



DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

„Phytochemisches Screening auf Pflanzenpeptide
in ausgewählten Drogen“

Verfasserin

Birgit Semper

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2012

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreuerin:

Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter

Danksagung

Mein Dank gilt...

... Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Sabine Glasl-Tazreiter für die großartige Betreuung während der Diplomarbeit. Danke für deine aufbauenden und motivierenden Worte und die unkomplizierte, rasche Abwicklung!

... Dr. Martin Zehl für die Vergabe des interessanten Themas und vor allem für die hervorragende Betreuung während der gesamten Diplomarbeit. Vielen Dank, dass ich mich mit jeder Frage und jedem Anliegen an dich wenden konnte - bis zum Schluss! Du bist mir immer hilfsbereit entgegengekommen und hast mich während weniger vielversprechenden Passagen stets motiviert.

... Univ. Prof. Dr. Verena Dirsch für die Bereitstellung des Diplomarbeitsplatzes am Department für Pharmakognosie.

... Univ. Prof. Mag. Dr. Dr. h. c. Brigitte Kopp, Pharm.D. Hamid-Reza Adhami und Ao. Univ. Prof. Mag. Dr. Johannes Saukel für die Bereitstellung diversen Pflanzenmaterials.

... der Arbeitsgruppe Glasl/Krenn/Reznicek für die freundliche Aufnahme ins Team und die Schaffung eines angenehmen Arbeitsklimas.

... meinen Eltern und Schwestern, die mir stets ein Vorbild waren und mich immer liebevoll unterstützt haben. Danke, dass ihr immer hinter mir gestanden seid, mich vor Prüfungen beruhigt und mich immer motiviert habt.

... meinen StudienkollegInnen, die vielmehr wunderbare Freunde wurden. Danke für die schöne gemeinsame Zeit auf der Uni und eure Unterstützung in so vielen Belangen!

... Stefan für sein Verständnis, wenn ich tagelang nicht ansprechbar in meinen Büchern versunken bin. Danke für deine beruhigenden Worte und Unterstützung!

... vielen weiteren Freunden und Verwandten.

INHALTSVERZEICHNIS

1) ALLGEMEINER TEIL	6
1.1 Pflanzenpeptide	6
1.1.1 Definitionen	6
1.1.2 Einteilung der Peptidklassen	7
1.2 Pharmazeutische Relevanz	10
1.3 Problemstellung	11
2) MATERIAL UND METHODEN	12
2.1 Pflanzenmaterial	12
2.1.1 Abnormal Savda Munziq (ASMq)	12
2.1.2 Gesammelte Drogen	13
2.1.3 Handelsware	14
2.2 Methoden	16
2.2.1 Extraktion der ASMq-Komponenten	16
2.2.2 Extraktion von <i>Urtica dioica</i> L.	19
2.2.3 Screening-Methode für Pflanzenpeptide	20
2.2.3.1 Extraktion des Pflanzenmaterials	20
2.2.3.2 Probenvorbereitung mittels 96-well-plate-SPE	20
2.2.4 Aufreinigung ausgewählter Pflanzenpeptide	23
2.2.4.1 Fraktionierte SPE (10 – 100% Acetonitril)	23
2.2.4.2 Optimierung der präparativen SPE für <i>Sambucus nigra</i> L.	25
2.2.4.3 Präparative SPE für Peptide aus <i>Sambucus nigra</i> L.	26
2.2.4.4 Säulenchromatographie (SC)	28
2.2.5 Reduktion und Alkylierung	30
2.2.6 Dünnschichtchromatographie (DC)	32
2.2.7 LC/MS	34

3) RESULTATE UND DISKUSSION	37
3.1 Vermutete Peptide aufgrund vorangegangener Arbeiten	37
3.1.1 Analyse der in ASMq enthaltenen Pflanzenmaterialien	37
3.1.2 <i>Urtica dioica</i> L.....	39
3.1.3 Methodenentwicklung anhand von <i>Viola odorata</i> L.	40
3.2 Screening auf Pflanzenpeptide	55
3.2.1 Methodenerstellung	55
3.2.2 Positivkriterien.....	58
3.2.3 Ergebnisse.....	59
3.3 Fraktionierte SPE von <i>Dianthus chinensis</i> L.	63
3.4 <i>Sambucus nigra</i> L.....	66
3.4.1 Methodenoptimierung.....	66
3.4.2 Fraktionierte SPE.....	71
3.4.3 Reduktion und Alkylierung	81
3.5 Diskussion und Ausblick.....	85
4) ZUSAMMENFASSUNG	87
5) LITERATURVERZEICHNIS	89
CURRICULUM VITAE	91

1) ALLGEMEINER TEIL

In diesem Kapitel wird ein Überblick über die Ausgangspunkte wie auch Herausforderungen dieser Arbeit gegeben. Weiters wird kurz die Relevanz für künftige pharmazeutische Zwecke erklärt.

1.1 Pflanzenpeptide

Im Fokus dieser Arbeit lagen die Identifizierung und Isolierung von biologisch aktiven Peptiden aus verschiedenen Pflanzen. Diese sind, etwa im Vergleich zu anderen sekundären Pflanzenstoffen wie Flavonoiden, wenig untersucht, obwohl aufgrund diverser Genomanalysen eine weite Verbreitung und hohe Anzahl vermutet wird.

1.1.1 Definitionen

Pflanzenpeptide sind aus verschiedenen Aminosäuren aufgebaut, weisen eine Größe von bis zu 10 kDa auf und spielen unter anderem eine wichtige Rolle in der Abwehr von Pathogenen. Eine große Gruppe stellen etwa die Defensine, auch gamma-Thionine genannt, dar [Farrokhi et al., 2008]. Diese sind sowohl im Pflanzen- als auch im Tierreich sehr weit verbreitet und dienen als vergleichsweise „altes“, endogenes Abwehrsystem zum Schutz vor schädlichen Mikroorganismen, Pilzen oder Insekten [Stotz et al., 2009]. Pflanzen-Defensine haben eine Größe von etwa 5 kDa und weisen grundsätzlich eine starke Sequenzheterogenität auf. Gemeinsam ist allen das Vorhandensein von folgenden konservierten Aminosäuren: acht Cysteine, die Disulfidbrücken ausbilden und die Molekülstruktur somit enorm stabilisieren, zwei Glycine und eine Glutaminsäure [Stotz et al., 2009].

Die Biosynthese von Pflanzenpeptiden erfolgt – anders als bei vielen peptidischen Naturstoffen aus Bakterien und Pilzen – in den Ribosomen, wodurch die Zahl der

möglichen Aminosäure-Bausteinen begrenzt wird und auch nur L-Aminosäuren vorkommen können.

Weiters ist heute auch eine Synthese von Peptiden sowohl im Labor-, als auch im Großmaßstab keine große Schwierigkeit mehr, wodurch es möglich ist, diverse Verbindungen in ausreichender Reinheit relativ rasch und kostengünstig herzustellen, beziehungsweise diese auch von Firmen produzieren zu lassen.

In der Analytik wird hauptsächlich die Massenspektrometrie, meist kombiniert mit einer Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (LC/MS), eingesetzt. Für die Strukturaufklärung, insbesondere von kleinen Peptiden, wird auch die Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) verwendet. Für letztere wird auch die chemische und enzymatische Spaltbarkeit der Pflanzenpeptide ausgenützt. Phytochemische Methoden, wie etwa die Dünnschichtchromatographie (DC), zählen hingegen nicht zu den Standard-Analysemethoden und kommen kaum zum Einsatz.

1.1.2 Einteilung der Peptidklassen

Die bisher untersuchten Pflanzenpeptide, die auch für diese Arbeit relevant sind, können grob in drei Klassen eingeteilt werden:

- 1) Lineare Peptide
- 2) Cyclopeptide
- 3) Cyclotide

Ad 1) Lineare Peptide sind gekennzeichnet durch eine Abfolge unterschiedlicher Aminosäuren, die ein lineares Backbone ausbilden. Eine gewisse Stabilisierung – etwa durch Disulfidbrückenbildung wie bei den Defensinen - ist zwar möglich, bringt jedoch nur wenig „Schutz“ vor chemischen oder enzymatischen Abbaureaktionen. Sie werden durch die in den Verdauungssäften des Menschen enthaltenen Enzyme oder durch die Magensalzsäure leicht gespalten und können somit inaktiviert werden - das heißt sie sind peroral nicht bioverfügbar. Daher ist diese Gruppe von Peptiden für die vorliegende Arbeit von untergeordnetem Interesse.

Ad 2) Cyclopeptide sind kleine, cyclische Peptide, die bereits lange bekannt sind (siehe Abbildung 1). So wurde etwa 1959 „Cyclolinopeptid A“, ein cyclisches, hydrophobes Nonapeptid aus den Samen von *Linum usitatissimum* L., beschrieben, das starke immunsuppressive Eigenschaften und eine Antimalaria-Wirkung besitzt [Picur et al., 2006]. Bis jetzt ist eine Vielzahl von weiteren Cyclopeptiden bekannt [Tan et al., 2006].

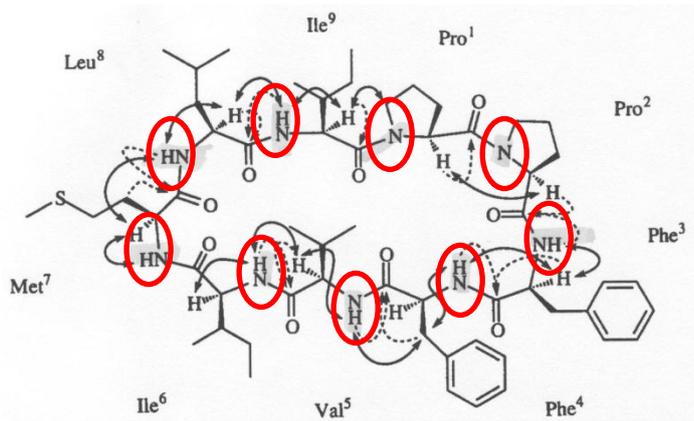


Abbildung 1: Struktur von Cyclolinopeptid B. Die Abbildung wurde aus [Morita et al., 1999] entnommen und modifiziert.

Ad 3) Cyclotide sind kleine, bioaktive Pflanzenpeptide mit cyclischem Backbone, die über ihre außergewöhnliche Struktur definiert sind. Sie bestehen aus 28-37 Aminosäuren, wobei sechs davon Cysteine sind, die insgesamt drei Disulfidbrücken ausbilden, wodurch weitere intramolekulare Verknüpfungen entstehen. Diese bilden das typische Cyclotid-Rückgrat, das auch als cyclic-cystine-knot (CCK) - Motiv bezeichnet wird (siehe Abbildung 2) [Tan et al., 2006]. Aufgrund dieser Struktur sind Cyclotide äußerst stabil gegen Hitze und enzymatische Abbaureaktionen und somit auch peroral verfügbar. Außerdem sind die Seitenketten der Aminosäuren aufgrund der strukturellen Rigidität so angeordnet, dass hydrophobe Regionen an der Außenseite dieser Moleküle zu finden sind. Trotzdem sind Cyclotide wasserlöslich [Colgrave et al., 2010].

In Pflanzen dienen Cyclotide – ebenso wie die Defensine - primär der Abwehr von Pathogenen. Dadurch lässt sich auch ihre insektizide, antimikrobielle und antimykotische Wirkung erklären und auch der Umstand, dass die Anzahl und Art der Cyclotide in den Pflanzen sehr stark variieren, selbst innerhalb derselben Gattung und Art [Ireland et al., 2006].

Die große Vielzahl an verschiedenen Cyclotiden, die sich aufgrund ihrer Heterogenität in der Aminosäure-Zusammensetzung und der geringen Anzahl an konservierten Regionen im Molekül ergibt, und die geringe Verfügbarkeit an Genom-Daten stellen eine große Herausforderung bei der Analyse dieser Peptidklasse dar [Colgrave et al., 2010].

Eine Möglichkeit der Detektion, die häufig angewendet wird, ist die Analyse mittels Flüssigchromatographie-gekoppelter Massenspektrometrie (LC/MS).

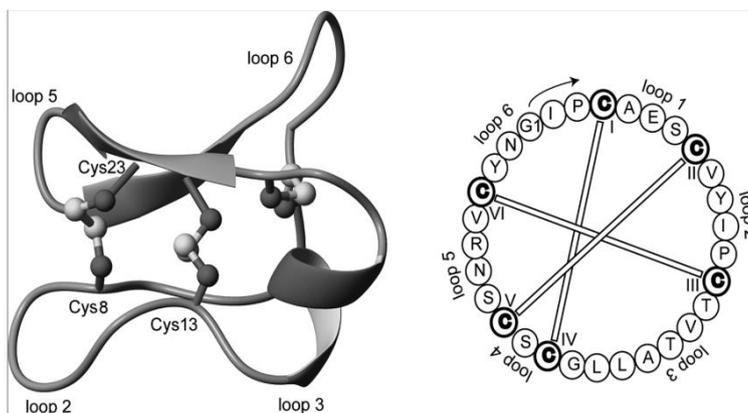


Abbildung 2: Struktur von Cycloviolacin O1 aus *Viola odorata* L.. Die Abbildung wurde aus [Ireland et al., 2006] entnommen.

1.2 Pharmazeutische Relevanz

Lineare Peptide sind aufgrund ihrer Struktur wenig stabil gegenüber enzymatischem und chemischem Abbau und daher peroral auch nicht bioverfügbar. Allerdings wird wegen ihrer antimikrobiellen Eigenschaften die Anwendung in Form von topischen Antibiotika untersucht [Nakatsuji, Gallo, 2012].

Cyclopeptide, wie die Cyclolinopeptide von Samen Lini, zeigten in bereits vorangegangenen Untersuchungen biologische Aktivität, etwa starke immunsuppressive Eigenschaften oder auch eine Antimalaria-Wirkung [Picur et al., 2006]. Ihre cyclische Struktur stabilisiert die Moleküle und schützt sie somit zu einem gewissen Grad vor enzymatischen oder chemischen Abbaureaktionen. Das erklärt auch den potentiellen Nutzen dieser Pflanzenpeptide in der pharmazeutischen Forschung.

Von sehr großem pharmazeutischem Interesse sind Cyclotide wegen ihrer bisher untersuchten vielfältigen Eigenschaften, wie ihrer uterotonischen, hämolytischen, insektiziden, antiviralen oder sogar cytotoxischen Wirkungen [Ireland et al., 2006]. Bemerkenswert an dieser Gruppe von Pflanzenpeptiden sind dabei auch ihre große Stabilität gegen Hitze und enzymatischen oder chemischen Abbau sowie ihre Wasserlöslichkeit [Ireland et al., 2006], was auch eine gute perorale Bioverfügbarkeit bedeutet. Diese Tatsache wurde auch schon über viele Jahre in der traditionellen afrikanischen Medizin ausgenutzt, wo ein Tee aus *Oldenlandia affinis* (genannt Kalata-Kalata) gekocht und während der Geburtsphase getrunken wird. Die uterotonische Wirkung dieses Tees wird hervorgerufen von dem Cyclotid Kalata B1 [Ireland et al., 2006].

Pflanzenpeptide bieten also vielversprechende Ansatzpunkte für die Auffindung neuer Leitstrukturen für Antibiotika, Virustatika, Insektizide und viele mehr.

1.3 Problemstellung

Trotz ihrer herausragenden Eigenschaften sind Pflanzenpeptide jedoch nur wenig untersucht im Vergleich etwa zu anderen Klassen von sekundären Pflanzeninhaltsstoffen wie Polyphenolen oder Alkaloiden. Die Gründe dafür und die Herausforderungen, die sich bei der Arbeit mit dieser Stoffgruppe daraus ergaben, sind vielfältig.

Die Proben stellen biologisches Material aus komplexen Stoffgemischen dar, wodurch bei jeder Untersuchung mit einem unterschiedlich und vielfältig zusammengesetzten Inhaltsstoffspektrum gearbeitet werden muss und die Detektierbarkeit der Peptide beeinflusst werden kann.

Auch die Peptide selbst zeigen aufgrund ihrer stark variierenden Größe, dem immensen Sequenzraum und der Möglichkeit von chemischen Modifikationen, wie zum Beispiel Disulfidbrücken, eine große Diversität und Heterogenität. Das erschwert die Suche nach einer selektiven, aber doch für möglichst viele Pflanzenpeptide geeigneten Analysemethode.

Weiters handelt es sich um kleine Proteine mit einer Größe von bis zu 10 kDa. Dieser Größenbereich wird mit der SDS-Gelelektrophorese, die sehr häufig zur Analyse von Proteinen eingesetzt wird, jedoch typischerweise nicht erfasst [Farrokhi et al., 2008]. Deshalb wird oft die LC/MS für die Detektion eingesetzt. Aufgrund der stabilisierten Struktur von cyclischen und cystinhaltigen Pflanzenpeptiden ist eine Fragmentierung im Massenspektrometer allerdings schwierig, und die Moleküle müssen zuerst linearisiert werden, um eindeutig charakterisiert werden zu können [Colgrave et al., 2010].

Außerdem gibt es bisher kein etabliertes Verfahren zur gezielten Detektion von Pflanzenpeptiden in komplexen Extrakten, sondern nur einige wenige Arbeiten, die sich mit ihrer Analyse beschäftigt haben. Ein wichtiger Punkt dieser Arbeit war daher, eine möglichst selektive Methode für ein breites Peptid-Screening von verschiedenen Pflanzen zu entwickeln. Darüber hinaus sollten eine Reihe von traditionell eingesetzten Heilpflanzen mit dieser Methode auf die Anwesenheit von relevanten Mengen an Pflanzenpeptiden untersucht werden.

2) MATERIAL UND METHODEN

2.1 Pflanzenmaterial

Das verwendete pflanzliche Drogenmaterial kann in drei verschiedene Gruppen eingeteilt werden:

2.1.1 Abnormal Savda Munziq (ASMq)

ASMq ist ein Dekokt einer Mischung von zehn Heilpflanzen, die in der traditionellen Uighurischen Medizin vor allem bei Diabetes, kardiovaskulären Erkrankungen, chronischem Asthma oder verschiedenen Krebserkrankungen verwendet wird [Kizaibek et al., 2011].

Die Proben wurden, mit Ausnahme von *Alhagi pseudoalhagi* Desv., welches von Herrn Pharm.D. Adhami bereitgestellt wurde, von Frau Prof. Kopp zur Verfügung gestellt (beide Department für Pharmakognosie, Universität Wien). Die verwendeten Pflanzen sind in Tabelle 1 angeführt.

Tabelle 1: Komponenten, die das ASMq bilden

Stammpflanze	Familie ¹	Pflanzenteil
<i>Adiantum capillus-veneris</i> L.	Adiantaceae	herba
<i>Alhagi pseudoalhagi</i> Desv.	Leguminosae	excretum
<i>Anchusa italica</i> Retz.	Boraginaceae	herba
<i>Cordia dichotoma</i> G. Forest.	Boraginaceae	fructus
<i>Euphorbia humifusa</i> Willd.	Euphorbiaceae	herba
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	Apiaceae	fructus
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	Leguminosae	radix
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	Lamiaceae	herba
<i>Melissa officinalis</i> L.	Lamiaceae	herba
<i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	Rhamnaceae	fructus

¹ Familienzugehörigkeiten – mit Ausnahme von *Anchusa italica* Retz. - laut Angabe von The Plantlist (<http://www.theplantlist.org>)

2.1.2 Gesammelte Drogen

Diese Kategorie umfasst jene Pflanzen, die aus Wildsammlungen stammen und aufgrund ihrer pharmakologischen Wirkungen und ihrer Anwendung in der Volksmedizin am Department für Pharmakognosie der Universität Wien untersucht wurden (siehe Tabelle 2).

Tabelle 2: Untersuchtes Pflanzenmaterial aus Wildsammlung stammend

Stammpflanze	Familie ¹	Pflanzenteil	Sammelort/KennNr.
<i>Dianthus versicolor</i> Fisch. Ex Link	Caryophyllaceae	radix herba stipites	Mongolei 53/04 bzw. 02/05
<i>Leonurus sibiricus</i> L.	Lamiaceae	herba	Mongolei 12.08.2009
<i>Stachys officinalis</i> L.	Lamiaceae	herba	Neustift, Österreich

Dianthus versicolor Fisch. ex Link wird in der traditionellen mongolischen Medizin bei Erkrankungen der Leber und des Gastrointestinaltraktes eingesetzt [Obmann et al., 2010].

Leonurus sibiricus L. wird ebenfalls in der Mongolei als Heilpflanze eingesetzt, allerdings wegen der blutdrucksenkenden, antibakteriellen, anticancerogenen, sowie uterotonischen Wirkungen [Ligaa, 2006].

Stachys officinalis L. wird vor allem im Alpenraum wegen ihrer antiinflammatorischen Wirkung verwendet.

¹ Familienzugehörigkeiten laut Angabe von The Plantlist (<http://www.theplantlist.org>)

2.1.3 Handelsware

Hierzu zählen jene Drogen aus dem Drogendepot des Departments für Pharmakognosie, die über verschiedene Großhändler bezogen wurden (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Untersuchte Heilpflanzen, die über einen Händler bezogen wurden

Stammpflanze	Familie¹	Pflanzenteil	Bezugsquelle
<i>Acorus calamus</i> L.	Acoraceae	radix	nicht verifizierbar
<i>Agrimonia</i> sp.	Rosaceae	herba	Mag. Kottas
<i>Angelica archangelica</i> L.	Apiaceae	radix	Mag. Kottas
<i>Angelica sylvestris</i> L.	Apiaceae	radix	Richter
<i>Bellis perennis</i> L.	Compositae	flos	Galke
<i>Berberis vulgaris</i> L.	Berberidaceae	fructus	Mag. Kottas
<i>Beta vulgaris</i> L.	Amaranthaceae	radix	Galke
<i>Calluna vulgaris</i> L.	Ericaceae	herba	Mag. Kottas
<i>Capsella bursa-pastoris</i> L.	Brassicaceae	herba	Mag. Kottas
<i>Cetraria islandica</i> L.	Parmeliaceae	lichen	Mag. Kottas
<i>Curcuma longa</i> L.	Zingiberaceae	radix	nicht verifizierbar
<i>Elaeagnus rhamnoides</i> L.	Elaeagnaceae	fructus	Galke
<i>Elymus repens</i> L.	Poaceae	rhizom	Mag. Kottas
<i>Epilobium parviflorum</i> Schreb.	Onagraceae	herba	Mag. Kottas
<i>Equisetum arvense</i> L.	Equisetaceae	herba	Richter
<i>Euphrasia</i> sp.	Orobanchaceae	herba	Mag. Kottas
<i>Filipendula ulmaria</i> L.	Rosaceae	herba	Mag. Kottas
<i>Geum urbanum</i> L.	Rosaceae	herba	Galke
<i>Geum urbanum</i> L.	Rosaceae	radix	Mag. Kottas

¹ Familienzugehörigkeiten laut Angabe von The Plantlist (<http://www.theplantlist.org>)

MATERIAL UND METHODEN

<i>Glechoma hederacea</i> L.	Lamiaceae	herba	Mag. Kottas
<i>Hamamelis virginiana</i> L.	Hamamelidaceae	cortex	Mag. Kottas
<i>Levisticum officinale</i> W. D.J. Koch	Apiaceae	radix	Mag. Kottas
<i>Linum usitatissimum</i> L.	Linaceae	semen	Richter
<i>Lycopodium</i> sp.	Lycopodiaceae	herba	Mag. Kottas
<i>Malva</i> sp.	Malvaceae	folium	Mag. Kottas
<i>Melissa officinalis</i> L.	Lamiaceae	folium	Galke
<i>Origanum majorana</i> L.	Lamiaceae	herba	Richter
<i>Petroselinum crispum</i> Mill.	Apiaceae	fructus	nicht verifizierbar
<i>Peucedanum ostruthium</i> W. Koch	Apiaceae	radix	Mag. Kottas
<i>Plantago lanceolata</i> L.	Plantaginaceae	folium	Mag. Kottas
<i>Potentilla anserina</i> L.	Rosaceae	herba	Mag. Kottas
<i>Primula veris</i> L.	Primulaceae	radix	nicht verifizierbar
<i>Ribes nigrum</i> L.	Grossulariaceae	fructus	Richter
<i>Rosa canina</i> L.	Rosaceae	fructus	Mag. Kottas
<i>Salvia officinalis</i> L.	Lamiaceae	herba	Richter
<i>Sambucus nigra</i> L.	Adoxaceae	fructus	Mag. Kottas
<i>Sorbus aucuparia</i> L.	Rosaceae	fructus	Mag. Kottas
<i>Symphytum officinale</i> L.	Boraginaceae	radix	Mag. Kottas
<i>Tilia</i> sp.	Malvaceae	herba	Mag. Kottas
<i>Tussilago farfara</i> L.	Compositae	folium	Richter
<i>Urtica dioica</i> L.	Urticaceae	folium	Richter
<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	Ericaceae	fructus	Richter
<i>Verbascum</i> sp.	Scrophulariaceae	flos	Richter
<i>Verbena officinalis</i> L.	Verbenaceae	herba	Mag. Kottas
<i>Veronica</i> sp.	Plantaginaceae	herba	Mag. Kottas
<i>Viola odorata</i> L.	Violaceae	herba	C. W. Gruber
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	Zingiberaceae	radix	nicht verifizierbar

2.2 Methoden

In diesem Kapitel werden die verschiedenen Verfahren erklärt, die in dieser Arbeit zur Anwendung kamen. All diese verschiedenen Methoden wurden von den wenigen bereits bestehenden Arbeiten entnommen und nötigenfalls abgewandelt.

