



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Phytochemische Untersuchungen: von der Grundlagen-
forschung zur Arzneibuchmonographie

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin / Verfasser:	Johannes Köhbach
Matrikel-Nummer:	0500502
Studienrichtung /Studienzweig (lt. Studienblatt):	Pharmazie
Betreuerin / Betreuer:	Univ.-Prof. Mag. Dr. Dr. hc. Brigitte Kopp

Wien, im Juni 2010

DANKSAGUNG:

Ich danke o. Univ. Prof. Dr. Brigitte Kopp für die Ermöglichung der Diplomarbeit, die interessanten Arbeiten und ausgezeichnete Betreuung.

Des Weiteren danke ich dem Bundesministerium für Gesundheit, Familie und Jugend für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Allen Leuten des Departements für Pharmakognosie, im Besonderen Mag. pharm. Judith Singhuber und Dr. Christian Gruber, möchte ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, die vielen Hilfestellungen und das tolle Arbeitsklima danken.

Ich danke meiner Freundin Mona, meiner Familie und allen Freunden für die Ermöglichung und tolle Unterstützung während des gesamten Studiums!

Abkürzungsverzeichnis:

AcN	Acetonitril
DC	Dünnschichtchromatographie
CYS	Cystein
DCM	Dichlormethan
DTT	Dithiotreitol
EtOAc	Ethylacetat
FA	formic acid = Ameisensäure
FM	Fließmittel
HPLC	high performance liquid-chromatography
LC/MS	liquid-chromatography mass-spectrometry
MS	Massenspektrometrie
MeOH	Methanol
ÖAB	Österreichisches Arzneibuch
rpm	rotations per minute = Umdrehungen pro Minute
RT	Retentionszeit
TCEP	Tris-carboxy-ethyl-phosphin
TFA	Trifluoressigsäure
ZNS	Zentrales Nervensystem

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2	UNTERSUCHUNGEN ZU <i>VIOLA TRICOLOR</i> L. UND VERWANDTER PFLANZEN HINSICHTLICH DES VORKOMMENS NEUER ZYKLOTIDE	7
2.1	EINLEITUNG	7
2.1.1	<i>Viola tricolor</i> L.....	7
2.1.2	<i>Zyklotide</i>	8
2.2	MATERIAL UND METHODEN	11
2.2.1	<i>Material</i>	11
2.2.1.1	Pflanzenmaterial	11
2.2.1.2	Reagenzien	13
2.2.2	<i>Methoden</i>	13
2.2.2.1	Pflanzenextraktion.....	13
2.2.2.2	Aufreinigung der Rohextrakte mittels Festphasenextraktion ...	14
2.2.2.3	Reduktion und Alkylierung der Pflanzenpeptide.....	15
2.2.2.4	LC/MS-Analyse von Zyklotiden und Pflanzenextrakten.....	15
2.2.2.5	Peptid-Aufreinigung und Analytik	16
2.3	ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	17
2.3.1	<i>Zyklotid-Screening</i>	17
2.3.2	<i>Identifizierung und Charakterisierung neuer zyklotidhaltiger Pflanzen.</i>	22
2.3.3	<i>Peptidaufreinigung</i>	23
2.3.4	<i>Testung der biologischen und pharmakologischen Aktivität von Zyklotiden.</i>	32

3 ÜBERARBEITUNG DER ARZNEIBUCHMONOGRAPHIEN

KOLAEXTRAKT UND KOLAFLUIDEXTRAKT	36
3.1 EINLEITUNG	36
3.1.1 <i>Kola – Botanik und Inhaltsstoffe</i>	36
3.1.2 <i>Anwendung, Wirkungen und pharmakologische Daten</i>	38
3.2 MATERIAL UND METHODEN	40
3.2.1 <i>Material</i>	40
3.2.1.1 Zubereitungen	40
3.2.1.2 Reagenzien	41
3.2.2 <i>Methoden</i>	42
3.2.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)	42
3.2.2.2 Flüssigchromatographie (HPLC)	43
3.2.2.3 Ethanolgehalt.....	44
3.2.2.4 Trocknungsverlust	44
3.3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	46
3.3.1 <i>Ergebnisse</i>	46
3.3.2 <i>Diskussion</i>	51
3.3.3 <i>Vorschlag für die neuen Monographien</i>	53
3.3.3.1 Vorschlag für die neue Monographie „Eingestellter Kolaextrakt“	53
3.3.3.2 Vorschlag für die neue Monographie „Eingestellter Kolafluidextrakt“	56
4 ALLGEMEINE DISKUSSION.....	60
5 ZUSAMMENFASSUNG	64

6	SUMMARY	66
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	68
	CURRICULUM VITAE	71
	ANHANG	i
1.	Ergebnis der LC/MS Analysen des Zyklotid Screenings	ii
2.	Chromatogramme der analytischen HPLC Analysen aller Fraktionen der Peptidaufreinigung des Rohextrakts von <i>V. tricolor</i>	viii
3.	Chromatogramme der analytischen HPLC Analysen aller Fraktionen der Peptidaufreinigung des Rohextrakts von <i>O. affinis</i>	xiii
4.	Monographie Kolaextrakt, ÖAB 2009.....	xvi
5.	Monographie Kolafluidextrakt, ÖAB 2009	xviii
6.	Monographie Kolasamen, Ph. Eur. 6	xix
7.	HPLC-Chromatogramme der Coffein-Gehaltsbestimmung der untersuchten Kolaextrakte und Kolafluidextrakte.....	xxi

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1: Übersicht von phytochemischen Untersuchungen	1
Abb. 2: Übersicht zur Aufreinigung von Zyklotiden aus Pflanzenextrakten.....	4
Abb. 3: Übersicht der Analyse zur Bestimmung von zyklotidhaltigen Pflanzen ..	4
Abb. 4: <i>Viola tricolor</i> L.	7
Abb. 5: Struktur von Zyklotiden am Beispiel von Kalata B1	9
Abb. 6: LC/MS Analyse von <i>O. affinis</i> Rohextrakt und chemisch modifiziertem Extrakt	19
Abb. 7: LC/MS Analyse des unbehandelten Extrakts von <i>Morinda citrifolia</i>	21
Abb. 8: LC/MS Analyse des unbehandelten Extrakts von <i>Psychotria deflexa</i> ..	21
Abb. 9: Übersicht der Peptidaufreinigung mit preparativer und semipreparativer HPLC des Rohextrakts von <i>V. tricolor</i>	24
Abb. 10: LC/MS Analyse der durch preparative HPLC erhaltenen Fraktionen des <i>V. tricolor</i> Rohextrakts.....	25
Abb. 11: Analytische HPLC-Chromatogramme der 6 aufgereinigten Fraktionen von <i>V. tricolor</i>	26
Abb. 12: Übersicht der Peptidaufreinigung mit preparativer und semipreparativer HPLC des Rohextrakts von <i>O. affinis</i>	27
Abb. 13: LC/MS Analyse der durch preparative HPLC erhaltenen Fraktionen des Rohextrakts von <i>O. affinis</i> (1)	28
Abb. 14: LC/MS Analyse der durch preparative HPLC erhaltenen Fraktionen des Rohextrakts von <i>O. affinis</i> (2)	29
Abb. 15: LC/MS Analyse und analytische HPLC der Fraktion 5.1.1 von <i>O. affinis</i>	30
Abb. 16: LC/MS Analyse und analytische HPLC der Fraktion 5.1.2 von <i>O. affinis</i>	31
Abb. 17: LC/MS Analyse und analytische HPLC der Fraktion 4.1 von <i>O. affinis</i>	31
Abb. 18: Oxytocin-ähnliche Sequenz der Viola-Peptide	32
Abb. 19: Uterusmuskel - Kontraktilitätsassay mit Kalata B1	33
Abb. 20: Kolasamen	36
Abb. 21: In Kola enthaltene Purinalkaloide - Koffein und Theobromin.....	37

Abb. 22: In Kola enthaltene Polyphenole - Catechin und Epicatechin.....	37
Abb. 23: DC-Chromatogramme der Trocken- und Fluidextrakte	46
Abb. 24: HPTLC-Chromatogramme der Trocken- und Fluidextrakte	47
Abb. 25: HPLC-Chromatogramm der Koffein-Gehaltsbestimmung der Referenzlösung Koffein und Theobromin.....	48
Abb. 26: HPLC-Chromatogramm der Koffein-Gehaltsbestimmung des Kolafluidextrakts K.Nr. 4493.....	48
Tab. 1: Bioaktive Peptide natürlichen Ursprungs	2
Tab. 2: Pflanzenmaterial zur Peptidanalyse.....	11
Tab. 3: Eingesetzte Säulen für die verschiedenen HPLC-Anwendungen	16
Tab. 4: Ergebnisse der LC/MS Analyse des Zyklotid-Screenings	18
Tab. 5: Untersuchungsmaterial Kolaextrakt	40
Tab. 6: Untersuchungsmaterial Kolafluidextrakt.....	40
Tab. 7: Technische Daten für die HPLC-Gehaltsbestimmung von Koffein.....	43
Tab. 8: Ergebnis der HPLC-Gehaltsbestimmung von Koffein der Kolaextrakte	49
Tab. 9: Ergebnis der HPLC-Gehaltsbestimmung von Koffein der Kolafluidextrakte.....	49
Tab. 10: Ergebnis der durchgeführten Doppelbestimmung des Trocknungsverlust der Kolaextrakte.....	50
Tab. 11: Ergebnis der durchgeführten Doppelbestimmung des Ethanolgehalts der Kolafluidextrakte	50

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

Die Pharmakognosie oder die Kenntnis biogener Arzneimittel, befasst sich mit allen pflanzlichen, tierischen und mikrobiellen Wirk- und Hilfsstoffen sowie deren Produzenten. Besonderes Interesse liegt dabei seit jeher auf der Verwendung von Pflanzen (Teuscher et al., 2004). Neben der anatomischen und morphologischen Betrachtung und Identifizierung arzneilich verwendeter Pflanzen stellen die phytochemischen Untersuchungen hinsichtlich der Drogeninhaltsstoffe und daraus hergestellten Zubereitungen einen wichtigen Bestandteil pharmakognostischer Forschung dar.

