die Narbenäste zeigten in dieser Studie weder mutagene, comutagene noch antimutagene Eigenschaften. Oxidative sowie antioxidative Eigenschaften der NÄ gegenüber *TA102* konnten nicht nachgewiesen werden. Der Test *TA102* gegenüber TNFone zeigte zwar einen dosisabhängigen, reduzierenden Effekt der auftretenden his^+ Revertantenzahlen, jedoch waren nur vier Proben signifikant.

Zusammenfassend konnten mit dieser Arbeit Studien bestätigt werden, die keine mutagenen, keine antimutagenen sowie keine comutagenen Eigenschaften gegenüber dem *TA98*-Stamm der NÄ-Extrakte belegen. Anti-/mutagene sowie anti-/oxidative Eigenschaften wurden auch im *TA102* gegenüber AFB1+S9 nicht erkannt. Die Tepalenextrakte wiesen eine comutagene Wirkung gegenüber TNFone auf, im *TA98*-Stamm jedoch zeigten sich weder antimutagene, antioxidative noch comutagene Effekte der Revertantenzahlen im *TA102* Stamm gegenüber TNFone. Tepalenextrakte, getestet im *TA102* gegenüber AFB1+S9, zeigten eine Tendenz zum antioxidativen/antimutagenen Potenzial der Tepalenextrakte. Unterschiede im Effekt der Ethanol-Extrakte gegenüber den Wasserextrakten konnten nur unregelmäßig festgestellt werden. Auch die eingesetzten unterschiedlichen Temperaturen in den Wasserextrakten zeigten keine Tendenzen. Mutagenität konnte in keinem der durchgeführten Tests detektiert werden.

10 SUMMARY

The aim of the present study was to investigate the anti-/mutagenic and anti-/oxidative effects of food relevant parts of *crocus sativus* L. cultivated in Austria (Klingenbach/Siegendorf, Bgld) in the Ames *Salmonella* test. The present test was conducted on two different *Salmonella typhimurium* strains: *TA98* and *TA102.* Different mutagens TNFone, AFB1+S9, PHiP+S9 were used to induce mutagenicity. The extract of the dried stigmas from „Crocus sativus austriacus" showed no-mutagenic, no-antimutagenic and no-comutagenic effects in *TA98* and also no-oxidative and no-antioxidative effects in *TA102*. The assay *TA102* against TNFone showed a dose-dependent reduction of the numbers of his+ revertants, however, only four samples showed significance against positive control. Anti-/mutagenic and anti-/oxidative effects against AFB1 in *TA102* was not observed.

A comutagnic effect could be seen in the *TA98*-strain against TNFone, however, there was no effect on *TA102* with the same mutagen. Saffron-petals-extracts, used in *TA102,* were indicating some possible antioxidative/antimutagic potential against AFB1+S9. The use of the different solvents used to produce no specific outcome.

Mutagenicity was not detected in any test.

11 LITERATUR

ABDULLAEV FI., RIVERON-NEGRETE L., CABALLERO-ORTEGA H., HERNANDEZ J. MANUEL, PEREZ-LOPEZ I., PEREDA-MIRANDA R., ESPINOSA-AGUIRRE J.J.. Use of in-vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.). Toxicology in-vitro 2003 Vol.17 (5-6); 731-736.

ALONSO GL., SALINAS MR., ESTEBAN-INFANTES FJ., SANCHEZ-FERNANDEZ MA.. Determination of Safranal from Saffron (*Crocus sativus* L.) by Thermal Desorption-Gas Chromatography. J. Agric. Food Chem. 1996 Vol.44; 185-188.

AMES BN., LEE FD., DURSTON WE.. An improved bacterial test system for the detection and classification of mutagens and carcinogens. Proceedings of the National Academy of Sciences 1973 70; 782-786.

BLASCHEK W., HÄNSEL R., KELLER K., REICHLING J., RIMPLER H., SCHNEIDER G.. Hagers Enzyklopädie der Arzneistoffe und Drogen. 5. Auflage Cod-Dig, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 2007; 319-336.

BOLANDI M., SHAHIDI F., SEDAGHAT N., FARHOSH R., GHASEMZADEH R.. Effect of Temperature, Water Activity and Storage Time on Color Strength, Aroma and Bitterness of Saffron. Journal of Science and Technology of Agriculture and Natural Resources, 2009, Vol.13(47); 61-66.

CABALLERO-ORTEGA H., PEREDA-MIRANDA R., ABDULLAEV FI.. HPLC quantification of major active components from 11 different saffron (*Crocus sativus* L.) sources. Food Chemistry 2007 Vol. 100 (3), 1126-1131.

CHEN Y., ZHANG H., TIAN X. , ZHAO C., CAI L. , LIU Y., JIA L. , YIN HX, CHEN C.. .Antioxidant potenzial of crocins and ethanol extracts of *Gardenia jasminoides* ELLIS and *Crocus sativus* L.: A relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents. Food Chemistry 2008 Vol.109 (3); 484-492.

CHERMAHINI SH., MAJID FAA., SARMIDI MR., TAGHIZADEH E., SALEHNEZ-HAD S.. Impact of saffron as an anti-cancer and anti-tumor herb. African Journal of Pharmacy and Pharmacology 2010 Vol. 4 (11); 834-840.

DEL CAMPO CP., CARMONA M., MAGGI L., KANAKIS CD., ANASTASAKI EG., TARANTILIS PA., POLISSIOU MG., ALONSO GL.. Picrocrocin Content and Quality Categories in Different (345) Worldwide Samples of Saffron (Crocus sativus L.). Journal Of Agricultural And Food Chemistry 2010 Vol.58 (2); 1305-1312.

ESCRIBANO J., ALONSO GL., COCA-PRADOS M., FERNÁNDEZ JA.. Crocin, safranal and picrocrocin from saffron (*Crocus sativus* L.) inhibit the growth of human cancer cells in-vitro. Cancer Letters 1996 Vol. 100 (1-2); 23-30.

FERNANDEZ JA.. Anticancer properties of saffron, Crocus sativus Linn.. Lead molecules from natural products 2007; 313-330.

HÄNSEL R., STICHER O.. Pharmakognosie Phytopharmazie 9 Auflage. Springer Medizin Verlag 2010; 829-830.

HEIDARZADEH H., BATHAIE Z., ASHOORI MM.. Effect of picrocrocin on breast cancer and EDA activity in rat. Clinical Biochemistry 2011 Vol. 44 (13); 177–178.

HOSHYAR R., BATHAIE ZS., SADEGHIZADEH M.. Crocetin inhibits cell proliferation in gastric cancer cell line, a highly expressing Bax gene. Clinical Biochemistry 2011 Vol. 44 (13); 114-115.

HUNZIKER R, HUNZIKER E.. Safran die Königin der Pflanzen. Herausgeber im Eigenverlag 2004; 8, 9, 29, 37.

ISONO K., YOURNO J.. Chemical Carcinogens as Frameshift Mutagens: *Salmonella* DNA Sequence Sensitive to Mutagenesis by Polycyclic Carcinogens. PNAS 1974 Vol. 71 (5); 1612-1617

KAFI M., KOOCHEKI A., RASHED MH., NASSIRI M.. Saffron (Crocus sativus) Production and Processing. Science Publishers 2006; 8

KANAKIS CD., ANASTASAKI EG., TARANTILIS PA., POLISSIOU MG., ALONSO GL.. Picrocrocin Content and Quality Categories in Different (345) Worldwide Samples of Saffron (Crocus sativus L.). J. Agric. Food Chem. 2010 58; 1305–1312.

KANAKIS CD., TARANTILIS PA., PAPPAS C., BARIYANGA J., TAJMIR-RIAHI HA., POLISSIOU MG.. An overview of structural features of DNA and RNA complexess with saffron compounds: Models and antioxidant activity. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology 2009 Issue: 3; 204-212.

KARI F. NTP technical report on the toxicity studies of trinitrofluorenone (Cas No. 129-79-3) administered by dermal application and dosed feed to F344/N rats and B6C3F1 mice. Toxicity report series 1992; 1-D4.

KARIMI E., OSKOUEIAN E., HENDRA R., JAAFAR HZE.. Evaluation of *Crocus sativus* L. Stigma Phenolic and Flavonoid Compounds and Its Antioxidant Activity. Molecules 2010 15, 6244-6256.

KOBERTZ WR., WANG D., WOGAN GN., ESSIGMANN JM.. An intercalation inhibitor altering the target selectivity of DNA damaging agents: Synthesis of site-specific aflatoxin B_1 adducts in a p53 mutational hotspot, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America (PNAS) 1997 Vol.: 94 (18); 9579-9584.

KUMAR V., BHAT ZA., KUMAR D., KHAN NA., CHASHOO IA., SHAH M.. Pharmocological Profile of Crocus sativus – A Comprehensive Review. Pharmacology-online3 2011: 799-811.

LEVIN DE., HOLLSTEIN M., CHRISTMAN MF., SCHWIERS EA., AMES BN.. A new Salmonella tester strain (TA102) with A•T base pairs at the site of mutation detects oxidative mutagens. Proceedings of the National Academy of Sciences 1982 79; 7445-7449.

MADAN CL., KAPUR BM., GUPTA US.. Saffron Economic Botany 1966 Vol. 20 4; 377-385.

MADRIGAL-SANTILLAN E., MORALES-GONZALEZ JA., VARGAS-MENDOZA N., REYES-RAMIREZ P., CRUZ-JAIME S., SUMAYA-MARTÍNEZ T., PEREZ-PASTEN R., MADRIGAL-BUJAIDAR E.. Antigenotoxic Studies of Different Substances to Reduce the DNA Damage Induced by Aflatoxin B1 and Ochratoxin A. Toxins 2010 2: 738-757.

MAGGI L, CARMONA M, . KELLY SD., MARIGHETO NS., ALONSO GL.. Geographical origin differentiation of saffron spice (*Crocus sativus* L. stigmas) – Preliminary investigation using chemical and multi-element (H, C, N) stable isotope analysis. Food Chemistry 2011 Vol. 128 (2), 543-548.

MARON DM., AMES BN.. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. Mutation research 1983 113 (3-4); 173-215.