2.2.1 Extraktion der ASMq-Komponenten

Die Aufarbeitungsschritte jener Bestandteile, die das ASMq bilden (siehe Tabelle 1, Seite 12), wurden in abgekürzter Form aus einer vorangegangenen Studie übernommen [Kizaibek et al., 2011]. In dieser Arbeit wurden die zehn Pflanzen aber nicht als Mischung, sondern separat aufgearbeitet, um die detektierten Inhaltsstoffe dem jeweiligen Ausgangsmaterial zuordnen zu können. Das dafür eingesetzte Verfahren war die Extraktion. Bei dieser Methode wird versucht die gewünschten Pflanzeninhaltsstoffe mit einem geeigneten, der Löslichkeit entsprechenden Extraktionsmittel möglichst gezielt aus der Pflanzenmatrix herauszulösen, ohne dass es zwischen den zu extrahierenden Stoffen und dem Lösungsmittel zu einer chemischen Reaktion kommt, die diese verändert [Ammon, 2004]. In diesem Fall handelte es sich dabei um eine Extraktion mit dem Lösungsmittel Wasser unter Rückfluss. Dabei wurde dem Extraktionsgefäß ein Rückflusskühler aufgesetzt, an dem der Dampf, der aus dem siedenden Extraktionsgut aufstieg, kondensierte und wieder in das Gefäß zurückfloss [Ammon, 2004].

Dazu wurden je 2,0 g der einzelnen, zerkleinerten Droge mit 20 mL destilliertem Wasser in einem Rundkolben im Wasserbad bei 110°C unter Rückfluss für drei Stunden erhitzt. Danach wurde noch warm durch einen Faltenfilter in ein zuvor gewogenes Zentrifugenröhrchen filtriert, um die festen Bestandteile abzutrennen. Der Faltenfilter diente dabei der Oberflächenvergrößerung der Filterfläche, wodurch dieser Vorgang weniger Zeit in Anspruch nahm. Über Nacht wurde danach gekühlt. Anschließend wurde der Extrakt mittels eines Evaporators (Genevac® L-TD, Modell EZ-2.3 Evaporator) zur Trockene gebracht.

Ein Evaporator ist ein Gerät, das Proben automatisiert, schnell und schonend einengt beziehungsweise trocknet. Die Proben werden dabei in einem Zentrifugensystem platziert. Je nach dem verwendeten Lösungsmittel wird ein bestimmtes Programm gewählt, das dann automatisch Druck und Temperatur so wählt, dass das entsprechende Lösungsmittel oder Gemisch mehrerer Extraktionsmittel abgedampft und in einem separaten Behälter gesammelt werden kann (siehe Abbildung 3).



Abbildung 3: Genevac®
Die Abbildung wurde aus
[<http://genevac.com>]
entnommen.

Nach erfolgter Trocknung wurde die Ausbeute bestimmt. Ein aliquoter Teil davon wurde mit jeweils so viel destilliertem Wasser versetzt, dass ein Verhältnis von Trockenextrakt/Wasser (1/3)¹ resultierte (siehe Tabelle 4). Bei *Adiantum*, *Anchusa*, *Cordia* und *Ziziphus* musste aufgrund der schlechten Löslichkeit des Trockenextraktes mehr Wasser zugesetzt werden (siehe Tabelle 4).

Die Proben wurden im 60°C warmen Wasserbad für drei Stunden bis zur Lösung erhitzt. Dadurch wurden Proben mit vergleichbaren und vor allem bekannten Konzentrationen an Extrakt erhalten.

Die gelösten Extrakte wurden homogenisiert und zur Abtrennung von Polysacchariden mit 60% Vol. Ethanol gefällt. Dazu wurden die Proben zuerst mit 96% Vol. Ethanol versetzt (entsprechendes Volumen siehe Tabelle 4), danach 20 min ultraschalliert und über einen Zeitraum von weiteren 20 min in Ruhe stehen gelassen.

¹ sämtliche in dieser Arbeit angeführten Lösungsmittelzusammensetzungen sind in Volumenteilen angegeben

Tabelle 4: Extraktionsausbeute der ASMq-Komponenten und Herstellung der Lösung für die Polysaccharidfällung

Probe	Ausbeute [mg]	Aliquot [mg]	Zusatz Wasser dest. [µL]	Zusatz Ethanol [µL]
<i>Adiantum capillus-veneris</i> L.	110	83	504	696
<i>Alhagi pseudoalhagi</i> Desv.	1830	1830	5500	8200
<i>Anchusa italica</i> Retz.	320	145	2616	3744
<i>Cordia dichotoma</i> G. Forest.	280	149	896	1284
<i>Euphorbia humifusa</i> Willd.	220	147	443	635
<i>Foeniculum vulgare</i> Mill.	220	144	432	618
<i>Glycyrrhiza uralensis</i> Fisch.	370	155	465	668
<i>Lavandula angustifolia</i> Mill.	nicht erhoben	151	455	653
<i>Melissa officinalis</i> L.	110	93	280	390
<i>Ziziphus jujuba</i> Mill.	930	321	1962	2883

Danach wurden feste Partikel und Schwebstoffe in einer Zentrifuge bei 14.000 U/min für 10 min abgetrennt. Die dazu verwendete Zentrifuge ist die Laborfuge 400 Function Line von Haeraeus Instruments.

Von der überstehenden Flüssigkeit wurden 100 µL entnommen und mittels LC/MS analysiert (siehe Tabelle 5 und 6, Seite 36).

2.2.2 Extraktion von *Urtica dioica* L.

Weiters wurden in dieser Arbeit die Blätter von *Urtica dioica* L. untersucht.

Das Drogenmaterial wurde mit drei verschiedenen Methoden extrahiert:

- 1) 10,0 g Droge wurden mit 50 mL Wasser und 50 mL Methanol in einem 250 mL-Rundkolben im Wasserbad bei 70°C für zwei Stunden unter Rückfluss erhitzt. Anschließend wurde die noch warme Lösung über einen Faltenfilter filtriert. Ein Aliquot von 1 mL wurde entnommen und bei 14.000 U/min für 10 min zentrifugiert, um eventuelle Schwebstoffe abzutrennen. Die überstehende Flüssigkeit wurde direkt für die Analyse mittels LC/MS verwendet (siehe Tabelle 5 und 6, Seite 36).
- 2) Im zweiten Ansatz wurden 10,0 g Droge mit 100 mL destilliertem Wasser im Wasserbad bei 70°C für zwei Stunden extrahiert, wieder durch einen Faltenfilter filtriert, etwa 1 mL zentrifugiert und der Überstand mit LC/MS analysiert. Durch den Einsatz von Wasser statt Methanol wurde also die Polarität des Extraktionsmittels erhöht.
- 3) Im dritten Aufbau wurde zunächst versucht, 10,0 g Droge mit 100 mL destilliertem Wasser im Wasserbad bei 70°C für zwei Stunden zu destillieren, wie auch in der Literatur angegeben [Domola et al., 2010]. Da reines Wasser allerdings erst ab 100°C siedet, konnte auch kein Destillat gewonnen werden. Der gleiche Ansatz wurde daher im selben Versuchsaufbau jedoch bei 100°C Wassertemperatur noch einmal destilliert bis etwa 3 mL Destillat erhalten wurden. Dieses wurde mittels Evaporator wieder zur Trockene gebracht, danach wurden die resultierenden 0,7 mg Rückstand in 500 µL destilliertem Wasser gelöst und nach einem Zentrifugationsschritt mittels LC/MS analysiert (siehe Tabelle 5 und 6, Seite 36).

2.2.3 Screening-Methode für Pflanzenpeptide

Um möglichst zeit-, kosten- und materialsparend eine große Zahl von Pflanzen auf unterschiedliche Arten von linearen und cyclischen Peptiden hin untersuchen zu können, wurde eine Screening Methode erstellt (siehe auch Kapitel 3.2.1, Seite 55 - 57), die sich in die beiden unten angeführten Abschnitte gliedern lässt.

2.2.3.1 Extraktion des Pflanzenmaterials

Es wurden jeweils 2,0 g der zu testenden Pflanze in getrockneter und fein geschnittener, zerstoßener oder grob pulverisierter Form (je nach Beschaffenheit des Ausgangsmaterials) mit 20 mL Acetonitril/2% Ameisensäure¹ (50%)² zugedeckt für 30 min im Ultraschallbad extrahiert. (Der Säurezusatz wurde, wie generell in der Literatur für die Extraktion von Peptiden beschrieben, beibehalten.) Anschließend wurde über einen Faltenfilter filtriert und der Flüssigextrakt danach mit einem Evaporator zur Trockene gebracht und ausgewogen.

2.2.3.2 Probenvorbereitung mittels 96-well-plate-SPE

Die Festphasenextraktion (kurz SPE für Solid Phase Extraction) ist eine Methode, die häufig zur Probenvorbereitung eingesetzt wird, um die Analyten rasch und selektiv zu reinigen oder zu konzentrieren. Sie ist auch deshalb eine beliebte Methode, weil sie leicht handhabbar, leistungsfähig und für viele Substanzen einsetzbar ist [Gey, 2008].

Bei der Festphasenextraktion macht man sich die unterschiedlich starken Wechselwirkungen der Probenkomponenten mit der stationären und mobilen Phase zu Nutze. Als stationäre Phase wird dabei häufig unterschiedlichst modifiziertes Silicagel verwendet, das in Extraktionsröhrchen gefüllt ist [Gey, 2008]. Die

¹ sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Säuren sind wässrige Lösungen

² alle Prozentigkeiten in dieser Arbeit sind bezogen auf Volumenteile

Probenaufarbeitung in der Kartusche erfolgte in mehreren Schritten. Zuerst musste jedoch die Probe für die Extraktion vorbereitet werden:

Dazu wurden vom Trockenextrakt in Kapitel 2.2.3.1 (Seite 20) etwa 10 mg in einer 1%igen Ameisensäure gelöst, beziehungsweise bei schlechter Löslichkeit trotz Vortexen und Ultraschallierens für einige Minuten in Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) gelöst. Die angestrebte Endkonzentration für das Auftragen auf die SPE-Kartuschen war 10 mg in 100 μ L. Damit die feinen Poren der Kartusche jedoch nicht verstopfen, wurden nach dem Lösungsschritt eventuelle Schwebstoffe mit einer kleinen Tischzentrifuge (Kinetic Energy 26 Joules Galaxy Mini Centrifuge, Mini Star silverline, VWR International) abgetrennt.

Die 96-well-plate-SPE-Apparatur (Supelco PlatePrep™ Vacuum) besteht, wie in Abbildung 4 ersichtlich, aus einem Unterteil, in den entweder ein Einsatz für Lösungsmittelabfälle gestellt werden kann, oder ein Einsatz mit voneinander abgeteilten Auffangbehältnissen mit je ca. 2 mL Fassungsvermögen für die Probenfraktionen. Am Boden befindet sich außerdem der Anschluss für das Anlegen eines Unterdruckes, der für die Extraktion nötig ist, mit einem Regler mit Druckanzeige. Laut Angabe des Herstellers sollte der Druck so gewählt werden, dass eine „Extraktionsgeschwindigkeit“ von ein bis zwei Tropfen pro Sekunde resultiert [<http://www.instrument.com.cn/Quotation/Manual/71841.pdf>]. Aufgesetzt ist ein Deckel bestehend aus insgesamt 96 SPE-Kartuschen (Supelco Discovery® DSC-18), gepackt mit je 100 mg C18 - Umkehrphasenmaterial und einem Säulenvolumen von 2 mL.



Abbildung 4: 96-well-plate-SPE-Apparatur

Zu Beginn der Festphasenextraktion wurde das SPE-Material konditioniert, um es auf die Startbedingungen einzustellen. Dazu wurden die Kartuschen zuerst mit drei Reservoirvolumina Methanol gespült und danach mit drei Reservoirvolumina 1%iger Ameisensäure equilibriert. Dann wurde der jeweilige Überstand, der wie beschrieben vorbereiteten Probe, aufgetragen und mit drei mal 2 mL Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) gewaschen. All diese Eluate wurden verworfen, da sie nur zur Einstellung der Kartuschen dienten beziehungsweise die für diese Arbeit nicht relevanten sehr polaren Stoffe enthielten. Die nun folgende Fraktion, die man durch Elution mit zwei mal 2 mL Acetonitril/1% Ameisensäure (80%) erhielt, wurde gesammelt und mittels Evaporator zur Trockene gebracht.

Anschließend wurde dieser Trocknungsrückstand in soviel Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) aufgenommen, dass wenn möglich eine Endkonzentration von 10 mg/mL resultierte. Bei unzureichender Löslichkeit musste jedoch das Lösungsmittelvolumen erhöht und die Konzentration somit verringert werden.

Die Analyse erfolgte mittels LC/MS (siehe Tabelle 5 und 6, Seite 36).

2.2.4 Aufreinigung ausgewählter Pflanzenpeptide

Im Falle, dass das Screening ein positives Ergebnis zeigte (siehe Tabelle 9, Seite 59 - 61), bestand also ein Verdacht auf lineare oder cyclische Peptidstrukturen. Der nächste Schritt zielte darauf ab größere Mengen dieser Verbindungen aufzureinigen, um eine chemische und pharmakologische Charakterisierung zu ermöglichen. Dazu erfolgte zunächst eine feinere Fraktionierung des entsprechenden Pflanzenextraktes (siehe Kapitel 2.2.4.1, Seite 23 – 24).

2.2.4.1 Fraktionierte SPE (10 – 100% Acetonitril)

Hierbei wurde nicht wie beim Screening nur eine Fraktion eluiert, sondern mehrere, indem die Polarität des Extraktionsmittels schrittweise erniedrigt wurde, und somit eine feinere Auftrennung der Analyten erfolgte. Um genügend große, handhabbare Mengen bei den einzelnen Fraktionen zu erhalten, wurde dabei mit größeren Drogenmengen und daher notwendigerweise auch mit größeren SPE-Kartuschen als eben genannt gearbeitet.

Es wurden SPE-Kartuschen folgender Art verwendet:

Varian® Mega Bond Elut® C18 - Säulen, Füllmenge an stationärer Phase 2 g, Säulenvolumen 12 mL.

Der Unterdruck wurde wiederum derart gewählt, dass eine Elutionsgeschwindigkeit von ein bis zwei Tropfen pro Sekunde resultierte. Die einzelnen Schritte der Festphasenextraktion wurden wie folgt verfeinert:

- 1) Waschen mit 3 Reservoirvolumina Methanol
- 2) Equilibrieren mit 3 Reservoirvolumina 1%iger Ameisensäure
- 3) Probe auftragen gelöst in Acetonitril/1% Ameisensäure (10%)¹

→ Die Eluate, die bis zu diesem Punkt aufgefangen wurden, wurden verworfen. Erst die nun nachfolgenden Fraktionen wurden einzeln gesammelt.

¹ Die genaue Menge und Konzentration der hier aufgetragenen Probenlösungen sind in Kapitel 3 angegeben.

- 4) Fraktion 1: eluieren mit 3 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure(10%)
- 5) Fraktion 2: eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure(20%)
- 6) Fraktion 3: eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure(30%)
- 7) Fraktion 4: eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure(40%)
- 8) Fraktion 5: eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure(50%)
- 9) Fraktion 6: eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure(60%)
- 10) Fraktion 7: eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure(70%)
- 11) Fraktion 8: eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure(80%)
- 12) Fraktion 9: eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure(90%)
- 13) Fraktion 10: eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril

Die einzelnen Fraktionen (1 bis 10; künftig auch abgekürzt mit *x%-Fraktion*) wurden mit einem Rotationsverdampfer (Laborota 4000 efficient von Heidolph Instruments) zur Trockene gebracht, und die Trockenextrakte wurden anschließend in Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) gelöst. Nach zehnmütigem Abzentrifugieren eventueller Schwebstoffe wurden die Fraktionen einzeln mittels LC/MS vermessen (siehe Tabelle 5 und 6, Seite 36).

2.2.4.2 Optimierung der präparativen SPE für *Sambucus nigra* L.

Im Zuge des Screenings zeigte sich Fructus Sambuci nigrae als vielversprechender „Hit“ (siehe Tabelle 9, Seite 59 - 61). Deshalb wurde nun, basierend auf der fraktionierten SPE (10 - 100% Acetonitril, siehe Kapitel 2.2.4.1, Seite 23 – 24), in der die Peptide in den 40-60%-Fraktionen eluiert werden konnten, eine Hochskalierung dieser Methode durchgeführt mit dem Ziel, genügend große Mengen hochangereicherter Einzelfractionen für weiterführende Versuche zu erhalten. In einem ersten Schritt wurde die Reproduzierbarkeit der Fraktionierung im größeren Maßstab überprüft.

Die hierzu verwendeten SPE-Kartuschen waren Varian® Mega Bond Elute - C18 - Säulen, Füllmenge an stationärer Phase 10 g, Säulenvolumen 60 mL.

Als Probe wurden 20,0 g zerkleinertes Drogenmaterial mit 200 mL Acetonitril/2% Ameisensäure (50%) für 30 min im Ultraschallbad extrahiert, durch einen Faltenfilter filtriert, und der Flüssigextrakt im Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht. Diese Aufarbeitungsschritte entsprachen also denen der Screening-Methode (siehe Kapitel 3.2.1, Seite 55 – 57), jedoch in größerem Maßstab. Vom erhaltenen Trockenextrakt wurde ein Aliquot von 2,5 g entnommen, in 14 mL Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) im Ultraschallbad vollständig gelöst und nach fünfminütigem Abzentrifugieren eventuell ungelöster Bestandteile als Probe für folgende SPE verwendet:

- 1) Waschen mit 3 Reservoirvolumina Methanol
- 2) Equilibrieren mit 3 Reservoirvolumina 1% Ameisensäure
- 3) 2,5 g Probe gelöst in 14 mL Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) auftragen
- 4) Eluieren mit 3 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure (10%)
 - Die Eluate, die bis zu diesem Punkt aufgefangen wurden, wurden verworfen. Erst die nun nachfolgenden Fraktionen wurden einzeln gesammelt:
- 5) Fraktion 1: eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure(30%)
- 6) Fraktion 2: eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure(40%)
- 7) Fraktion 3: eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure(60%)

Die drei Fraktionen wurden nun im Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht.

2.2.4.3 Präparative SPE für Peptide aus *Sambucus nigra* L.

Im weiteren Verlauf wurde außerdem eine engmaschigere fraktionierte SPE-Methode entwickelt, um die einzelnen Peptide von Fructus Sambuci nigrae im Zuge der Aufreinigung in den einzelnen Fraktionen möglichst selektiv voneinander getrennt zu erhalten. Dazu wurde mit je einem Säulenvolumen Acetonitril/1% Ameisensäure von 27% bis 55% (in 4%-Abständen) eluiert, wobei jede Fraktion in vier Teilfraktionen zu jeweils 15 mL gesammelt wurde.

Die hierzu verwendeten Kartuschen waren ident mit denen in Kapitel 2.2.4.2 (Seite 25): Varian® Mega Bond Elute - C18 - Säulen, Füllmenge an stationärer Phase 10 g, Säulenvolumen 60 mL.

Als Probe wurde ein Aliquot von 2,5 g jenes Trockenextraktes verwendet, der auch bei der SPE in Kapitel 2.2.4.2 (Seite 25) herangezogen wurde. Dieser Extrakt wurde in 15 mL Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) im Ultraschallbad vollständig gelöst und nach fünfminütigem Abzentrifugieren eventuell ungelöster Bestandteile als Probe für die SPE verwendet.

Die Schritte dieser Festphasenextraktion im Detail:

- 1) Waschen mit 3 Reservoirvolumina Methanol
- 2) Equilibrieren mit 3 Reservoirvolumina 1% Ameisensäure
- 3) 2,5 g Probe gelöst in 15 mL Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) auftragen
- 4) Eluieren mit 3 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure (10%)
 - Die Eluate, die bis zu diesem Punkt aufgefangen wurden, wurden verworfen. Erst die nun nachfolgenden Fraktionen wurden einzeln gesammelt:
- 5) Fraktion 1: eluieren mit 1 Säulenvolumen Acetonitril/1% Ameisensäure (27%)
Auffangen von vier Teilfraktionen zu jeweils 15 mL (bezeichnet als „27a“ bis „27d“)
- 6) Fraktion 2: eluieren mit 1 Säulenvolumen Acetonitril/1% Ameisensäure (31%)
Auffangen von vier Teilfraktionen zu jeweils 15 mL (bezeichnet als „31a“ bis „31d“)
- 7) Fraktion 3: eluieren mit 1 Säulenvolumen Acetonitril/1% Ameisensäure (35%)

- Auffangen von vier Teilfraktionen zu jeweils 15 mL (bezeichnet als „35a“ bis „35d“)
- 8) Fraktion 4: eluieren mit 1 Säulenvolumen Acetonitril/1% Ameisensäure (39%)
Auffangen von vier Teilfraktionen zu jeweils 15 mL (bezeichnet als „39a“ bis „39d“)
- 9) Fraktion 5: eluieren mit 1 Säulenvolumen Acetonitril/1% Ameisensäure (43%)
Auffangen von vier Teilfraktionen zu jeweils 15 mL (bezeichnet als „43a“ bis „43d“)
- 10) Fraktion 6: eluieren mit 1 Säulenvolumen Acetonitril/1% Ameisensäure (47%)
Auffangen von vier Teilfraktionen zu jeweils 15 mL (bezeichnet als „47a“ bis „47d“)
- 11) Fraktion 7: eluieren mit 1 Säulenvolumen Acetonitril/1% Ameisensäure (51%)
Auffangen von vier Teilfraktionen zu jeweils 15 mL (bezeichnet als „51a“ bis „51d“)
- 12) Fraktion 8: eluieren mit 1 Säulenvolumen Acetonitril/1% Ameisensäure (55%)
Auffangen von vier Teilfraktionen zu jeweils 15 mL (bezeichnet als „55a“ bis „55d“)

Die einzelnen Teilfraktionen wurden im Evaporator zur Trockene gebracht und anschließend in jeweils 1000 µL Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) vollständig gelöst. Nach zehnmütigem Zentrifugieren bei 14.000 U/min wurde der Überstand mittels LC/MS vermessen (siehe Tabelle 5 und 6, Seite 36).

2.2.4.4 Säulenchromatographie (SC)

Die Säulenchromatographie, kurz SC oder auch LC für Liquid Chromatography, ist, wie zum Beispiel auch die Dünnschichtchromatographie, eine Trennmethode, die sich die unterschiedliche Verteilung der Substanzen in komplexen Proben zwischen zwei Phasen zunutze macht: einer ruhenden stationären Phase und einer mobilen Phase, die daran vorbeiströmt [Gey, 2008]. Durch die unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften und den daraus resultierenden verschieden starken Wechselwirkungen der Probenkomponenten mit den einzelnen Phasen, kommt es zu einer Auftrennung der komplexen Probe.

Als stationäre Phase wurde in dieser Arbeit Lipophilic Sephadex® LH-20 verwendet, das häufig für die Trennung von Terpenen, niedermolekularen Peptiden, etc. nach ihrer Molekülgröße eingesetzt wird. Diese Matrix besteht aus quervernetzten, hydroxypropylierten Dextran-Molekülen, die ein Polysaccharidgrundgerüst aufbauen. Dadurch besitzt dieses Material sowohl lipophile, als auch hydrophile Eigenschaften, die ebenfalls zur Auftrennung der Probenkomponenten beitragen [www.gelifesciences.com].

Im Zuge der vorliegenden Arbeit wurde eine Säule mit einem Durchmesser von 1 cm 20 cm hoch gepackt (siehe Abbildung 5). Daraus ergab sich ein Volumen von ca. 16 mL, was experimentell ermittelt einer Menge von 5 g Lipophilic Sephadex®-Material entspricht. Dieses wurde mit ausreichend Methanol (HPLC-Qualität) möglichst luftblasenfrei über zwei Tage in einem Becherglas quellen gelassen.

Zum Packen der Säule wurde diese zuerst mit einem kleinen Stück Watte und darauf mit dem gequollenen Lipophilic Sephadex®-Material unter Klopfen luftblasenfrei gefüllt. Danach wurde die Säule mit ca. 60 mL Methanol (HPLC-Qualität) gewaschen und die Matrix etwa 2 cm dick mit Seesand bedeckt, um ein Aufwirbeln des Materials zu verhindern.

Nun wurde zwei mal mit je 16 mL 50% Vol. Methanol equilibriert und danach die Probe aufgetragen: Als Probe wurde die „methanolische Fructus Sambuci nigrae – 40%-Fraktion“ (Fraktion 2, siehe Kapitel 2.2.4.2, Seite 25) verwendet, um die darin enthaltenen Peptide feiner aufzutrennen. Die 19,7 mg dieser getrockneten Fraktion wurden dazu in 2 mL Methanol/0,15% Ameisensäure (50%) vollständig gelöst und

zur Abtrennung möglicherweise ungelöster Partikel für 10 min bei 14.000 U/min zentrifugiert.

Der Überstand wurde langsam, ohne das Säulenmaterial aufzuwirbeln, in der Mitte der Säulenoberfläche aufgetragen und mit 50 mL 50% Vol. Methanol eluiert. Dabei wurden einzelne Fraktionen zu 4 - 5 mL gesammelt und im Evaporator zur Trockene gebracht. Die Fraktionen 3 und 4, welche die Hauptmenge der Peptide enthielten, wurden für die Reduktion und Alkylierung verwendet (siehe Kapitel 2.2.5, Seite 30 – 31).

Die Trockenextrakte wurden danach in je 1 mL Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) vollständig gelöst und nach zehnmütiger Zentrifugation bei 14.000 U/min mittels LC/MS analysiert (siehe Tabelle 5 und 6, Seite 36).



Abbildung 5: Sephadex-Säule für die SC von *Sambucus nigra* L.- Peptiden

2.2.5 Reduktion und Alkylierung

Um nachweisen zu können, wieviele Cysteine im Peptid vorhanden sind und ob diese frei oder über Disulfidbrücken gebunden vorliegen, wurde eine Reduktion mit anschließender Alkylierung an ausgewählten, aufgereinigten Fraktionen von *Sambucus nigra* L. durchgeführt.