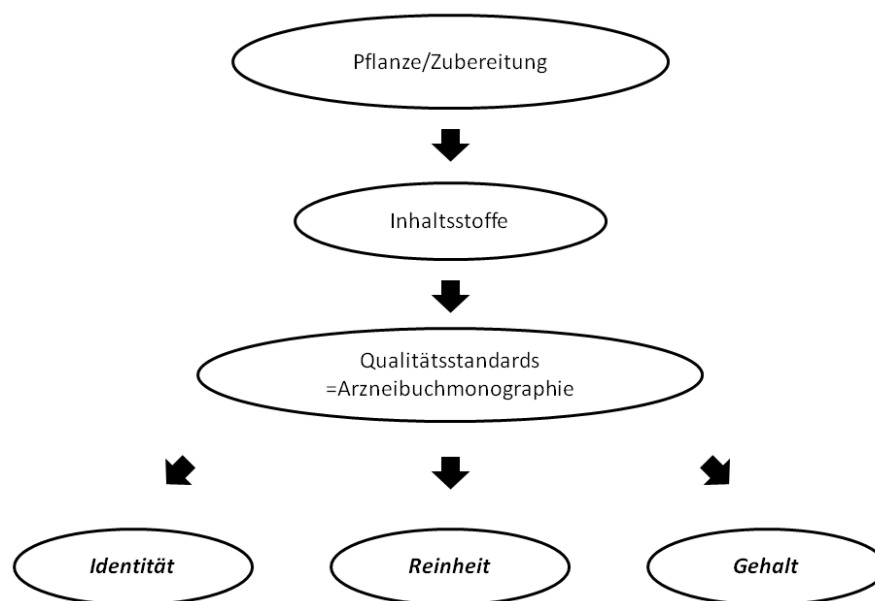


Abb. 1: Übersicht von phytochemischen Untersuchungen

Neben der Analyse der Drogeninhaltsstoffe, fallen auch bei Prüfung der Qualitätsstandards, wie Identitäts-, Reinheits- und Gehaltsbestimmung eine Reihe phytochemischer Analysen an

Bevor jedoch Qualitätsstandards für die Identität, die Reinheit und den Gehalt einer Droge oder Zubereitung, wie sie die Arzneibuchmonographien darstellen, festgesetzt werden, ist also zunächst grundlegendes Wissen über die Art und Zusammensetzung der Inhaltsstoffe nötig. Mithilfe verschiedenster Extraktions-,

Analyse- und Strukturaufklärungsmethoden konnten so eine Vielzahl unterschiedlicher Inhaltsstoffgruppen identifiziert werden.

Eine große Gruppe phytochemischer Stoffe stellen bioaktive Peptide dar, die aus Pflanzen, Tieren und Mikroorganismen isoliert wurden. (Tab.1; übernommen aus Gruber et al., 2010)

Tab. 1: Bioaktive Peptide natürlichen Ursprungs

Quelle	Peptide Klasse	Geschätzte Zahl der Peptide	Aktivität/Angriffspunkt
Bakterien, Pflanzen, Tiere (wirbellose, Wirbeltiere) Menschen	antimikrobielle Peptide (AMPs), Defensine	~*	Immunität, antimikrobiell, insektizid, fungizid, enzymhemmend
Tiere/Tiergifte	Bienen, Wespen und Ameisen	Hunderte bis Tausende [§]	hämolytisch, antimikrobiell, zytolytisch, Rezeptor/G-protein /rezeptomimetisch (z.B., Mastoparan)
	Kegelschnecken, Conotoxine	50,000	schmerzunterdrückend (Ionenkanäle, Acetylcholin Rezeptor), Neurotensin R, Entdothelin R, Adreno R, 5-HT R, OT/AVP R, und viele weitere
	Skorpione	100,000	Ionenkanäle, zytolytisch
	Schlangen	viele Tausende [#]	Neurotoxine; muscarinische-, α -adrenerge- und Neurotensin R
	Spinnen	1.5 – 16 Millionen	Ionenkanäle, cytolytisch
Pflanzen	Zyklotide	>19,000-59,000	insektizid, anti-HIV, zytotoxisch, uterotonisch, Neurotensin R

*Die Gesamtzahl wurde nicht zuverlässig bestimmt, aber aufgrund der Verbreitung und Vielfalt bilden diese Peptide große natürliche Peptidbibliotheken.

[§]Nur wenige Peptide aus einzelnen Spezies wurden beschrieben, wenngleich einzelne Schlangengift-Bestandteile im Detail untersucht wurden (z.B., Melittin und Mastoparan); allgemein wird angenommen, dass Peptide aus Arthropoden großes pharmakologisches Potenzial besitzen.

[#]einschließlich Peptide und größere Proteine

Ich beschäftige mich in dieser Arbeit mit der Untersuchung von cystein-haltigen zyklischen Peptiden in Pflanzen, den sogenannten Zyklotiden, deren

Vorkommen durch Gran (1970) in *Oldenlandia affinis* DC und Schöpke (1993) in *Viola tricolor* L. erstmals gezeigt werden konnte. Seither konnten einige dieser Peptide aus *O. affinis* und verwandten Pflanzen nachgewiesen und deren Struktur aufgeklärt werden, jedoch fehlen auf diesem Gebiet noch viele Informationen bezüglich ihres Vorkommens, der Strukturvielfalt sowie ihrer Wirkungen und Wirkmechanismen.

Ziel dieser Arbeit ist es, sowohl bekannte als auch neue Zyklotide aus *Viola tricolor* L. sowie *Oldenlandia affinis* DC. aufzureinigen. Aus *V. tricolor* sind bisher nur wenige Peptide genauer beschrieben (vgl. Kapitel 2.1.1, S. 7), daher liegt hier das Interesse auf der Identifizierung und Charakterisierung neuer Zyklotide sowie der in weiterer Folge durchzuführenden pharmakologischen Testung, vor allem hinsichtlich einer potenziellen uterotonischen Aktivität. Da einige Peptide wie Tricyclon A und B aus *V. tricolor* Sequenz- und Strukturähnlichkeiten mit dem humanen Oxytocin (OT) aufweisen (Abb.18, S. 32, Gruber et al., 2010), ist eine Untersuchung dieser Peptide im Hinblick auf die Aktivität auf OT und Vasopressin (AVP) Rezeptoren von großem Interesse. Dazu muss zunächst einerseits deren Aminosäurezusammensetzung mit Hilfe von enzymatischer Sequenzierung aufgeklärt werden, andererseits durch pharmakologische Tests die Bioaktivität bestimmt werden.

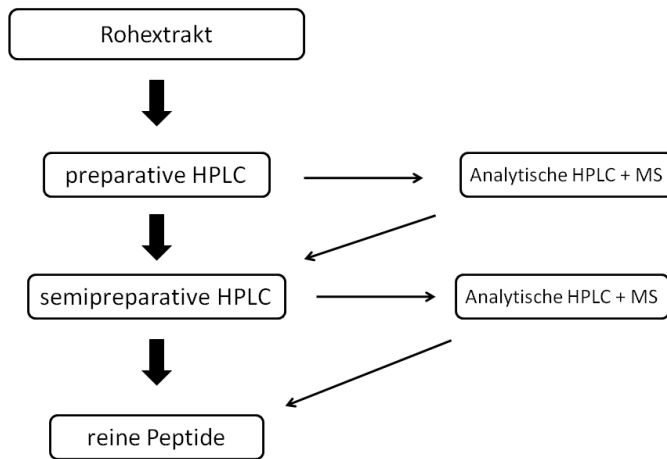


Abb. 2: Übersicht zur Aufreinigung von Zyklotiden aus Pflanzenextrakten

Ablauf der Aufreinigung, der Rohextrakt wird mittels HPLC fraktioniert, die Auswahl der Fraktionen welche weiter aufgereinigt werden, erfolgt nach Analyse mit analytischer HPLC und MS

Es werden dabei Rohextrakte von *V. tricolor* und *O. affinis* durch mehrfache Fraktionierung mittels preparativer und semipreparativer HPLC aufgereinigt. Die einzelnen Fraktionen werden mit analytischer HPLC auf ihre Reinheit und mittels MS nach Massen der darin enthaltenen Peptide untersucht (Abb. 2).

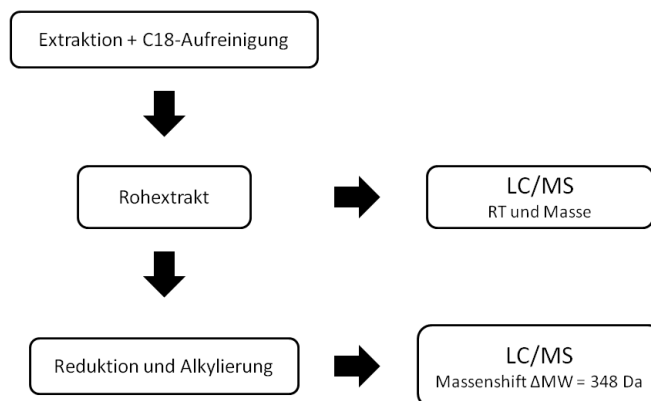


Abb. 3: Übersicht der Analyse zur Bestimmung von zyklotidhaltigen Pflanzen

Nach Extraktion und Aufreinigung werden die Rohextrakte mittels LCMS analysiert, nach Reduktion und Alkylierung darin enthaltener Peptide wird eine zweite Messung durchgeführt

Im Rahmen dieser Experimente werden 28 weitere Pflanzen, die aufgrund ihrer botanischen Verwandtschaft oder ihrer ethnopharmakologischen Verwendung

potenziell Zyklotide enthalten, im Rahmen eines Screenings (Abb. 3, S. 4) hinsichtlich des Vorkommens dieser neuen Stoffklasse untersucht.

Zum Nachweis werden die chemischen und biophysikalischen Eigenschaften von Zyklotiden genutzt. So haben diese eine hydrophobe Oberfläche, was eine späte Elution bei RP-Chromatographie ergibt, und eine Größe zwischen 2500 bis 4000 Dalton. Weiters besitzen diese Peptide 3 Disulfidbrücken, welche durch Behandlung mit einem Reduktionsmittel aufgespalten und anschließend alkyliert werden können. Bei sechsfacher Alkylierung – also bei Vorhandensein von sechs freien CYS nach Reduzierung – kommt es bei MS-Analysen zu einem definierten Massenshift von 348 Dalton. Die Identifizierung erfolgt somit durch zweifache Messung mit LC/MS, zunächst der unbehandelten und danach der reduzierten und alkylierten Proben. Dies ergibt einen ersten Hinweis, dass sich im Extrakt Peptide befinden, welche aufgrund ihres molekularen Gewichts, ihrer Hydrophobizität (HPLC Retentionszeit) sowie dem Auftreten von 6 CYS Aminosäuren eine Ähnlichkeit zu Zyklotiden aufweisen. Ein endgültiger Nachweis über das Vorhandensein von Zyklotiden kann jedoch nur durch die Aminosäuresequenzierung und Bestimmung der dreidimensionalen Struktur eindeutig erbracht werden.