MARQUARDT H, SCHÄFER S.. Lehrbuch der Toxikologie 2 Auflage 2004; 742-743.

MASTER Z. , CHAUDHARYA., SUTTER TR. , WILLETT KL. . Effects of flavonoids on CYP1 expression in RL95-2 endometrial carcinoma cells. Food Chemistry 2012 Vol. 133 (3); 912-922.

MELNYK JP. , WANG S., MARCONE MF.. Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. Food Research International 2010 Vol.: 43 (8); 1981-1989.

MORTELMANS K., ZEIGER E.. The Ames Salmonella/microsome assay. Mutation Research 2000 455; 29-60.

MUNTEANU FD., MANO N., KUHN A., GORTON L.. NADH electrooxidation using carbon paste electrodes modified with nitro-fluorenone derivatives immobilized on zirconium phosphate, Journal of Electroanalytical Chemistry 2004 Vol.: 564; 167-178.

NEGBI M.. Saffron, Crocus sativus L.. harwood academic publishers 1999; 103-110.

RESENDE FA., WAGNER V., CAMPANER DOS SANTO L., VARANDA EA.. Mutagenicity of Flavonoids Assayed by Bacterial Reverse Mutation (Ames) Test. Molecules 2012 17(5): 5255-5268.

SAMARGHANDIAN S., HOSSEIN BOSKABADY M., DAVOODI S.. Use of *in-vitro* assays to assess the potenzial antiproliferative and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.) in human lung cancer cell line. Pharmacogn Mag. 2010 6(24); 309–314.

SAMUELSSON G., BOHLEN L.. Drugs of Natural Origin: A Treatise of Pharmacognosy, 6th Revised Edition 2010; 477-479.

SANCHEZ-VIOQUEA R., RODRIGUEZ-CONDE MF., REINA-URENA JV., ESCOLANO-TERCERO MA., HERRAIZ-PENALVER D, SANTANA-MERIDAS O.. In-vitro antioxidant and metal chelating properties of corm, tepal and leaf from saffron (Crocus sativus L.). Industrial Crops and Products 2012 39; 149-153.

SCHIER V.. Probing the Mystery of the Use of Saffron in Medieval Nunneries. Sense and Society 2010 Vol. 4 (1); 57-72.

SCHMIDT M., BETTI G., HENSEL A.. Saffron in phytotherapy: Pharmacology and clinical uses. Wiener medizinische Wochenschau 2007 157 13-14; 315-319.

SERRANO-DÍAZ J., SÁNCHEZ AM., **MAGGI L. , CARMONA M., ALONSO GL..** Synergic effect of water-soluble components on the coloring strength of saffron spice. Journal of Food Composition and Analysis 2011 Vol. 24 (6); 873–879.

SRIVASTAVA R. , HMEDH. A, DIXIT RK. , DHARAMVEER, SARAF SA.. *Crocus sativus* L.: A comprehensive review. Pharmacognosy Review 2010 Vol. 4 (8); 200-208.

TERMENTZI A, KOKKALOU E.. LC-DAD-MS Analysis and Antioxidant Capacity of *Crocus sativus* Petal Extracts. Planta Med. 2008, 74(5): 573-581.

TEUSCHER E., LINDEQUIST U.. Biogene Gifte 3 Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart 2009; 226-228.

Vohr HW.. Toxikologie Band 1: Grundlagen der Toxikologie. WILEY-VCH Verlag Gmbh & Co. KGaA Weinheim; 149-150

WATZL B., LEITZMANN C.. Bioaktive Substanzen in Lebensmitteln 3., unveränderte Auflage, Hippokrates Verlag 2005; 82-86.

WICHTL M.. Teedrogen und Phytopharmaka. 4. Auflage 2002; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart; 59-161.

XI L. , QIAN Z. , DU P. , FU J. . Pharmacokinetic properties of crocin (crocetin digentiobiose ester) following oral administration in rats. Phytomedicine 2007 Vol. 14 (9); 633-636.

ZARINKAMAR F., TAJIK S., SOLEIMANPOUR S.. Effects of Altitude on Anatomy and Concentration of Crocin, Picrocrocin and Safranal in 'Crocus sativus' L. Australian Journal of Crop Science 2011, Vol. 5 (7); 831-838.

ZOUGAGH M., SIMONET BM., RIOS A., VALCARCEL M.. Use of non-aqueous capillary electrophoresis for the quality control of commercial saffron samples. Journal of Chromotography A 2005 Vol. 1085 (2); 293-298.

Internetquellen:

Report on Carcinogens, Twelfth Edition 2011, U.S. Department of Health and Human Services Public Health Service National Toxicology Program; 222 Datum 06.08.2012; Zeit: 21:44. http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/twelfth/roc12.pdf.

KAFI M., SHOWKET T.. A Comparative Study of Saffron Agronomy and Production Systems of Khorasan (Iran) and Kashmir (India). http://confbank.um.ac.ir/modules/conf_display/conferences/saffron/pdf/p16.pdf

KUMAR V., BHAT ZA., KUMAR D., KHAN NA., CHASHOO IA., SHAH M.. Pharmocological Profile of Crocus sativus – A Comprehensive Review. Pharmacology-online3 2011: 799-811. http://www.unisa.it/uploads/5917/80.kumar.pdf

BAZYLAK G., PAN T., WANG P., LEU Y., WU Y., WU T.. HPLC/UPLC assay of flavonoid fraction in polar extracts from various parts of medicinal spice *Crocus sativus* L. II Conference of Bioactive Plant Compounds, Pulawy Poland 2011. Session II: Analysis of phytochemicals in different matrix; 6-8. http://www.actabp.pl/pdf/Supl3_11/S2.pdf

12 ANHANG

12.1 Antimutagenitätstest TA98

12.1.1 Revertantenzahl für *TA98* Safranextrakt Narbenäste

Mutagen	Safranextrakt Narbenäste Konzentration [mg/Platte]									
	RT [1,33]	RT [0,67]	RT [0,33]	RT [0,07]	40°C [1,33]	40°C [0,67]	40°C [0,33]	40°C [0,07]	70°C [1,33]	70°C [0,67]
TNFone [0,3*10^{-6} mol/Platte]										
Safranextrakt Narbenäste	778	592	611	395	831	722	583	356	765	616
	752	614	631	419	844	734	542	368	773	603
	792	601	675	391	773	626	263	361	693	596
Mittelwert	774	6,02	639	402	816	694	463	362	744	605
StAbw	20,3	1,1	32,7	15,7	37,8	59,2	174,1	6,0	44,1	10,1
% Pos	217,4	169,2	179,5	112,8	229,2	194,9	130,0	101,6	208,9	169,9
StAbw% Pos	5,7	3,1	9,2	4,3	10,6	16,6	480,9	1,7	12,4	2,9

Mutagen	Safranextrakt Narbenäste Konzentration [mg/Platte]									
	70°C [0,33]	70°C [0,07]	90°C [1,33]	90°C [0,67]	90°C 0,33]	90°C [0,07]	EtOH [1,33]	EtOH [0,67]	EtOH [0,33]	EtOH [0,07]
TNFone [0,3*10^{-6} mol/Platte]										
Safranextrakt Narbenäste	468	400	506	444	320	299	291	360	320	322
	456	443	510	412	300	280	273	310	343	282
	452	413	517	371	328	293	303	345	378	325
Mittelwert	459	419	511	409	316	291	289	338	347	310
StAbw	8,3	22,1	5,6	36,6	14,4	9,7	15,1	25,7	29,2	24,0
% Pos	128,8	117,6	143,5	114,9	88,8	81,6	81,9	95,8	98,3	87,7
StAbw% Pos	2,3	6,2	1,6	10,3	4,1	2,7	4,3	7,3	8,3	6,8

Mutagen	Safranextrakt Narbenäste Konzentration [mg/Platte]									
	RT [1,33]	RT [0,67]	RT [0,33]	RT [0,07]	40°C [1,33]	40°C [0,67]	40°C [0,33]	40°C [0,07]	70°C [1,33]	70°C [0,67]
TNFone [0,3*10^{-6} mol/Platte] Testwiederholung										
Safranextrakt Narbenäste	522	470	406	322	458	400	475	332	572	432
	505	487	415	285	483	290	392	345	512	472
	541	492	366	298	544	249	399	343	518	480
Mittelwert	523	483	396	302	495	380	422	340	534	461
StAbw	18,0	11,5	26,1	18,8	44,2	81,4	46,0	7,0	33,0	25,7
% Pos	148,9	137,6	112,7	85,9	141,0	108,2	120,2	96,9	152,1	131,4
StAbw% Pos	5,1	3,3	7,4	5,3	12,6	23,2	13,1	2,0	9,4	7,3

Mutagen	Safranextrakt Narbenäste Konzentration [mg/Platte]									
	70°C [0,33]	70°C [0,07]	90°C [1,33]	90°C [0,67]	90°C [0,33]	90°C [0,07]	EtOH [1,33]	EtOH [0,67]	EtOH [0,33]	EtOH [0,07]
TNFone [0,3*10^{-6} mol/Platte] Testwiederholung										
Safranextrakt Narbenäste	447	368	491	544	491	387	–	–	–	–
	386	398	534	541	456	392	–	–	–	–
	406	355	520	531	392	399	–	–	–	–
Mittelwert	413	374	515	539	446	393	–	–	–	–
StAbw	31,1	22,1	21,9	6,8	50,2	6,0	–	–	–	–
% Pos	117,7	106,5	146,7	153,5	127,2	111,9	–	–	–	–
StAbw% Pos	8,9	6,3	6,2	1,9	14,3	1,7	–	–	–	–