Die dazu benötigten Reagentien waren:

1) 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung:

NH_4HCO_3 hat ein Molekulargewicht von 79,06 g/mol. Einer 0,1 molaren Lösung entsprechen also 7,906 g gelöst in 1000 mL destilliertem Wasser. Es wurden daher 2,6779 g eingewogen und in 338 mL destilliertem Wasser vollständig gelöst. Der pH-Wert dieser Lösung lag bei 7,78.

2) 0,1 M Dithiotreitol-Lösung:

Dithiotreitol (DTT) hat ein Molekulargewicht von 154,25 g/mol, was in der hier benötigten Konzentration also einer Menge von 15,425 mg gelöst in 1000 μL destilliertem Wasser entspricht. Da dieses Reagens sehr oxidationsempfindlich ist, wurden 13,45 mg in 872 μL destilliertem Wasser vollständig gelöst, um die Lösung alsbald zu je 100 μL aliquotiert und dicht verschlossen bei -20°C aufzubewahren.

3) 0,1 M Iodacetamid-Reagens:

Das Molekulargewicht von Iodacetamid beträgt 184,96 g/mol. Es wurden daher 18,7 mg in 1011,5 μL destilliertem Wasser gelöst. Dieses Reagens ist ebenfalls sehr empfindlich, vor allem gegenüber Abbaureaktionen unter Lichteinwirkung. Daher wurde auch dieses Reagens aliquotiert und lichtgeschützt verpackt bei -20°C aufbewahrt.

Als Proben wurden verwendet:

- a) Ein Aliquot von rund 1 mg der getrockneten vereinigten Fraktionen 3 und 4 nach der Aufreinigung mittels SC (siehe Kapitel 3.4.2, Seite 76)

- b) Ein Aliquot von etwa 1 mg der getrockneten 35%-Subfraktion der 30%-Fraktion nach der Aufreinigung von Fructus Sambuci nigrae in einer 10 g – SPE-Kartusche (siehe Tabelle 15, Seite 76).

Die Proben wurden in Anlehnung an das Arbeitsschema zur Reduktion und Alkylierung nach Colgrave et al., 2010 aufgearbeitet. Dazu wurden die Proben im Ultraschallbad jeweils in 500 µL 0,1 M Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung gelöst. Danach wurden jeder Probe 100 µL 0,1 M Dithiotreitol-Reagens zugesetzt und diese bei 60°C für 30 min unter leichtem Schwenken inkubiert. Diese Reaktion wurde durch Kühlen in Eiswasser beendet. Anschließend wurden jeweils 300 µL 0,1 M Iodacetamid-Lösung zugesetzt, wobei möglichst unter Ausschluss von Licht gearbeitet wurde. Dieser Reaktionsschritt lief für 60 min im Dunkeln unter gelegentlichem Schwenken ab. Danach wurde eine SPE durchgeführt, um die überschüssigen Reagenzien und Nebenprodukte abzutrennen. Es wurden LiChrolut® RP18 - Kartuschen, Füllmenge an stationärer Phase 200 mg, Säulenvolumen 3 mL, verwendet. Die Festphasenextraktion verlief nach folgendem Schema:

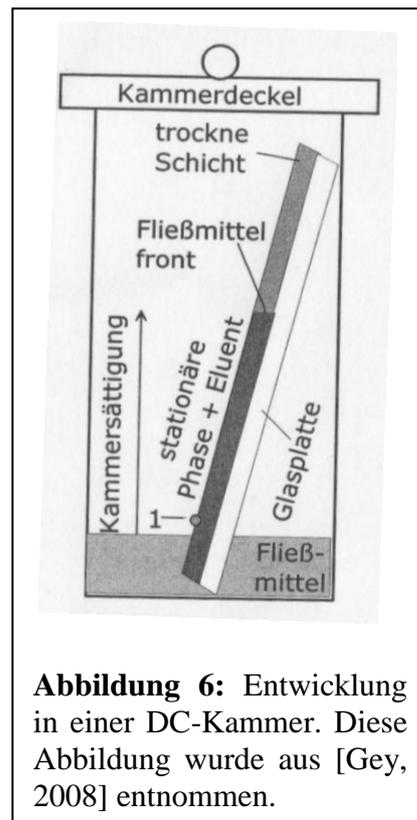
- 1) Waschen mit 3 Reservoirvolumina Methanol
- 2) Equilibrieren mit 3 Reservoirvolumina destilliertem Wasser
- 3) Vorbereitete Probe auftragen
- 4) Eluieren mit 1 Reservoirvolumen destilliertem Wasser
- 5) Eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure (10%)
→ all diese Eluate werden verworfen
- 6) Eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril / 1% Ameisensäure (80%)

Die erhaltenen Extrakte wurden im Evaporator getrocknet. Von Probe a) wurden 0,82 mg und von Probe b) 0,80 mg Rückstand erhalten. Diese wurden mit je 1000 µL Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) vollständig im Ultraschallbad gelöst und nach Abzentrifugieren eventueller Schwebstoffe für 10 min bei 14.000 U/min wurde der Überstand mit LC/MS analysiert (siehe Tabelle 5 und 6, Seite 36).

2.2.6 Dünnschichtchromatographie (DC)

Die Dünnschichtchromatographie, kurz DC, ist wie die bereits beschriebene Säulenchromatographie eine Trennmethode, die auf den unterschiedlichen Wechselwirkungen der Probenkomponenten mit der stationären und mobilen Phase beruht, wobei hier die stationäre Phase - meist chemisch modifiziertes Silicagel - auf einer dünnen Platte oder Folie aufgebracht ist [Gey, 2008].

Nachdem wenige μL einer oder mehrerer Proben auf der Startzone ca. 1 cm vom unteren Plattenrand entfernt aufgetragen worden und getrocknet sind, wird die Platte in eine DC-Kammer gestellt, die bereits solange mit der mobilen Phase weniger als 1 cm hoch gefüllt ist, dass schon eine Kammersättigung eingetreten ist. In der verschlossenen Kammer steigt die mobile Phase über Kapillarwirkung an der Platte nach oben und transportiert dabei die Analyten aus der Probe je nach ihrer Affinität zu den Phasen unterschiedlich weit mit (siehe Abbildung 6). So kommt es zur Auftrennung der Probenbestandteile in einzelne, möglichst klar voneinander abgegrenzten Banden.



Kurz bevor das Laufmittel das Ende der DC-Platte erreicht, wird die Platte aus der Kammer genommen und der Trennvorgang somit beendet.

Nach dem Trocknen der Platte erfolgt die Auswertung der Banden. Diese kann direkt bei Tageslicht oder bei Licht unterschiedlicher Wellenlängen stattfinden. Sehr häufig kommen ergänzend verschiedene Sprühreagenzien zum Einsatz, die mehr oder weniger selektiv bestimmte Substanzen über Farbreaktionen sichtbar machen.

Meist, wie auch im vorliegenden Fall, dienen Dünnschichtchromatogramme der qualitativen Analyse. Nur bei der präparativen DC wird sie auch zur Isolierung von Substanzen eingesetzt [Gey, 2008].

Die DC stellt somit eine relativ einfache, schnelle und kostengünstige Methode dar, um Substanzgemische zu trennen und zu detektieren.

Xu Wen Yan et al. haben eine Methode entwickelt, um Peptide aus Pflanzen mittels DC zu detektieren und um Cyclopeptide, Cyclotide, Aminosäuren, Proteine und lineare Peptide unterscheiden zu können [Xu et al., 2008].

Dazu wurden zuerst drei Dünnschichtchromatogramme der Probe angefertigt. Als stationäre Phase wurde eine Silicagel-Platte (Kieselgel 60 F254, Größe: 5x10 cm) verwendet und als mobile Phase diente ein Laufmittelgemisch aus n-Butanol/Essigsäure/Wasser (3/1/1). Nach der Entwicklung der Platten und dem Abdampfen des Laufmittels wurden die Peptide auf der DC-Platte hydrolysiert. Dazu wurde die Platte in eine Hälfte einer Doppeltrogkammer gestellt und etwa 1 mL konzentrierte Salzsäure in die andere Hälfte des DC-Troges pipettiert, ohne dass die Säure in direkten Kontakt mit der DC-Platte kam. Die Hydrolyse erfolgte im vorgeheizten Trockenschrank bei 110°C für zwei Stunden. Durch die große Hitze entsteht in der DC-Kammer ein HCl-Dampfraum, wodurch es auf der DC-Platte zu einer Reaktion kommt. Danach wurde die Platte erkalten gelassen. Diese und eine weitere der DC-Platten wurden mit einem 0,2%igen ethanolischen Ninhydrin-Lösung besprüht und für wenige Minuten im Trockenschrank getrocknet. Der Vergleich der beiden Platten (hydrolysiert und nicht hydrolysiert) sollte es ermöglichen, relativ sensitiv zwischen Cyclotiden, Cyclopeptiden, Aminosäuren, linearen Peptiden und Proteinen zu differenzieren: Purpur bis rot gefärbte oder gelbe Banden auf der hydrolysierten Platte, die auf der nicht-hydrolysierten Platte nicht zu finden sind, sollten Cyclopeptide beziehungsweise Cyclotide anzeigen. Um nun auch zwischen diesen beiden Klassen unterscheiden zu können, wurde die dritte der DC-Platten mit Coomassie Brilliant Blue besprüht. Für dieses Sprühreagens wurden 5,1 mg Coomassie Brilliant Blue in 1 mL 96% Vol. Ethanol gelöst, anschließend mit 1 mL konzentrierter Phosphorsäure oder konzentrierter Essigsäure versetzt und danach 8 mL 50% Vol. Ethanol zugegeben. Wenn Cyclotide vorhanden sind, sollten diese nach Besprühen und Trocknen der Platte als cyanfarbene Banden auf rotem Hintergrund erscheinen, während Cyclopeptide keine Reaktion geben sollten [Xu et al., 2008].

2.2.7 LC/MS

Die Massenspektrometrie, kurz MS, ist anders als die bisher besprochenen chromatographischen Techniken keine analytische Trennmethode, sondern dient vor allem der Strukturaufklärung und der Quantifizierung aufgetrennter Substanzen aus einer komplexen Matrix. Daher wird diese Methode auch häufig in der Analytik biogener Stoffe eingesetzt.

Das Prinzip der Massenspektrometrie besteht darin, dass Probenmoleküle durch eine Ionenquelle in geladene, gasförmige Moleküle überführt und diese dann nach ihrem Masse/Ladungsverhältnis (m/z) getrennt und mit einem Detektor erfasst werden. Um Kollisionen zwischen den Analytionen und Molekülen aus der Luft und somit Streueffekte zu vermeiden, muss im Massenspektrometer ein Hochvakuum erzeugt werden [Gey, 2008].

In dieser Arbeit wurde die Massenspektrometrie mit einer vorgeschalteten HPLC-Trennmethode kombiniert, was auch als HPLC/MS (LC/MS) – Analyse bezeichnet wird. Es werden also zwei sehr effiziente Analysenmethoden gekoppelt, wodurch die Anzahl der detektierbaren Komponenten in einer Probe stark erhöht wird.

Grundsätzlich besteht ein LC/MS-Anlage aus folgenden Elementen:

- Einem HPLC-System mit geeigneter Trennsäule für die Probenauftrennung.
- Direkt daran gekoppelt befindet sich eine Ionenquelle, die Ionen erzeugt, sie fokussiert und zum Massenanalysator transferiert. In dieser Arbeit wurde dazu ein sogenanntes „weiches“ Ionisierungsverfahren, die Elektrospray-Ionisation (ESI) eingesetzt. Dabei wird das Eluat, bestehend aus Probenmolekülen und Lösungsmittel aus dem HPLC-System, durch eine unter elektrischer Spannung stehende Nadel in eine Sprühkammer geleitet. Dadurch, und mit Hilfe eines Vernebelungsgases, werden kleine Tröpfchen gebildet. Ein Trocknungsgas, meist erhitzter Stickstoff, wird ebenfalls im Gegenstrom in diese Kammer geleitet. Dadurch dampft das Lösungsmittel ab und unzerstörte, reine Ionen mit einer Überschussladung, die durch den elektrischen Feldgradienten durch eine Kapillare gezogen werden, bleiben zurück. Am Ende dieser erfolgt eine Fokussierung der Ionen durch einen Skimmer und verschiedene Linsensysteme. Entlang dieses Weges wird der

Druck stufenweise von Luftdruck bis zu einem Hochvakuum reduziert, was ebenfalls zur vollständigen Desolvatisierung der Ionen beiträgt (siehe Abbildung 7).

- Von der Ionenoptik der Quelle gelangen die Ionen in einen Analysator, wobei für diese Arbeit eine Ionenfalle mit Helium als Kollisionsgas verwendet wurde. Diese besteht aus speziell angeordneten Elektroden, zwischen denen durch Anlegen verschiedener Gleich- und Wechselspannungen ein elektrisches Feld erzeugt wird, in dem Ionen eines spezifischen m/z -Bereiches „festgehalten“ werden können. Von dort aus können die Ionen nun gezielt entlassen und nach ihrer m/z -Zahl detektiert werden. Daraus resultiert ein Massenspektrum, in dem die Intensität des Detektorsignals gegen den m/z -Wert aufgetragen ist. Auch hier gibt es verschiedene „Aufnahmetechniken“: In MS^1 -Spektren werden meist die intakten Molekülonen detektiert, wobei man qualitative Informationen über die Probe erhält. Wenn man eine schrittweise Fragmentierung durchführt (MS^n -Spektren), erhält man zusätzliche Informationen über Teilstrukturen von gewissen Molekülen [Bruker Daltonics GmbH, esquire/HCT series User Manual, Version 1.3].

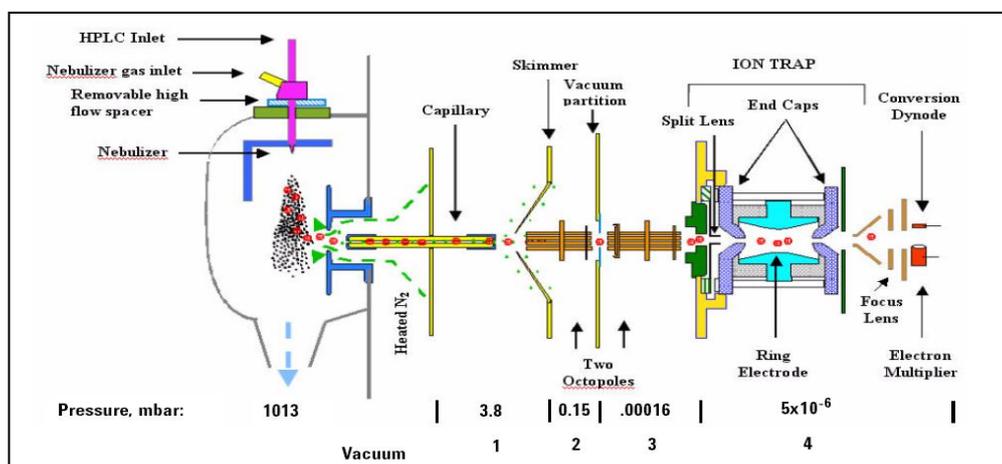


Abbildung 7: Schema des für diese Arbeit verwendeten Ionenfallen-Massenspektrometers mit ESI-Quelle; Diese Abbildung wurde entnommen aus [Bruker Daltonics GmbH, esquire/HCT series User Manual, Version 1.3].

Der überwiegende Teil der LC/MS-Analysen für diese Arbeit wurde mit einer Standardmethode durchgeführt. Die wichtigsten Parameter dieser Methode sind in Tabelle 5 und 6 angeführt.

Tabelle 5: Daten und Parameter des Massenspektrometers

Gerät	ESI-IT-MS (HCT, Bruker Daltonics)
Ionisation	Elektrospray (ESI)
Ionenpolarität	Positiv
Trockengastemperatur	340°C
Trockengasfluss	9 L/min
Vernebelungsgasdruck	26 psi
Kapillarspannung	- 3,7 kV
Messbereich	80 – 2500 m/z
Kollisionsgas	Helium

Tabelle 6: Daten und Parameter der HPLC

Gerät	UltiMate 3000 RSLC-System (Dionex)	
Stationäre Phase	Acclaim 120 (Dionex) C18, 3 µm, 120 Å	
Säulendimensionen	2,1x150 mm	
Säulentemperatur	25°C	
Mobile Phase	1% Ameisensäure (Laufmittel A) Acetonitril (Laufmittel B)	
Wellenlängenbereich DAD	190 – 400 nm	
Flussrate	0,5 mL/min	
Gradient	Min	% B
	0	10
	2	10
	52	60
	53	95
	63	95
	64	10
	74	10

3) RESULTATE UND DISKUSSION

3.1 Vermutete Peptide aufgrund vorangegangener Arbeiten

Wie bereits im Allgemeinen Teil beschrieben, gibt es bislang nur vereinzelte Berichte über Methoden zur Isolierung und Aufreinigung linearer oder cyclischer Peptide aus Pflanzen. In den folgenden Kapiteln werden einige Versuche mit Pflanzenmaterial beschrieben, in denen entweder aufgrund vorangegangener Arbeiten oder der Literatur das Vorhandensein interessanter Peptide vermutet wurde.

3.1.1 Analyse der in ASMq enthaltenen Pflanzenmaterialien

Im Zuge von LC/MS-Untersuchungen, die Kizaibek et al. zur Identifizierung der Inhaltsstoffe in ASMq-Fractionen durchgeführt haben, traten Peaks auf, die aufgrund ihrer Masse und ihres Fragmentierungsverhaltens auf das Vorhandensein von kleinen Peptiden hindeuteten [Kizaibek et al., 2012].

Daher wurde das Aufarbeitungsschema größtenteils beibehalten. Zum Einsatz kam allerdings nicht das Gemisch der zehn Pflanzen, sondern es wurde jede Teilkomponente separat aufgearbeitet und analysiert (siehe Methoden 2.2.1, Seite 16 - 18). Außerdem wurde die Methode im Vergleich zur Originalvorschrift dahingehend abgekürzt, dass keine Feinreinigung mittels Säulenchromatographie erfolgte. Dies geschah, weil nur eine Ja/Nein-Aussage erzielt werden sollte, in welcher der Pflanzen diese Strukturen wiederzufinden sind.

Die LC/MS-Analyse ergab jedoch bei keiner der Einzelpflanzen jene vielversprechenden Peaks, die auch bei der Analyse der Mischung aufgetreten waren. Auch mit einer anderen HPLC-Säule und unterschiedlichen mobilen Phasen wie sie auch in der Literatur zu finden sind [Kizaibek et al., 2012], konnte das Ergebnis nicht reproduziert werden.

Bei genauerer Betrachtung der Arbeitsvorschrift kam der Verdacht, dass die stickstoffhaltigen Moleküle möglicherweise „Verunreinigungen“ vom verwendeten Säulenmaterial sein könnten. Deshalb wurde ein Polyamid-Säulenmaterial kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend im Becherglas für einige Minuten mit 60% Vol. Ethanol versetzt. Der Ethanol wurde abpipettiert, zentrifugiert und mittels LC/MS vermessen.

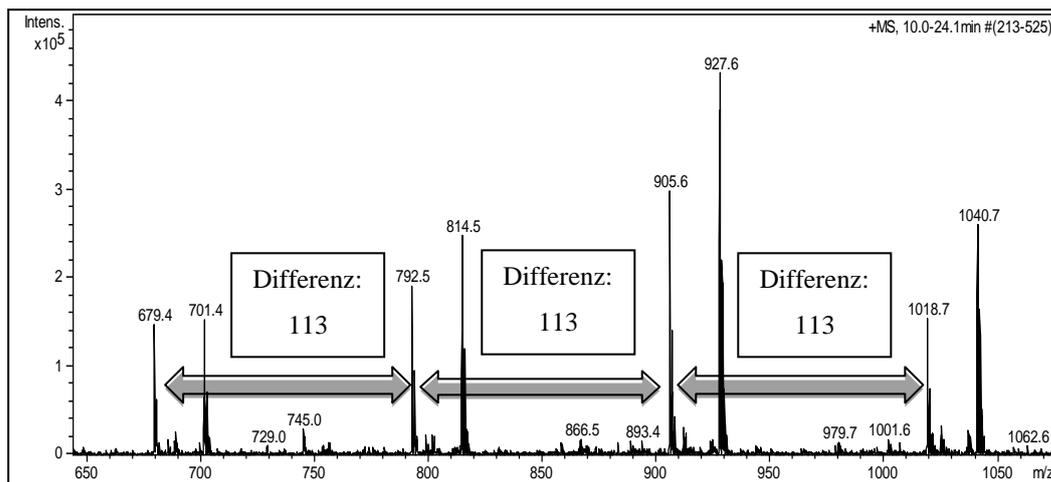


Abbildung 8: MS¹-Spektrum der „Polyamid-Lösung“

Das MS¹-Spektrum zeigt genau jene Peaks, die auch in der ASMq-Mischung zu finden waren (siehe Abbildung 8). Die Massendifferenz zwischen den Signalen von vier verwandten Verbindungen beträgt jeweils 113 Da, was von den Polyamid-Einheiten (ϵ -Caprolactam) stammt und nicht, wie zu Beginn vermutet, von den Aminosäuren Leucin beziehungsweise Isoleucin. Dieselbe Massendifferenz wurde auch in den MSⁿ-Spektren zwischen den Fragmentationen gefunden (Daten nicht gezeigt), wodurch die detektierten Verbindungen mit hoher Wahrscheinlichkeit als cyclische Caprolactam-Oligomere mit sechs bis neun Einheiten identifiziert werden konnten. Die Signale im MS¹-Spektrum, die jeweils einen m/z-Abstand von + 22 haben, stammen von Na-Addukten.

Somit konnte gezeigt werden, dass in den zehn Pflanzenmaterialien, die zur Herstellung von ASMq verwendet werden, unter den gegebenen Extraktionsbedingungen keine Peptidstrukturen detektierbar waren.

3.1.2 *Urtica dioica* L.

Domola et al. beschreiben peptidische Strukturen in den Blättern von *Urtica dioica* L. [Domola et al., 2010]. Daher wurde in dieser Arbeit versucht, die Ergebnisse zu reproduzieren und anschließend das Verfahren nötigenfalls zu optimieren. Dabei stellte sich das Problem, dass mit der in jener Arbeit beschriebenen Methode der Destillation mit der angegebenen Temperatur (zwei Stunden bei 70°C) bei Luftdruck kein Destillat des wässrigen Ansatzes gewonnen werden konnte, das hätte analysiert werden können. Aus diesem Grund wurde das Verfahren in dieser Arbeit abgewandelt (siehe Methoden 2.2.2, Seite 19). Doch weder in dem im siedenden Wasserbad gewonnenen Destillat, noch in dem mit Wasser beziehungsweise 50% Vol. Methanol bei 70°C gewonnenen Extrakt konnten die beschriebenen Peptide mittels LC/MS detektiert werden.

Auch eine dünnschichtchromatographische Analyse unter Verwendung der Sprühreagenzien Ninhydrin bzw. Coomassie Brilliant Blue (siehe Abbildung 13, Seite 49) brachte keinen Hinweis auf Peptid-Strukturen.

Aus diesen Gründen wurden im Zuge der vorliegenden Arbeit keine weiteren Versuche mit *Urtica dioica* L. unternommen.

3.1.3 Methodenentwicklung anhand von *Viola odorata* L.

Eine der auf dem Gebiet der Cyclotide bisher am besten untersuchten Pflanzen ist *Viola odorata* L.. Dazu liegen auch schon verschiedene Forschungsarbeiten vor, wie etwa jene der Forschungsgruppe um David Craik, die als Ausgangspunkt für weitere Versuche auch in dieser Arbeit gedient haben. Auch hier wurden wiederum die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse, sowie eine eventuelle Optimierung des Versuchsablaufes angestrebt.

Ein Versuchsaufbau beruhte auf dem Schema, das in der Arbeit von M. Colgrave et al., 2008 publiziert wurde. Dazu wurden 10,0 g von Herba *Violae odoratae* in geschnittener und getrockneter Form (anstatt der Frischpflanze) mit 100 mL Dichlormethan/Methanol (1/1) versetzt und zugedeckt in einem Erlenmeyerkolben unter langsamem Rühren über Nacht extrahiert.

In einem zweiten Aufbau wurde mit etwas kleineren Mengen, aber im selben Verhältnis gearbeitet: 2,0 g Droge wurden mit 20 mL Dichlormethan/Methanol (1/1) zugedeckt in einem Erlenmeyerkolben extrahiert. Allerdings wurde eine Zeitreduktion angestrebt und daher nicht am Magnetrührer, sondern für 30 min im Ultraschallbad extrahiert.

Beide Ansätze wurden durch einen Faltenfilter filtriert, anschließend mit etwa derselben Menge destilliertem Wasser versetzt und im Scheidetrichter partitioniert. Dabei wurde die wässrige, also obere Phase gesammelt, was beim größeren Ansatz aufgrund der langsamen Phasentrennung über zwei Tage in Anspruch nahm. Der wässrige Extrakt wurde nun im Evaporator zur Trockene gebracht. Ein Aliquot des Trockenextraktes wurde entnommen (siehe Tabelle 7, Seite 42), in 500 µL 1%iger Ameisensäure möglichst vollständig gelöst und zur Abtrennung eventueller Schwebstoffe zentrifugiert. Diese Lösungen stellten jeweils die Proben dar, die im Folgenden über eine SPE weiter aufgereinigt wurden.