Sind die Inhaltsstoffe einer Pflanze einmal eindeutig identifiziert, werden einerseits pharmakologische Tests durchgeführt, um die Wirkungen und Wirkmechanismen zu erklären, andererseits werden Standards festgelegt, denen die jeweiligen Drogen und daraus hergestellte Zubereitungen entsprechen müssen. Gesammelt stellen diese Qualitätsstandards, welche eine Reihe phytochemischer Prüfungen beinhalten, die Arzneibücher dar. Im Rahmen der Überarbeitung des österreichischen Arzneibuchs (ÖAB), der

nationalen Ergänzung des europäischen Arzneibuchs (Ph. Eur.), durch die ÖAB-Expertengruppe werden die aktuellen Monographien an die Form und den Methoden der Ph. Eur. angepasst, obsolet gewordene Drogenmonographien gestrichen und bei Bedarf neue erstellt. Ziel ist es die, Monographien an den aktuellen Stand der Wissenschaft und Technik anzugleichen und eine Harmonisierung mit der Ph. Eur. zu erreichen.

Im Rahmen phytochemischer Untersuchungen beschäftige ich mich in dieser Arbeit auch mit zwei Monographien, im speziellen ‚Kolaextrakt‘ und ‚Kolafluidextrakt‘, zwei Zubereitungen aus der Droge Kolasamen, welche in der Ph. Eur. monographiert ist. Im Gegensatz zu *Viola tricolor* sind hier die Inhaltsstoffe schon lange bekannt und eindeutig identifiziert. Die Aufgabe der phytochemischen Untersuchungen liegt hier auf der Prüfung der Qualität der Droge und ihrer Zubereitungen.

2 UNTERSUCHUNGEN ZU *VIOLA TRICOLOR* L. UND VERWANDTER PFLANZEN HINSICHTLICH DES VORKOMMENS NEUER ZYKLOTIDE

2.1 Einleitung

2.1.1 *Viola tricolor* L.

Viola tricolor L., im deutschen bekannt als Wildes Stiefmütterchen, ist eine Arzneipflanze aus der Familie der Violaceae (Veilchengewächse) und ist neben *Viola arvensis* Murray, dem Ackerstiefmütterchen, auch Stammpflanze für die Drogenmonographie *Violae herba cum flore* (wildes Stiefmütterchen mit Blüten) der aktuellen Ph. Eur. Die traditionelle



Anwendung der Droge, verwendet wird das blühende Kraut, erfolgt vor allem in Form von Aufgüssen oder Abkochungen für die äußerliche Anwendung bei verschiedenen Hauterkrankungen, wie Seborrhoe oder Milchschorf bei Kindern oder als Diuretikum und Diaphoretikum sowie bei Erkrankungen der Atemwege (Hänsel und Sticher, 2010; Wichtl und Löw, 2009). *V. tricolor* ist in gemäßigten Zonen Europas und Asiens heimisch und wird zum Teil aus Wildsammlungen als auch aus Kulturen gewonnen. Als Inhaltsstoffe sind Flavonoide, nach Ph. Eur. werden mindestens 1,5%, berechnet als Violanthin, gefordert, sowie etwa 10% Schleimstoffe, Phenolcarbonsäuren, Salicylsäurederivate, Gerbstoffe und

Cumarine bekannt (Wichtl und Löw, 2009). Entgegen älterer Untersuchungen, in denen bis zu 5,2% hämolytisch aktive Saponine gefunden worden sein sollen, wurde von Schöpke (1993) gezeigt, dass es sich bei diesen aktiven Verbindungen nicht um Saponine, sondern um makrozyklische Peptide handelt. Das Vorkommen dieser zyklischen Peptide konnte in verschiedenen Arbeiten nachgewiesen werden, jedoch sind nur sehr wenige Peptide aus *V. tricolor* bekannt (Mulvena et al., 2005; Svangard et al., 2004) und lediglich ihre hämolytischen sowie zytotoxischen Wirkungen beschrieben (Göransson et al., 2003; Lindholm et al., 2002; Schöpke et al., 1993; Svangard et al., 2004). Jedoch fehlen Untersuchungen hinsichtlich der möglichen uterotonischen Wirkung dieser Peptide sowie detaillierte pharmakologische Untersuchungen auf ihren möglichen Rezeptoren.

2.1.2 Zyklotide

Zyklotide sind Peptide mit einer Größe von ungefähr 30 Aminosäuren und einem Kopf-Schwanz Ringschluss des Proteinrückgrats. Weiters besitzen sie 6 Cysteine, die 3 Disulfidbrücken ausbilden, wodurch sich eine verknotete Struktur ergibt, welche als „cyclic cystine knot“ (CCK) bezeichnet wird (Abb. 5, S. 9). Diese komplexe Struktur verleiht ihnen eine sehr hohe Stabilität gegen thermische, chemische und enzymatische Denaturierung (Colgrave and Craik, 2004; Craik et al., 1999). Ihre chemischen und biophysikalischen Eigenschaften bieten die Möglichkeit einer gezielten Untersuchung von Pflanzen hinsichtlich des Vorkommens dieser Peptide (vgl. Kapitel 1, S. 5)

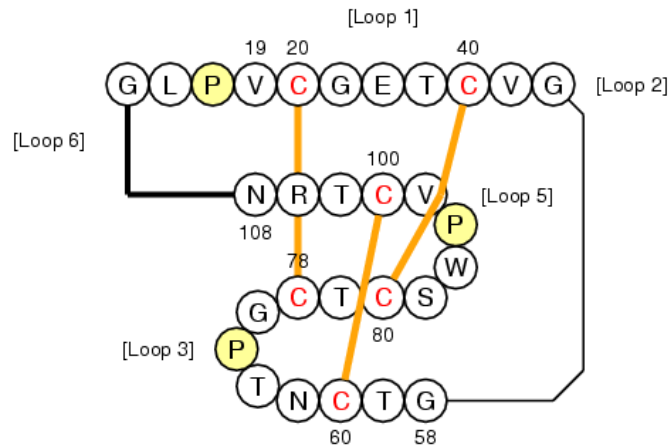


Abb. 5: Struktur von Zyklotiden am Beispiel von Kalata B1

(<http://research1t.imb.uq.edu.au/cybase/?page=card&table=protein&id=1>)

Angabe der Aminosäuren (Einbuchstabencode), des Ringschlusses (schwarz), sowie der 3 Disulfidbrücken (orange) des Zyklotids Kalata B1 aus *O. affinis*

Neben ihrer interessanten Struktur weisen Zyklotide eine Reihe unterschiedlicher biologischer Aktivitäten, wie uterotonische (Gran et al., 2000), zytotoxische (Lindholm et al., 2002), hämolytische (Schöpke et al., 1993) und insektizide (Gruber et al., 2007) Wirkungen sowie Neurotensin-Antagonismus (Witherup et al., 1994) und anti-HIV Wirkung (Ireland et al., 2008) auf.

Das Vorkommen dieser zyklischen Peptide ist jedoch noch wenig untersucht. Die erste Pflanze aus der Zyklotide isoliert wurden, ist *Oldenlandia affinis* DC., eine Rubiaceae (*Kaffeebaumgewächse*), welche in der traditionellen afrikanischen Medizin in Form eines Teeaufgusses angewendet wird (Gran et al., 2000). Bisher konnten solche zyklischen Peptide in einigen Vertretern aus den Familien der Violaceae (*Veilchengewächse*), Rubiaceae (*Kaffeebaumgewächse*), Cucurbitaceae (*Kürbisgewächse*) und Apocynaceae (*Hundsgiftgewächse*) nachgewiesen werden (Gruber et al., 2008). *O. affinis* ist die bisher am besten untersuchte Pflanze und dient bei vielen Experimenten damit auch als Kontrolle. Da jedoch noch weitere grundlegende Information über die Verbreitung von Zyklotiden im Pflanzenreich, ihre strukturelle Vielfalt

und pharmakologische Wirkungen dieser neuen Stoffklasse noch weitgehend fehlen, bedarf es in den nächsten Jahren noch weiteren Untersuchungen und Tests um genügend Wissen über Zyklotide zu erhalten, um diese auch als neue Wirkstoffklasse zu etablieren und in weiterer Folge Qualitätsanforderungen an zyklotidhaltige Drogen erarbeiten zu können. Ihre komplexe Struktur und die zahlreichen biologischen Aktivitäten machen Zyklotide jedenfalls zu einem interessanten Ziel pharmazeutischer Forschung (Craik et al., 2006).

2.2 Material und Methoden

2.2.1 Material

2.2.1.1 Pflanzenmaterial

Die Untersuchungen wurden an dem in Tabelle 2 angeführten Pflanzenmaterial durchgeführt. Für die Experimente an *Viola tricolor* L. wurde Ware in Arzneibuchqualität der Firma Kottas verwendet. Die Samen von *Oldenlandia affinis* DC, welche im Glashaus des Departements für Pharmakognosie der Universität Wien gezüchtet wurde, sind ein Geschenk von David Craik (IMB, Queensland University, Australien). Die Herkunft der verschiedenen Psychotria Spezies (Pflanzen Nummer 15 bis 28) ist, wenn nicht anders angegeben, die österreichische Tropenstation La Gamba in Costa Rica. Die Pflanzen wurden dankenswerterweise von Harald Greger zur Verfügung gestellt (Departement für systematische und evolutionäre Botanik, Universität Wien). Des Weiteren wurden verschiedene Pflanzen aus dem Glashaus des Departements für Pharmakognosie Wien und aus privaten Sammlungen verwendet.