Tabelle 18: Singelrevertantenzahl *TA98*: TNFone, NÄ

Mutagen	Safranextrakt Narbenäste Konzentration [mg/Platte]									
	RT [1,33]	RT [0,67]	RT [0,33]	RT [0,07]	40°C [1,33]	40°C [0,67]	40°C [0,33]	40°C [0,07]	70°C [1,33]	70°C [0,67]
AFB1 [1,2*10^{-8} mol/Platte]+S9										
Safranextrakt Narbenäste	180	150	167	132	157	211	231	140	157	152
	146	153	143	118	159	–	135	132	136	148
	173	133	144	125	162	182	175	145	160	140
Mittelwert	166	145	151	125	159	197	180	139	151	147
StAbw	18,0	10,8	13,6	7,0	2,5	20,5	48,2	6,6	13,1	6,1
% Pos	101,8	89,0	92,7	76,5	97,6	120,3	110,4	85,1	92,4	89,8
StAbw% Pos	11,0	6,6	8,3	4,3	1,5	12,6	29,5	4,0	8,0	3,7

Mutagen	Safranextrakt Narbenäste Konzentration [mg/Platte]									
	70°C [0,33]	70°C [0,07]	90°C [1,33]	90°C [0,67]	90°C [0,33]	90°C [0,07]	EtOH [1,33]	EtOH [0,67]	EtOH [0,33]	EtOH [0,07]
AFB1 [1,2*10^{-8} mol/Platte]+S9										
Safranextrakt Narbenäste	149	152	180	173	175	152	171	161	134	132
	153	143	162	146	151	141	162	189	149	110
	170	147	171	153	174	110	150	159	152	128
Mittelwert	157	148	171	157	167	134	161	170	145	123
StAbw	11,2	4,6	9,0	14,0	13,6	21,8	10,5	16,8	9,6	11,7
% Pos	96,3	90,6	104,7	96,3	102,0	82,2	98,6	103,9	8,8	75,5
StAbw% Pos	6,8	2,8	5,5	8,6	8,3	13,3	6,5	103	5,9	7,2

Mutagen	Safranextrakt Narbenäste Konzentration [mg/Platte]									
	RT [1,33]	RT [0,67]	RT [0,33]	RT [0,07]	40°C [1,33]	40°C [0,67]	40°C [0,33]	40°C [0,07]	70°C [1,33]	70°C [0,67]
AFB1 [1,2*10^{-8} mol/Platte]+S9 Testwiederholung										
Safranextrakt Narbenäste	172	164	170	156	169	193	158	160	191	154
	163	193	184	156	172	160	160	164	185	172
	169	156	167	143	123	167	171	156	185	163
Mittelwert	168	171	175	152	155	173	163	160	187	163
StAbw	4,6	19,5	11,9	7,5	7,5	17,4	7,0	4,0	3,5	9,0
% Pos	94,7	96,4	98,9	85,5	87,2	97,7	91,9	90,2	105,5	91,9
StAbw% Pos	2,6	11,0	6,7	4,2	15,5	9,8	3,9	2,3	2,0	5,1

Mutagen	Safranextrakt Narbenäste Konzentration []									
	70°C [0,33]	70°C [0,07]	90°C [1,33]	90°C [0,67]	90°C [0,33]	90°C [0,07]	EtOH [1,33]	EtOH [0,67]	EtOH [0,33]	EtOH [0,07]
AFB1 [1,2*10^{-8} mol/Platte]+S9 Testwiederholung										
Safranextrakt Narbenäste	137	171	173	142	166	151	158	180	152	143
	152	166	156	133	176	161	187	173	177	133
	142	132	151	145	150	124	208	183	174	154
Mittelwert	144	156	160	140	164	145	184	179	168	143
StAbw	7,6	21,2	11,5	6,2	13,1	19,1	25,1	5,1	13,7	10,5
% Pos	81,0	88,2	90,2	78,9	92,5	82,0	103,9	100,8	94,5	80,8
StAbw% Pos	4,3	12,0	6,5	3,5	7,4	10,8	14,2	2,9	7,7	5,9

Tabelle 19: Singelrevertantenzahl TA98: AFB1+S9, Narbenäste

Mutagen	Safranextrakt Narbenäste Konzentration [mg/Platte]									
	RT [1,33]	RT [0,67]	RT [0,33]	RT [0,07]	40°C [1,33]	40°C [0,67]	40°C [0,33]	40°C [0,07]	70°C [1,33]	70°C [0,67]
PhiP [0,1*10^{-8} mol/Platte]+S9										
Safranextrakt Narbenäste	473	682	641	644	542	506	456	461	684	583
	491	622	575	612	563	644	470	512	691	530
	511	645	648	642	609	477	456	478	643	591
Mittelwert	492	650	621	633	571	542	461	484	673	568
StAbw	19,0	30,3	40,3	17,9	34,3	89,2	8,1	26,0	25,9	33,2
% Pos	80,0	105,7	101,1	102,9	93,0	88,2	74,9	78,7	109,4	92,4
StAbw% Pos	3,1	4,9	6,6	2,9	5,6	14,5	1,3	4,2	4,2	5,4

Mutagen	Safranextrakt Narbenäste Konzentration [mg/Platte]									
	70°C [0,33]	70°C [0,07]	90°C [1,33]	90°C [0,67]	90°C [0,33]	90°C [0,07]	EtOH [1,33]	EtOH [0,67]	EtOH [0,33]	EtOH [1,33]
PhiP [0,1*10^{-8} mol/Platte]+S9										
Safranextrakt Narbenäste	452	628	568	591	551	534	471	551	518	497
	483	677	500	496	560	599	524	493	542	493
	471	704	556	578	583	674	515	523	523	462
Mittelwert	469	670	541	555	565	602	503	522	528	484
StAbw	15,6	38,5	36,3	51,5	16,5	70,1	28,4	29,0	12,7	19,2
% Pos	76,2	108,9	88,1	90,3	91,9	98,0	81,9	85,0	85,8	78,7
StAbw% Pos	2,5	6,3	5,9	8,4	2,7	11,4	4,6	4,7	2,1	3,1

Mutagen	Safranextrakt Narbenäste Konzentration [mg/Platte]									
	RT [1,33]	RT [0,67]	RT [0,33]	RT [0,07]	40°C [1,33]	40°C [0,67]	40°C [0,33]	40°C [0,07]	70°C [1,33]	70°C [0,67]
PhiP [0,1*10^{-8} mol/Platte]+S9 Testwiederholung										
Safranextrakt Narbenäste	690	657	531	499	473	447	533	460	789	732
	613	642	554	546	516	468	435	423	631	653
	732	623	638	518	484	478	484	412	703	616
Mittelwert	678	641	574	521	491	464	484	432	708	666
StAbw	60,4	17,0	56,3	23,6	22,3	15,8	49,0	25,1	79,1	60,6
% Pos	104,3	98,5	88,3	80,1	75,5	71,4	74,4	66,3	108,8	102,4
StAbw% Pos	9,3	2,6	8,7	3,6	3,4	2,4	7,5	3,9	12,2	9,3

Mutagen	Safranextrakt Narbenäste Konzentration [mg/Platte]									
	70°C [0,33]	70°C [0,07]	90°C [1,33]	90°C [0,67]	90°C [0,33]	90°C [0,07]	EtOH [1,33]	EtOH [0,67]	EtOH [0,33]	EtOH [0,07]
PhiP [0,1*10^{-8} mol/Platte]+S9 Testwiederholung										
Safranextrakt Narbenäste	559	761	541	706	601	649	692	411	472	477
	558	721	627	626	637	627	569	464	476	487
	663	695	693	625	523	603	537	422	442	464
Mittelwert	593	726	620	652	587	626	599	432	463	476
StAbw	60,3	33,2	76,2	46,5	58,3	23,0	81,8	28,0	18,6	11,5
% Pos	91,2	111,5	95,3	100,3	90,2	96,3	92,1	66,4	71,2	73,2
StAbw% Pos	9,3	5,2	11,7	7,1	9,0	3,5	12,6	4,3	2,9	1,8

Tabelle 20: Singelrevertantenzahl *TA98*: PHiP+S9, NÄ

12.1.2 *Werte der Positivkontrolle für TA98 Safranextrakt, Narbenäste*

	TNFone	TNFone Wiederholung	PhiP+S9	PhiP+S9 Wiederholung	AFB1+S9	AFB1+S9 Wiederholung
Positiv I	370	348	565	623	162	193
Positiv II	366	340	687	714	170	183
Positiv III	332	365	592	615	158	156
Mittelwert	356	351	615	651	163	177
StAbw.	20,9	12,8	64,1	55,0	6,1	19,1
% Pos	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0
StAbw.% Pos	5,9	3,6	10,4	8,5	3,7	10,8

Tabelle 21: Werte der Positivkontrolle für TNFone, PHiP+S9 und AFB1+S9 in *TA98*, NÄ

12.1.3 Werte der Negativkontrolle für *TA98* Safranextrakte, Narbenäste

	TNFone	TNFone Wiederholung	PhiP+S9	PhiP+S9 Wiederholung	AFB1+S9	AFB1+S9 Wiederholung
Negativ I	39	78	47	55	57	57
Negativ II	37	75	47	66	60	59
Negativ III	38	76	71	61	59	54
Negativ IV	43	93	56	45	52	62
Negativ V	49	98	58	42	49	63
Negativ VI	39	103	55	58	50	60
Mittelwert	41	87	56	55	55	59
StAbw.	4	12	9	9	4,8	3,3
% Pos	11,5	24,8	9,1	8,4	33,4	33,4
StAbw.% Pos	1,3	3,5	1,4	1,4	2,9	1,9

Tabelle 22: Werte der Negativkontrolle H_2O für TNFone, PHiP+S9, AFB1+S9 in *TA98*, NÄ

	TNFone	TNFone Wiederholung	PhiP+S9	PhiP+S9 Wiederholung	AFB1+S9	AFB1+S9 Wiederholung
Negativ I	71	–	72	53	50	70
Negativ II	94	–	69	69	44	65
Negativ III	65	–	63	71	53	62
Negativ IV	66	–	64	83	64	59
Negativ V	69	–	79	79	61	61
Negativ VI	79	–	61	54	60	60
Mittelwert	74	–	68	68	55	63
StAbw.	11,0	–	6,8	12,5	7,6	4,1
% Pos	20,8	–	11,1	10,5	33,9	35,4
StAbw.% Pos	3,1	–	1,1	1,9	4,7	2,3

Tabelle 23: Werte der Negativkontrolle H_2O:EtOH für TNFone, PHiP+S9, AFB1+S9 in *TA98*, NÄ