Für die SPE wurden LiChrolut® RP18 - Extraktionssäulen, Füllmenge an stationärer Phase 500 mg, Säulenvolumen 3 mL, verwendet. Es wurde nach folgendem Schema verfahren:

- 1) Waschen mit 3 Reservoirvolumina Methanol
- 2) Equilibrieren mit 3 Reservoirvolumina 1%iger Ameisensäure
- 3) Probe gelöst in 1%iger Ameisensäure auftragen
- 4) Waschen mit 3 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure (10%)
→ Alle Eluate, die bis zu diesem Punkt aufgefangen wurden, wurden verworfen. Erst die nun nachfolgende Fraktion wurde gesammelt:
- 5) Eluieren mit 3 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure (80%)

Bei allen Schritten wurde der Unterdruck so gewählt, dass eine Tropfgeschwindigkeit von etwa ein bis zwei Tropfen pro Sekunde resultierte.

Die Fraktionen wurden im Evaporator getrocknet und für die Analyse mittels LC/MS in soviel Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) gelöst, dass eine Endkonzentration von 20 mg/mL resultierte (siehe Tabelle 7).

Parallel dazu wurde eine weitere Methode durchgeführt ähnlich jenem Schema von Poth et al., 2011. Dazu wurde als Extraktionsmittel Acetonitril/2% Ameisensäure (50%) verwendet. Auch hier wurden wieder zwei Extraktionsmethoden durchgeführt, wobei jeweils 2,0 g Drogenmaterial mit 20 mL Extraktionsmittel versetzt wurden. Einmal wurde danach wieder über Nacht am Magnetrührer und der zweite Ansatz für 30 min im Ultraschallbad extrahiert. Anschließend wurden die Extrakte wieder über einen Faltenfilter filtriert und ohne Partitionieren im Evaporator zur Trockene gebracht. Vom Trockenextrakt wurde je ein Aliquot entnommen (siehe Tabelle 7), in 600 µL 1%iger Ameisensäure gelöst und zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder, ident wie in den beiden vorhergehenden Versuchen, mittels SPE für die LC/MS-Analyse aufgearbeitet.

Zur besseren Übersicht sind die Arbeitsschritte in Abbildung 9 noch einmal zusammengefasst:

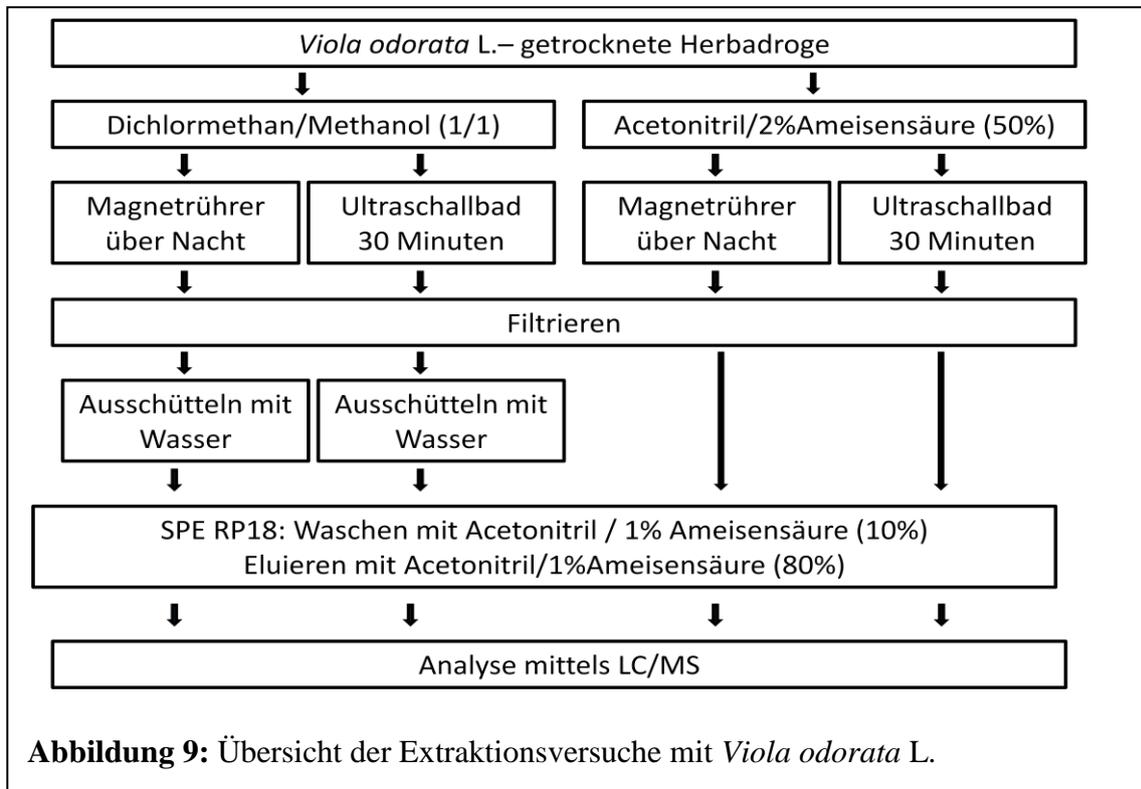


Tabelle 7: Ausgangsmenge und Auswaagen der Extraktionsversuche mit *Viola odorata* L. sowie der nachfolgenden SPE-Fraktion

Extraktionsverfahren	Ausgangsmenge Droge [g]	Menge Trockenextrakt [mg]	Aliquot für SPE [mg]	Ausbeute nach SPE [mg]	Lösungsmittel für LC/MS [µL]
Dichlormethan / Methanol Magnetrührer	10,0	307	56	7,5	375
Dichlormethan / Methanol Ultraschallbad	2,0	63	63	2,1	105
Acetonitril / Ameisensäure Magnetrührer	2,0	270	65	11,6	580
Acetonitril / Ameisensäure Ultraschallbad	2,0	150	60	10,0	500

Die in der Literatur beschriebenen Cyclotide konnten mittels LC/MS in allen vier Extrakten detektiert werden. Allerdings waren jene beiden Methoden, bei denen mit Dichlormethan/Methanol extrahiert wurde, sowohl was die Extraktionsausbeute, den Gehalt an Cyclotiden, als auch den Zeitaufwand betrifft, deutlich schlechter als die anderen beiden Methoden, bei denen mit Acetonitril/Ameisensäure als Extraktionsmittel gearbeitet wurde. Bei den Extrakten, die mit Acetonitril/Ameisensäure erhalten wurden, lieferte die Extraktion am Magnetrührer bei vergleichbarem Cyclotidgehalt zwar eine bessere Extraktausbeute, aufgrund der leichten Verfügbarkeit an Probenmaterial und der großen Zeitersparnis wurde aber die Methode, bei der im Ultraschallbad extrahiert wurde, bevorzugt. Aus diesen Gründen wurde die Methode auch für alle folgenden Versuche verwendet und stellte auch die Basis für die Screening-Methode (siehe Kapitel 3.2.1, Seite 55 – 57) dar.

Als weiterer Schritt wurde untersucht, ob auch in der Aufreinigung mittels SPE (siehe Abbildung 9) eine Modifikation sinnvoll, beziehungsweise sogar nötig ist. Daher wurde mit jenem Material, das nach der Extraktion von *Viola odorata* L. mit Acetonitril/Ameisensäure im Ultraschallbad noch übrig war (etwa 180 mg Trockenextrakt) eine fraktionierte SPE, ähnlich wie im Kapitel 2.2.4.1 (Seite 23 - 24) beschrieben, durchgeführt. Dazu wurden die 180 mg Trockenextrakt in 1000 μ L 1%iger Ameisensäure im Ultraschallbad vollständig gelöst, danach kurz zentrifugiert und der Überstand als Probe für die SPE verwendet. Als Kartuschen wurden LiChrolut® RP18 - Extraktionssäulen, Füllmenge an stationärer Phase 2 g, Säulenvolumen 6 mL, verwendet. Die einzelnen Schritte der Aufreinigung erfolgten nach jenem Schema, das im Kapitel 2.2.4.1 (Seite 23 - 24) beschrieben ist, wobei die 10%-Fraktion hier nicht analysiert, sondern verworfen wurde, und in diesem Fall lediglich bis zur 80%-Fraktion (statt bis zur 100%-Fraktion) gesammelt wurde.

Die einzelnen Fraktionen wurden mittels Evaporator zur Trockene gebracht und anschließend in soviel Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) aufgenommen, dass zumindest eine Konzentration von 1 mg/mL resultierte (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Auswaagen der SPE-Fractionen von *Viola odorata* L. (siehe Abbildung 9, Seite 42), sowie die weiteren Lösungsmittelzusätze

Fraktion [%Acetonitril]	Ausbeute [mg]	Lösungsmittel [µL]	Konzentration [mg/mL]
20	9,15	1525	6
30	3,46	1150	3
40	1,01	1000	1
50	0,63	630	1
60	0,62	620	1
70	0,60	600	1
80	0,75	750	1

Nach vollständigem Lösen und zehnminütigem Zentrifugieren wurden die einzelnen SPE-Fractionen mittels LC/MS analysiert.

In den LC/MS-Daten waren in den 30% bis 60%–Fraktionen deutlich jene Peaks sichtbar, die mit den Massen der in der Literatur beschriebenen „Cycloviolacine“ [Ireland et al., 2006] übereinstimmen. In den restlichen Fraktionen waren diese Signale nicht vorhanden oder nur äußerst schwach ausgeprägt.

Da im Zuge eines Screenings eine große Zahl von Pflanzenproben zur Untersuchung kam und dabei angestrebt wurde, mit möglichst geringen Mengen zu arbeiten, wurde nun untersucht, ob diese Methode auch im kleinen Maßstab angewendet werden kann und welches Elutionsschema tatsächlich benötigt wird.

Dazu wurde jenes Trockenextrakt verwendet, das nach der Extraktion von *Viola odorata* L. mit Acetonitril/2% Ameisensäure (50%) am Magnetrührer und anschließender Trocknung noch zur Verfügung stand (siehe Tabelle 7, Seite 42). Diese 60 mg wurden in 400 µL 1%iger Ameisensäure vollständig gelöst und kurz zentrifugiert. Ein Aliquot von 133 µL des Überstandes (entsprechend 20 mg Extrakt) diente als Probe für die nachfolgende SPE (siehe Abbildung 10).

Es wurden LiChrolut® RP18 - Extraktionssäulen, Füllmenge an stationärer Phase 200 mg, Säulenvolumen 3 mL, nach folgendem Schema genutzt:

- 1) Waschen mit 3 Reservoirvolumina Methanol
- 2) Equilibrieren mit 3 Reservoirvolumina 1 % Ameisensäure
- 3) Probe gelöst in 1%iger Ameisensäure auftragen
- 4) Waschen mit 3 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure (10%)
 - Alle Eluate, die bis zu diesem Punkt aufgefangen wurden, wurden verworfen. Erst die nun nachfolgenden Fraktionen wurden gesammelt:
- 5) Eluieren mit 4,5 mL Acetonitril/1% Ameisensäure (70%), wobei die ersten 3 Fraktionen je 500 μ L und die Fraktionen 4 bis 6 je 1000 μ L fassen (siehe Abbildung 10).

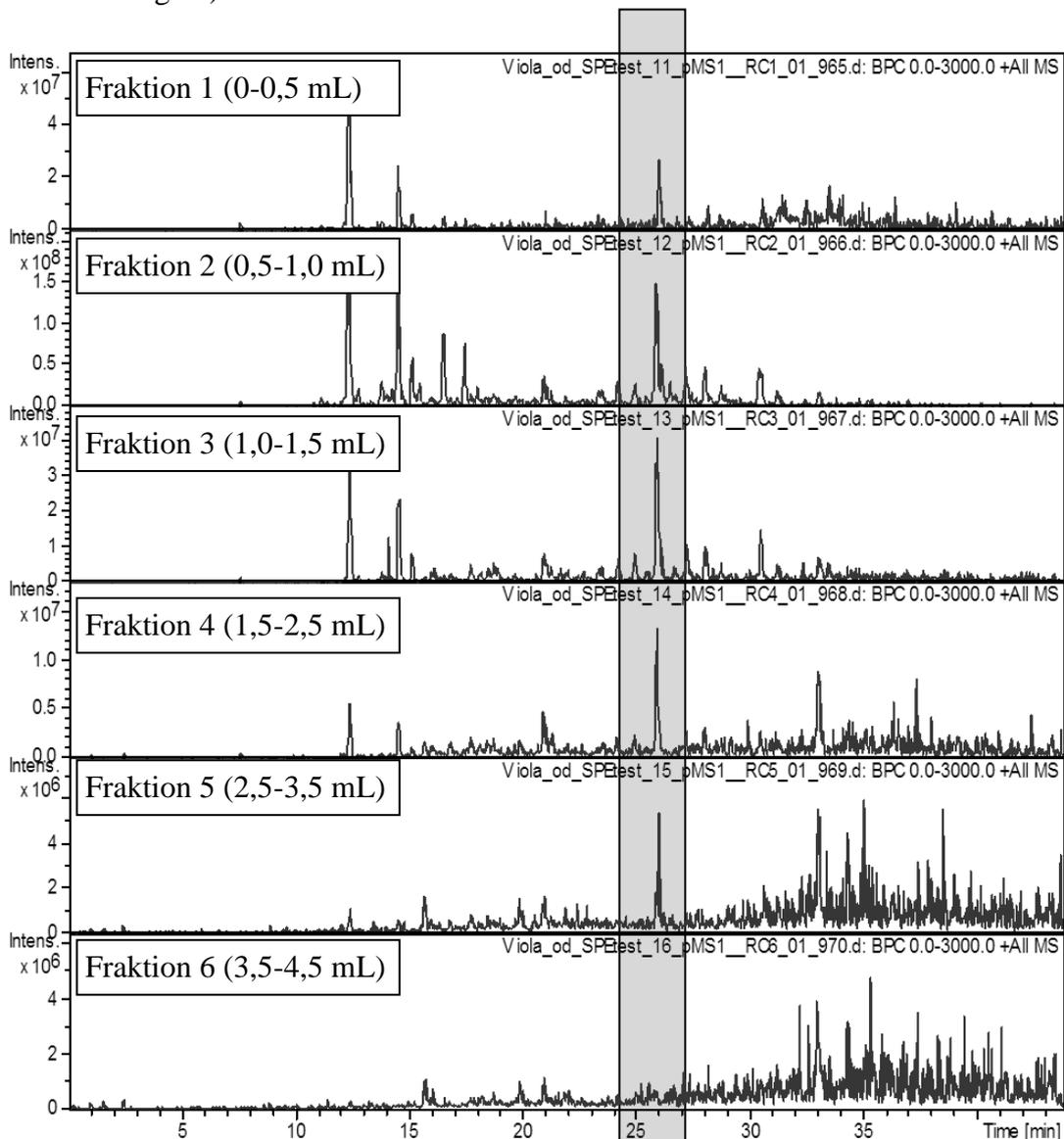


Abbildung 10: „Base peak chromatograms“ der SPE-Fraktionen 1 – 6 von *Viola odorata* L. mit speziellem Augenmerk auf die Intensitätsveränderung des Signals mit der Retentionszeit 25,8 min (grau unterlegt)

Weiters wurde untersucht, ob eine höhere Beladung der Säulen Auswirkungen auf die Trennleistung und –scharfe hat. Deshalb wurde genau derselbe Versuch noch einmal durchgeführt, allerdings wurde die doppelte Menge an Probe, also 266 µL (entsprechend 40 mg Extrakt) aufgetragen (siehe Abbildung 11).

Alle Fraktionen wurden im Evaporator zur Trockene gebracht. Aufgrund der geringen Mengen wurde ohne zu wägen jeder Extrakt in 200 µL Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) gelöst und der Überstand nach zehnmütigem Zentrifugieren mittels LC/MS analysiert.

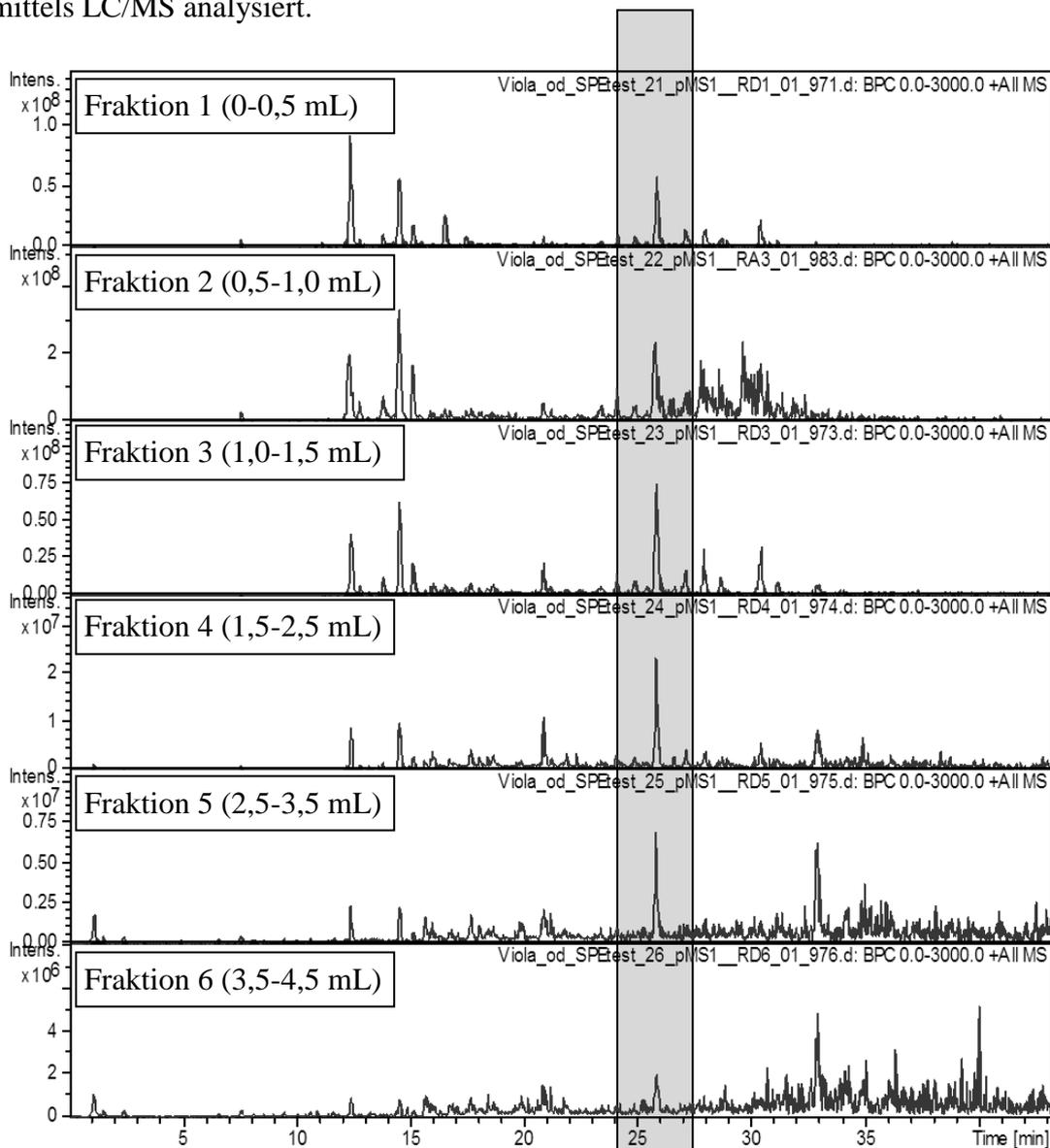


Abbildung 11: „Base peak chromatograms“ der SPE-Fractionen 1 – 6 von *Viola odorata* L. mit der doppelten Auftragemenge auf die SPE-Kartusche mit speziellem Augenmerk auf die Intensitätsveränderung des Signals mit der Retentionszeit 25,8 min (grau unterlegt).

Es wurde deutlich sichtbar, dass trotz hoher Beladung der Säule (normalerweise wird die Probenmenge so gewählt, dass sie etwa 5% des Gewichtes an SPE-Material entspricht) der größte Teil an Cyclotiden bereits in den ersten 3 mL Eluat zu finden war. Dies wurde vor allem durch die Intensitätsabnahme im Verlauf des Eluierens deutlich (siehe auch Abbildung 12).

Es sind bei den folgenden SPE-Verfahren auch im kleinen Maßstab also nicht mehr als je zwei Reservoirvolumina notwendig, um selbst relativ große und zum Teil hydrophobe Peptide zu eluieren.

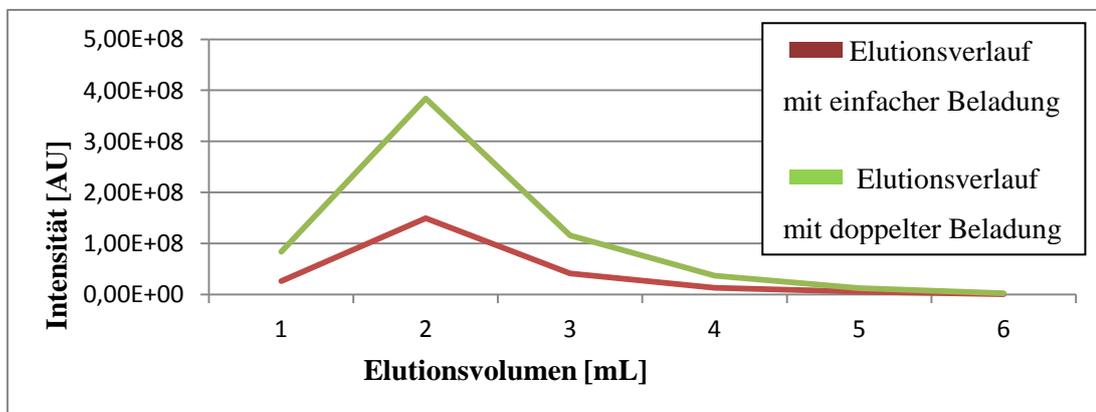


Abbildung 12: Intensitätsänderung des Signals bei 25,8 min (siehe Abbildung 10 und 11) nach Elution mit Acetonitril/1% Ameisensäure (70%) mit einfacher beziehungsweise doppelter Beladungsmenge

Weiters wurde in dieser Arbeit versucht, auf eine einfachere und vor allem kostengünstigere Art als mit der LC/MS, nämlich mittels DC, eine „Schnellerkennung“ von Peptiden in Pflanzen zu ermöglichen. Damit haben sich bereits einige Forschungsgruppen auseinandergesetzt - sie haben allerdings Reinstoffe für ihre Versuche verwendet [Xu et al., 2008]. In dieser Arbeit wurde überprüft, ob diese Methode auch zur selektiven Detektion von Peptiden in einer komplex zusammengesetzten Pflanzenmatrix angewendet werden kann. Da es gelungen war das Vorhandensein von Cyclotiden in den oberirdischen Teilen von *Viola odorata* L. reproduzierbar nachzuweisen, wurden die potentiell „Cyclotid-positiven“ Extrakte für die nachfolgenden Dünnschichtchromatogramme verwendet.

Als Negativprobe wurde der in Kapitel 2.2.2 (Seite 19) beschriebene und mittels LC/MS analysierte Extrakt von *Herba Urticae dioicae* analysiert. Das grundsätzliche Arbeitsschema dazu ist in Kapitel 2.2.6 (Seite 32 - 33) beschrieben.

Auf vier je 5x10 cm große DC-Platten (Kieselgel 60F254) wurden jeweils drei Proben aufgetragen:

Bahn 1: 6 µL des Flüssigextraktes von *Folium Urticae dioicae* nach der Extraktion mit 50% Vol. Methanol unter Rückfluss im Wasserbad und anschließender Filtration und Zentrifugation (siehe Kapitel 2.2.2, Seite 19).

Bahn 2: 6 µL des „Gesamtextraktes“ von *Herba Violae odoratae* nach Extraktion mit Acetonitril/2% Ameisensäure (50%) unter Rühren über Nacht, anschließender Filtration, Trocknung im Evaporator, Lösung von 60 mg in 400 µL 1%iger Ameisensäure und Zentrifugation, aber ohne Aufreinigung durch SPE (siehe Tabelle 7, Seite 42).

Bahn 3: 6 µL des eben genannten Extraktes von *Herba Violae odoratae* nach SPE (Elution mit Acetonitril/1% Ameisensäure (80%)).

Nach der Entwicklung wurden die Peptide auf einer Platte im HCl-Dampfraum bei 110°C für zwei Stunden hydrolysiert. Danach wurden diese und eine weitere Platte mit 0,2 %igem Ninhydrin-Reagens besprüht und nach dem Trocknen miteinander verglichen (siehe Abbildung 13).

Bei Betrachtung im Tageslicht zeigte sich, dass nach der Hydrolyse vor allem zwei Banden bei Bahn 2 und 3 in einem Gelbton erschienen, die ohne Hydrolyse nur äußerst schwach auftraten (siehe Abbildung 13) - ein potentieller Hinweis also auf Cyclotide.

Die zwei verbleibenden DC-Platten wurden mit einem anderen Sprühreagens behandelt, nämlich mit Coomassie Brilliant Blue R-250. Eine Platte wurde dabei mit einem mit konzentrierter Phosphorsäure angesäuerten Reagens besprüht und die zweite Platte mit einem mit konzentrierter Essigsäure versetzten Sprühreagens.