Tab. 2: Pflanzenmaterial zur Peptidanalyse

Nr.	Pflanze	Familie [#]	Herkunft
0	<i>Viola tricolor</i> L.	Vio	Firma Kottas; Ch.Nr. KLA-81247
1	<i>Carissa bispinosa</i> (L.) Desf. ex Brenan	Apo	Palmenhaus Schönbrunn, Wien
2	<i>Morinda citrifolia</i> L.	Rub	Palmenhaus Schönbrunn, Wien
3	<i>Psychotria</i> sp.	Rub	Palmenhaus Schönbrunn, Wien
4	<i>Acokanthera oblongifolia</i> (Hochst.) Codd	Apo	Palmenhaus Schönbrunn, Wien
5	<i>Serissa foetida</i> (Thunb.)	Rub	Singapore Botanical Garden
6	<i>Hibiscus</i> sp.	Ros	Vanuatu, Tanna

7	<i>Sarcocephalus latifolia</i> (J.E. Smith) E.A. Bruce	Rub	Botanischer Garten, Berlin
8	<i>Euclinia longiflora</i> Salisb.	Rub	Botanischer Garten, Berlin
9	<i>Viola</i> sp.	Vio	Steinhof, Wien
10	<i>Viola</i> sp.	Vio	Burtenbach, Deutschland
11	<i>Vincetoxicum hirundinaria</i> MEDIK.	Apo	Pharmakognosie Garten, Wien
12	<i>Oldenlandia affinis</i> DC.	Rub	Pharmakognosie Glashaus, Wien
13	<i>Rauwolfia tetraphylla</i> L.	Apo	Pharmakognosie Glashaus, Wien
14	<i>Rauwolfia serpentina</i> (L.) BENTH.	Apo	Pharmakognosie Glashaus, Wien
15	<i>Psychotria polyphlobia</i> Donn. Sm.	Rub	2907084
16	<i>Psychotria chiapensis</i> Standl.	Rub	19070813
17	<i>Psychotria borucana</i> (A. R. Molina) C. M. Taylor and W. C. Burger	Rub	1907082
18	<i>Psychotria buchtienii</i> Standl.	Rub	2607087
19	<i>Psychotria pillosa</i> Ruiz and Pav.	Rub	1907087
20	<i>Psychotria deflexa</i> DC.	Rub	22070810
21	<i>Psychotria mortomiana</i> Standl.	Rub	2407087
22	<i>Psychotria macrophylla</i> Ruiz and Pav.	Rub	2907083
23	<i>Psychotria elata</i> (Sw.) Hammel	Rub	2407081
24	<i>Psychotria poeppigiana</i> Müll. Arg.	Rub	3007081
25	<i>Psychotria bifaria</i> Hiern.	Rub	South Cameroon
26	<i>Psychotria solitudinum</i> Standl.	Rub	2607083
27	<i>Psychotria capitata</i> Ruiz and Pav.	Rub	24070811
28	<i>Psychotria chagrensis</i> Standl.	Rub	2607082

*Vio...*Violaceae, *Rub...*Rubiaceae, *Apo...*Apocynaceae, *Ros...*Rosaceae

2.2.1.2 Reagenzien

Für die Untersuchungen wurden folgende Reagenzien und Puffer verwendet, welche analytische Reinheit besitzen:

- Acetonitril, VWR
- Dichlormethan, VWR
- Methanol, VWR
- Aqua dest.
- Trifluoressigsäure, Sigma-Aldrich
- Iodacetamid, Sigma-Aldrich
- Dithiotreitol, Sigma-Aldrich
- TCEP, Sigma-Aldrich
- Tris-HCl, Sigma-Aldrich
- Harnstoff, Sigma-Aldrich
- Ameisensäure, Gatt-Koller
- Extraktionspuffer (50% DCM, 50% Methanol)
- Puffer A (100% Wasser, 0,05% TFA)
- Puffer B (90% Acetonitril, 10% Wasser, 0,045% TFA)
- Kieselgel C18, Zeoprep, 40-63 µm (Zeochem, Schweiz)
- Strata C18-E (55u, 70A) 500mg/6mL(Phenomenex, Germany)

2.2.2 Methoden

2.2.2.1 Pflanzenextraktion

Für die Peptid-Analyse werden 1 bis 2 getrocknete Blätter (~100-500 mg) mit Hilfe einer kleinen Pulvermühle fein gepulvert und mit etwa 4 ml Extraktionspuffer über Nacht auf einem Schüttler extrahiert. Nach Zugabe des gleichen Volumens Wasser wie Methanol vorhanden ist, wird kräftig geschüttelt, und 3 Minuten bei 3500 rpm zentrifugiert. Die überstehende wässrige Phase

wird abpipettiert und mit Wasser auf eine Konzentration von weniger als 10% Methanol verdünnt, was eine Menge von etwa 20 ml Rohextraktlösung ergibt. Für die Extraktion zur weiteren Peptidaufreinigung werden dreimal etwa 250 g *V. tricolor* und einmal 227 g *O. affinis* gepulvert und mit jeweils 1,5 l Extraktionspuffer auf einem Magnetrührer über Nacht extrahiert. Nach dem Abfiltrieren des Pflanzenmaterials wird die Lösung, aufgeteilt auf mehrere Teile, im Scheidetrichter mit Wasser ausgeschüttelt und die wässrige Phase anschließend nochmals filtriert. Um sicher zu gehen, dass der Methanolgehalt unter 10% ist, werden die Extrakte noch auf dem Rotationsverdampfer eingeeengt.

2.2.2.2 *Aufreinigung der Rohextrakte mittels Festphasenextraktion*

Die wässrigen Lösungen werden zur groben Vorreinigung über C18 Kieselgel laufen gelassen. Für kleine Volumina werden dafür fertige Kartuschen verwendet (Strata C18, 500 mg/6 mL). Nach dem Waschen mit je einmal (d.h. ein Kartuschen-Volumen von ~6 mL) Methanol und 100% Puffer B wird zweimal mit 100% Puffer A equilibriert und danach wird die Probe aufgetragen. Nach dem Waschen mit je einmal Methanol und 100% Puffer B sowie zweimal 100% Puffer A wird die Probe aufgetragen. Für die Proben Nr. 1-14 wird zunächst einmal mit 10% Puffer B gewaschen und anschließend mit einmal 100% Puffer B eluiert. Für die Proben Nr. 15-28 wird einmal mit 20% Puffer B gewaschen und anschließend einmal mit 80% Puffer B eluiert. Die potenziell peptidhaltigen Fraktionen zwischen 10% bis 100% (Proben Nr. 1-14) bzw. 20% bis 80% (Proben Nr. 15-28) Puffer B werden gesammelt und gefriergetrocknet. Die getrockneten Extrakte werden bei 4°C gelagert.

2.2.2.3 Reduktion und Alkylierung der Pflanzenpeptide

Zur Reduktion werden die Proben zunächst in 0.2 M Tris-HCl, pH 8.3 (Proben Nr. 1-14) oder 0.1 M NH_4HCO_3 , pH 7.8 (Proben Nr. 15-28) gelöst. Für die Reduktion werden zu 25 μl dieser Lösung 70 μl einer 8 M Harnstofflösung gegeben sowie 5 μl einer 160 mM DTT-Lösung. Die Proben werden 1 h bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Danach werden 10 μl von einer 200 mM Iodacetamid-Lösung dazugeben und die Proben für eine Minute bei 65°C inkubiert. Nach der Zugabe von 4 μl FA, um die Reaktion zu stoppen, werden die Proben in HPLC-Vials überführt und mit LC/MS analysiert.

2.2.2.4 LC/MS-Analyse von Zyklotiden und Pflanzenextrakten

Der Nachweis, ob die Proben Zyklotide enthalten oder nicht, basiert auf Messung ihrer chemischen und biophysikalischen Eigenschaften. Dazu werden zwei Messungen mittels gekoppelter LC/MS durchgeführt. Im ersten Lauf werden die Rohextrakte nach erwarteten Retentionszeiten und dabei auftretenden Massen analysiert. Im zweiten Lauf, nach Reduktion und Alkylierung zeigen Zyklotide bei vollständiger Reduktion der Disulfidbrücken und sechsfacher Alkylierung einen Massenshift von genau 348 Da (vgl. Kapitel 1, S. 5).

Des Weiteren wurde MS verwendet um bei der Peptidaufreinigung bereits bekannt Peptide zu erkennen und damit gezielt bestimmte Fraktionen weiter aufzureinigen.

Alle Messungen mittels gekoppelter LC/MS wurden an folgendem Gerät durchgeführt:

Liquid-chromatography (LC):

Nano-Fluß HPLC, Ultimate 3000, Dionex Austria GmbH

Mass-spectrometry (MS):

Elektronen-Spray Ionisierung Hybrid Triple Quadrupol - Lineare Ionen Falle

Massenspektrometer, Applied Biosystems, Austria

Für die Auswertung der Spektren wurde die Software Analyst 1.5 verwendet.

2.2.2.5 Peptid-Aufreinigung und Analytik

Die Peptidaufreinigung aus den Rohextrakten von *V. tricolor* und *O. affinis* sowie alle analytischen HPLC-Läufe wurden an folgendem HPLC-Gerät mit den aus Tabelle 3 ersichtlichen Säulen durchgeführt:

Perkin-Elmer Series 200 (Autosampler, Pumpe, UV/VIS-Detector)

Tab. 3: Eingesetzte Säulen für die verschiedenen HPLC-Anwendungen

Anwendung	Säule	Flußrate
Preparative	Phenomenex Jupiter, 10 µ; C18 300A; 250 mm x 21.2 mm	8 ml/min
Semipreparative	Kromasil C18 (10 mm x 250 mm)	3 ml/min
Analytische	Phenomenex Gemini, 5 µ; C18 110A; 250 mm x 4.6 mm	1 ml/min
Nano-Fluss	Dionex-Acclaim PepMap 75 µm i.d. x 15 cm, C18 100, 3 µm	300 nl/min

Als mobile Phase wurden Puffer A und Puffer B verwendet. Je nach Grad der Reinheit und Art der Anwendung wurden Gradienten von 0.5%, 1% oder 2% Puffer B/min verwendet. Detektiert wurde bei 214 nm für analytische und bei 280 nm für preparative und semipreparative Untersuchungen.

2.3 Ergebnisse und Diskussion

2.3.1 Zyklotid-Screening

Die Untersuchung der Extrakte mittels gekoppelter LC/MS hinsichtlich des Nachweises von Zyklotiden lieferte folgende Ergebnisse, die aus nachstehender Tabelle ersichtlich sind (Tab. 4, S. 18).

Es sind jeweils die Massen („average“) der zweifach (+2 ion) und dreifach (+3 ion) geladenen Ionen (m/z) möglicher oder bekannter Zyklotide, das daraus berechnete Molekulargewicht in Dalton (calcMW Da), sowie die jeweiligen Retentionszeiten (RT min) bei denen diese Massen detektiert wurden, jeweils der unbehandelten (NATIVE) und der reduzierten/alkylierten (RED+ALK) Proben zu entnehmen.