Revertantenzahl für *TA98* Safranextrakt Tepalen

Mutagen	Safranextrakt Tepalen Konzentration [mg/Platte]								
	RT [5]	RT [2,5]	RT [1,25]	40°C [5]	40°C [2,5]	40°C [1,25]	70°C [5]	70°C [2,5]	70°C [1,25]
TNFone [0,3*10^{-6} mol/Platte]									
Safranextrakt Tepalen	576	616	602	614	702	508	483	612	502
	629	657	565	566	711	600	527	595	512
	507	643	547	553	715	489	388	600	534
Mittelwert	571	639	571	578	709	532	466	602	516
StAbw	61,2	20,8	28,0	32,1	6,7	59,4	71,0	8,7	16,4
% Pos	241,8	270,6	242,1	244,8	300,6	225,6	197,5	255,2	218,6
StAbw% Pos	25,9	8,8	11,9	13,6	2,8	25,2	30,1	3,7	6,9

Mutagen	Safranextrakt Tepalen Konzentration [mg/Platte]								
	90°C [5]	90°C [2,5]	90°C [1,25]	ED [5]	ED [2,5]	ED [1,25]	EL [5]	EL [2,5]	EL [1,25]
TNFone [0,3*10^{-6} mol/Platte]									
Safranextrakt Tepalen	666	836	659	391	497	389	678	625	541
	794	873	531	337	429	301	647	595	581
	732	821	555	369	413	377	562	583	517
Mittelwert	731	843	582	366	446	356	629	601	546
StAbw	64,0	26,8	68,0	27,2	44,6	47,7	60,1	21,6	32,3
% Pos	309,6	357,3	246,5	154,9	189,1	150,7	266,5	254,7	231,5
StAbw% Pos	27,1	11,3	28,8	11,5	18,9	20,2	25,4	9,2	13,7

Mutagen	Safranextrakt Tepalen Konzentration [mg/Platte]								
	RT [5]	RT [2,5]	RT [1,25]	40°C [5]	40°C [2,5]	40°C [1,25]	70°C [5]	70°C [2,5]	70°C [1,25]
TNFone [0,3*10^{-6} mol/Platte] Testwiederholung									
Safranextrakt Tepalen	1105	984	866	1035	1145	1135	913	744	780
	1123	939	903	970	1111	1105	813	784	826
	1145	912	983	940	1093	833	886	703	738
Mittelwert	1124	947	917	982	1116	1024	871	745	781
StAbw	20,0	39,1	59,8	48,6	26,4	166,4	51,7	42,0	44,0
% Pos	329,4	277,3	268,8	287,6	327,1	300,1	255,1	218,2	228,9
StAbw% Pos	5,9	11,4	17,5	14,2	7,7	48,7	15,2	12,3	12,9

Mutagen	Safranextrakt Tepalen Konzentration [mg/Platte]								
	90°C [5]	90°C [2,5]	90°C [1,25]	ED [5]	ED [2,5]	ED [1,25]	EL [5]	EL [2,5]	EL [1,25]
TNFone [0,3*10^{-6} mol/Platte] Testwiederholung									
Safranextrakt Tepalen	1195	985	937	564	729	637	893	653	643
	1145	993	993	620	538	641	903	665	612
	1092	1009	972	579	800	619	866	727	647
Mittelwert	1144	996	967	588	689	632	887	682	634
StAbw	51,5	12,2	28,3	29,0	135,5	11,7	19,1	39,7	19,2
% Pos	335,2	291,7	283,4	172,2	201,9	185,3	260,0	199,7	185,7
StAbw% Pos	15,1	3,6	8,3	8,5	39,7	3,4	5,6	11,6	5,6

Tabelle 24: Singelrevertantenzahl *TA98*: TNFone, Tepalen

Mutagen	Safranextrakt Tepalen Konzentration [mg/Platte]								
	RT [5]	RT [2,5]	RT [1,25]	40°C [5]	40°C [2,5]	40°C [1,25]	70°C [5]	70°C [2,5]	70°C [1,25]
AFB [1,2*10^{-8} mol/Platte]+S9									
Safranextrakt Tepalen	179	205	176	241	213	178	182	192	165
	104	154	161	203	200	139	198	209	164
	129	147	179	214	207	118	196	190	157
Mittelwert	137	169	172	219	207	145	192	197	162
StAbw	38,2	31,7	9,6	19,6	6,5	30,4	8,7	10,4	4,4
% Pos	65,8	80,8	82,4	105,1	99,0	69,5	92,0	94,4	77,6
StAbw% Pos	18,3	15,2	4,6	9,4	3,1	14,6	4,2	5,0	2,1

Mutagen	Safranextrakt Tepalen Konzentration [mg/Platte]								
	90°C [5]	90°C [2,5]	90°C [1,25]	ED [5]	ED [2,5]	ED [1,25]	EL [5]	EL [2,5]	EL [1,25]
AFB1 [1,2*10^{-8} mol/Platte]+S9									
Safranextrakt Tepalen	181	163	165	182	124	104	180	208	157
	209	118	170	143	117	146	175	183	160
	260	179	182	81	104	144	194	156	182
Mittelwert	217	153	172	135	115	131	183	182	166
StAbw	40,1	31,6	8,7	50,9	101	23,7	9,8	26,0	13,7
% Pos	103,8	73,5	82,6	64,9	5,1	62,9	87,7	87,4	79,7
StAbw% Pos	19,2	15,2	4,2	24,4	4,9	11,4	4,7	12,5	6,5

Mutagen	Safranextrakt Tepalen Konzentration [mg/Platte]								
	RT [5]	RT [2,5]	RT [1,25]	40°C [5]	40°C [2,5]	40°C [1,25]	70°C [5]	70°C [2,5]	70°C [1,25]
AFB1 [1,2*10^{-8} mol/Platte]+S9 Testwiederholung									
Safranextrakt Tepalen	149	154	191	158	193	166	232	234	213
	155	120	174	128	148	159	216	313	198
	188	172	179	154	107	151	252	–	210
Mittelwert	164	149	181	147	149	159	233	274	207
StAbw	21,0	26,4	8,7	16,3	43,0	7,5	18,0	55,9	7,9
% Pos	92,0	83,4	101,7	82,2	83,7	89,0	130,8	153,4	116,1
StAbw% Pos	11,8	14,8	4,9	9,1	24,1	4,2	10,1	31,3	4,5

Mutagen	Safranextrakt Tepalen Konzentration []								
	90°C [5]	90°C [2,5]	90°C [1,25]	ED [5]	ED [2,5]	ED [1,25]	EL [5]	EL [2,5]	EL [1,25]
AFB1 [1,2*10^{-8} mol/Platte]+S9 Testwiederholung									
Safranextrakt Tepalen	184	141	175	102	159	90	194	203	203
	184	160	183	112	142	149	180	199	191
	194	93	190	132	149	140	–	205	182
Mittelwert	187	131	183	115	150	126	187	202	192
StAbw	5,8	34,5	7,5	14,2	8,5	31,8	9,9	3,1	10,5
% Pos	105,0	73,6	102,4	64,3	84,1	70,8	104,9	113,5	107,7
StAbw% Pos	3,2	19,4	4,2	8,0	4,8	17,8	5,6	1,7	5,9

Tabelle 25: Singelrevertantenzahl *TA98*: AFB1+S9, Tepalen

Mutagen	Safranextrakt Tepalen Konzentration [mg/Platte]								
	RT [5]	RT [2,5]	RT [1,25]	40°C [5]	40°C [2,5]	40°C [1,25]	70°C [5]	70°C [2,5]	70°C [1,25]
PhiP [0,1*10^{-8} mol/Platte]+S9									
Safranextrakt Tepalen	498	562	583	467	574	378	498	607	457
	446	445	547	447	497	562	448	613	479
	526	568	601	463	523	431	465	552	518
Mittelwert	490	525	577	459	531	457	470	591	485
StAbw	406	69,3	27,5	10,6	39,2	94,7	25,4	33,6	30,9
% Pos	95,6	102,5	112,6	89,6	103,7	89,2	91,8	115,3	94,6
StAbw% Pos	7,9	13,5	5,4	2,1	7,6	18,5	5,0	6,6	6,0

Mutagen	Safranextrakt Tepalen Konzentration [mg/Platte]								
	90°C [5]	90°C [2,5]	90°C [1,25]	ED [5]	ED [2,5]	ED [1,25]	EL [5]	EL [2,5]	EL [1,25]
PhiP [0,1*10^{-8} mol/Platte]+S9									
Safranextrakt Tepalen	416	480	430	540	502	400	519	496	528
	416	434	429	397	431	415	446	502	483
	423	378	383	458	497	405	512	466	423
Mittelwert	418	431	414	468	477	407	492	488	477
StAbw	4,0	51,1	26,9	71,8	39,6	7,6	40,3	19,3	51,3
% Pos	81,7	84,1	80,8	90,8	93,0	79,4	96,1	95,3	93,1
StAbw% Pos	0,8	10,0	5,2	14,0	7,7	1,5	7,9	3,8	10,0

Mutagen	Safranextrakt Tepalen Konzentration [mg/Platte]								
	RT [5]	RT [2,5]	RT [1,25]	40°C [5]	40°C [2,5]	40°C [1,25]	70°C [5]	70°C [2,5]	70°C [1,25]
PhiP [0,1*10^{-8} mol/Platte]+S9 Testwiederholung									
Safranextrakt Tepalen	295	262	409	442	180	402	236	521	372
	267	272	403	327	305	416	196	365	297
	379	273	293	342	231	376	179	–	251
Mittelwert	314	269	368	370	239	398	204	443	307
StAbw	58,3	6,1	65,3	62,5	62,9	20,3	29,3	110,3	61,1
% Pos	17,9	61,7	84,4	84,9	54,7	91,2	46,7	101,5	70,3
StAbw% Pos	13,4	1,4	15,0	14,3	14,4	4,7	6,7	25,3	14,0