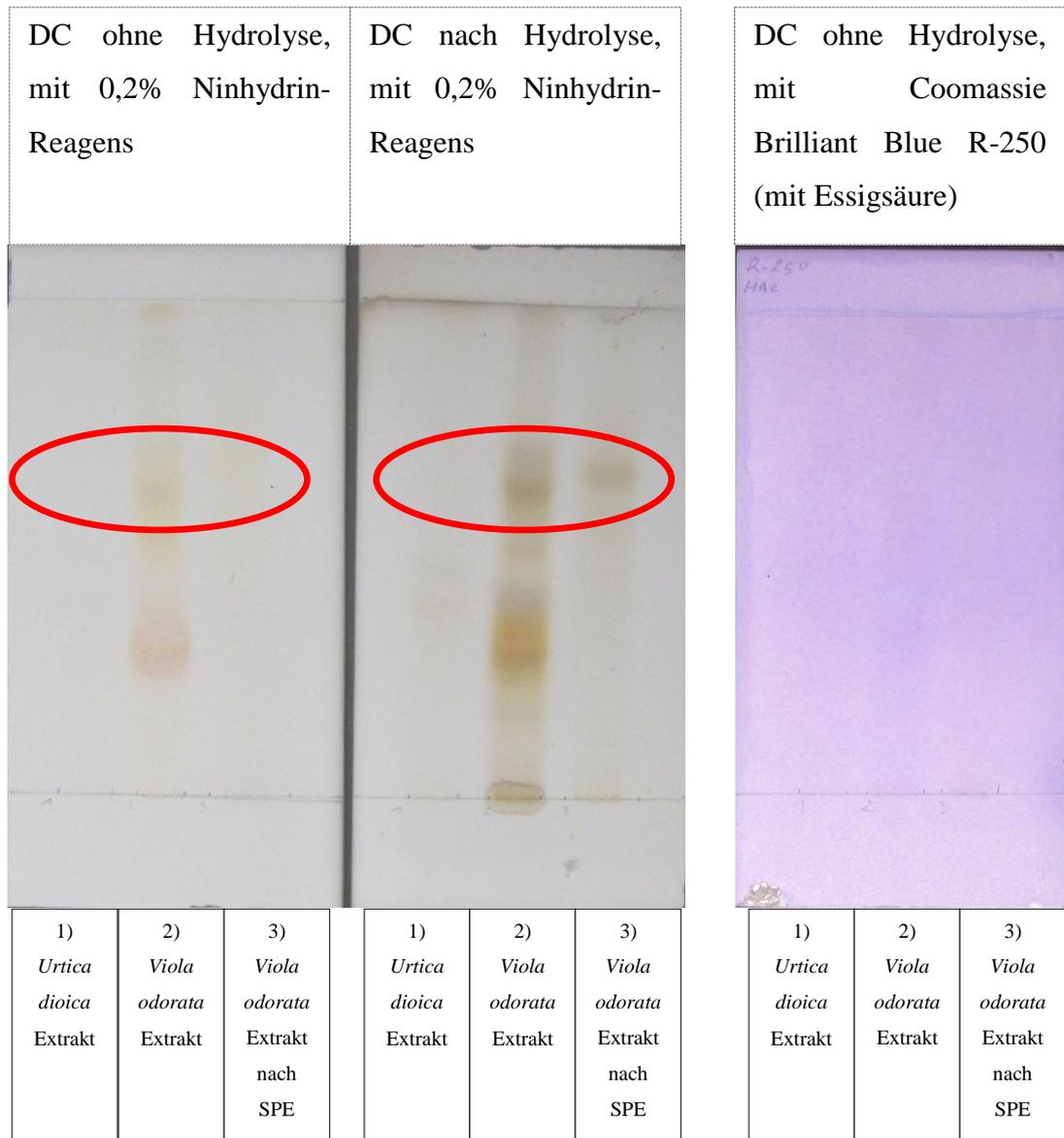


Abbildung 13: Dünnschichtchromatographische Überprüfung der Extrakte von *Urtica dioica* L. und *Viola odorata* L. auf das Vorhandensein von Cyclotiden nach Behandlung mit verschiedenen Sprühreagenzien

Es waren bei keiner der Platten repräsentative Banden bei Betrachtung bei Tageslicht sichtbar (siehe Abbildung 13). Die DC-Platte war weiters auch nicht rot gefärbt, wie in der Literatur beschrieben [Xu et al., 2008]. Deshalb wurde ein neuerlicher Versuch mit einer anderen Charge Coomassie Brilliant Blue durchgeführt, wieder unter denselben Bedingungen, aber anstatt der 80%-Fraktion von Herba *Viola odoratae* wurde die 30%-Fraktion nach der fraktionierten SPE (siehe Tabelle 8, Seite 44)

verwendet, da in dieser eine stärkere Anreicherung der Peptide vermutet wurde. Doch auch hier waren keine signifikanten Banden sichtbar.

Daher wurde eine weitere, idente DC angefertigt, wobei eine Lösung des Farbreagens Coomassie Brilliant Blue bei einer Probe direkt mitlaufen gelassen wurde. Somit sollte festgestellt werden können, ob die direkte Farbzugabe eine Reaktion und somit Detektion der Cyclotide ermöglicht, da ein Besprühen mit diesem Reagens die gesamte DC-Platte einheitlich und zu stark färbte. Auf die neue DC-Platte wurden folgende Proben aufgetragen:

Bahn 1: Extrakt von *Herba Violae odoratae* nach Aufreinigung mit SPE und Elution mit Acetonitril/1% Ameisensäure (80%) in einer Konzentration von 20 mg/mL wurde versetzt mit Coomassie Brilliant Blue R-250 Sprühreagens in einem Verhältnis von 10:1. Gesamtauftragemenge 5 µL.

Bahn 2: 5 µL des gleichen Extraktes wie bei Bahn 1 nur ohne Zugabe von Coomassie Brilliant Blue R-250.

Bahn 3: 5 µL vom „Gesamtextrakt“ von *Herba Violae odoratae* ohne SPE.

Nach dem Entwickeln der Platte in der DC-Kammer wurde Bahn 1 bei Tageslicht analysiert. Dabei konnte deutlich eine blaue Bande erkannt werden. Da nicht genau zugeordnet werden konnte, ob diese Farbgebung durch Cyclotide verursacht wurde, oder vom Reagens stammt, wurden Bahn 1 und Bahn 3 abgedeckt und Bahn 2 mit Coomassie Brilliant Blue R-250 Reagens (mit Essigsäure angesäuert) besprüht. Nach dem Trocknen der DC-Platte konnten wieder keine Banden detektiert werden. Die Färbung von Bahn 1 kam also wahrscheinlich vom zugesetzten Reagens selbst.

Zum Schluss wurde die gesamte Platte für zwei Stunden bei 110°C im Trockenschrank mit HCl-Dampf hydrolysiert. Danach wurden Bahn 1 und 2 abgedeckt und die Platte mit 0,2% ethanolischem Ninhydrin-Reagens besprüht. Nach Trocknen an der Luft wurde diese Bahn bei Tageslicht analysiert. Es konnte keine Veränderung der Banden verglichen mit der Färbung vor der Hydrolyse wahrgenommen werden.

Als weiterer Versuch wurde eine DC der einzelnen SPE-Fractionen von *Herba Violae odoratae* (siehe Tabelle 8, Seite 44) unter denselben Entwicklungsbedingungen mit einer entsprechend breiteren Platte durchgeführt. Es wurden acht Bahnen aufgetragen:

Bahn 1: 5 μL der 20%-Fraktion von *Viola odorata* L., die auch für die LC/MS-Analyse verwendet wurde. Konzentration: 6 mg/mL

Bahn 2: 5 μL der 30%-Fraktion von *Viola odorata* L., die auch für die LC/MS-Analyse verwendet wurde. Konzentration: 3 mg/mL

Bahn 3: 10 μL der 40%-Fraktion von *Viola odorata* L., die auch für die LC/MS-Analyse verwendet wurde. Konzentration: 1 mg/mL

Bahn 4: 10 μL der 50%-Fraktion von *Viola odorata* L., die auch für die LC/MS-Analyse verwendet wurde. Konzentration: 1 mg/mL

Bahn 5: 10 μL der 60%-Fraktion von *Viola odorata* L., die auch für die LC/MS-Analyse verwendet wurde. Konzentration: 1 mg/mL

Bahn 6: 10 μL der 70%-Fraktion von *Viola odorata* L., die auch für die LC/MS-Analyse verwendet wurde. Konzentration: 1 mg/mL

Bahn 7: 10 μL der 80%-Fraktion von *Viola odorata* L., die auch für die LC/MS-Analyse verwendet wurde. Konzentration: 1 mg/mL

Bahn 8: 5 μL vom „Gesamtextrakt“ von *Viola odorata* L. nach der Standard-Screening-Methode ohne weiterführende SPE. Konzentration: 150 mg/mL

Nach Entwickeln und Trocknen der Platte wurde sie für zwei Stunden bei 110°C im Trockenschrank im HCl-Dampfraum hydrolysiert und anschließend mit 0,2% ethanolischem Ninhydrin-Reagens besprüht. Dabei wurden deutliche Banden beim „Gesamtextrakt“ (Bahn 8) und in der 20%-Fraktion (Bahn 1) sichtbar und eine helle Bande bei der 30%-Fraktion (Bahn 2). Durch die LC/MS-Analyse war aber bereits klar gezeigt worden, dass die höchste Anreicherung der Peptide in der 40%-Fraktion zu finden war (siehe Kapitel 3.1.3, Seite 44). Deshalb müsste bei Bahn 3 also eine deutliche Bande sichtbar sein. Die Ergebnisse der beiden Methoden stimmen also nicht überein, was möglicherweise auf eine geringe Empfindlichkeit der Cyclotide gegenüber den verwendeten Sprühreagenzien schließen ließ.

Um auszuschließen, dass dieses Ergebnis lediglich konzentrationsabhängig war (Bahn 1 und 8 hatten beim Auftragen auf die Platte die größte Konzentration), wurden je 200 µL der übrigen Mengen von den eben verwendeten Proben im Evaporator getrocknet, die 20%-Fraktion und die 30%-Fraktion in jeweils 40 µL Methanol gelöst und die 40%-Fraktion und die 50%-Fraktion in je 20 µL Methanol.

Die verwendeten Proben wurden also aufkonzentriert, um damit eine neue DC anzufertigen. Die Platte wurde in zwei Hälften geteilt und folgende Bahnen aufgetragen:

Erste Hälfte:

Bahn 1: 20 µL der aufkonzentrierten 20%-Fraktion

Bahn 2: 20 µL der aufkonzentrierten 30%-Fraktion

Bahn 3: 10 µL der aufkonzentrierten 40%-Fraktion

Bahn 4: 10 µL der aufkonzentrierten 50%-Fraktion

Für die **zweite Hälfte** wurden dieselben Proben verwendet, allerdings wurden diese zuvor mit Coomassie Brilliant Blue R-250-Lösung (5 mg Substanz in 1 mL 96% Vol. Ethanol gelöst) in einem Verhältnis von 10:1 versetzt. Zusätzlich wurde zur Kontrolle außerdem eine fünfte Bahn mitlaufen gelassen.

Bahn 5: 2 µL Coomassie Brilliant Blue R-250-Lösung (5 mg Substanz in 1 mL 96% Vol. Ethanol gelöst)

Nach Entwickeln und Trocknen der DC-Platte wurde diese für zwei Stunden bei 110°C im Trockenschrank im HCl-Dampf hydrolysiert. Nach dem Abkühlen der Platte wurde die zweite Hälfte abgedeckt und die erste Hälfte mit 0,2% ethanolischem Ninhydrin-Reagens besprüht. Da nach dem Trocknen keine Farbänderung eintrat, wurde noch einmal besprüht, allerdings mit einer 1% ethanolischen Ninhydrin-Lösung. Danach wurde die Platte für etwa 15 min im Trockenschrank bei 100°C getrocknet.

Es zeigten sich zwar in etwa gleich intensive rötliche Banden bei den 30%, 40% und 50%-Fraktionen in der ersten Hälfte, die eventuell auf cyclische Peptide hinweisen könnten, aber laut der Analyse mit LC/MS sollte die Intensität in der 40%-Fraktion deutlich höher sein. Außerdem waren auf der gleichen Höhe in der zweiten Hälfte der DC-Platte Banden sichtbar, die blau gefärbt waren. Diese waren in der

40%-Fraktion am stärksten ausgeprägt. Allerdings war eben solch eine Bande auch bei Bahn 5, dem Kontroll-Lauf einer reinen Coomassie Brilliant Blue R-250-Lösung, auf derselben Höhe sichtbar (siehe Abbildung 14). Daraus schlussfolgerten wir, dass weder Besprühen mit Coomassie Brilliant Blue-Reagens, noch die Zugabe von diesem Farbstoff zur Probe vor dem Entwickeln eine Detektierbarkeit der Cyclotide in *Viola odorata* L. erlaubte.



Abbildung 14: Geteilte DC-Platte nach Hydrolyse und Färbung mit zwei verschiedenen Reagenzien

In einem letzten Versuch wurde wieder eine DC nach dem gleichen Schema durchgeführt, allerdings mit längerer Hydrolysezeit. Als Proben wurden folgende Bahnen aufgetragen:

Bahn 1: 5 µL der 20%-Fraktion von *Viola odorata* L., die auch für die LC/MS-Analyse verwendet wurde. Konzentration: 6 mg/mL

Bahn 2: 10 µL der 30%-Fraktion von *Viola odorata* L., die auch für die LC/MS-Analyse verwendet wurde. Konzentration: 3 mg/mL

Bahn 3: 5 µL vom „Gesamtextrakt“ von *Viola odorata* L. nach der Standard-Screening-Methode ohne weiterführende SPE. Konzentration: 150 mg/mL

Nach dem Entwickeln und Trocknen der Platte wurde diese für vier Stunden bei 110°C im Trockenschrank im HCl-Dampfraum hydrolysiert. Nach der Hydrolyse wurde am Rand der DC-Platte eine kleine Probe einer L-Valin-Lösung aufgetragen, um zu sehen, ob nach Besprühen mit 1% ethanolischem Ninhydrin-Reagens eine reine Aminosäure die in der Literatur [Xu et al., 2008] beschriebene Farbreaktion zeigt.

Auch hier zeigten sich keine signifikanten Banden, die jedoch der LC/MS-Analyse zufolge schwach bei Bahn 1 und intensiver in Bahn 3 erscheinen hätten sollen. Die Aminosäure-Probe hingegen war in einem blassen Rotton sichtbar. Eine doppelt so lange Hydrolyse änderte demzufolge also nichts am Ergebnis.

In einem weiteren Versuch wurde dasselbe Schema aber mit einer anderen stationären Phase erprobt. Es wurde eine Cellulose-Platte ohne Fluoreszenzindikator mit einer Schichtdicke von 0,1 mm verwendet. Im Zuge der Hydrolyse im HCl-Dampfraum verkohlte die Platte allerdings und wurde unbrauchbar.

Auch zwei weitere Methoden mit je einer HPTLC- RP8 F254s Kieselgel-Platte auf Glas, einmal mit der Laufmittelzusammensetzung Methanol/Wasser (2/1) und andererseits mit Chloroform/Methanol (1/1) als mobile Phase brachten keine Verbesserung der Ergebnisse.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass anhand der Versuche, die mit *Viola odorata* L. durchgeführt wurden, eine Methode zur raschen Extraktion, Aufreinigung mittels SPE und Detektion über LC/MS von Cyclotiden entwickelt werden konnte. Allerdings konnte keine DC-Methode gefunden werden, die eine geeignete Alternative zur LC/MS-Analyse darstellt, da die dünnschichtchromatographischen Versuche, weder wie in der Literatur beschrieben [Xu et al., 2008], noch verschiedene Abwandlungen davon, verwertbare Ergebnisse geliefert haben.

3.2 Screening auf Pflanzenpeptide

Ziel dieser Experimente war es, eine Methode zu entwickeln, mit der lineare und vor allem cyclische Peptidstrukturen in Pflanzen selektiv, rasch und mit geringen Ausgangsmengen qualitativ erfasst werden können. Diese Methode sollte also ein breites Screening auf diese Inhaltsstoffe erlauben. Weiters sollte eine erste Reihe von Proben, bestehend aus traditionellen Heilpflanzen, die vorrangig im europäischen und asiatischen Raum eingesetzt werden, mit dieser Methode untersucht werden, um eine grobe Abschätzung der Verbreitungshäufigkeit von Pflanzenpeptiden zu erhalten.

3.2.1 Methodenerstellung

Im Zuge der verschiedenen Vorversuche in Kapitel 3.1 (Seite 37 – 54), hatte sich eine Methode, mit der *Herba Violae odoratae* untersucht worden war, als besonders zielführend erwiesen. Dabei handelte es sich um jene Methode, bei der das zerkleinerte Drogenmaterial mit einer Mischung aus Acetonitril/2% Ameisensäure (50%) im Ultraschallbad extrahiert worden war (siehe Abbildung 9, Seite 42).

Nun wurde überprüft, ob mit dieser Methode neben Cyclotiden auch kleinere Cyclopeptide erfasst werden können. Daher wurde dieses Analyseverfahren auch an *Linum usitatissimum* L. angewandt, da die Anwesenheit von Cyclopeptiden in Samen Lini bereits durch andere Forschungsgruppen erfolgreich nachgewiesen werden konnte [Morita et al., 1999 / Picur et al., 2006]. Aus 2,0 g in der Reibschale zerkleinerten Totdroge wurden nach der oben genannten Extraktionsmethode 576 mg Trockenextrakt erhalten. Davon wurden 63 mg entnommen und in 693 µL Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) möglichst vollständig gelöst. Aufgrund des hohen Gehaltes an Schleimstoffen und Fetten war ein Abpipettieren einer klaren Flüssigkeit trotz langen Zentrifugierens nur sehr schwer möglich. Es wurde nur jene kleine Menge verwendet, die klar abpipettiert werden konnte - der restliche Extrakt wurde verworfen.

Die Festphasenextraktion verlief analog zur jener, mit der auch *Herba Violae odoratae* aufgereinigt worden war (siehe Kapitel 3.1.3, Seite 40 - 42). Die resultierenden 2,1 mg Trockenextrakt wurden in Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) gelöst, sodass eine Endkonzentration von 20 mg/mL resultierte. Danach wurde zentrifugiert und der Überstand wieder mittels LC/MS analysiert.

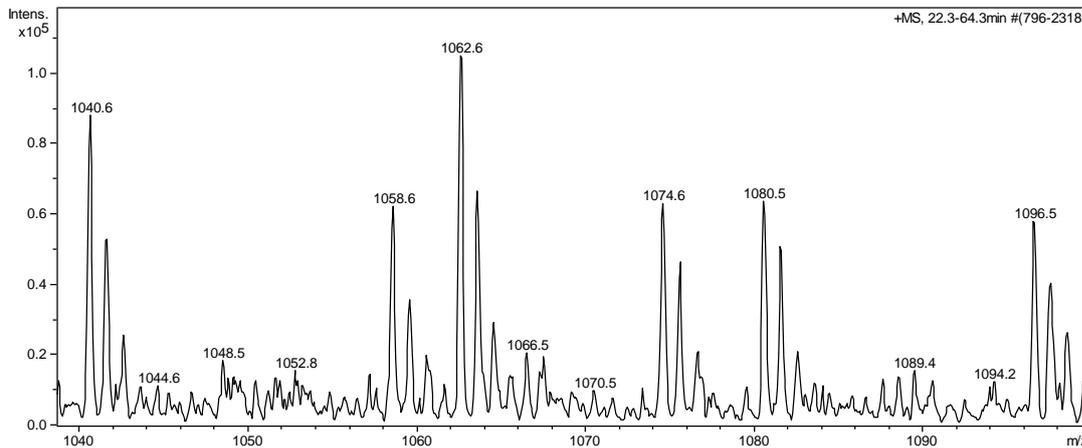


Abbildung 15: Ausschnitt eines mittels LC/MS erhaltenen Massenspektrums von *Linum usitatissimum* L., das die $[M + H]^+$ -Ionen der Cyclolinopeptide zeigt

In den LC/MS-Daten waren jene Signale klar sichtbar, die den in der Literatur beschriebenen Cyclolinopeptiden entsprechen [Morita et al., 1999] (siehe Abbildung 15). Aufgrund der ungeraden Anzahl von Stickstoffen in diesen Molekülen (siehe Abbildung 1, Seite 8), weisen die entsprechenden $[M + H]^+$ -Ionen geradzahlige m/z -Werte auf. Im Vergleich dazu werden die Cyclotide, wie im Massenspektrum der 40%-Fraktion von *Herba Violae odoratae* gezeigt (siehe Abbildung 16), als $[M + 3H]^{3+}$ -Ionen detektiert – sie sind also mehrfach geladen. Mehrfach geladene Ionen zeigen sich im Massenspektrum in Form von Peaks mit einem Isotopenabstand unter $\Delta m/z$ 1. Die Ladungszahl z ist aus der Höhe der Isotopenabstände, die $\Delta m/z = 1/z$ beträgt, ersichtlich (z.B. ein zweifach positiv geladenes Molekül hat einen Isotopenabstand von m/z 1/2; ein dreifach positiv geladenes Molekül hat einen Isotopenabstand von m/z 1/3 – wie auch in Abbildung 16 ersichtlich; ...).

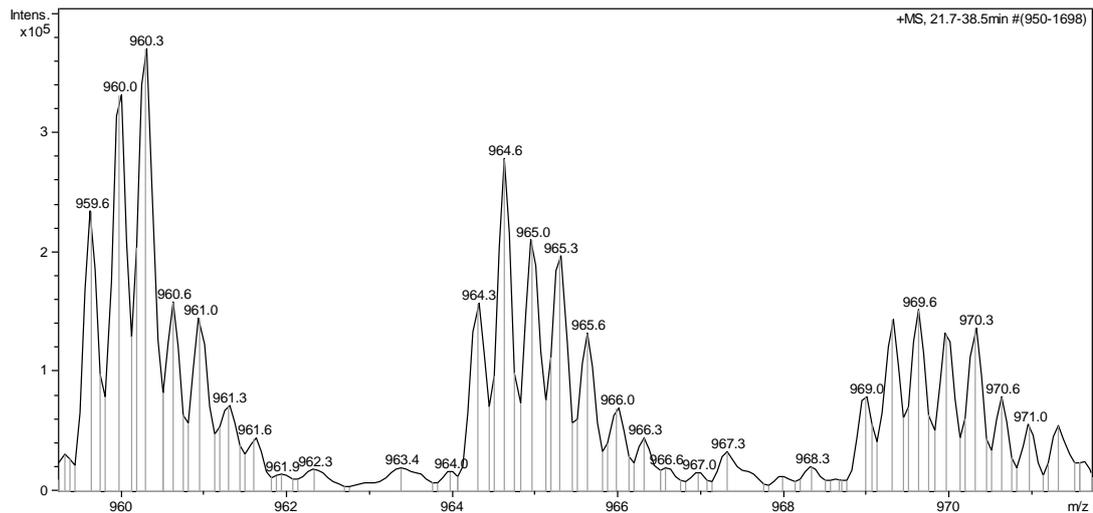


Abbildung 16: Ausschnitt eines mittels LC/MS erhaltenen Massenspektrums von *Viola odorata* L., das drei $[M + 3H]^{3+}$ -Ionen von drei Cycloviolacinen zeigt

Da diese Methode also nachweislich sowohl zur Detektion von Cyclotiden, als auch von Cyclopeptiden geeignet war, wurde sie für das Screening von weiteren Pflanzen herangezogen.

Um den Substanzverbrauch weiter zu mindern, sowie eine größere Zahl an Proben parallel bearbeiten zu können, wurde mit einer 96-well-plate-SPE-Apparatur (Supelco Discovery® DSC-18, Füllmenge an stationärer Phase 100 mg, Säulenvolumen 2 mL) gearbeitet (siehe Kapitel 2.2.3.2, Seite 20 – 22), denn dass ein Herunterskalieren der Methode adäquat möglich war, wurde bereits durch einen Vorversuch mit *Herba Violae odoratae* gezeigt (siehe Kapitel 3.1.3, Seite 44 – 47).

3.2.2 Positivkriterien

Die Schwierigkeit bei der Interpretation der Massenspektren liegt darin, jene Massenpeaks zu identifizieren, die von Peptiden stammen. Peptide und Cyclopeptide mit mindestens fünf bis sechs Aminosäuren zeichnen sich durch hohe Massen (≥ 500 Da) und oft eine ungerade Anzahl von Stickstoff-Atomen aus, die bei anderen Naturstoffen eher selten zu finden sind (siehe Abbildung 15). Dieses Kriterium allein ist aber zu unselektiv, um auf das Vorhandensein von Peptiden schließen zu können. Es diente daher primär zur Auswahl jener Proben und Peaks, die in einem zweiten Schritt mittels gezielter LC/MS-Analysen weiter untersucht wurden. Nur wenn in den derart gewonnenen MS^n -Spektren klare Hinweise auf Peptidstrukturen, also Fragmentationen, die sich durch Aminosäurenabspaltung erklären lassen, gegeben war, wurde diese Pflanze für weiterführende Untersuchungen in Betracht gezogen.

Cyclotide und andere höher molekulare Peptide (ab etwa zehn bis zwanzig Aminosäuren) können aufgrund ihrer größeren Masse und Zahl an protonierbaren funktionellen Gruppen mehr als ein Proton stabil binden. Sie werden also bevorzugt als mehrfach geladene $[M + nH]^{n+}$ -Ionen detektiert (siehe Abbildung 16) – eine Eigenschaft, die kaum bei anderen Sekundärmetaboliten in Pflanzen auftritt und daher deutlich selektiver ist als das erste Kriterium.

Im Zuge des Screenings dieser Arbeit wurden deshalb als Positivkriterien folgende Parameter festgelegt:

- 1) Protonierte Ionen mit geradzahligem Massen ≥ 500 Da: Diese resultieren aus den Molekülen mit einer ungeraden Anzahl an Stickstoffen (siehe Abbildung 15).
- 2) Mehrfachladungen: Diese sind anhand eines Isotopenabstandes kleiner 1 erkennbar (siehe Abbildung 16).

Nur wenn beide dieser Kriterien erfüllt wurden, erfolgte die Einstufung der Pflanze als eindeutiger „Hit“. Im Falle eines Treffers waren weiterführende Analysen erforderlich, um das als vorläufig zu betrachtende Ergebnis „Peptid-positiv“ zu verifizieren.