Durch die Kontrolle mit der Modellpflanze *O. affinis* (Abb. 6, S. 19) konnte nachgewiesen werden, dass die Experimente technisch funktioniert haben. Bei den neu untersuchten Pflanzen liefert die LC/MS Analyse der reduzierten und alkylierten Proben jedoch kein eindeutig positiv auswertbares Ergebnis. Eine mögliche Erklärung ist, dass die verwendeten Rohextrakte noch andere Verbindungen enthalten, welche sich störend auf die Signalaufnahme von Peptiden auswirken. Des Weiteren ist es möglich, dass aufgrund der besonderen Struktur der in den untersuchten Pflanzen potenziell enthaltenen Zyklotiden, die Bedingungen der Reduktion und Alkylierung nicht ausgereicht haben, die Disulfidbrücken zu brechen, um eine anschließende Alkylierung zu ermöglichen. Ob es sich bei den untersuchten Pflanzen letztendlich um neue Zyklotid-produzierende Spezies handelt, oder ob es sich bei den experimentell erhaltenen Molekulargewichten von möglichen Peptiden um Artefakte handelt, kann erst durch weitere Experimente nachgewiesen werden.

Tab. 4: Ergebnisse der LC/MS Analyse des Zyklotid-Screenings

Aus LC/MS Analysen erhaltene Massen von Peptiden, die aufgrund ihrer Größe (2,5-4 kDa) und ihrer Retentionszeit, dem Massenshift nach Reduzierung und Alkylierung sowie der Analyse ihrer Isotopenverteilung auf Zyklotide hinweisen

	RT min	"+3 ion" NATIVE	calcMW Da	"+2 ion" NATIVE	calcMW Da	RT min	"+3 ion" RED+ALK	"+2 ion" RED+ALK
2 Morinda citrifolia	39,2	986,1	2955,3	1478,8	2955,6		1102,1	1652,8
9 Viola sp. Steinhof	28,5	994,9	2981,7	1491,7	2981,4	20,44	1115,9	1673,9
	26	1000,3	2997,9	1499,6	2997,2	21,45	1110,7	1665,8

10 Viola sp. Burtenbach	27,5	1048,2	3141,6	1571,5	3141	23	1163,8	
	30,5	959,5	2875,5	1439,8	2877,6			
	
12 Oldenlandia affinis	30,5	965,4	2893,2	1446,7	2891,4	22	1081,2	1621,4
	27	1025,3	3072,9	1537,1	3072,2	22	1141,1	1711
	32,8	1012,9	3035,7	1519	3036	23,7	1128,4	1692,4
13 Rauwolfia tetraphylla	25,44	725,6	2173,8	1087,3	2172,6		841,6	1261,3
	36,74	972,7	2915,1				1088,7	
	25,44	1087,3	3258,9				1203,3	
	33,52	1322,9	3965,7				1438,9	
	36,74	1544,9	4631,7				1660,9	
	45			1087,6	2173,2			1261,6
	45			1629,1	3256,2			1803,1
20 P. deflexa	24	1042,2	3123,6	1563,3	3124,6		1158,2	1737,3
	25	1102,4	3304,2	1653,6	3305,2		1218,4	1827,6
	22	1034,1	3099,3				1150,1	
	23	1042,5	3124,5				1158,5	
	27,5	1081	3240			22,5	1197	
	27,5			1621,6	3241,2			1795,6
	26	1090,9	3269,7				1206,9	
	23			1554,3	3106,6			1728,3
	23			1646,4	3290,8			1820,4
	23			1639,4	3276,8			1813,4
21 P. mortomiana	25			1455,2	2908,4			1629,2
	26,5			1457,9	2913,8			1631,9
	28			1215,2	2428,4			1389,2
22 P. macrophylla	27	979,9	2936,7				1095,9	
	27			1458,1	2914,2			1632,1
24 P. poeppigiana	22	1045,8	3134,4	1568,3	3134,6		1161,8	1742,3
	22			1539,8	3077,6			1713,8
	17	1170,4	3508,2				1286,4	
26 P. solitudinum	22	969,5	2905,5			14,5	1085,5	
	24	919,1	2754,3				1035,1	
	24	1022,6	3064,8				1138,6	
	24	1034	3099				1150	
	25	1014,9	3041,7				1130,9	
	26	1037	3108				1153	
	27	1035	3102				1151	
	27	1028	3081				1144	
27 P. capitata	27,5			1466,7	2931,4			1640,7
	27,5			1478,3	2954,6	17		1652,3
	25			1463,3	2924,6			1637,3
	24	1046,8	3137,4				1162,8	
	28			1492,2	2982,4			1666,2
	27			1488,8	2975,6	17		1662,8

RT min...Retentionszeit in Minuten;

+2/+3 ion...zweifach/dreifach geladenes Ion (m/z) eines möglichen oder bekannten Zyklotids;

calcMW Da...berechnetes Molekulargewicht in Da;

NATIVE...unbehandelte Extrakte;

RED+ALK...reduzierte und alkylierte Extrakte

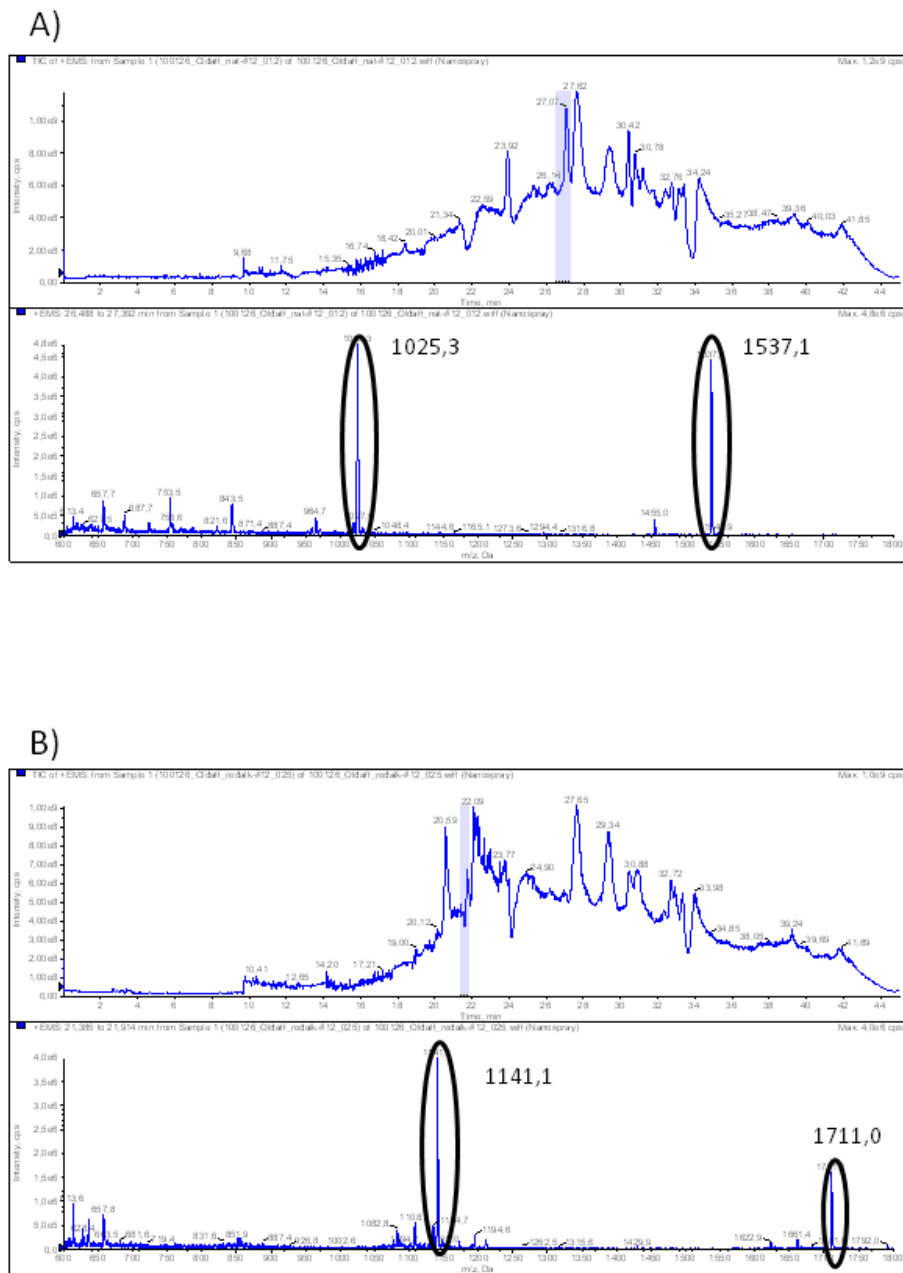


Abb. 6: LC/MS Analyse von *O. affinis* Rohextrakt und chemisch modifiziertem Extrakt
 A) nativer (=unbehandelter) Extrakt B) reduzierter und alkylierter Extrakt; Angabe der average mass (m/z) des zweifach und dreifach geladenen Ions eines Zyklotids (m/z), sowohl das zweifach als auch dreifach geladene Ion zeigen nach Reduzierung und Alkylierung (B) den erwarteten Massenshift von 348 Dalton

Es konnte gezeigt werden, dass einige Pflanzen, wie beispielsweise *Morinda citrifolia* (Abb. 7) oder *Psychotria deflexa* (Abb. 8), aber auch *Rauwolfia tetraphylla*, *P. mortomiana*, *P. macrophylla*, *P. poeppigiana*, *P. capitata* und *P. solitudinum* potenziell Zyklotide enthalten, da in den Chromatogrammen und Spektren der unbehandelten Extrakte einige Peaks und Massen enthalten sind, welche durch Analyse ihrer Isotopenverteilung auf Zyklotide hinweisen. Die LC/MS Spektren aller untersuchten Pflanzen sind dem Anhang (S. ii bis vii) zu entnehmen. Eine genaue Aussage, ob es sich tatsächlich um Zyklotide handelt, ist jedoch nicht möglich. Der Nachweis des Massenshifts nach Reduzierung und Alkylierung zeigte kein positiv auswertbares Ergebnis. Einerseits konnten keine Massenshifts von potenziellen Zyklotid-Peaks der unbehandelten Proben in den reduzierten und alkylierten Extrakten detektiert werden, andererseits wurden in den reduzierten und alkylierten Proben Peaks gefunden, die auf Zyklotide hinweisen, jedoch fehlen hier die korrespondierenden Peaks (d.h. mit einer Molekulargewichts-Differenz von 348 Da) in den Spektren der unbehandelten Extrakte. Es werden daher noch weitere Experimente benötigt. Neben dem Einsatz alternativer Reduktionsbedingungen stehen auch Techniken wie zum Beispiel MALDI-TOF oder gekoppelte MS/MS Experimente zur Verfügung, um eine eindeutige Identifizierung der Zyklotide zu erhalten. Genauso ist nicht ausgeschlossen, dass Pflanzen, deren Spektren keine Hinweise enthielten, dennoch Zyklotide enthalten. Für den definitiven Nachweis sind in weiterer Folge auch noch die Sequenzierung durch enzymatischen Verdau sowie weitere Methoden der Strukturaufklärung wie auch NMR-Untersuchungen nötig.