Mutagen	Safranextrakt Tepalen Konzentration [mg/Platte]								
	90°C [5]	90°C [2,5]	90°C [1,25]	ED [5]	ED [2,5]	ED [1,25]	EL [5]	EL [2,5]	EL [1,25]
PhiP [0,1*10^{-8} mol/Platte]+S9 Testwiederholung									
Safranextrakt Tepalen	456 434 369	346 310 335	275 344 407	382 378 368	396 387 369	361 367 370	253 337 328	341 322 362	347 313 –
Mittelwert	420	330	342	376	384	366	306	342	330
StAbw	45,2	18,4	66,0	7,2	13,7	4,6	46,1	20,0	24,0
% Pos	96,2	75,7	78,4	86,2	88,0	83,9	70,1	78,3	75,6
StAbw% Pos	10,4	4,2	15,1	1,7	3,2	1,1	10,6	4,6	5,5

Tabelle 26: Singelrevertantenzahl TA98: PHiP+S9, Tepalen

12.1.4 Werte der Positivkontrolle für *TA98* Tepalen

	TNFone	TNFone Wiederholung	PhiP+S9	PhiP+S9 Wiederholung	AFB1+S9	AFB+S9 Wiederholung
Positiv I	239	365	542	554	201	167
Positiv II	232	326	500	361	194	188
Positiv III	237	333	495	394	231	180
Mittelwert	236	341	512	436	209	178
StAbw.	3,6	20,8	25,8	103,2	19,7	10,6
% Pos	100	100	100	100	100	100
StAbw.% Pos	1,5	6,1	5,0	23,7	9,4	5,9

Tabelle 27: Werte der Positivkontrolle für TNFone, PHiP+S9 und AFB1+S9 in *TA98* (Tepalen)

12.1.5 Werte der Negativkontrolle *TA98* Safranextrakt Tepalen

	TNFone	TNFone Wiederholung	PhiP+S9	PhiP+S9 Wiederholung	AFB1+S9	AFB+S9 Wiederholung
Negativ I	46	36	51	81	34	51
Negativ II	54	36	51	60	39	62
Negativ III	56	35	54	59	34	55
Negativ IV	48	33	58	71	41	59
Negativ V	37	36	53	61	42	51
Negativ VI	44	46	43	65	43	49
Mittelwert	48	37	52	66	39	55
StAbw.	6,9	4,6	5,0	8,5	4,0	5,1
% Pos	20,1	10,8	10,1	15,2	18,6	30,6
StAbw.% Pos	2,9	1,3	1,0	1,9	1,9	2,9

Tabelle 28: Werte der Negativkontrolle H_2O für TNFone, PHiP+S9, AFB1+S9 in *TA98* (Tepalen)

	TNFone	TNFone Wiederholung	PhiP+S9	PhiP+S9 Wiederholung	AFB1+S9	AFB1+S9 Wiederholung
Negativ I	37	36	57	80	45	56
Negativ II	41	45	44	67	57	54
Negativ III	43	31	61	77	56	56
Negativ IV	39	35	55	65	47	58
Negativ V	47	39	87	55	50	53
Negativ VI	31	41	86	–	66	74
Mittelwert	40	38	65	69	54	59
StAbw.	5,5	4,9	17,6	10,0	7,8	7,8
% Pos	16,8	11,1	12,7	15,8	25,6	32,8
StAbw.% Pos	2,3	1,4	3,4	2,3	3,7	4,4

Tabelle 29: Werte der Negativkontrolle H_2O:EtOH für TNFone, PHiP+S9, AFB1+S9 in *TA98* (Tepalen)

12.2 Antimutagenität/Antioxidativitäts-Test mit TA102

12.2.1 Revertantenzahl für *TA102* Safranextrakt Narbenäste

Mutagen	Safranextrakt Narbenäste Konzentration [mg/Platte]									
	RT [1,33]	RT [0,67]	RT [0,33]	RT [0,07]	40°C [1,33]	40°C [0,67]	40°C [0,33]	40°C [0,07]	70°C [1,33]	70°C [0,67]
TNFone [0,2*10-^{7} mol/Platte]										
Safranextrakt Narbenäste	1002	1205	1073	1142	995	1062	966	1192	735	1083
	1024	1207	1154	984	973	1323	1089	853	805	7221
	975	1171	1008	1070	998	1122	1162	759	838	890
Mittelwert	1000	1194	1078	1065	989	1169	1072	935	793	1065
StAbw	24,5	20,2	73,1	79,1	13,7	136,7	99,1	227,8	52,6	166,3
% Pos	83,6	99,9	90,2	89,1	82,7	97,7	89,7	78,1	66,3	89,0
StAbw% Pos	2,1	1,7	6,1	6,6	1,1	11,4	8,3	19,0	4,4	13,9

Mutagen	Safranextrakt Narbenäste Konzentration [mg/Platte]									
	70°C [0,33]	70°C [0,07]	90°C [1,33]	90°C [0,67]	90°C [0,33]	90°C [0,07]	EtOH [1,33]	EtOH [0,67]	EtOH [0,33]	EtOH [0,07]
TNFone [0,2*10-^{7} mol/Platte]										
Safranextrakt Narbenäste	962	983	915	1032	1054	1213	693	976	1173	1239
	998	1073	889	1057	1167	1293	713	1007	1270	1074
	970	979	1017	1090	1241	981	890	752	1003	1051
Mittelwert	977	1012	940	1060	1154	1162	765	912	1149	1121
StAbw	18,9	53,2	67,7	29,1	94,2	162,1	108,4	139,1	135,2	102,5
% Pos	81,7	84,6	78,6	88,6	96,5	97,2	64,0	76,2	96,0	93,8
StAbw% Pos	1,6	4,4	5,7	2,4	7,9	13,5	9,1	11,6	11,3	8,6

Mutagen	Safranextrakt Narbenäste Konzentration [mg/Platte]									
	RT [1,33]	RT [0,67]	RT [0,33]	RT [0,07]	40°C [1,33]	40°C [0,67]	40°C [0,33]	40°C [0,07]	70°C [1,33]	70°C [0,67]
TNFone [0,2*10-^{7} mol/Platte] Testwiederholung										
Safranextrakt Narbenäste	1036	987	912	1115	1064	966	1091	1133	942	1015
	1049	981	961	848	1034	851	1111	1093	944	966
	978	1047	687	1000	1084	852	1004	996	1034	909
Mittelwert	1019	1005	853	988	1061	890	1069	1074	973	963
StAbw	36,8	36,5	146,1	133,9	25,2	66,1	56,9	70,4	52,5	53,1
% Pos	87,7	86,5	73,5	85,0	91,3	76,6	92,0	92,5	83,8	82,9
StAbw% Pos	3,2	3,1	12,6	11,5	2,2	5,7	4,9	6,1	4,5	4,6

Mutagen	Safranextrakt Narbenäste Konzentration [mg/Platte]									
	70°C [1,33]	70°C [0,67]	90°C [1,33]	90°C [0,67]	90°C [0,33]	90°C [0,07]	EtOH [1,33]	EtOH [0,67]	EtOH [0,33]	EtOH [0,07]
TNFone [0,2*10-^{7} mol/Platte] Testwiederholung										
Safranextrakt Narbenäste	932	1280	932	873	993	1022	726	774	988	733
	1035	1303	1001	1145	962	1014	1000	843	918	822
	1013	1163	1033	697	991	906	868	912	941	798
Mittelwert	993	1249	989	905	982	981	865	843	849	784
StAbw	54,2	75,1	51,6	225,7	17,3	64,8	137,0	69,0	35,7	46,0
% Pos	85,5	107,5	85,1	77,9	84,5	84,4	74,4	72,6	81,7	67,5
StAbw% Pos	4,4	6,5	4,4	19,4	1,5	5,6	11,8	5,9	3,1	4,0

Tabelle 30: Singelrevertantenzahl für *TA102*: TNFone NÄ

Mutagen	Safranextrakt Narbenäste Konzentration [mg/Platte]									
	RT [1,33]	RT [0,67]	RT [0,33]	RT [0,07]	40°C [1,33]	40°C [0,67]	40°C [0,33]	40°C [0,07]	70°C [1,33]	70°C [0,67]
AFB1 [2,9*10^{-7} mol/Platte]+S9										
Safranextrakt Narbenäste	823	794	753	734	856	981	801	727	823	886
	801	796	767	683	987	1004	792	824	867	1069
	768	600	826	714	894	937	785	695	912	1021
Mittelwert	797	730	782	710	912	974	793	749	867	992
StAbw	27,7	112,6	38,7	25,7	67,4	34,0	8,0	67,2	44,5	94,9
% Pos	91,9	84,1	90,1	81,8	105,1	112,2	91,3	86,3	99,9	114,3
StAbw% Pos	3,2	13,0	4,5	3,0	7,8	3,9	0,9	7,7	5,1	10,9

Mutagen	Safranextrakt Narbenäste Konzentration [mg/Platte]									
	70°C [0,33]	70°C [0,07]	90°C [1,33]	90°C [0,67]	90°C [0,33]	90°C [0,07]	EtOH [1,33]	EtOH [0,67]	EtOH [0,33]	EtOH [0,07]
AFB1 [2,9*10^{-7} mol/Platte]+S9										
Safranextrakt Narbenäste	921	882	862	912	765	712	852	775	671	679
	1075	756	896	934	722	692	874	747	659	724
	907	810	888	862	823	741	820	843	677	652
Mittelwert	968	816	882	903	770	715	849	788	669	685
StAbw	93,2	63,2	17,8	36,9	50,7	24,6	27,2	49,4	9,2	36,4
% Pos	111,5	94,0	101,6	104,0	88,7	82,4	97,8	90,8	77,1	78,9
StAbw% Pos	10,7	7,3	2,0	4,3	5,8	2,8	3,1	5,7	1,1	4,2