3.2.3 Ergebnisse

Tabelle 9 zeigt die getesteten Pflanzen und welche der beiden oben genannten Kriterien sie erfüllt haben. Dabei bedeutet „✓“, das eindeutige Vorhandensein von Peaks mit dieser Eigenschaft und „-“, die Abwesenheit von solchen.

Tabelle 9: Arzneipflanzen, die mittels der Screening-Methode untersucht wurden; Wenn beide Kriterien (gerade Masse ≥ 500 Da und Mehrfachladung) eindeutig erfüllt wurden („✓“), wurde die betreffende Pflanze als „Hit“ eingestuft.

<u>Stammpflanze</u>	<u>Pflanzenteil</u>	<u>gerade Masse</u> <u>≥ 500Da</u>	<u>Mehrfachladung</u>
<i>Acorus calamus</i> L.	radix	-	-
<i>Agrimonia</i> sp.	herba	-	-
<i>Angelica archangelica</i> L.	radix	✓	-
<i>Angelica sylvestris</i> L.	radix	✓	-
<i>Bellis perennis</i> L.	Ffos	-	-
<i>Berberis vulgaris</i> L.	fructus	-	-
<i>Beta vulgaris</i> L.	radix	✓	✓
<i>Calluna vulgaris</i> L.	herba	-	-
<i>Capsella bursa-pastoris</i> L.	herba	-	-
<i>Cetraria islandica</i> L.	lichen	-	-
<i>Curcuma longa</i> L.	radix	✓	✓
<i>Dianthus chinensis</i> L.	herba	✓	✓
<i>Dianthus chinensis</i> L.	radix	✓	✓
<i>Dianthus chinensis</i> L.	stipites	✓	✓
<i>Elaeagnus rhamnoides</i> L.	fructus	-	-

RESULTATE UND DISKUSSION

<i>Elymus repens</i> L.	rhizom	-	-
<i>Epilobium parviflorum</i> Schreb.	herba	-	-
<i>Equisetum arvense</i> L.	herba	-	-
<i>Euphrasia</i> sp.	herba	-	-
<i>Filipendula ulmaria</i> L.	herba	-	-
<i>Geum urbanum</i> L.	herba	-	-
<i>Geum urbanum</i> L.	radix	-	-
<i>Glechoma hederacea</i> L.	herba	✓	-
<i>Hamamelis virginiana</i> L.	cortex	-	-
<i>Leonurus sibiricus</i> L.	herba	-	-
<i>Levisticum officinale</i> W.D.J. Koch	radix	✓	-
<i>Lycopodium</i> sp.	herba	-	-
<i>Malva</i> sp.	folium	✓	-
<i>Melissa officinalis</i> L.	folium	✓	-
<i>Origanum majorana</i> L.	herba	-	-
<i>Petroselinum crispum</i> Mill.	fructus	-	-
<i>Peucedanum ostruthium</i> W. Koch	radix	-	-
<i>Plantago lanceolata</i> L.	folium	-	-
<i>Potentilla anserina</i> L.	herba	✓	-
<i>Primula veris</i> L.	radix	-	-
<i>Ribes nigrum</i> L.	fructus	-	-
<i>Rosa canina</i> L.	fructus	-	-
<i>Salvia officinalis</i> L.	herba	-	-

<i>Sambucus nigra</i> L.	fructus	✓	✓
<i>Sorbus aucuparia</i> L.	fructus	-	-
<i>Stachys officinalis</i> L.	herba	✓	-
<i>Symphytum officinale</i> L.	radix	✓	-
<i>Tilia</i> sp.	herba	✓	-
<i>Tussilago farfara</i> L.	folium	-	-
<i>Vaccinium myrtillus</i> L.	fructus	-	-
<i>Verbascum</i> sp.	flos	✓	-
<i>Verbena officinalis</i> L.	herba	✓	-
<i>Veronica</i> sp.	herba	-	-
<i>Zingiber officinale</i> Roscoe	radix	✓	-

Aus diesen 46 verschiedenen getesteten Pflanzen wurden *Beta vulgaris* L., *Curcuma longa* L., *Dianthus chinensis* L. und *Sambucus nigra* L. als positiv bewertet.

Bei Radix Betae vulgaris konnte nur ein repräsentatives $[M + 3H]^{3+}$ -Ion mit einem m/z-Wert von 960,9 (entsprechend einer Masse von 2879,7 Da) detektiert werden, wobei die Intensität gering war. Außerdem waren Blätter dieser Pflanze bereits auf Peptide hin untersucht worden, wobei ein Peptid mit der Masse 3185 Da nachgewiesen werden konnte [Nielsen et al., 1997]. Im Fall der unterirdischen Organe handelt es sich also wahrscheinlich um ein verwandtes Peptid. Daher wurde *Beta vulgaris* L. im Zuge dieser Arbeit nicht mehr weiter untersucht.

Im Extrakt von *Curcuma longa* L. waren mehrere Peaks von $[M + H]^+$ -Ionen und $[M + 2H]^{2+}$ -Ionen in einem m/z-Bereich von 600 bis 1400 in hoher Intensität sichtbar. Weitergehende LC/MS-Experimente deuteten darauf hin, dass es sich bei diesen Verbindungen um lineare Peptide handelt.

Bei *Dianthus chinensis* L. konnten ebenfalls einige Peaks von $[M + H]^+$ und $[M + 2H]^{2+}$ -Ionen detektiert werden, die auf Peptide hindeuten. Dies ist nicht sonderlich erstaunlich, da schon Cyclopeptide aus anderen *Dianthus*-Arten bekannt

sind [Wang et al., 1998]. Da sich *Dianthus chinensis* L. in vorangegangenen Untersuchungen als leberwirksam gezeigt hatte [Obmann et al., 2010], wurden im Zuge dieser Arbeit einige weitere Versuche mit *Dianthus chinensis* L. durchgeführt (siehe Kapitel 3.3, Seite 63 - 65).

Auch die Analyse von *Sambucus nigra* L. zeigte deutlich eine Vielzahl von Peaks mit $[M + 3H]^{3+}$ -Ionen in sehr hoher Intensität. Im Vergleich zu *Dianthus chinensis* L. sind bei dieser einheimischen Pflanze noch keine Peptide beschrieben worden, weshalb *Sambucus nigra* L. in dieser Arbeit ebenfalls noch weiter untersucht wurde (siehe Kapitel 3.4, Seite 66 - 84).

3.3 Fraktionierte SPE von *Dianthus chinensis* L.

Dianthus chinensis L. (Synonym: *Dianthus versicolor* Fisch. ex Link¹) ist eine Pflanze, die unter anderem in der Mongolei beheimatet ist, von wo sie auch für diese Arbeit aus Wildsammlungen bezogen wurde. Da die Analyse der verschiedenen Pflanzenteile von *Dianthus chinensis* L. im Zuge des Screenings jeweils einen „Hit“ ergeben hat (siehe Tabelle 9), wurde diese Droge noch weiter untersucht, um Fraktionen zu erhalten, in denen diese fraglichen Komponenten möglichst angereichert vorkommen. Das ist die Voraussetzung für weitere Versuche, wie etwa die enzymatische Spaltung zur Charakterisierung der Peptide.

Da es sich beim analysierten Material um getrocknete Pflanzen aus einer Wildsammlung handelte, bei der Verwechslungen und Verfälschungen auftreten könnten, wurde auch noch der unterirdische Anteil aus einer zweiten Sammlung (2004), ebenfalls aus der Mongolei stammend, mit der Screening-Methode untersucht. Auch hier wurden wieder beide Kriterien für einen „Hit“ erfüllt. Daher wurde mit der Menge an Trockenextrakt, die nach der Extraktion mit Acetonitril/2% Ameisensäure (50%), Filtration und Trocknung im Evaporator vom Screening noch verblieben war (siehe Kapitel 2.2.3.1, Seite 20), eine feinmaschigere SPE-Fraktionierung durchgeführt. Dazu wurde versucht die 102,5 mg Trockenextrakt in 308 µL 1%iger Ameisensäure vollständig zu lösen, was anfangs auch erfolgreich schien. Während des fünfminütigen Zentrifugationsschrittes setzten sich jedoch große Mengen an ungelöstem Material ab. Daher wurde die Probe weiter verdünnt auf insgesamt 1025 µL Acetonitril/1% Ameisensäure (10%). Es resultierte also eine Endkonzentration von ca. 100 mg/mL. Nach fünfminütigem Zentrifugieren war zwar wieder ein deutlicher Niederschlag sichtbar, die Probe wurde nun allerdings nicht noch weiter verdünnt, sondern der Überstand abpipettiert und für die SPE verwendet.

Zur Festphasenextraktion wurden Varian® Mega Bond Elut C18 – Extraktionssäulen Füllmenge an stationärer Phase 2g, Säulenvolumen 12 mL, verwendet. Die Aufreinigungsschritte erfolgten nach folgendem Schema:

- 1) Waschen mit 3 Reservoirvolumina Methanol
- 2) Equilibrieren mit 3 Reservoirvolumina 1%iger Ameisensäure

¹ laut Angabe von <http://www.theplantlist.org>

3) Probe auftragen

→ die Eluate, die bis zu diesem Punkt aufgefangen wurden, wurden verworfen.

Erst die nachfolgenden Fraktionen wurden gesammelt.

4) Eluieren mit 3 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure (10%)

5) Eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure (20%)

6) Eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure (30%)

7) Eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure (40%)

8) Eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure (50%)

9) Eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure (60%)

10) Eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure (70%)

11) Eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure (80%)

12) Eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure (90%)

13) Eluieren mit 2 Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure (100%)

Die 10% und 20%-Fraktion wurden mittels Lyophilisator (Zirbus Technology, VaCo 5-11) gefriergetrocknet, die restlichen Fraktionen wurden im Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht. Anschließend wurden die Trockenextrakte, mit Ausnahme der 10%-Fraktion, in je 1 mL Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) vollständig gelöst. Die resultierenden Extrakte und Verdünnungsschritte sind in Tabelle 10 ersichtlich.

Tabelle 10: Auswaagen der SPE-Fraktionen (10-100% Acetonitril) von *Dianthus chinensis* L. und die entsprechende Zugabe von Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) für die LC/MS-Analyse

Fraktion [%Acetonitril]	Ausbeute [mg]	Lösungsmittel [μ L]
10	*59,40	500
20	2,08	1000
30	3,61	1000
40	7,17	1000
50	2,01	1000
60	0,75	1000
70	1,02	1000
80	0,68	1000
90	0,78	1000
100	1,60	1000

* Aliquot von 5,30 mg wurde verwendet

Die Proben wurden für 10 min bei 14.000 U/min zentrifugiert und der Überstand anschließend mittels LC/MS analysiert.

Die LC/MS-Daten zeigten zwar Hinweise auf die bereits im Screening detektierten Peptide (siehe Tabelle 9, Seite 59 – 61), diese Peaks waren aber in ihrer Intensität nur schwach ausgeprägt und auch das Fraktionierungsschema schien nicht optimal zu sein. Es wären also noch zahlreiche weitere Versuche nötig gewesen, um ein optimiertes Anreicherungsschema und im Anschluss auch ausreichend aufgereinigtes Material für die Strukturaufklärung zu erlangen. Dem gegenüber stand allerdings die begrenzte Menge an Drogenmaterial, da dieses – wie schon erwähnt – nur aus Wildsammlungen der Mongolei stammt und nicht etwa von einem österreichischen Großhändler jederzeit bezogen werden kann.

Weiters gibt es bereits Arbeiten, in denen eine andere Art der Gattung *Dianthus*, nämlich *Dianthus superbis* L., erfolgreich auf Cyclopeptide hin untersucht wurde [Wang et al., 1998].

Aus diesen Gründen wurden hier keine weiteren Versuche mit *Dianthus chinensis* L. unternommen, sondern das Augenmerk auf eine andere Pflanze gerichtet, in dem nach dem Screening Peptide vermutet wurden.

3.4 *Sambucus nigra* L.

Da der Extrakt von Fructus Sambuci nigrae beim Screening ebenfalls einen klaren "Hit" ergeben hat (siehe Tabelle 9, Seite 59 – 61), wurde er in dieser Arbeit noch weiter analysiert. Wir entschieden uns für fortführende Analysen, da der Holunder sowohl eine wichtige Heilpflanze darstellt, als auch eine in der Ernährung vielfach verwendete europäische und daher leicht zugängliche Pflanze ist, von der in der Literatur trotz vieler vorangegangener Untersuchungen keine Peptide bekannt sind. Ziel der folgenden Experimente war es, durch eine möglichst gut auf das Inhaltsstoffmuster dieser Pflanze abgestimmte Aufreinigung, die möglicherweise enthaltenen Peptide zu selektieren und anzureichern, um ausreichend Ausgangsmaterial für die Strukturaufklärung und pharmakologische Testung zu erhalten.

3.4.1 Methodenoptimierung

Folgende Kontrollversuche wurden vorab noch zur Absicherung durchgeführt:

- 1) Mehrfachextraktion einer Probe mit Lösungsmitteln sinkender Polarität zur Erprobung des geeigneten Extraktionsverfahrens
- 2) Analyse einer neuen Charge, um sicher zu gehen, dass es sich nicht um Abbauprodukte gehandelt hatte und die Ergebnisse chargenunabhängig sind
- 3) Aufarbeitung ohne Zugabe von Säure, um auszuschließen, dass sich Artefakte nach einer Hydrolyse gebildet hatten

Ad 1) Mehrfachextraktion:

2,0 g Droge (Fructus Sambuci nigrae toto FaL, Nr. A726066-001, bezogen von Mag. Kottas, Mindesthaltbarkeitsdatum 01/2010) wurden in der Reibschale möglichst fein zerkleinert und mit 20 mL destilliertem Wasser versetzt für 30 min im Ultraschallbad extrahiert. Danach wurde durch einen Faltenfilter filtriert. Der erhaltene Extrakt wurde im weiteren Verlauf als „Wasserrohextrakt“ bezeichnet.

Der Filtrerrückstand wurde abgekratzt und mit 20 mL Acetonitril/2% Ameisensäure (50%) noch einmal wie oben extrahiert und anschließend filtriert. Da dieses Mischungsverhältnis jenes darstellt, das auch in der Screening-Methode verwendet wurde, wurde es als „Screeningrohextrakt“ bezeichnet.

Anschließend wurde der Filterkuchen ein weiteres Mal abgekratzt und mit 20 mL reinem Acetonitril extrahiert. Nach dem Filtrieren erhielt man den „Acetonitrilrohextrakt“.

Der Wasserrohextrakt wurde in einer Lyophilisationsanlage gefriergetrocknet, die beiden anderen Extrakte mit einem Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht.

Von den getrockneten Rohextrakten wurde jeweils ein Aliquot entnommen und in Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) gelöst (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Auswaagen von Wasser-, Screening- und Acetonitrilrohextrakt nach Mehrfachextraktion von 2,0 g Droge, sowie Zugabe von Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) für die nachfolgende SPE

Extrakt	Trockengewicht [mg]	Aliquot für SPE [mg]	Zusatz Lösungsmittel [µL]
Wasserrohextrakt	546,0	56,6	566
Screeningrohextrakt	167,5	36,9	369
Acetonitrilrohextrakt	51,2	51,2	*1688

* Aufgrund der unzureichenden Löslichkeit dieses Rohextraktes, musste die Menge an zugesetztem Lösungsmittel gegenüber den anderen beiden Rohextrakten entsprechend erhöht werden.

Nach kurzem Zentrifugieren der Extrakte diente der Überstand jeweils als Probe für eine SPE. Dazu wurden LiChrolut® RP18 - Extraktionssäulen, Füllmenge an stationärer Phase 500 mg, Säulenvolumen 3 mL, verwendet. Die einzelnen Schritte verliefen nach jenem Schema der Screening-Methode (siehe Kapitel 2.2.3.2, Seite 22).

Die erhaltenen Extrakte der SPE (Wasser-, Screening- und Acetonitrilextrakt) wurden im Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht, für die Analyse mittels LC/MS in Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) auf eine Konzentration von 10 beziehungsweise 5 mg/mL vollständig gelöst und zentrifugiert. Die Auswaagen und Lösungsmittelzusätze sind in Tabelle 12 ersichtlich.

Tabelle 12: Verwendete Aliquote und Auswaagen der mittels SPE aufgereinigten Wasser-, Screening- und Acetonitrilextrakte, sowie Zugabe von Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) für die nachfolgende LC/MS-Analyse

Extrakt	Aliquot für SPE [µL]	Trockengewicht nach SPE [mg]	Zusatz Lösungsmittel [µL]	End- konzentration [mg/mL]
Wasser- extrakt	500	3,88	388	10
Screening- extrakt	300	2,25	225	10
Acetonitril- extrakt	1500	1,81	362	5

Die LC/MS-Daten zeigten im „Wasserextrakt“ zwar Peaks potentieller Peptide, diese waren in ihrer Intensität aber im „Screeningextrakt“ weitaus stärker ausgeprägt. Hier war die größte Konzentration zu finden. Im „Acetonitrilextrakt“ hingegen waren die entsprechenden Peaks von sehr geringer Intensität (siehe Abbildung 17).

Es zeigte sich also, dass die Screening-Methode auch in diesem Fall eine günstige Extraktionsmethode im Hinblick auf das Mischungsverhältnis der Lösungsmittel darstellte. Darum wurde es auch für die weiteren Versuche beibehalten.

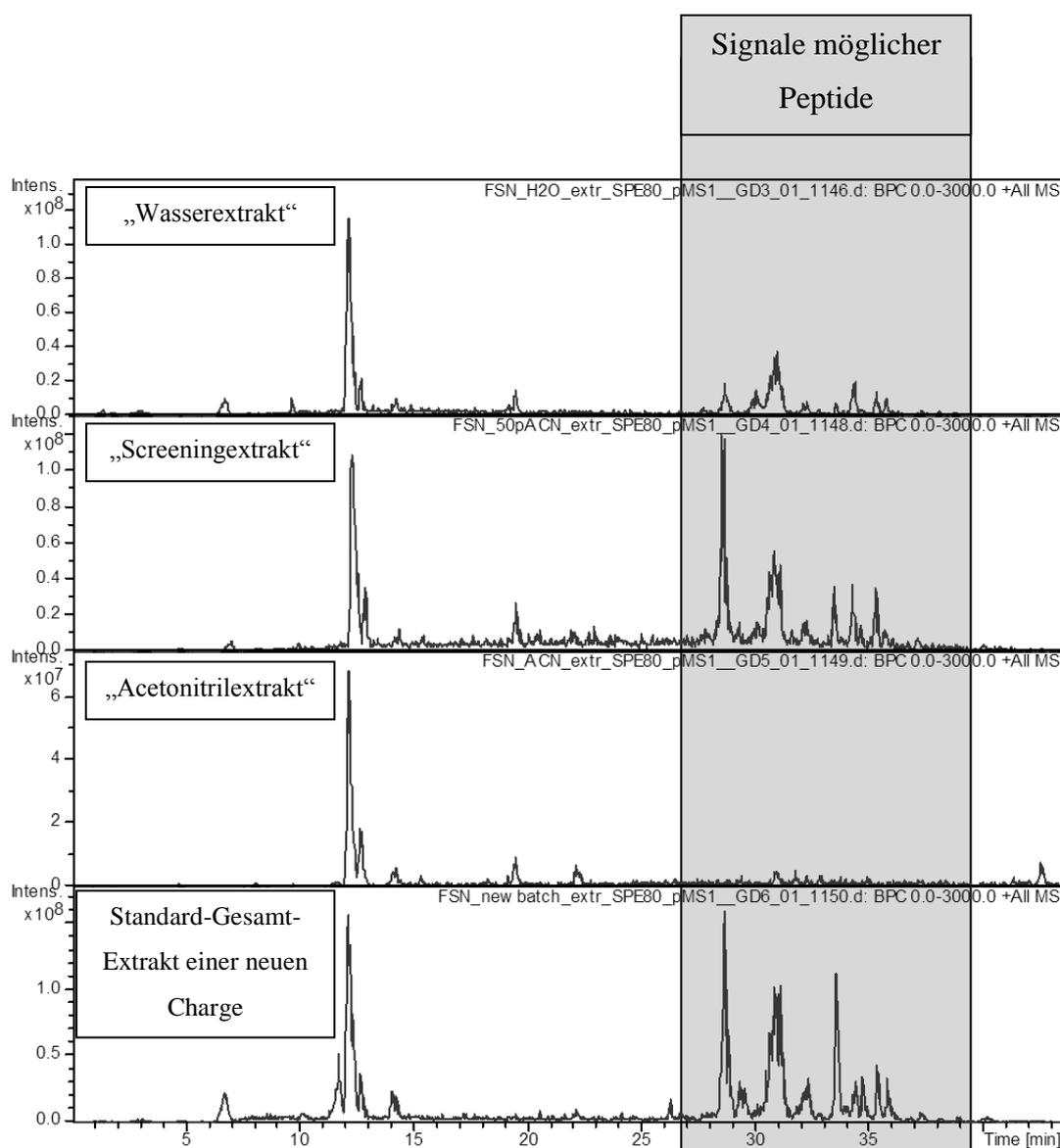


Abbildung 17: „Base peak chromatograms“ der nach Mehrfachextraktion und anschließender SPE-Reinigung von Fructus Sambuci nigrae erhaltenen Extrakte: „Wasserextrakt“ / „Screeningextrakt“ / „Acetonitrilextrakt“ / Extrakt nach der Standard-Screening-Methode der neuen Charge

Ad 2) Analyse einer zweiten Charge

2,0 g Fructus Sambuci nigrae einer neuen Charge mit der Nr. W10201493, bezogen von Mag. Kottas, Mindesthaltbarkeitsdatum 11/2013, wurden wie üblich nach der Screening-Methode aufgearbeitet. Auch hier wurden wieder dieselben SPE-Kartuschen verwendet wie beim vorhergehenden Punkt „Mehrfachextraktion“.

Die LC/MS-Daten zeigten ein „base peak chromatogramm“, das weitgehend als ident mit dem Screeningextrakt der zuvor verwendeten Charge bezeichnet werden kann (siehe Abbildung 17).

Ad 3) Säurefreie Extraktion:

Um sicher zu gehen, dass die gefundenen Verbindungen keine durch die zugesetzte Ameisensäure gebildeten Abbauprodukte größerer Moleküle sind, wurde nun eine Screening-Extraktionsmethode inklusive SPE durchgeführt, bei der sämtliche Schritte ohne Zusatz von Säure erfolgten.

Als Probe für die SPE wurde jener „Wasserrohextrakt“ verwendet, der von der „Mehrfachextraktion“ vorhin stammte (siehe Tabelle 11, Seite 67). Ein Aliquot von 26,1 mg wurde davon entnommen, in 261 µL destilliertem Wasser gelöst und anschließend kurz zentrifugiert. Der Überstand wurde für die SPE genutzt. Es wurden LiChrolut® RP18 - Extraktionskartuschen, Füllmenge an stationärer Phase 200 mg, Säulenvolumen 3 mL, verwendet. Die einzelnen Schritte erfolgten nach folgendem Schema:

- 1) Waschen mit 3 Reservoirvolumina Methanol
- 2) Equilibrieren mit 3 Reservoirvolumina destilliertem Wasser
- 3) Überstand von 200 µL der Probe gelöst in destilliertem Wasser auftragen
- 4) Waschen mit 3 Reservoirvolumina 10%igem Acetonitril
- 5) Eluieren mit 3 Reservoirvolumina 80%igem Acetonitril

Die 80%-Fraktion wurde gesammelt und im Evaporator getrocknet. Da der Trocknungsrückstand nur minimal war, wurde ohne die genaue Endkonzentration zu ermitteln in 100 µL 10%igem Acetonitril gelöst und nach Zentrifugation mittels LC/MS analysiert.

Auch diese Chromatogramme zeigten potentielle Peptidpeaks. Diese waren nahezu ident mit denen, die durch die Standard-Screening-Methode mit Säure-Zugabe resultierten. Jedoch waren sie hier in weitaus geringerer Konzentration enthalten. Es gab also keinen Hinweis, dass die Zugabe von Säure eine Artefaktbildung induziert.

Die Kontrollversuche ergaben also, dass die Versuche reproduzierbar waren, es zu keiner Artefaktbildung kam, und dass die ursprünglich gewählte Extraktionsmethode (siehe Kapitel 2.2.3.1, Seite 20) in weiterer Folge zum Einsatz kommen sollte.

3.4.2 Fraktionierte SPE

Wie auch schon im Fall von *Dianthus chinensis* L. war auch hier der nächste Schritt eine fraktionierte SPE, um eine feinere Auftrennung der Analyten zu erzielen.

Als Probe für die SPE diente jenes Trockenextrakt, das im Zuge des Screenings erhalten wurde (siehe Kapitel 2.2.3.1, Seite 20). Diese verbliebenen 520 mg wurden in 3 mL Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) im Ultraschallbad vollständig gelöst und anschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde nun für die fraktionierte SPE nach jenem Schema, das im Kapitel 2.2.4.1 (Seite 23 - 24) beschrieben ist verwendet. Die 10%-Fraktion wurde diesmal durch Lyophilisation getrocknet. Tabelle 13 zeigt die jeweiligen Ausbeuten und Verdünnungsschritte.

Die LC/MS-Analyse zeigte, dass in den 10% bis 30%-Fraktionen, die auch mengenmäßig die größten Fraktionen darstellten, hauptsächlich die polaren Pflanzenstoffe, wie etwa Zucker oder Flavonoid-Glykoside, zu finden waren. Da es sich beim verwendeten Pflanzenmaterial um die Früchte von *Sambucus nigra* L. handelt, ist es auch nicht verwunderlich, dass diese Inhaltsstoffe in großer Menge enthalten und Peptide nicht die Hauptkomponenten sind. Allerdings war es methodisch sehr wünschenswert, dass dieser große polare Ballast bereits sehr früh weitgehend vollständig abgetrennt werden konnte. Auch die größte Menge an Anthocyanen ist in dieser Fraktion zu finden, allerdings eluieren geringe Mengen auch in der 40%- und 60%-Fraktion (siehe Abbildung 18).