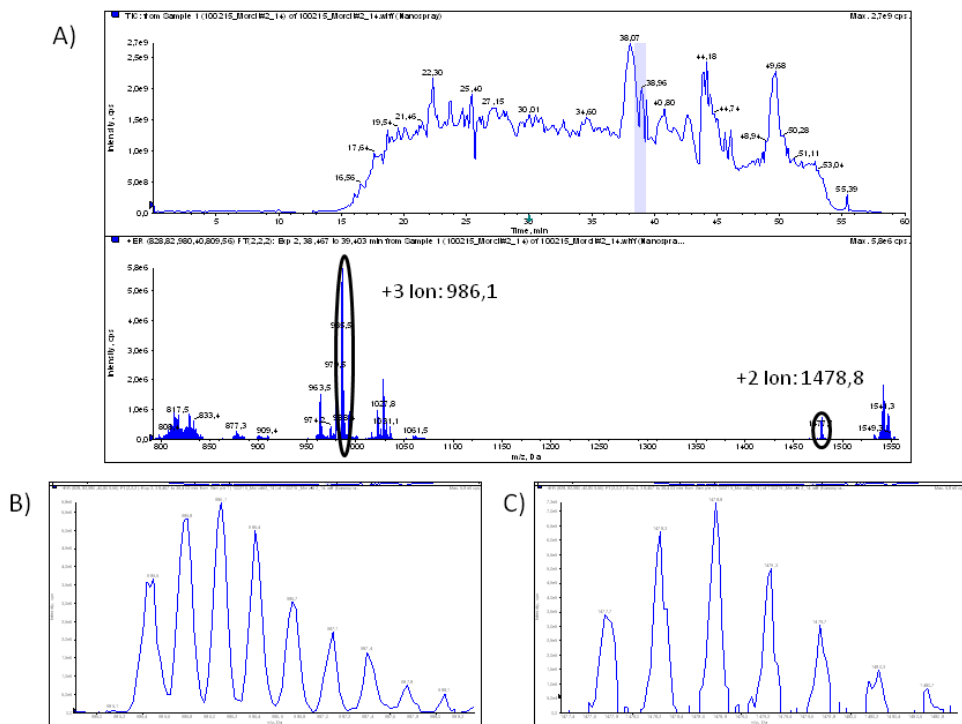


Abb. 7: LC/MS Analyse des unbehandelten Extrakts von *Morinda citrifolia*

A) LC/MS - Angabe der average mass (m/z) des zweifach und dreifach geladenen Ions eines möglichen Zyklotids B) Isotopenverteilung +3 Ion C) Isotopenverteilung +2 Ion

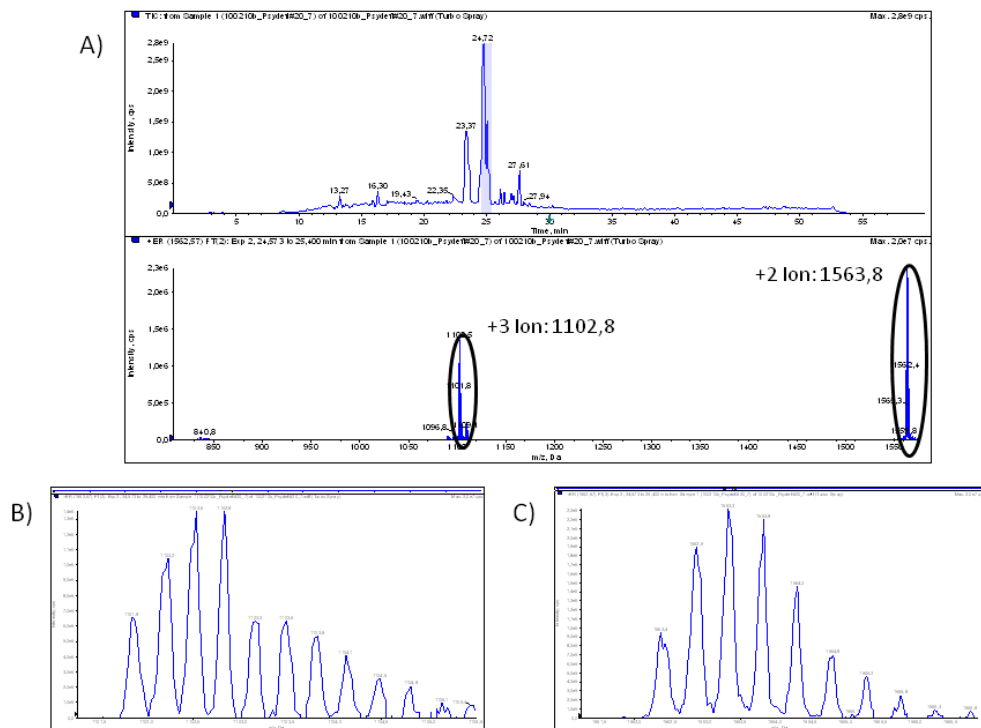


Abb. 8: LC/MS Analyse des unbehandelten Extrakts von *Psychotria deflexa*

A) LC/MS Angabe der average mass (m/z) des zweifach und dreifach geladenen Ions eines möglichen Zyklotids B) Isotopenverteilung +3 Ion C) Isotopenverteilung +2 Ion

2.3.2 Identifizierung und Charakterisierung neuer zyklotidhaltiger Pflanzen

Neben der genauen pharmakologischen Betrachtung und Beschreibung der Wirkungen und Wirkmechanismen bekannter Zyklotide (vgl. Kapitel 2.3.4, S.32) soll das Auffinden neuer Zyklotide helfen, ihre strukturelle Vielfalt und Verbreitung im Pflanzenreich näher zu erklären. Aufgrund ihrer geschätzten Anzahl (>50.000) stellen Zyklotide eine der größten bioaktiven Proteingruppen natürlichen Ursprungs dar (vgl. Tab. 1, S. 2) und bieten somit ein sehr großes Potenzial an Möglichkeiten für die Arzneimittelforschung. Wie auch in dieser Arbeit erfolgt die Auswahl der neu untersuchten Pflanzen einerseits nach taxonomischer Verwandtschaft zu schon bekannten zyklotidhaltigen Familien oder Spezies - vor allem Vertreter aus den Familien der Violaceae, Rubiaceae und Apocynaceae - andererseits aufgrund der ähnlichen ethnopharmakologischen Anwendung. Eine Vielzahl an Pflanzen, deren traditionelle Anwendung auf dem Gebiet der Frauenheilkunde, Schwangerschaft und Geburt liegt, stehen für weitere Untersuchungen hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffe bereit (Gruber und O'Brien, 2010).

Des Weiteren ist es nötig, die Techniken der Identifizierung von Zyklotiden zu verbessern, um eine schnellere und genauere Analyse zu gewährleisten. Neben der bekannten Methode mittels MS Analyse der Rohextrakte und den reduzierten/alkylierten Peptiden in den Extrakten mit anschließender Aufreinigung und Sequenzierung, bietet die Analyse mit „state-of-the-art“ MALDI-TOF/TOF kombiniert mit ultrasensitiver und hochauflösender nano-LC-MS/MS der enzymatisch verdauten Peptidproben eine neue Möglichkeit des Zyklotidnachweises (Gruber, 2010).

Die Suche nach neuen Zyklotiden versucht neue Erkenntnisse zur Verbreitung und Evolution dieser Peptide im Pflanzenreich zu erhalten und in weiterer Folge Peptide mit neuen, besseren und stärkeren Aktivitäten als bei bisher untersuchten Vertretern zu finden. Die weite Verbreitung, die strukturelle Vielfalt und die unterschiedlichen biologischen Aktivitäten dieser natürlich vorkommenden Peptide, von denen lediglich ein kleiner Bruchteil analysiert und bekannt ist, machen diese zu einem interessanten Forschungsgebiet hinsichtlich der Entdeckung neuer pflanzlicher Wirkstoffe mit pharmazeutischem Entwicklungspotenzial.

2.3.3 Peptidaufreinigung

Aus der Extraktion von 750 g *V. tricolor* bzw. 227 g *O. affinis* erhält man etwa 2,1 l wässrige Rohextrakt-Lösung von *V. tricolor* bzw. 800 ml von *O. affinis*, welche nach dem Trocknen eine Menge von 1.535 g *V. tricolor* Rohextrakt bzw. 427,5 mg *O. affinis* Rohextrakt ergeben.

Mithilfe preparativer und semipreparativer HPLC (Abb. 9, S. 24), der Analyse mittels LC/MS (Abb. 10, S. 25) sowie analytischer HPLC konnten aus dem Rohextrakt von *V. tricolor* 6 Peptidfraktionen (Abb. 9, S. 24, Abb. 11, S. 26) aufgereinigt werden.