Mutagen	Safranextrakt Narbenäste Konzentration [mg/Platte]									
	RT [1,33]	RT [0,67]	RT [0,33]	RT [0,07]	40°C [1,33]	40°C [0,67]	40°C [0,33]	40°C [0,07]	70°C [1,33]	70°C [0,67]
AFB1 [2,9*10^{-7} mol/Platte]+S9 Testwiederholung										
Safranextrakt Narbenäste	793	708	581	705	804	798	614	495	662	721
	801	777	646	722	958	814	638	624	651	674
	826	723	712	664	883	815	511	639	640	671
Mittelwert	807	736	646	697	882	809	588	586	651	689
StAbw	17,2	36,3	65,5	29,8	77,0	9,5	67,5	79,2	11,0	28,0
% Pos	88,2	80,5	70,7	76,2	96,4	88,4	64,2	64,1	71,2	75,3
StAbw% Pos	1,9	4,0	7,2	3,3	8,4	1,0	7,4	8,7	1,2	3,1

Mutagen	Safranextrakt Narbenäste Konzentration [mg/Platte]									
	70°C [0,33]	70°C [0,07]	90°C [1,33]	90°C [0,67]	90°C [0,33]	90°C [0,07]	EtOH [1,33]	EtOH [0,67]	EtOH [0,33]	EtOH [0,07]
AFB1 [2,9*10^{-7} mol/Platte]+S9 Testwiederholung										
Safranextrakt Narbenäste	719	687	780	637	681	682	879	763	754	756
	710	713	783	763	678	541	862	842	742	714
	733	680	687	780	569	750	833	860	682	779
Mittelwert	721	693	750	727	643	658	858	822	726	750
StAbw	11,6	17,4	54,6	78,1	63,8	106,6	23,3	51,6	38,6	33,0
% Pos	78,8	75,8	82,0	79,4	70,3	71,9	93,8	89,8	79,4	82,0
StAbw% Pos	1,3	1,9	6,0	8,5	7,0	11,7	2,5	5,6	4,2	3,6

Tabelle 31: Singelrevertantenzahl für *TA102*: AFB1+S9, NÄ

12.2.2 Werte der Positivkontrolle für *TA102* Safranextrakt Narbenäste

	TNFone	TNFone Wiederholung	AFB1+S9	AFB1+S9 Wiederholung
Positiv I	1113	1245	891	926
Positiv II	1235	1130	868	931
Positiv III	1240	1110	845	887
Mittelwert	1196	1162	868	915
StAbw.	71,9	72,9	23,0	24,1
% Pos	100	100	100	100
StAbw.% Pos	6,0	6,3	2,6	2,6

Tabelle 32: Werte der Positivkontrolle für TNFone und AFB1+S9 in TA102, NÄ

12.2.3 Werte der Negativkontrolle *TA102* Safranextrakt Narbenäste

	TNFone	TNFone Wiederholung	AFB1+S9	AFB1+S9 Wiederholung
Negativ I	314	303	421	438
Negativ II	304	264	413	424
Negativ III	242	306	462	383
Negativ IV	345	302	386	387
Negativ V	350	301	407	338
Negativ VI	372	288	343	282
Mittelwert	321	294	405	375
StAbw.	46,0	16,0	39,4	57,6
% Pos	26,9	25,3	46,7	41,0
StAbw.% Pos	3,8	1,4	4,5	6,3

Tabelle 33: Werte der Negativkontrolle H_2O für TNFone und AFB1+S9 in *TA98*, NÄ

	TNFone	TNFone Wiederholung	AFB1+S9	AFB1+S9 Wiederholung
Negativ I	356	345	444	352
Negativ II	292	352	391	403
Negativ III	313	374	329	421
Negativ IV	330	324	384	465
Negativ V	383	312	344	370
Negativ VI	368	356	367	396
Mittelwert	340	344	377	401
StAbw.	34,7	22,5	40,6	39,7
% Pos	28,5	29,6	43,4	43,9
StAbw.% Pos	2,9	1,9	4,4	4,3

Tabelle 34: Werte der Negativkontrolle H_2O:EtOH für TNFone und AFB1+S9 in *TA98*, NÄ

12.2.4 Revertantenzahl für *TA102* Safranextrakt Tepalen

Mutagen	Safranextrakt Tepalen Konzentration [mg/Platte]								
	RT [5]	RT [2,5]	RT [1,25]	40°C [5]	40°C [2,5]	40°C [1,25]	70°C [5]	70°C [2,5]	70°C [1,25]
TNFone [$0,2*10^{-7}$ mol/Platte]									
Safranextrakt Tepalen	1576	1650	1288	1344	1057	1308	1583	1376	1260
	1621	1453	1397	1512	1236	1522	1444	1331	1431
	1500	1531	1340	1353	1088	1284	1368	–	–
Mittelwert	1566	1545	1342	1403	1127	1371	1465	1354	1346
StAbw	61,2	99,2	54,5	94,5	95,7	131,0	109,0	31,8	120,9
% Pos	119,9	118,3	102,8	107,5	86,3	105,1	112,2	103,7	103,1
StAbw% Pos	4,7	7,6	4,2	7,2	7,3	10,0	8,4	2,4	9,3

Mutagen	Safranextrakt Tepalen Konzentration [mg/Platte]								
	90°C [5]	90°C [2,5]	90°C [1,25]	ED [5]	ED [2,5]	ED [1,25]	EL [5]	EL [2,5]	EL [1,25]
TNFone [0,2*10^{-7} mol/Platte]									
Safranextrakt Tepalen	776	1405	1313	1525	1231	941	1202	1190	1284
	783	1796	1226	1430	1305	997	1212	1164	1172
	1162	–	1110	1565	1336	952	1066	1318	1212
Mittelwert	907	1601	1216	1507	1291	963	1160	1224	1223
StAbw	220,9	276,5	101,8	69,3	53,9	29,7	81,6	82,4	56,8
% Pos	69,5	122,6	93,2	115,4	98,9	73,8	88,9	93,8	93,7
StAbw% Pos	16,9	21,2	7,8	5,3	4,1	2,3	6,2	6,3	4,3

Mutagen	Safranextrakt Tepalen Konzentration [mg/Platte]								
	RT [5]	RT [2,5]	RT [1,25]	40°C [5]	40°C [2,5]	40°C [1,25]	70°C [5]	70°C [2,5]	70°C [1,25]
TNFone [0,2*10^{-7} mol/Platte] Testwiederholung									
Safranextrakt Tepalen	1920	1814	1114	1728	1853	1648	1458	1454	1469
	1828	1854	1205	1500	1836	1568	1346	1452	1438
	1905	1816	1226	1632	1796	1703	1582	1806	1495
Mittelwert	1884	1828	1182	1620	1828	1640	1462	1571	1467
StAbw	49,4	22,5	59,5	114,5	29,3	67,9	118,1	203,8	28,5
% Pos	165,6	160,7	103,9	142,4	160,7	144,1	128,5	138,1	129,0
StAbw% Pos	4,3	2,0	5,2	10,1	2,6	6,0	10,4	17,9	2,5

Mutagen	Safranextrakt Tepalen Konzentration [mg/Platte]								
	90°C [5]	90°C [2,5]	90°C [1,25]	ED [5]	ED [2,5]	ED [1,25]	EL [5]	EL [2,5]	EL [1,25]
TNFone [0,2*10^{-7} mol/Platte] Testwiederholung									
Safranextrakt Tepalen	1201	993	1065	1745	1503	1430	1600	1380	1148
	1156	1030	1123	1683	1346	1394	1652	1344	1310
	1410	1000	970	1682	1313	1325	1486	1154	1468
Mittelwert	1256	1008	1053	1703	1387	1384	1579	1293	1309
StAbw	135,5	19,7	77,2	36,1	101,5	51,7	84,9	121,4	160,0
% Pos	110,4	88,6	92,8	149,7	121,9	121,7	138,8	113,6	115,0
StAbw% Pos	11,9	1,7	6,8	3,2	8,9	4,5	7,5	10,7	14,1

Mutagen	Safranextrakt Tepalen Konzentration [mg/Platte]								
	RT [5]	RT [2,5]	RT [1,25]	40°C [5]	40°C [2,5]	40°C [1,25]	70°C [5]	70°C [2,5]	70°C [1,25]
AFB1 [2,9*10^{-7} mol/Platte]+S9									
Safranextrakt Tepalen	763	673	782	578	706	684	660	769	579
	771	701	633	778	675	699	591	731	697
	672	768	655	677	793	692	552	690	552
Mittelwert	735	714	690	678	725	692	601	730	609
StAbw	55,0	48,8	80,4	100,0	61,2	7,5	54,7	39,5	77,1
% Pos	82,0	79,7	77,0	75,6	80,8	77,2	67,0	81,4	68,0
StAbw% Pos	6,1	5,4	9,0	11,2	6,8	0,8	6,1	4,4	8,6

Tabelle 35: Singelrevertantenzahl für *TA102*: TNFone Tepalen

Mutagen	Safranextrakt Tepalen Konzentration [mg/Platte]								
	90°C [5]	90°C [2,5]	90°C [1,25]	ED [5]	ED [2,5]	ED [1,25]	EL [5]	EL [2,5]	EL [1,25]
AFB1 [2,9*10^{-7} mol/Platte]+S9									
Safranextrakt Tepalen	770	814	640	613	460	883	702	521	549
	658	767	633	682	522	799	657	647	506
	687	533	671	588	572	842	684	473	512
Mittelwert	705	705	648	628	518	841	681	547	522
StAbw	58,1	150,5	20,2	48,7	56,1	42,0	22,6	89,9	23,3
% Pos	78,6	78,6	72,3	73,2	60,4	98,2	79,5	63,8	60,9
StAbw% Pos	6,5	16,8	2,3	5,7	6,5	4,9	2,6	10,5	2,7

Mutagen	Safranextrakt Tepalen Konzentration [mg/Platte]								
	RT [5]	RT [2,5]	RT [1,25]	40°C [5]	40°C [2,5]	40°C [1,25]	70°C [5]	70°C [2,5]	70°C [1,25]
AFB1 [2,9*10^{-7} mol/Platte]+S9 Testwiederholung									
Safranextrakt Tepalen	727	804	613	841	478	642	851	593	872
	604	755	627	768	524	614	774	617	835
	773	615	686	788	545	–	733	631	863
Mittelwert	701	725	642	799	513	628	786	614	85,7
StAbw	87,4	98,1	38,7	37,7	34,3	19,8	59,9	19,2	19,3
% Pos	71,8	74,2	25,7	81,8	52,8	64,3	80,5	62,8	87,7
StAbw% Pos	8,9	10,0	4,0	3,9	3,8	2,0	6,1	2,0	2,0