Tabelle 13: Auswaagen der einzelnen SPE-Fractionen (10-100% Acetonitril) (siehe Kapitel 2.2.4.1, Seite 23 – 24), sowie die verwendeten Aliquote und entsprechenden Lösungsmittelzugaben von Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) für die nachfolgende LC/MS-Analyse

Fraktion [%Acetonitri]	Trockenextrakt [mg]	Aliquot [mg]	Lösungsmittel [μ L]	Konzentration [mg/mL]
10	289,10	3,01	301	10
20	38,72	4,33	433	10
30	nicht erhoben	3,66	366	10
40	4,03	4,03	403	10
50	5,07	5,07	507	10
60	1,55	1,55	155	10
70	0,70	0,70	140	5
80	2,17	2,17	217	10
90	1,98	1,98	198	10
100	nicht erhoben	nicht erhoben	100	nicht erhoben

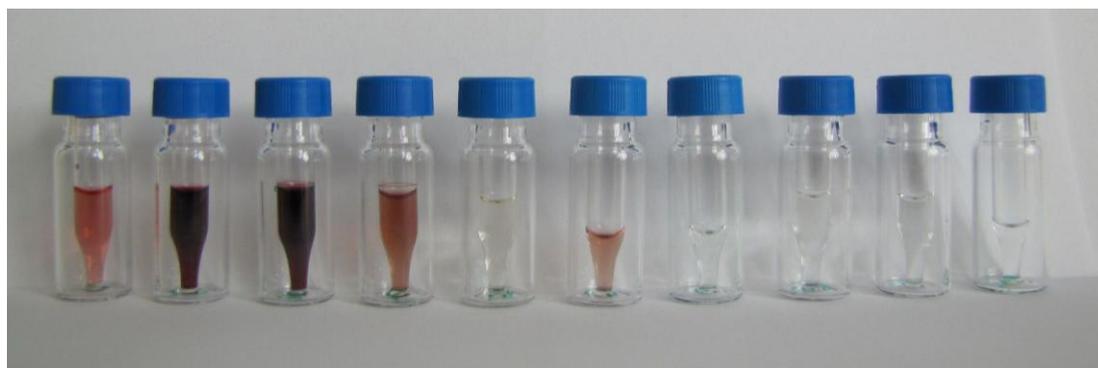


Abbildung 18: SPE-Fractionen von 10% bis 100% (von links nach rechts) nach Aufreinigung des Trockenextraktes (siehe Tabelle 13)

In der 40%-Fraktion waren bereits viele potentielle Peptidpeaks sichtbar, darunter auch solche Signale, die in den weiteren Fraktionen nicht mehr zu finden waren (siehe Abbildung 19). Weiters hatte der Hauptpeak dieses Spektrums eine m/z-Zahl,

die vergleichbar in keiner anderen Fraktion und auch nicht im Gesamtextrakt zu finden war (in Abbildung 19 mit ★ gekennzeichnet). Hierbei handelte es sich wahrscheinlich um eine versehentlich eingebrachte Verunreinigung.

Die 50%-Fraktion stellte die Hauptfraktion an Peptiden dar, die auch relativ gut isoliert von anderen Stoffen auftrat.

In der 60%-Fraktion waren ebenfalls relevante Peaks zu finden, allerdings in deutlich geringerer Zahl und Intensität.

Ab der 70%-Fraktion waren kaum noch Peptide zu detektieren, weshalb diese letzten Fraktionen nicht weiter verwendet wurden.

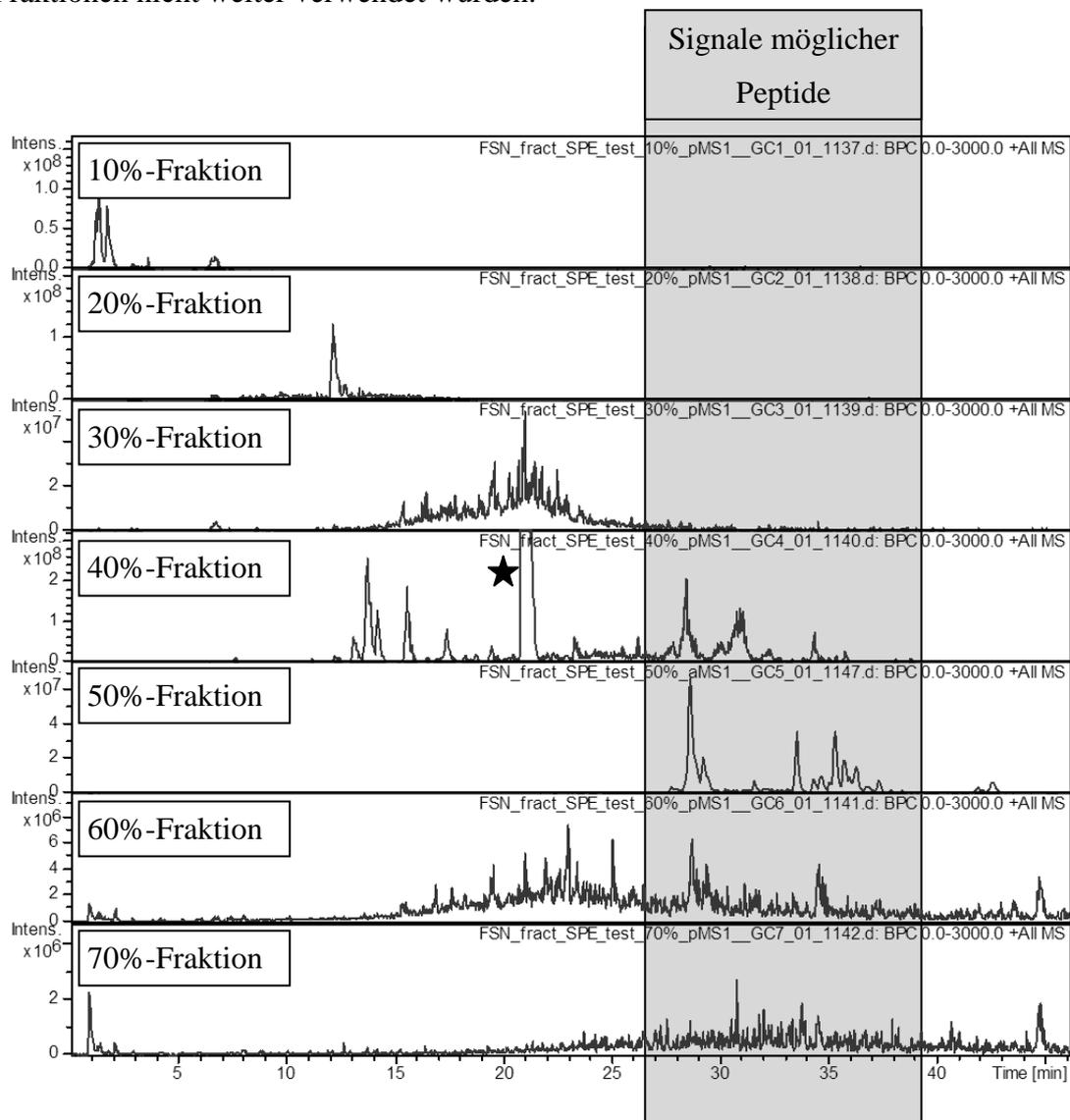


Abbildung 19: „Base peak chromatograms“ von *Sambucus nigra* L. nach der fraktionierten SPE: 10%–Fraktion / 20%–Fraktion / 30%–Fraktion / 40%–Fraktion / 50%–Fraktion / 60%–Fraktion / 70%–Fraktion

Mit diesen neuen Informationen wurde nun eine angepasste Methode im großen Maßstab durchgeführt. Es sollte herausgefunden werden, ob das Übertragen des Elutionsschemas zwischen einer kleineren und größeren Säule adäquat möglich ist. Das Ziel war es, durch eine hochskalierte Methode eine große Menge an Peptiden zu erhalten, die für weitere Versuche zur Strukturaufklärung verwendet werden kann.

Dazu wurde die zehnfache Menge an Probe mit der Screening-Methode (siehe Kapitel 2.2.3, Seite 20) extrahiert. 2,5 g des Trockenextraktes wurden in 14 mL Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) im Ultraschallbad vollständig gelöst, zentrifugiert und der Überstand wurde als Probe für die SPE verwendet. Aufgrund der Analysen der vorangegangenen Versuche (siehe Seite 71 – 73), gingen wir davon aus, dass eine Elution mit Acetonitril/1% Ameisensäure (30%), (40%) und (60%) ausreichend waren, wodurch die Zeit zur Aufreinigung mittels SPE verkürzt werden konnte. Bis inklusive der 30%-Fraktion wurden in der vorangegangenen SPE keine Peptide eluiert. Daher erfolgte nun ein zweiter Waschschrift mit Acetonitril/1% Ameisensäure (30%). In der 40%-Fraktion waren viele potentielle Peptidpeaks sichtbar. Darum wurde mit Acetonitril/1% Ameisensäure (40%) eluiert. Da im vorangegangenen Versuch sowohl in der 50%- als auch in der 60%-Fraktion ähnliche Peptide, aber kaum andere Verbindungen gefunden wurden, wurden diese beiden Fraktionen hier gemeinsam mit Acetonitril/1% Ameisensäure (60%) eluiert und gesammelt. Die detaillierten Schritte der Festphasenextraktion sind im Kapitel 2.2.4.2 (Seite 25) angeführt.

Die 40%- und 60%-Fraktionen wurden im Rotationsverdampfer getrocknet und in 50% Vol. Methanol gelöst. Diese beiden Fraktionen wurden folgend als „methanolische Fructus Sambuci nigrae - 40% beziehungsweise 60%-Fraktion“ bezeichnet. Nach zehnmütigem Zentrifugieren wurden die beiden Fraktionen mittels LC/MS analysiert.

Die Auswaagen und Verdünnungsschritte können aus der Tabelle 14 entnommen werden.

Tabelle 14: Auswaagen der 30%-, 40%- und 60%-Fraktion von Fructus Sambuci nigrae, sowie die entsprechenden Zugaben von 50% Vol. Methanol

Fraktion [%Acetonitril]	Auswaage [mg]	Zusatz 50% Methanol [μ L]
30	146,9	-
40	19,7	1700
60	11,2	1000

Aufgrund der vorangegangenen fraktionierten SPE wurde vermutet, dass in der 30%-Fraktion keine relevanten Peptide enthalten waren. Zur Sicherheit wurde aber auch diese Fraktion mittels LC/MS analysiert. Dies geschah aus Zeit-Gründen direkt nach der SPE ohne einen Trocknungs- und Lösungsschritt, nur nach kurzem Einengen im Rotationsverdampfer und anschließendem Zentrifugieren.

Hierbei zeigte sich, dass die Hochskalierung der Methode zu einer Verschiebung der Elution der Peptide geführt haben musste, denn in der 30%-Fraktion waren neben polaren Stoffen nun auch deutlich Peptidsignale sichtbar. Deshalb wurde die restliche Ausbeute dieser Fraktion im Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht, und die erhaltenen 146,9 mg weiter aufgereinigt, um die Peptide von den anderen Stoffen der Fraktion abzutrennen. Dazu wurde die getrocknete Fraktion in 3 mL Acetonitril/1% Ameisensäure (20%) im Ultraschallbad gelöst, kurz zentrifugiert und der Überstand als Probe noch einmal auf dieselbe 10g Kartusche aufgetragen. Diese wurde zuvor mit vier Reservoirvolumina Methanol gewaschen, bis die Waschlösung klar war. Danach wurde mit drei Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure (20%) equilibriert und im Anschluss die Probe aufgetragen. Nun wurde nacheinander mit zwei Reservoirvolumina Acetonitril/1% Ameisensäure (20%), (25%) und (35%) eluiert.

Die einzelnen Fraktionen wurden im Rotationsverdampfer zur Trockene gebracht und anschließend in einer entsprechenden Menge Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) gelöst (siehe Tabelle 15).

Tabelle 15: Auswaagen der Subfraktionen nach Fraktionierung der 30%-Fraktion (siehe Tabelle 14) und die entsprechende Zugabe von Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) für die LC/MS-Analyse

Fraktion [%Acetonitril]	Trockenextrakt [mg]	Lösungsmittel [μ L]	Konzentration [mg/mL]
20	*147,95	180	10,0
25	7,74	1174	6,6
35	7,93	793	10,0

*Aliquot von 1,80 mg verwendet

Nach zehnminütigem Zentrifugieren wurde der Überstand mittels LC/MS analysiert. Dabei zeigte sich, dass in der 20% und 25%-Fraktion nur der polare Ballast zu finden waren, während sämtliche Peptide in der 35%-Fraktion eluieren.

Weiters wurde versucht eine geeignete „orthogonale Methode“ zu finden, also eine Methode, die im Vergleich zu der bisher verwendeten Aufreinigung mittels SPE auf einem anderen Trennprinzip beruht. Dazu wurde in dieser Arbeit die Säulenchromatographie mit Sephadex® LH-20 herangezogen. Wie schon im Kapitel 2.2.4.4, Seite 28 – 29 beschrieben, erfolgt die Auftrennung der Probenkomponenten hier sowohl über ihre Molekülgröße, als auch über ihre Wechselwirkung mit der Säulenmatrix, die in diesem Fall lipophile, wie auch hydrophile Eigenschaften besitzt. Das Ziel dieser weitgehend orthogonalen Methode war es, Peptide, die durch die SPE nicht voneinander getrennt werden konnten, über das Ausnützen anderer chemischer Eigenschaften separiert voneinander zu eluieren.

Da eine große Zahl von Peptidstrukturen in der methanolischen Fructus Sambuci nigrae – 40%-Fraktion zu finden war (siehe Tabelle 14, Seite 75), wurde diese mittels SC weiter aufgearbeitet. Dazu wurde der Überstand dieser Fraktion nach zehnminütigem Zentrifugieren auf eine mit Lipophilic-Sephadex befüllte Säule aufgetragen (siehe Kapitel 2.2.4.4, Seite 28 - 29). Danach wurde mit 50% Vol. Methanol eluiert, wobei insgesamt elf Fraktionen zu je 4-5 mL gesammelt wurden. Diese wurden im Evaporator zur Trockene gebracht und anschließend in jeweils 1 mL Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) gelöst. Nach einem weiteren zehnminütigem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand mittels LC/MS

analysiert. Dabei zeigte sich jedoch, dass es zu keiner ausreichenden Auftrennung gekommen war. Die Peptide eluierten in den Fraktionen 2-10, wobei die Hauptmenge aller Peptidvarianten in den Fraktionen 3 und 4 gefunden wurde. Das bedeutet, dass die Peptide nur unwesentlich auf einer Lipophilic-Sephadex Säule retardiert werden, und diese Methode daher wahrscheinlich zwar sehr gut geeignet ist, um die Peptide in Fructus Sambuci nigrae von kleinen Molekülen zu reinigen, nicht aber, um sie aufzutrennen.

Daher wurden im weiteren Verlauf eine möglichst weitgehende Auftrennung der Peptide ausschließlich mit Hilfe der Festphasenextraktion angestrebt und weitere fraktionierte SPEs durchgeführt. Aufgrund der Ergebnisse der vorangegangenen Untersuchungen wurden die einzelnen Elutionsschritte jedoch verfeinert, nämlich in je 4%-Acetonitril - Abständen von Acetonitril/1% Ameisensäure (27%) bis Acetonitril/1% Ameisensäure (55%) („27“, „31“, ...) zu je einem Säulenvolumen, wobei jede dieser Elutionsstufen in vier Teilfraktionen à 15 mL („a“-„d“) aufgefangen wurde. Die einzelnen Teilfraktionen wurden im Evaporator getrocknet und vollständig in 1000 µL Acetonitril/1% Ameisensäure (10%) gelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt wurde ein Aliquot des Überstandes für die LC/MS verwendet.

Die LC/MS-Daten zeigten, dass in den Fraktionen „27a“ bis „31b“ keine, beziehungsweise kaum Peptide zu finden waren. In den Teilfraktionen „35a“ und „35b“, in der gesamten Fraktion „47“ und in der Teilfraktion „51a“ konnten außerdem Peptide eluiert werden, die gut und sauber von allen anderen Peptiden gereinigt und angereichert vorlagen (siehe auch Abbildungen 20a - c).

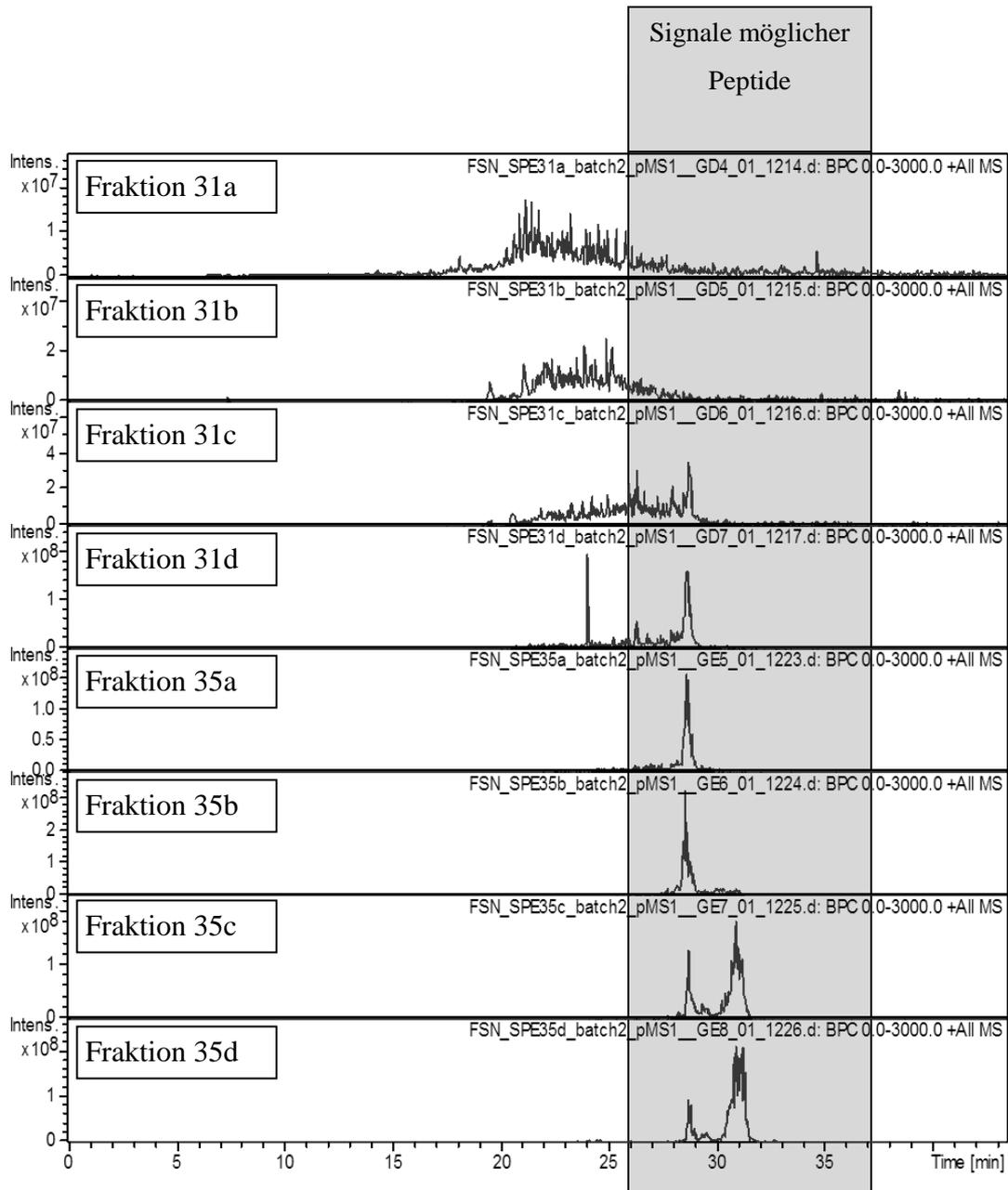


Abbildung 20a: „Base peak chromatograms“ aller 31% - 35%-Teilfraktionen erhalten durch SPE-Reinigung des Screeningrohextraktes

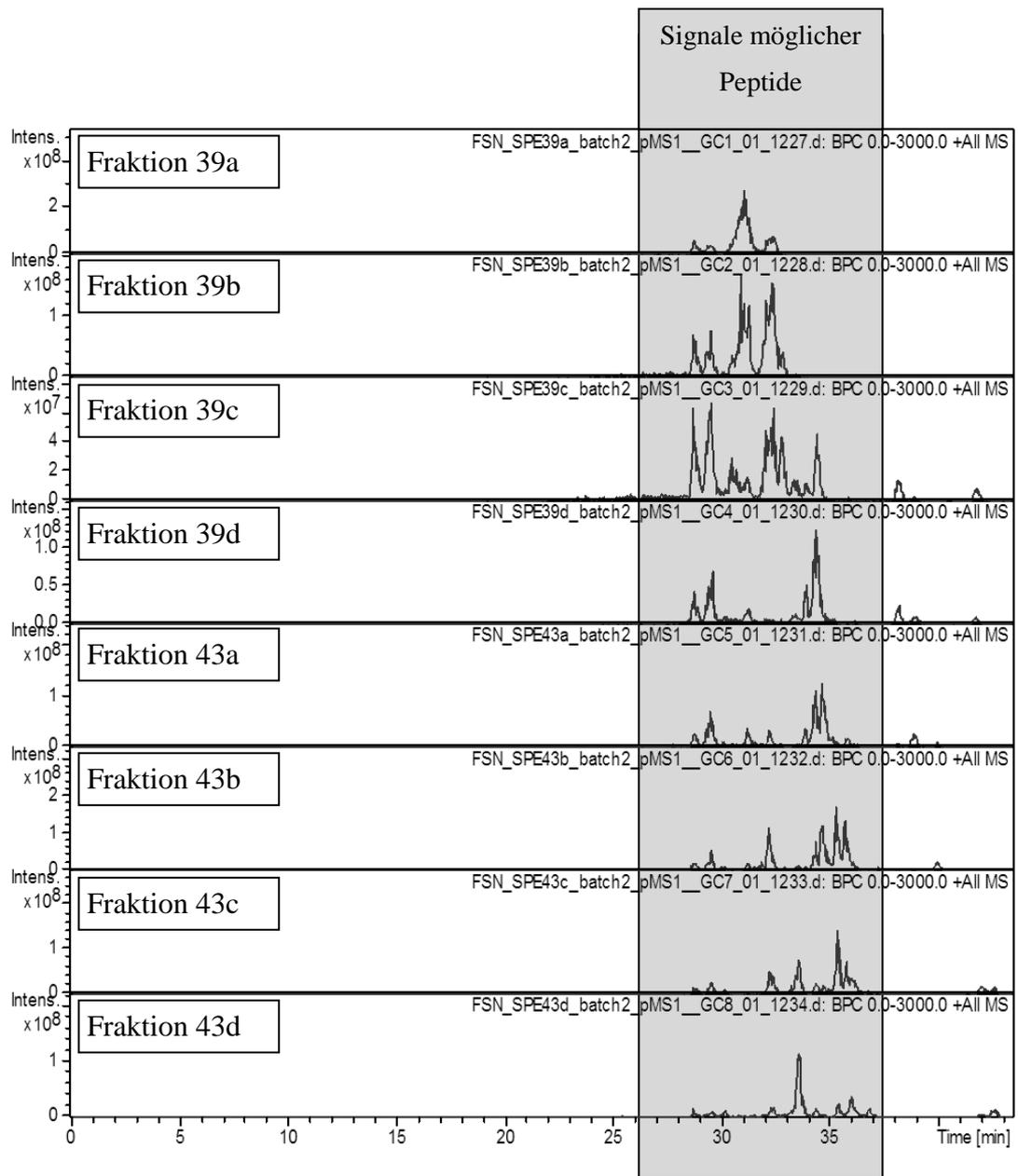


Abbildung 20b: „Base peak chromatograms“ aller 39% - 43%-Teilfraktionen erhalten durch SPE-Reinigung des Screeningrohextraktes

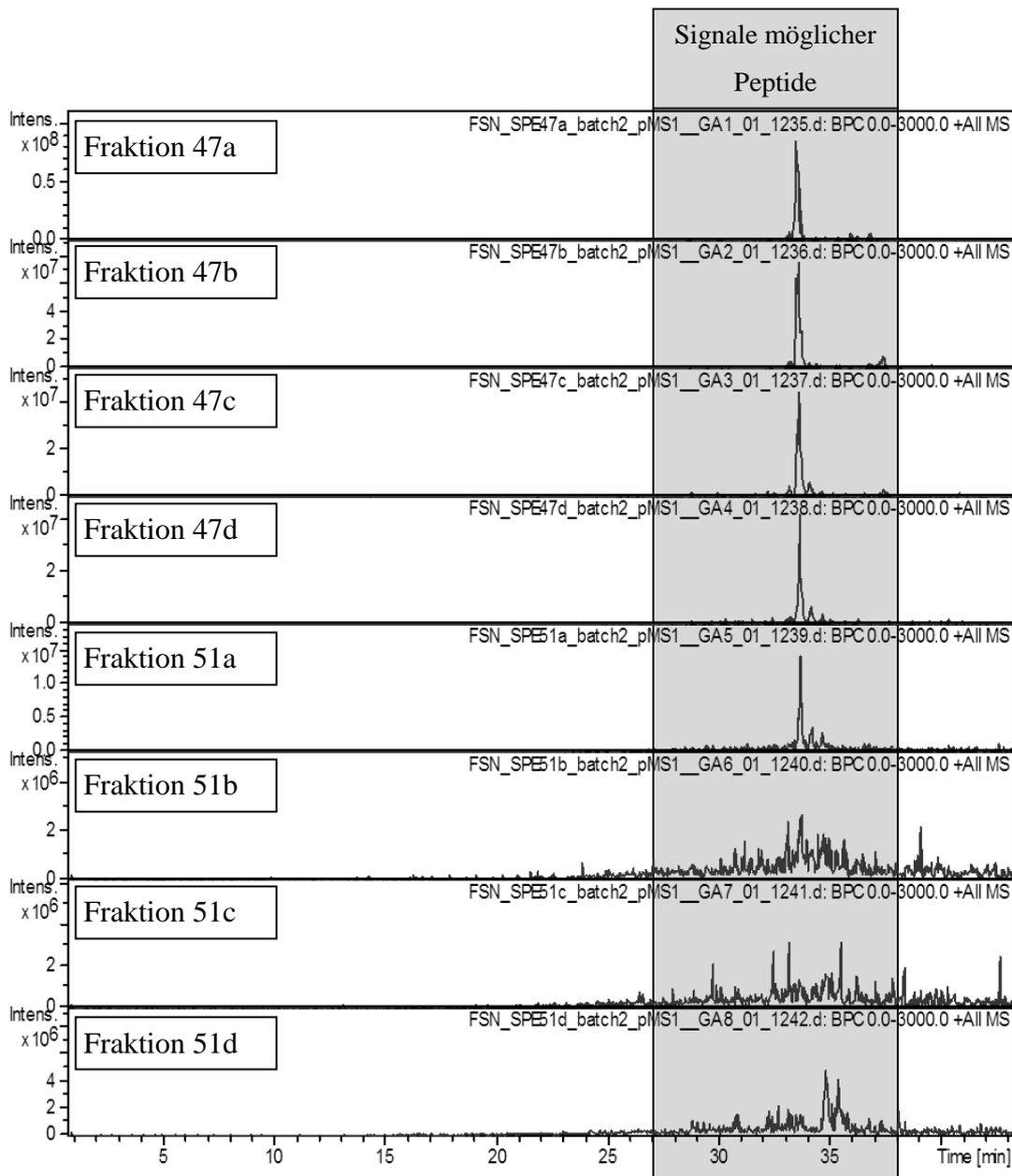


Abbildung 20c: „Base peak chromatograms“ aller 47% - 51%-Teilfraktionen erhalten durch SPE-Reinigung des Screeninghextraktes

Es war also möglich, nach diesem Extraktions- und Aufreinigungsschema einige einzelne Peptide bereits relativ rein zu erhalten. Dazu wurde Fructus Sambuci nigrae mit Acetonitril/2% Ameisensäure (50%) extrahiert und anschließend eine Aufreinigung mittels SPE mit Acetonitril/1% Ameisensäure (27% bis (55%) in 4%-Abständen durchgeführt. So konnte mit nur einer Methode eine bereits sehr weitgehende Aufreinigung der Peptide von Fructus Sambuci nigrae erzielt werden.