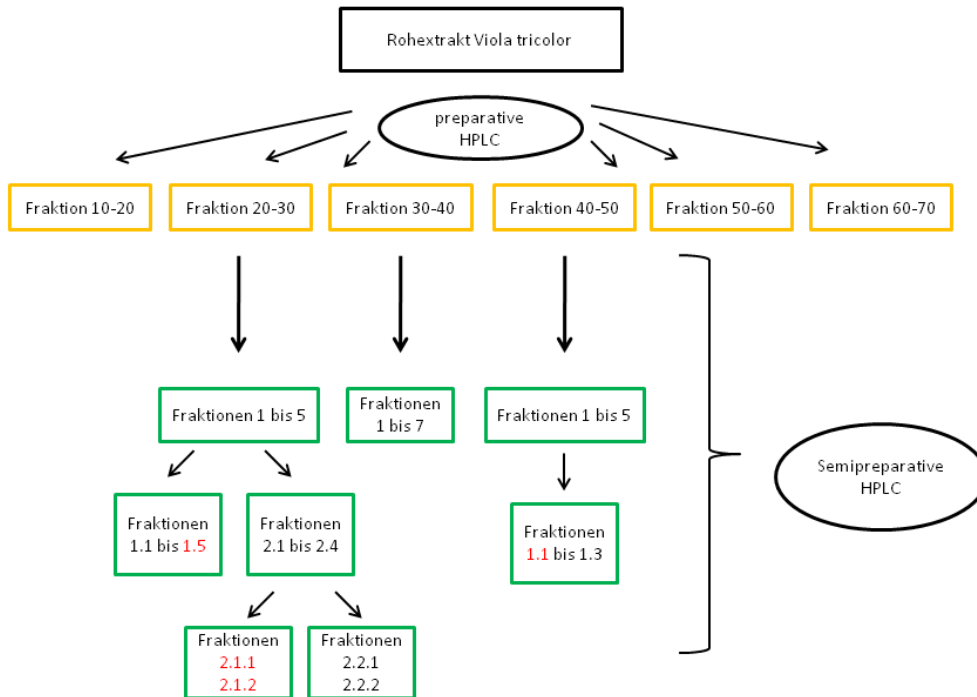


Abb. 9: Übersicht der Peptidaufreinigung mit preparativer und semipreparativer HPLC des Rohextrakts von *V. tricolor*

Preparative Fraktionen des Rohextrakts wurden zwischen 10 und 70 Minuten alle 10 min gesammelt (orange), nach Analyse mit analytischer HPLC wurden interessante Fraktionen mit semipreparativer HPLC weiter aufgereinigt (grün), Fraktionen, deren analytische HPLC-Chromatogramme nur einen Peak zeigen, stehen für LCMS Analysen bereit (rot)

Die LC/MS Spektren der preparativen Fraktionen wurden mithilfe der Softwareanwendung „LCMS-Reconstruct“ nach darin enthaltenen Signalen des Molekulargewichts von bekannten und unbekanntem Peptiden (Abb. 10, S. 25) analysiert. Eine Zuordnung der Massen Molekulargewichte zu einzelnen Massepeaks und damit die Zuordnung der Zyklotide ist trotz der vielen Signale - Rohextrakte können bis zu mehrere hunderte Peptide enthalten - relativ gut möglich. Die berechneten Massen Molekulargewichte der preparativen Fraktionen 20-30min, 30-40min und 40-50min (Abb. 10, S. 25) sind nach Suche in der Cybase Datenbank (<http://research1t.imb.uq.edu.au/cybase/>) noch unbekannt. Die daraus weiter aufgereinigten Fraktionen stehen daher nun

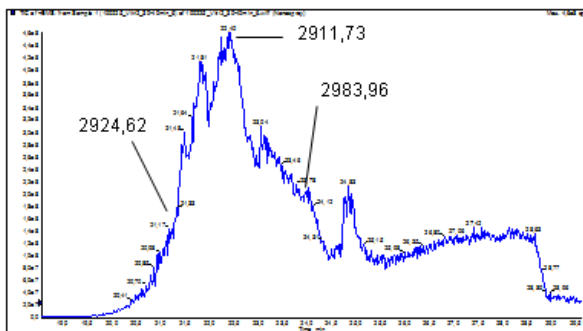
einerseits für Sequenzanalysen, andererseits für pharmakologische Tests zur Verfügung.

A)



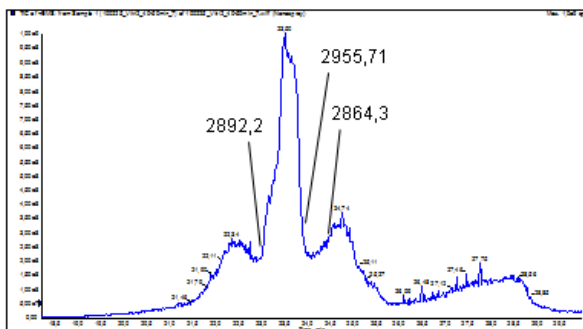
Fraktion 20-30min preparativ	
Masse	Peptide
2955,33	unbekannt1
2876,91	unbekannt2
3082,05	unbekannt3

B)



Fraktion 30-40min preparativ	
Masse	Peptide
2983,96	unbekannt1
2924,62	unbekannt2
2911,73	unbekannt3
2894,23	unbekannt4
2938,44	unbekannt4

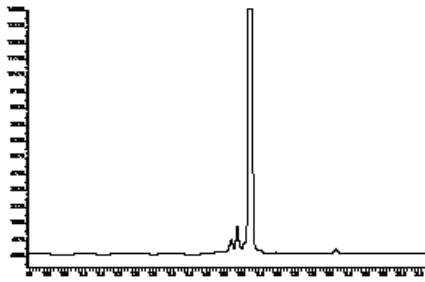
C)



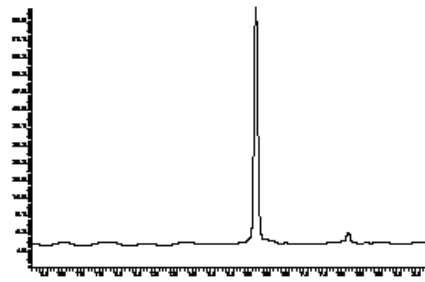
Fraktion 40-50 min preparativ	
Masse	Peptid
2892,2	Cycloviolacin 012
2908,4	unbekannt1
2924,4	unbekannt2
2938,5	unbekannt3
2959,6	unbekannt4
2922,2	unbekannt5
3051,1	unbekannt6
2864,3	unbekannt7
2955,7	unbekannt8
3026,8	unbekannt9
3032,3	unbekannt10
3059,3	unbekannt11
3017,6	unbekannt12

Abb. 10: LC/MS Analyse der durch preparative HPLC erhaltenen Fraktionen des *V. tricolor* Rohextrakts

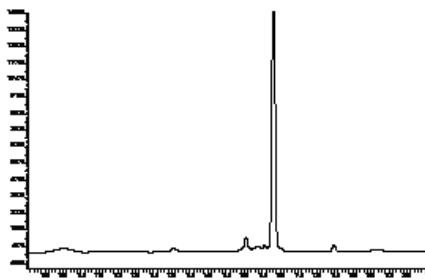
Es wurden von 10 bis 70 Minuten alle 10 Minuten Fraktionen gesammelt A) Fraktion 20-30 min B) Fraktion 30-40 min C) Fraktion 40-50 min; in den nebenstehenden Tabellen sind jeweils die durch die Softwareanwendung LCMS-Reconstruct errechneten Massen (average) sowie bereits bekannte Peptide angegeben



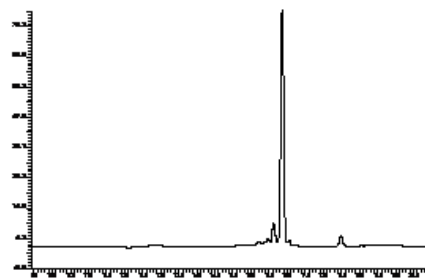
V.tricolor semiprep. 20-30-2-1-1



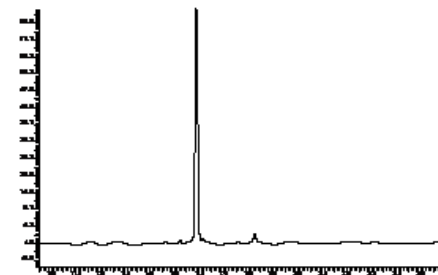
V.tricolor semiprep. 20-30-2-2-1



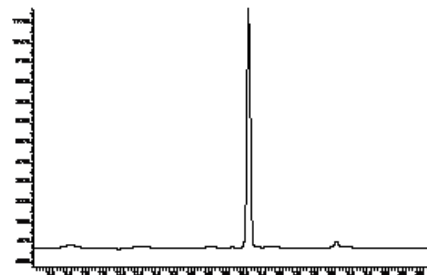
V.tricolor semiprep. 20-30-2-1-2



V.tricolor semiprep. 20-30-2-2-2



V.tricolor semiprep. 40-50-1-1



V.tricolor semiprep. 20-30-1-5

Abb. 11: Analytische HPLC-Chromatogramme der 6 aufgereinigten Fraktionen von *V. tricolor*

Die durch mehrfache semipreparative HPLC Aufreinigungsschritte erhaltenen Fraktionen, welche bei UV-Detektion der analytischen HPLC nur einen Peak zeigen und weiter mit LCMS untersucht werden können

Die 6 aufgereinigten Fraktionen (Abb. 11, vgl. Abb. 9, S. 24) können nun mittels LC/MS hinsichtlich der Massen der enthaltenen Peptide untersucht werden und anschließend durch enzymatischen Verdau ihre Aminosäuresequenz bestimmt werden. Falls diese von Interesse beziehungsweise neuartig sind, können Sie auf Struktur und Bioaktivität untersucht werden.

Die aus dem Rohextrakt von *O. affinis* aufgereinigten Fraktionen (Abb. 12) und bekannten Peptide (Abb. 15, S. 30, Abb. 16 und 17, S. 31), stehen nun für pharmakologische Tests vor allem auf dem Gebiet der uterotonischen und insektiziden Wirkung zur Verfügung.

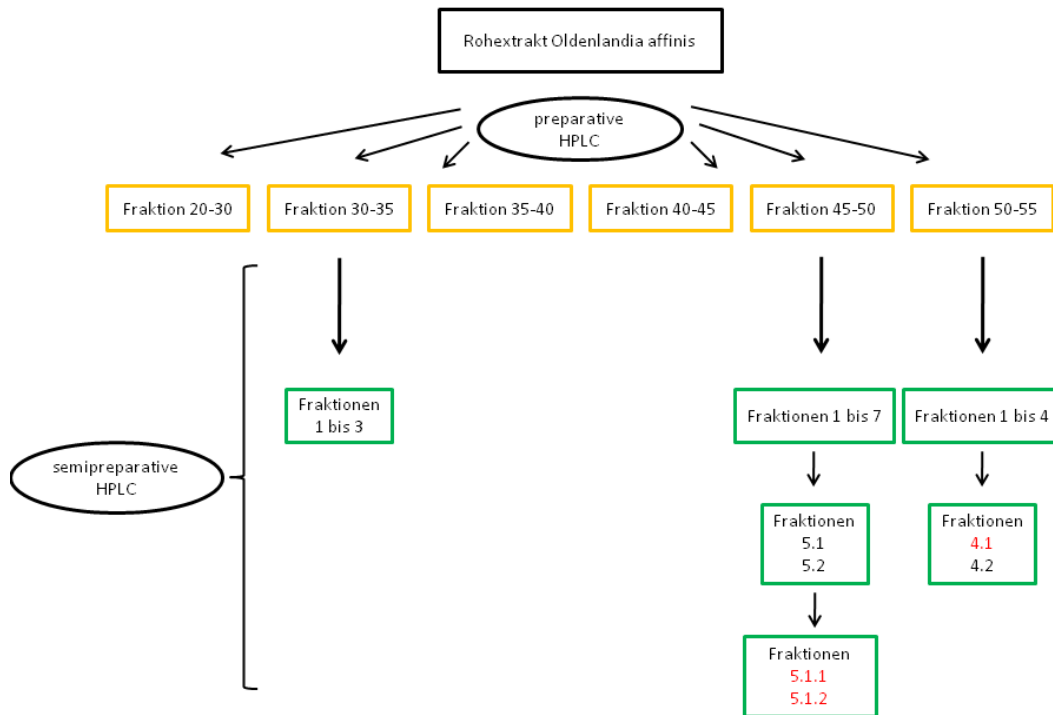
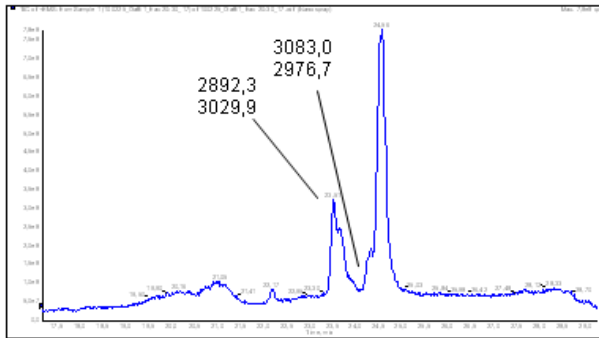