Mutagen	Safranextrakt Tepalen Konzentration [mg/Platte]								
	90°C [5]	90°C [2,5]	90°C [1,25]	ED [5]	ED [2,5]	ED [1,25]	EL [5]	EL [2,5]	EL [1,25]
AFB1 [2,9*10^{-7} mol/Platte]+S9 Testwiederholung									
Safranextrakt Tepalen	682	587	806	692	643	577	556	643	698
	686	502	666	767	714	588	537	633	705
	694	–	749	731	736	650	533	587	716
Mittelwert	687	545	740	730	696	605	542	621	706
StAbw	6,1	60,1	70,4	37,5	47,1	39,4	12,3	29,9	9,1
% Pos	70,4	55,8	75,8	74,7	71,3	61,9	55,5	63,6	72,3
StAbw% Pos	0,6	6,2	7,2	3,8	4,8	4,0	1,3	3,1	0,9

Tabelle 36: Singelrevertantenzahl für TA102: AFB1 Tepalen

12.2.5 Werte der Positivkontrolle für *TA102* Safranextrakt Tepalen

	TNFone	TNFone Wiederholung	AFB1+S9	AFB1+S9 Wiederholung
Positiv I	1305	1188	844	1019
Positiv II	1291	1135	855	1028
Positiv III	1320	1090	872	883
Mittelwert	1305	1138	864	977
StAbw.	14,5	49,1	17,4	81,2
% Pos	100	100	100	100
StAbw.% Pos	1,1	4,3	2,0	8,3

Tabelle 37: Werte der Positivkontrolle für TNFone und AFB1+S9 in *TA102,* Tepalen

12.2.6 Werte der Negativkontrolle *TA102* Safranextrakt Tepalen

	TNFone	TNFone Wiederholung	AFB1+S9	AFB1+S9 Wiederholung
Negativ I	376	322	352	453
Negativ II	396	435	419	444
Negativ III	314	332	402	421
Negativ IV	344	332	406	448
Negativ V	331	391	437	422
Negativ VI	393	301	457	341
Mittelwert	359	352	412	422
StAbw.	34,2	50,4	35,9	41,7
% Pos	27,5	31,0	47,4	43,2
StAbw.% Pos	2,6	4,4	4,2	4,3

Tabelle 38: Werte der Negativkontrolle H_2O für TNFone und AFB1+S9 in *TA102*, Tepalen

	TNFone	TNFone Wiederholung	AFB1+S9	AFB1+S9 Wiederholung
Negativ I	302	412	342	430
Negativ II	243	283	505	451
Negativ III	303	322	434	442
Negativ IV	323	343	432	416
Negativ V	341	342	410	476
Negativ VI	421	476	360	462
Mittelwert	322	363	414	446
StAbw.	58,6	69,4	58,5	21,7
% Pos	24,7	31,9	48,3	45,7
StAbw.% Pos	4,5	6,1	6,8	2,2

Tabelle 39: Werte der Negativkontrolle H_2O:EtOH für TNFone und AFB1+S9 in *TA102*, Tepalen

12.3 Mutagenitätstests TA98 und TA102

12.3.1 Mutagenitätstests *TA98* Safranextrakt Narbenäste

Mutagen	Safranextrakt Konzentration [mg/Platte]									
TNFone	RT [1,33]	RT [0,07]	40°C [1,33]	40°C [0,07]	70°C [1,33]	70°C [0,07]	90°C [1,33]	90°C [0,07]	EtOH [1,33]	EtOH [0,07]
Safranextrakt	26	11	23	24	22	28	44	22	25	34
Narbenäste	24	13	35	21	24	32	38	29	29	26
	21	34	24	24	21	27	31	24	33	30
Mittelwert	24	19	27	23	22	29	38	25	29	30
StAbw	2,5	12,7	6,7	1,7	1,5	2,6	6,5	3,6	4,0	4,0
% Neg	95,3	77,9	110,1	92,6	89,9	116,8	151,7	98,0	113,7	117,6
StAbw% Neg	10,1	51,3	26,8	7,0	6,2	10,7	26,2	14,1	15,7	15,7

Tabelle 40: Singelrevertantenzahl für *TA98,* NÄ, TNFone

Mutagen	Safranextrakt Konzentration [mg/Platte]									
AFB1+S9 PHiP+S9	RT [1,33]	RT [0,07]	40°C [1,33]	40°C [0,07]	70°C [1,33]	70°C [0,07]	90°C [1,33]	90°C [0,07]	EtOH [1,33]	EtOH [0,07]
Safranextrakt	31	42	22	26	33	44	34	69	53	47
Narbenäste	39	45	31	32	62	61	32	57	59	49
	42	38	21	32	23	59	44	46	47	43
Mittelwert	37	42	25	30	39	55	37	57	53	46
StAbw	5,7	3,5	5,5	3,5	20,3	9,3	6,4	11,5	6,0	3,1
% Neg	91,4	102,0	60,4	73,5	96,3	133,9	89,8	140,4	119,5	104,5
StAbw% Neg	13,9	8,6	13,5	8,5	49,6	22,8	15,7	28,2	13,5	6,9

Tabelle 41: Singelrevertantenzahl für *TA98,* NÄ, AFB1+S9, PHiP+S9

12.3.2 Positivkontrolle für *TA98* Safranextrakt Narbenäste

	TNFone	PHiP+S9	AFB1+S9
Positiv I	295	236	124
Positiv II	322	245	153
Positiv III	380	254	107
Mittelwert	332	246	128
StAbw.	43,4	10,5	23,3

Tabelle 42: Positivkontrolle Mutagenitätstest *TA98* induziert mit TNFone, PHiP+S9, AFB1+S9, NÄ

12.3.3 Negativkontrolle für *TA98* Narbenäste

	Negativ H_2O			Negativ EtOH:H_2O		
	TNFone	PHiP+S9	AFB1+S9	TNFone	PHiP+S9	AFB1+S9
Negativ I	32	47	47	30	52	52
Negativ II	27	35	35	34	48	48
Negativ III	32	40	40	17	43	43
Negativ IV	12	35	35	32	37	37
Negativ V	22	41	41	18	45	45
Negativ VI	24	47	47	25	41	41
Mittelwert	25	41	41	26	44	44
StAbw	7,5	5,4	5,4	8,0	5,3	5,3
% Neg	100	100	100	100	100	100
StAbw% Neg	30,2	13,2	13,2	31,2	11,9	11,9

Tabelle 43: Negativkontrolle *TA98*: H_2O und H_2O:EtOH gegenüber TNFone, PHiP+S9, AFB1+S9

12.3.4 Mutagenitätstests *TA102* Safranextrakt Narbenäste

Mutagen TNFone	Safranextrakt Konzentration [mg/Platte]									
	RT [1,33]	RT [0,07]	40°C [1,33]	40°C [0,07]	70°C [1,33]	70°C [0,07]	90°C [1,33]	90°C [0,07]	EtOH [1,33]	EtOH [0,07]
Safranextrakt	235	411	334	271	331	327	223	331	312	150
Narbenäste	244	372	312	250	341	298	228	273	266	141
	227	–	302	330	357	259	281	341	237	188
Mittelwert	235	392	316	284	343	305	244	315	272	160
StAbw	8,5	27,6	16,4	41,5	13,1	49,3	32,1	36,7	37,8	24,9
% Neg	111,4	185,3	149,5	134,2	162,3	144,2	115,5	149,1	123,1	72,4
StAbw% Neg	4,0	13,0	7,7	19,6	6,2	23,3	15,2	17,4	17,1	11,3

Tabelle 44: Singelrevertantenzahl für *TA102*, NÄ, TNFone

Mutagen AFB1+S9	Safranextrakt Konzentration [mg/Platte]									
	RT [1,33]	RT [0,07]	40°C [1,33]	40°C [0,07]	70°C [1,33]	70°C [0,07]	90°C [1,33]	90°C [0,07]	EtOH [1,33]	EtOH [0,07]
Safranextrakt	339	285	362	279	311	326	376	462	372	369
Narbenäste	359	240	476	216	195	361	480	442	321	361
	321	257	257	258	240	315	383	514	232	384
Mittelwert	340	261	365	251	249	334	413	473	308	371
StAbw	19,0	22,7	109,5	32,1	58,5	24,0	58,1	37,2	70,9	11,7
% Neg	125,4	96,2	134,8	92,7	91,8	123,3	152,5	174,5	103,2	124,3
StAbw% Neg	7,0	8,4	40,4	11,8	21,6	8,9	21,5	13,7	23,7	3,9

Tabelle 45: Singelrevertantenzahl für *TA102,* NÄ, AFB1+S9

12.3.5 Positivkontrolle für *TA102* Safranextrakt Narbenäste

	TNFone	AFB1+S9
Positiv I	667	605
Positiv II	605	693
Positiv III	583	665
Mittelwert	618	654
StAbw.	43,6	45

Tabelle 46: Positivkontrolle Mutagenitätstest *TA98* induziert mit TNFone und AFB1+S9, NÄ

12.3.6 Negativkontrolle für *TA102* Safranextrakt Narbenäste

	Negativ H_2O		Negativ EtOH:H_2O	
	TNFone	AFB1+S9	TNFone	AFB1+S9
Negativ I	212	311	234	381
Negativ II	223	282	253	371
Negativ III	207	303	196	258
Negativ IV	192	252	242	203
Negativ V	235	229	191	266
Negativ VI	199	248	208	314
Mittelwert	211	271	221	299
StAbw	15,8	32,9	25,8	69,5
% Neg	100	100	100	100
StAbw% Neg	7,5	12,1	11,7	23,2

Tabelle 47: Negativkontrolle *TA102*: H_2O und H_2O:EtOH gegenüber TNFone und AFB1+S9, NÄ