3.4.3 Reduktion und Alkylierung

Für den Nachweis der genauen Anzahl an Cysteinen und ihres Vorliegens in freier oder über Disulfidbrücken gebundener Form, wurde eine Reduktion mit anschließender Alkylierung durchgeführt. Durch diese Reaktionen können mögliche Disulfidbrücken zwischen Cysteinen zuerst gespalten werden und nach anschließender Carbamidomethylierung der Thiole über eine daraus resultierende charakteristische Massendifferenz mittels LC/MS detektiert werden (siehe Abbildung 22). In der vorliegenden Arbeit wurden diese Schritte an zwei Proben von Fructus Sambuci nigrae durchgeführt, in denen möglichst alle der vermuteten Peptide enthalten waren, alle anderen Komponenten aber weitgehend abgetrennt waren.

Probe a) stellte die vereinigten Fraktionen 3 und 4 der Säulenchromatographie (siehe Kapitel 2.2.4.4, Seite 28 – 29, bzw. Kapitel 3.4.2, Seite 76 - 77) dar (siehe Abbildung 21).

Probe b) war die 35%-Subfraktion der 30%-Fraktion (siehe Tabelle 15, Seite 76).

RESULTATE UND DISKUSSION

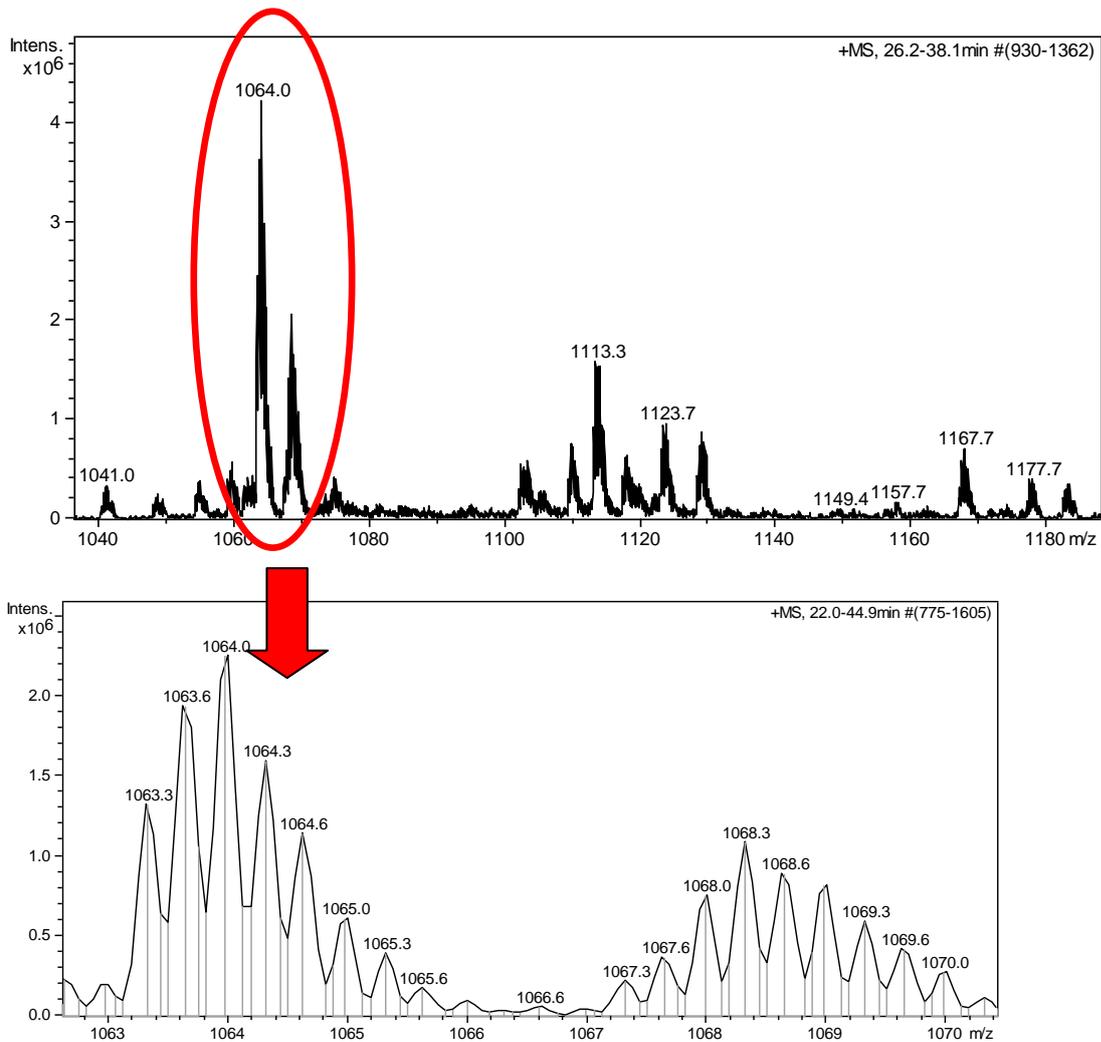


Abbildung 21: Massenspektrum der Probe a) (siehe Seite 81) vor der Reduktion und Alkylierung mit einer Vergrößerung zweier dreifach positiv geladener Molekülonen

Nach erfolgter Reduktion der Disulfidbrücken mit Dithiotreitol und Alkylierung der Cysteine mit Iodacetamid (Arbeitsschema siehe Kapitel 2.2.5, Seite 30 - 31) wurden die Proben mittels LC/MS analysiert.

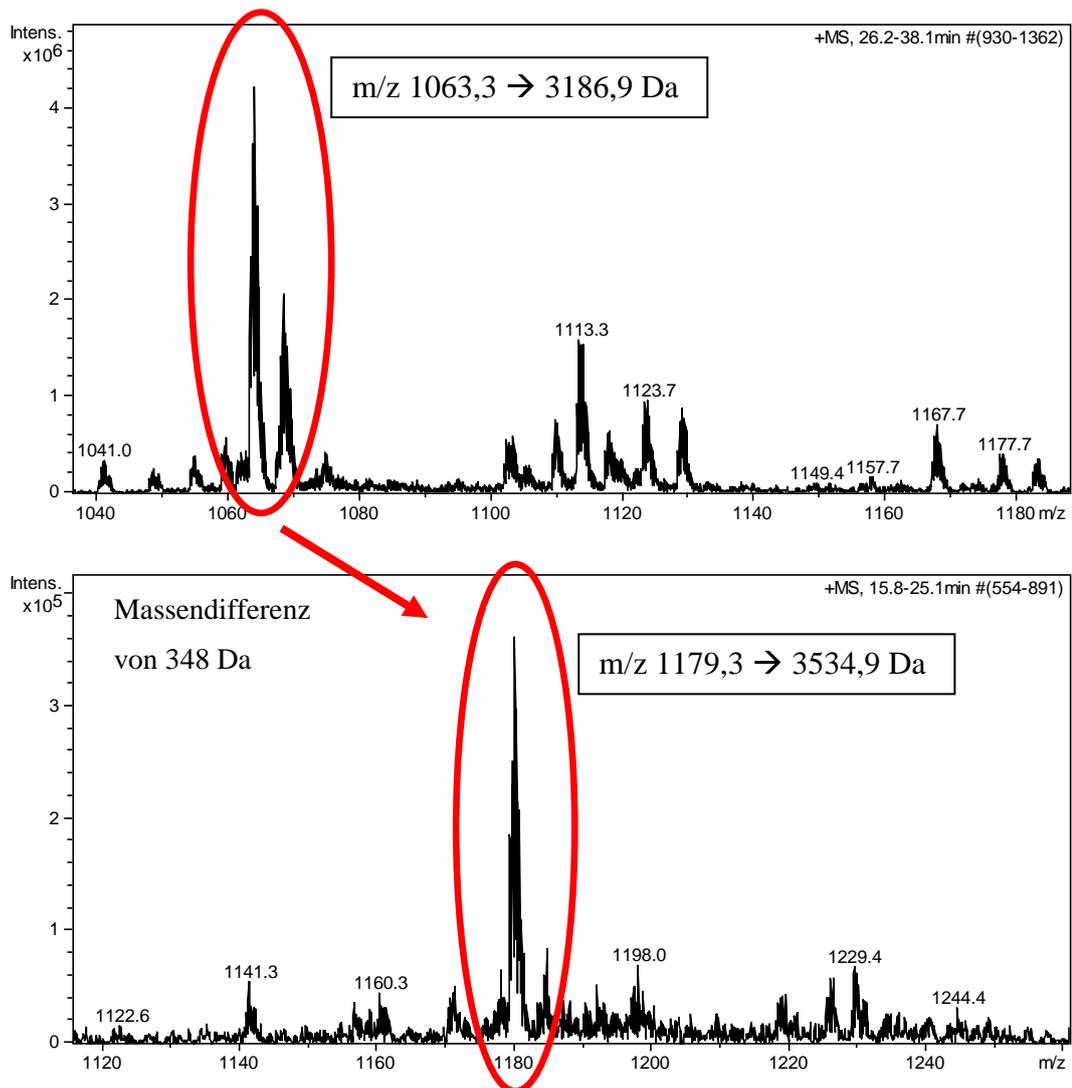


Abbildung 22: Probe a) (siehe Seite 81) vor beziehungsweise nach Reduktion und Alkylierung. Typische Erhöhung der Masse um 348 Da spricht für das Vorhandensein von sechs über Disulfidbrücken gebundenen Cysteinen

Der Vergleich der MS-Daten vor und nach der Reduktion und Alkylierung zeigt, dass das protonierte Molekül bei m/z 1063,3 zu m/z 1179,3 verschoben wurde, was einer Differenz von $\Delta m/z$ 116 entspricht. Es handelt sich hierbei um ein dreifach positiv geladenes Ion (aufgrund des Isotopenabstandes von 1/3), das heißt die monoisotope Molekülmasse liegt bei 3186,9 Da vor und bei 3534,9 Da nach erfolgter Reduktion und Carbamidomethylierung, was eine Massendifferenz von 348 Da ergibt. Dieser Wert setzt sich zusammen aus:

- 6x1 Da: Bei der Reduktion der drei Disulfidbrücken (-S-S-), lagert sich an die nun freie Bindungsstelle jedes der insgesamt sechs Schwefelatome ein Wasserstoff mit einer Masse von 1 Da an (-SH-) - es resultieren also freie Cysteine.
- + 6x57 Da: Durch die Alkylierung dieser sechs Cysteine mit Iodacetamid werden Carbamidomethylcysteine gebildet (-S-CH₂-CO-NH₂), die im Vergleich zum Cystein eine um 57 Da erhöhte Molekülmasse haben.

→ Σ 348 Da

Durch diese charakteristische Differenz von Δ m/z 116 (also entsprechend 348 Da) konnte der Verdacht auf Disulfidbrücken-stabilisierte Peptidstrukturen also bestätigt werden.

In Tabelle 16 sind weiters die prominentesten Peptide von Fructus Sambuci nigrae (=FSN-Peptide) aus den Proben a) und b) (siehe Seite 81) jeweils mit ihrer Masse und Intensität aufgelistet, um aufzuzeigen in welcher Fülle diese cyclischen Peptide hier vorhanden sind.

Tabelle 16: Übersicht über einige prominente Peptide von Fructus Sambuci nigrae (FSN-Peptide)

Name	Masse [Da]	m/z
FSN-Peptid 1	3102,9	1035,3
FSN-Peptid 2	3118,8	1040,6
FSN-Peptid 3	3159,9	1054,3
FSN-Peptid 4	3180,9	1061,3
FSN-Peptid 5	3186,9	1063,3
FSN-Peptid6	3198,9	1067,3
FSN-Peptid 7	3201,0	1068,0
FSN-Peptid 8	3303,0	1102,0
FSN-Peptid 9	3324,9	1109,3
FSN-Peptid 10	3336,0	1113,0
FSN-Peptid 11	3366,0	1123,0
FSN-Peptid 12	3381,9	1128,3
FSN-Peptid 13	3498,0	1167,0

3.5 Diskussion und Ausblick

Im Zuge dieser Arbeit konnte erfolgreich eine Screening-Methode, ausgehend von den wenigen in der Literatur publizierten Arbeiten, entwickelt und an 46 verschiedenen Pflanzenproben angewendet werden. Dabei konnte der Verbrauch an Lösungsmitteln und auch Drogenmenge durch ein Herunterskalieren der Ausgangsmethode stark gesenkt werden. Eine weitere Minimierung ist wahrscheinlich sogar noch möglich, da immer nur ein kleines Aliquot des Trockenextraktes für die nachfolgende 96-well-plate-SPE verwendet werden musste. Auch die SPE-Aufreinigung der Extrakte könnte theoretisch noch etwas herunterskaliert werden – obwohl auch hier schon sehr ressourcensparend gearbeitet wurde – es empfiehlt sich jedoch nicht, da sonst möglicherweise bei vielen Pflanzen eine zu kleine Menge an Eluat für die LC/MS-Analyse resultieren würde.

In der vorliegenden Arbeit wurde ausschließlich die Massenspektrometrie, die sich für die Untersuchung von Peptidstrukturen generell etabliert hat, angewendet. Diese Methode erwies sich als äußerst zielführend, hat allerdings den Nachteil, dass sie sehr komplex ist und nur von fachkundigen Personen sicher und erfolgreich angewendet werden kann. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit auch versucht, eine „Schnellerkennung“ von Peptiden in komplex zusammengesetzten pflanzlichen Extrakten mittels DC durchzuführen. Dies ist bereits in der Literatur beschrieben, allerdings wurde ausschließlich mit Reinstoffen experimentiert. Unsere Resultate konnten jedoch trotz zahlreicher verschiedener Versuchsanordnungen nicht reproduziert werden. In diesem Bereich muss also noch nach einer Lösung gesucht werden.

Auch die Aufreinigung über eine zur SPE mit C18 - Material orthogonalen Methode der SC mit Sephadex® LH-20-Material - konnte in dieser Arbeit nicht erfolgreich durchgeführt werden. Grund dafür kann sein, dass das Trennprinzip, welches hauptsächlich auf einem Größenausschluss beruht, für die Auftrennung von Pflanzenpeptiden nicht geeignet ist, da die FSN-Peptide auf der Lipophilic-Sephadex Säule nur unwesentlich retardiert werden. Diese stationäre Phase erscheint jedoch zumindest geeignet, Peptide von kleineren Molekülen zu trennen. In weiterer Folge

sollte jedoch noch versucht werden, mit anderen Säulenmaterialien eine gute Trennung zu erzielen.

Es sind außerdem noch weiterführende Versuche nötig, um auch die anderen „Hits“ des Screenings noch weiter zu untersuchen - was den Rahmen dieser Arbeit jedoch gesprengt hätte. Darüber hinaus müssten die cyclischen Peptide von Fructus Sambuci nigrae noch genauer und eindeutig charakterisiert, sowie auf ihre biologische Aktivität getestet werden. Der Weg dahin konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit ein Stück weit geebnet werden, indem es gelang, die Extraktionsmethode, sowie die anschließende Aufreinigung über SPE an RP18 – Material zu optimieren.

4) ZUSAMMENFASSUNG

Pflanzenpeptide sind von pharmazeutischer Relevanz, stellen allerdings eine Inhaltsstoffgruppe dar, die bislang nur unzureichend untersucht wurde. Ziel der vorliegenden Diplomarbeit war es, eine Screening-Methode zu erarbeiten, die eine rasche und selektive Analyse dieser Peptidstrukturen in komplex zusammengesetzten Pflanzenextrakten erlaubt. Mittels der neu entwickelten Methode ist es nunmehr möglich, eine Vielzahl von Proben zeit- und materialsparend auf Peptide zu screenen. Darüber hinaus wurden 46 Pflanzen verschiedenster Familien analysiert, wobei vier „Hits“ detektiert werden konnten: *Beta vulgaris* L., *Curcuma longa* L., *Dianthus chinensis* L. und *Sambucus nigra* L.. Zwei dieser Pflanzen, nämlich *Dianthus chinensis* L. und *Sambucus nigra* L., wurden noch weiter untersucht. Dabei konnte im Fall von Fructus Sambuci nigrae ein genau auf diese Pflanze abgestimmtes Aufreinigungsschema erstellt werden, das es ermöglicht, die erhaltenen Peptide in definierten Fraktionen anzureichern und in sehr großer Menge zu gewinnen. Nach Reduktion und Alkylierung konnte eindeutig bestätigt werden, dass es sich bei diesen um Peptide mit drei Disulfidbrückenbindungen handelt.

ABSTRACT

Plant peptides are of pharmaceutical interest, but are a class of compounds that are not very well studied. The aim of this diploma thesis was to develop a screening-method that enables fast and selective detection of these peptide structures in the complex matrix of raw plant extracts. The method developed in this thesis facilitates the time-, material- and cost-saving screening of a large number of samples. The method was applied for the analysis of 46 plants of different families, resulting in the detection of four “hits”: *Beta vulgaris* L., *Curcuma longa* L., *Dianthus chinensis* L. and *Sambucus nigra* L.. Two of these plants, namely *Dianthus chinensis* L. and *Sambucus nigra* L., were further analyzed. For Fructus Sambuci nigrae, a dedicated separation and purification scheme was established, which yields large quantities of fractions that are highly enriched in different peptides. Furthermore, these peptides were shown to contain three disulfide-bonds by LC/MS analysis following reduction and alkylation.

5) LITERATURVERZEICHNIS

- Ammon, Hermann. **Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch.** (2004) 9. Auflage, Walter de Gruyter
- Bruker Daltonics GmbH, esquire/HCT series User Manual, Version 1.3 *
- Colgrave, Michelle L.; Poth, Aaron G.; Kaas, Quentin; Craik, David J. **A new “era” for cyclotide sequencing.** *Biopolymers* (2010), 94(5), 592-601
- Danisco Biotechnology, Langebrogade 1, P.O. Box 17, DK 1 001 Copenhagen K, Denmark
- Domola, Masoud, Shabani; Vu, Vivian; Robson-Doucette, Christine A.; Sweeney, Gary; Wheeler, Michael B. **Insulin mimetics in *Urtica dioica*: structural and computational analyses of *Urtica dioica* extracts.** *Phytotherapy Research* (2010), 24 (Suppl 2), 175-182
- Farrokhi, Naser; Whitelegge, Julian P.; Brusslan, Judy A. **Plant peptides and peptidomics.** *Plant Biotechnology Journal* (2008), 6(2), 105-134
- Gey, Manfred H. **Instrumentelle Analytik und Bioanalytik – Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen.** (2008), 2. Auflage, Springer Verlag *
- Ireland, David C.; Colgrave, Michelle L.; Craik, David J. **A novel suite of cyclotides from *Viola odorata*: sequence variation and the implications for structure, function and stability.** *Biochemical Journal* (2006), 400(1), 1-12*
- Kizaibek, Murat; Popescu, Ruxandra; Prinz, Sonja; Upur, Halmurat; Singhuber, Judith; Zehl, Martin; Kopp, Brigitte. **Towards modernization of the formulation of the traditional Uighur medicine herbal preparation abnormal savda munziq.** Hindawi Publishing Corporation, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (2012), 2012, Article ID 863101
- Ligaa, Urtnasangiin. **Medicinal plants of Mongolia used in western and eastern medicine.** BayabMongol Capital CoLt, Ulaanbaatar (2006)
- Morita, Hiroshi; Shishido, Akira; Matsumoto, Teruki; Itokawa, Hideji; Takeya, Koichi. **Cyclic peptides from higher plants. 45. Cyclolinopeptides B - E, new cyclic peptides from *Linum usitatissimum*.** *Tetrahedron* (1999), 55(4), 967-976 *

- Nakatsuji, Teruaki; Gallo, Richard L. **Antimicrobial peptides: old molecules with new ideas.** *Journal of Investigative Dermatology* (2012) 132(3), 887–895
- Nielsen, Klaus K.; Nielsen, John E.; Madrid, Susan M.; Mikkelsen, Jorn D.. **Characterization of a new antifungal chitin-binding peptide from sugar beet leaves.** *Plant Physiology* (1997), 113(1), 83-91
- Obmann, Astrid; Tsendayush, Damba; Thalhammer, Theresia; Zehl, Martin; Vo, Thanh Phuong Nha; Purevsuren, Sodnomtseren; Natsagdorj, Damdinsuren; Narantuya, Samdan; Kletter, Christa; Glasl, Sabine. **Extracts from the Mongolian traditional medicinal plants *Dianthus versicolor* Fisch. and *Lilium pumilum* DELILE stimulate bile flow in an isolated perfused rat liver model.** *Journal of Ethnopharmacology* (2010), 131(3), 555-561
- Picur, Boleslaw; Cebrat, Marek; Zabrocki, Janusz; Siemion, Ignacy Z. **Cyclopeptides of *Linum usitatissimum*.** *Journal of Peptide Science* (2006), 12(9), 569-574
- Poth, Aaron G.; Colgrave, Michelle L.; Philip, Reynold; Kerenga, Bomai; Daly, Norelle L.; Anderson, Marilyn A.; Craik, David J. **Discovery of cyclotides in the fabaceae plant family provides new insights into the cyclization, evolution, and distribution of circular proteins.** *ACS Chemical Biology* (2011), 6(4), 345-355
- Stotz, Henrik U.; Thomson, James G.; Wang, Yueju: **Plant defensins defense, development and application.** *Plant Signaling & Behavior* (2009), 4(11), 1010-1012
- Tan, Ning-Hua; Zhou, Jun. **Plant cyclopeptides.** *Chemical Reviews* (2006), 106(3), 840-895
- Wang, You-Chu; Tan, Ning-Hua; Zhou, Jun; Wu, Hou-Ming. **Cyclopeptides from *Dianthus superbus*.** *Phytochemistry* (1998), 49(5), 1453-1456
- Xu, Wen Yan; Tang, Jun; Ji, Chang Jiu; He, Wen Jun; Tan, Ning Hua. **Application of a TLC chemical method to detection of cyclotides in plants.** *Chinese Science Bulletin* (2008), 53(11), 1671-1674

* Ich habe mich bemüht, sämtliche Inhaber der Bildrechte ausfindig zu machen und ihre Zustimmung zur Verwendung der Bilder in dieser Arbeit eingeholt. Sollte dennoch eine Urheberrechtsverletzung bekannt werden, ersuche ich um Meldung bei mir.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten

Name	Birgit Semper
Geburtsdatum	09.12.1987
Geburtsort	Gmünd/NÖ
Wohnort	Pernerstorfergasse 59, 1100 Wien
Familienstand	ledig

Schulbildung

1994 - 1998	Volksschule Weitra
1998 - 2006	Bundesgymnasium/ Bundesrealgymnasium Gmünd
01.06.2006	Schulabschluss: Matura

Studium

2006 - 2012	Diplomstudium Pharmazie in Wien
-------------	---------------------------------

Sonstige Tätigkeiten

Seit 2010	Beschäftigt in der Apotheke zum schwarzen Adler in Weitra
-----------	-----------------------------------------------------------

Sprachkenntnisse

Englisch
Russisch