12.3.7 Mutagenitätstests *TA98* Safranextrakt Tepalen

Mutagen	Safranextrakt Konzentration [mg/Platte]					
TNFone	RT	RT	40°C	40°C	70°C	70°C
	[5]	[1,25]	[5]	[1,25]	[5]	[1,25]
Safranextrakt	32	23	25	35	23	29
Tepalen	22	28	44	31	24	27
	28	29	30	24	15	32
Mittelwert	27	27	33	30	21	29
StAbw	5,0	3,2	9,8	5,6	4,9	2,5
% Neg	110,1	107,4	132,9	120,8	83,2	118,1
StAbw% Neg	20,3	12,9	39,7	22,4	19,9	10,1

Tabelle 48: Singelrevertantenzahl für *TA98* Tepalen, TNFone

Mutagen	Safranextrakt Konzentration [mg/Platte]					
TNFone	90°C	90°C	ED	ED	EL	EL
	[5]	[1,25]	[5]	[1,25]	[5]	[1,25]
Safranextrakt	21	36	26	31	24	12
Tepalen	15	25	29	28	21	19
	23	23	34	25	31	8
Mittelwert	20	28	30	28	25	13
StAbw	4,2	7,0	4,0	3,0	5,1	5,6
% Neg	79,2	109,8	116,3	109,8	99,3	51,0
StAbw% Neg	16,8	27,5	15,8	11,8	20,1	21,8

Mutagen	Safranextrakt Konzentration [mg/Platte]					
AFB1+S9	RT	RT	40°C	40°C	70°C	70°C
PHiP+S9	[5]	[1,25]	[5]	[1,25]	[5]	[1,25]
Safranextrakt	43	37	54	32	51	41
Tepalen	54	38	47	35	43	43
	53	36	42	56	38	39
Mittelwert	50	37	48	41	44	41
StAbw	6,1	1,0	6,0	13,1	6,6	2,0
% Neg	122,4	90,6	116,7	100,4	107,8	100,4
StAbw% Neg	14,9	2,4	14,8	32,0	16,1	4,9

Tabelle 49: Singelrevertantenzahl für *TA98* Tepalen, AFB1+S9, PHiP+S9

Mutagen	Safranextrakt Konzentration [mg/Platte]					
AFB1+S9	90°C	90°C	ED	ED	EL	EL
PHiP+S9	[5]	[1,25]	[5]	[1,25]	[5]	[1,25]
Safranextrakt	50	31	53	57	45	51
Tepalen	39	42	62	52	47	59
	47	49	46	49	31	52
Mittelwert	45	41	54	53	41	54
StAbw	5,7	9,1	8,0	4,0	8,7	4,4
% Neg	111,0	91,7	121,1	118,8	92,5	121,8
StAbw% Neg	13,9	20,5	18,1	9,1	19,7	9,8

12.3.8 Positivkontrolle für *TA98* Safranextrakt Tepalen

	TNFone	PhiP+S9	AFB1+S9
Positiv I	295	236	124
Positiv II	322	245	153
Positiv III	380	257	107
Mittelwert	332	246	128
StAbw.	43,4	10,5	23,3

Tabelle 50: Positivkontrolle Mutagenitätstest *TA98* induziert mit TNFone, PHiP+S9 und AFB1+S9, Tepalen

12.3.9 Negativkontrolle für *TA98* Safranextrakt Tepalen

	Negativ H_2O			Negativ EtOH:H_2O		
	TNFone	PhiP+S9	AFB1+S9	TNFone	PhiP+S9	AFB1+S9
Negativ I	32	47	47	30	52	52
Negativ II	27	35	35	34	48	48
Negativ III	32	40	40	17	43	43
Negativ IV	12	35	35	32	37	37
Negativ V	22	41	41	15	45	45
Negativ VI	24	47	47	25	41	41
Mittelwert	25	41	41	26	44	44
StAbw	7,5	5,4	5,4	8,0	5,3	5,3
% Neg	100	100	100	100	100	100
StAbw% Neg	30,2	13,2	13,2	31,2	11,9	11,9

Tabelle 51: Negativkontrolle *TA98*: H_2O und H_2O:EtOH gegenüber TNFone, PHiP und AFB1+S9, NÄ

12.3.10 Mutagenitätstests *TA102* Safranextrakt Tepalen

Mutagen TNFone	Safranextrakt Konzentration [mg/Platte]					
	RT [5]	RT [1,25]	40°C [5]	40°C [1,25]	70°C [5]	70°C [1,25]
Safranextrakt Tepalen	293 381 291	278 244 226	203 311 269	219 259 329	225 263 251	266 269 –
Mittelwert	322	249	261	269	246	268
StAbw	51,4	26,4	54,4	55,7	19,4	2,1
% Neg	152,2	118,0	123,5	127,3	116,6	126,6
StAbw% Neg	24,3	12,5	25,8	26,3	9,2	1,0

Mutagen TNFone	Safranextrakt Konzentration [mg/Platte]					
	90°C [5]	90°C [1,25]	ED [5]	ED [1,25]	EL [5]	EL [1,25]
Safranextrakt Tepalen	234 271 202	245 251 216	350 255 203	280 216 211	191 215 181	200 175 202
Mittelwert	236	237	269	236	196	192
StAbw	34,5	18,7	74,5	38,5	17,5	15,0
% Neg	111,5	107,6	122,1	106,8	88,7	87,2
StAbw% Neg	16,3	8,5	33,8	17,4	7,9	6,8

Tabelle 52: Singelrevertantenzahl für *TA102* Tepalen, TNFone

Mutagen AFB1+S9	Safranextrakt Konzentration [mg/Platte]					
	RT [5]	RT [1,25]	40°C [5]	40°C [1,25]	70°C [5]	70°C [1,25]
Safranextrakt	248	316	331	351	338	376
Tepalen	393	334	320	424	286	262
	280	341	326	502	386	304
Mittelwert	307	330	326	426	337	314
StAbw	76,2	12,9	5,5	75,5	50,0	57,7
% Neg	113,4	122,0	120,2	157,2	124,3	115,9
StAbw% Neg	28,1	4,8	2,0	27,9	18,5	21,3

Mutagen AFB1+S9	Safranextrakt Konzentration [mg/Platte]					
	90°C [5]	90°C [1,25]	ED [5]	ED [1,25]	EL [5]	EL [1,25]
Safranextrakt	466	356	509	367	230	324
Tepalen	474	325	523	465	162	218
	445	281	481	468	230	185
Mittelwert	462	321	504	433	207	242
StAbw	15,0	37,7	21,4	57,5	39,3	72,6
% Neg	170,5	107,3	168,8	145,0	69,4	81,1
StAbw% Neg	5,5	12,6	7,2	19,2	13,1	24,3

Tabelle 53: Singelrevertantenzahl für *TA102,* Tepalen, AFB1+S9

12.3.11 Positivkontrolle für *TA102* Safranextrakt Tepalen

	TNFone	AFB1+S9
Positiv I	667	605
Positiv II	605	693
Positiv III	583	665
Mittelwert	618	654
StAbw.	43,6	45,0

Tabelle 54: Positivkontrolle Mutagenitätstest *TA102* induziert mit TNFone und AFB1+S9, Tepalen

12.3.12 Negativkontrolle für *TA102* Safranextrakt Tepalen

	Negativ H_2O		Negativ EtOH:H_2O	
	TNFone	AFB1+S9	TNFone	AFB1+S9
Negativ I	212	311	234	381
Negativ II	223	282	253	371
Negativ III	207	303	196	258
Negativ IV	192	252	242	203
Negativ V	235	229	191	266
Negativ VI	199	248	208	314
Mittelwert	211	271	221	299
StAbw	15,8	32,9	25,8	69,5
% Neg	100	100	100	100
StAbw% Neg	7,5	12,1	11,7	23,2

Tabelle 55: Negativkontrolle *TA102*: H_2O und H_2O:EtOH gegenüber TNFone und AFB1+S9, Tepalen

13 CURRICULUM VITAE

PERSÖNLICHE DATEN

Name:	Roland Holler
Geburtsdatum/-ort:	27.08.1977 in Graz
Staatsbürgerschaft:	Österreich
e-mail:	holler.roland@gmx.at

BERUFLICHE ERFAHRUNG

Seit 2011:	Abhaltung von Kochkursen (Wiener Gesundheitsförderung)
Seit 2011:	Urlaubsvertretung Aids-Hilfe-Haus Bereich Küche
Seit 2008:	Produktionsassistent bei „Frisch gekocht mit Andi und Alex“, Wien
Seit 2006:	Freelancer Bereich Küche im Hotel InterContinental, Wien
2001–2008:	diverse Einsätze bei DO & CO Bereich Küche (u.a. Formel 1 Bahrain, Malaysien, America‘s Cup, Valencia)
2001:	5 Monate Chef de Partie-Entremetier im Restaurant „Zum Schwarzen Kameel“, Wien
2000:	2 Monate als Commis de Cuisine-Saucier im Grandhotel Krasnapolsky, Amsterdam
	1 Monat Jungkoch-Gardemanger im Steiermark-Restaurant à la Lafer auf der EXPO 2000, Hannover
	Bundesheer, 6 Monate im Bereich Küche und Service im Offiziers-Casino Gratkorn

1999:	4 Monate Praktikum Bereich Küche in „Johann Lafers Stromburg“, Stromberg
1998:	6 Monate Bereich Service im „Runnymede Hotel & Spa“, London
1993–1998:	Diverse Praktika im Bereich Tourismus (u.a. Hotel Weitzer Graz, Hotel Wolf Saalbach-Hinterglemm)

HOCHSCHULBILDUNG

Ab SS 2010:	Diplomarbeit mit dem Thema „Safranextrakte im Ames-Test Untersuchung anti-/oxidativer und anti-/mutagener Effekte“
Seit 2009:	Tutor an der Universität Wien für folgende Lehrveranstaltungen:
	UE Vorratshaltung/Vorratsschutz
	UE Nahrungszubereitung
	UE Fachdidaktik der Lebensmittelverarbeitung
2001–2012:	Diplomstudium Ernährungswissenschaften mit Schwerpunkt Lebensmitteltechnologie

SCHULBILDUNG

1993–1998	Fünfjährige Höhere Lehranstalt für Tourismus, Bad Gleichenberg
1992–1988	Übungshauptschule Hasnerplatz, Graz
1984–1988	Volksschule St. Peter, Graz