Abb. 12: Übersicht der Peptidaufreinigung mit preparativer und semipreparativer HPLC des Rohextrakts von *O. affinis*

Preparative Fraktionen wurde zwischen 30 und 55 Minuten alle 5 min gesammelt (orange), nach Analyse mit analytischer HPLC wurden interessante Fraktionen mit semipreparativ HPLC weiter aufgereinigt (grün), Fraktionen, deren analytische HPLC-Chromatogramme nur einen Peak zeigen, wurden mit LCMS weiter analysiert (rot)

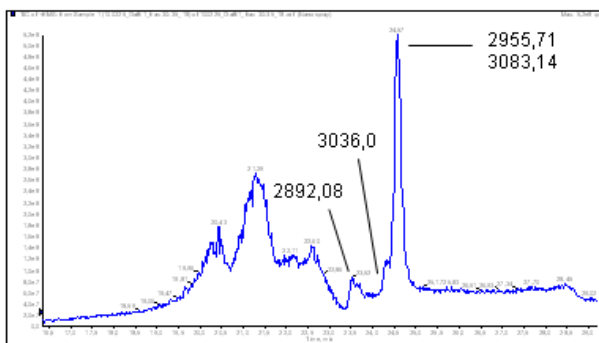
Die Identifizierung der Massesignale durch die Softwareanwendung „LC/MS-Reconstruct“ und der daraus berechneten Molekulargewichte von den preparativen Fraktionen (Abb. 13, S. 28 und Abb. 14, S. 29) erfolgt ebenfalls über die Suche in der Cybase Datenbank. In den Abbildungen 13 (S. 28) und 14 (S. 29) sind jeweils die LC/MS Spektren sowie in den nebenstehenden Tabellen die Massen der darin enthaltenen Peptide abgebildet. Wie bei *V. tricolor* ist auch hier die Zuordnung der Massen zu einzelnen Peaks trotz der hohen Signaldichte gut möglich.

A)



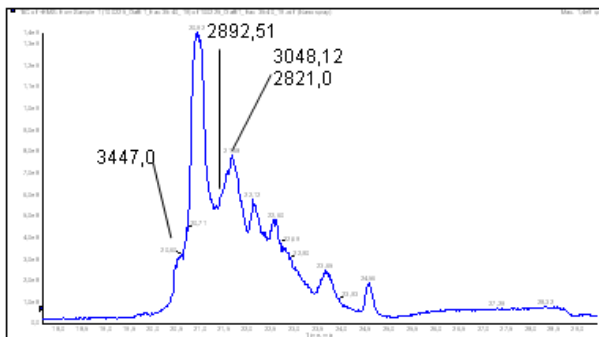
Fraktion 20-30min preparativ	
Masse	Peptid
2955,7	kB2
2892,3	kB1
3083	unbekannt1
3029,9	kB6
3035,9	unbekannt2
2976,7	kB15
3072,2	unbekannt4
2959,5	unbekannt5
3024,1	unbekannt6
2987,7	unbekannt7

B)



Fraktion 30-35min preparativ	
Masse	Peptid
2955,71	kB2
3083,14	unbekannt1
2892,08	kB1
3036	kB13
2976,71	unbekannt2
3092,96	unbekannt3
3024,38	unbekannt4
2824,38	unbekannt5
2987,1	unbekannt6
3028,81	unbekannt7
2958,02	unbekannt8

C)

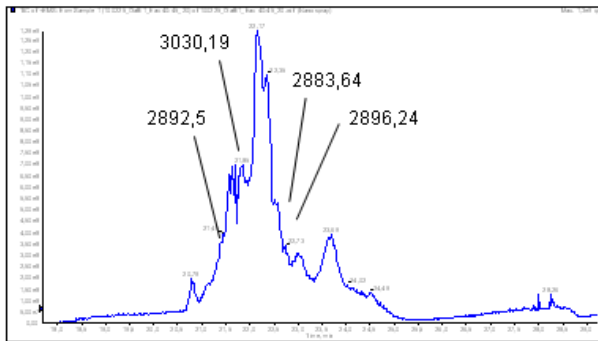


Fraktion 35-40min preparativ	
Masse	Peptid
2908,52	unbekannt1
2910,98	unbekannt2
2892,51	kB1
2955,4	kB2
2896,35	unbekannt3
3048,12	kB10 linear
2821	unbekannt4
3447	unbekannt5

Abb. 13: LC/MS Analyse der durch preparative HPLC erhaltenen Fraktionen des Rohextrakts von *O. affinis* (1)

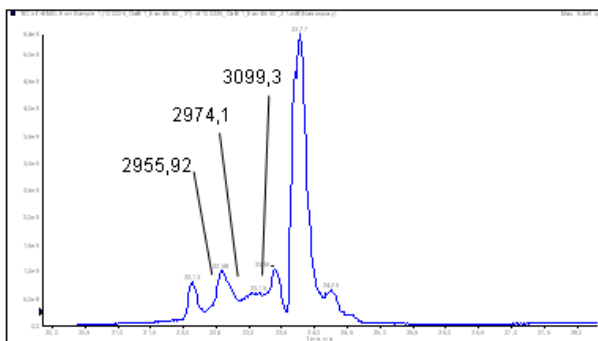
Es wurden eine Fraktion von 20 bis 30 Minuten und von 30 bis 55 Minuten alle 5 Minuten Fraktionen gesammelt A) Fraktion 20-30 min B) Fraktion 30-35 min C) Fraktion 35-40 min; in den nebenstehenden Tabellen sind jeweils die durch die Softwareanwendung LCMS-Reconstruct errechneten Massen (average) sowie bereits bekannte Peptide angegeben

A)



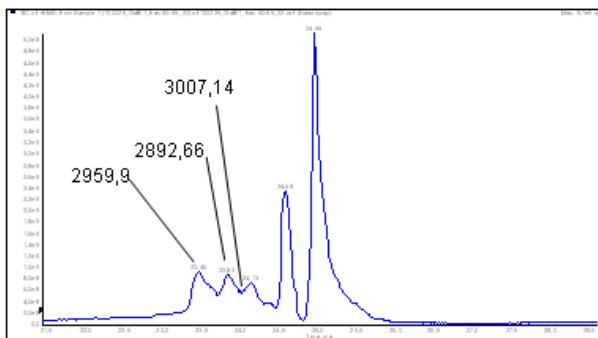
Fraktion 40-45min preparativ	
Masse	Peptid
3033,98	unbekannt1
2892,5	kB1
3048,28	kB10 linear
3204,35	unbekannt2
2910,54	unbekannt3
2896,24	unbekannt4
3234,3	unbekannt5
2909,63	unbekannt6
2973,88	unbekannt7
3090,1	unbekannt8
3030,19	kB6
2883,64	kB11

B)



Fraktion 45-50min preparativ	
Masse	Peptid
3070,78	kB7
2974,1	unbekannt1
3072,38	unbekannt2
2955,92	kB2
3036,11	kB13
3052,54	unbekannt3
2892,04	kB1
3083,34	unbekannt4
3099,3	unbekannt5
2987,82	unbekannt6
2884,48	unbekannt7
2992,46	unbekannt8

C)



Fraktion 50-55min preparativ	
Masse	Peptid
3036,21	kB13
2959,9	unbekannt1
3030,49	unbekannt2
2976,91	unbekannt3
2955,4	kB2
2879,48	unbekannt4
2972,58	unbekannt5
3083,39	unbekannt6
2892,66	kB1
2975,28	kB15
2875,28	unbekannt7
2957,22	unbekannt8
3072,41	kB7
3007,14	unbekannt9
3093,37	unbekannt10

Abb. 14: LC/MS Analyse der durch preparative HPLC erhaltenen Fraktionen des Rohextrakts von *O. affinis* (2)

Es wurden eine Fraktion von 20 bis 30 Minuten und von 30 bis 55 Minuten alle 5 Minuten Fraktionen gesammelt A) Fraktion 20-30 min B) Fraktion 30-35 min C) Fraktion 35-40 min; in den nebenstehenden Tabellen sind jeweils die durch die Softwareanwendung LCMS-Reconstruct errechneten Massen (average) sowie bereits bekannte Peptide angegeben

Wie durch LC/MS und anschließende Cybase Datenbanksuche gezeigt werden konnte, wurden die bekannten Peptide Kalata B1 (Abb. 15), Kalata B2 (Abb. 16, S. 31) und Kalata B6 (Abb. 17, S. 31) aufgereinigt. Das Chromatogramm der analytischen HPLC zeigt für diese Fraktionen einen einzigen Peak. Die Analyse mit LC/MS lieferte jedoch weitere Signale, welche auf das Vorhandensein anderer Verbindungen zurückzuführen sind, welche bei der verwendeten UV-Detektion nicht zu sehen sind. Zum Teil sind auch noch andere Peptide in Spuren enthalten, die aufgrund ihrer Strukturähnlichkeit durch die verwendeten Gradienten der mobilen Phase auf der semipreparativen Säule nicht getrennt werden konnten. Reine Peptide können nur durch wiederholte HPLC-Fraktionierung, eventuell auch mit isokratischen Gradienten und anderen Trennmethode erhalten werden.

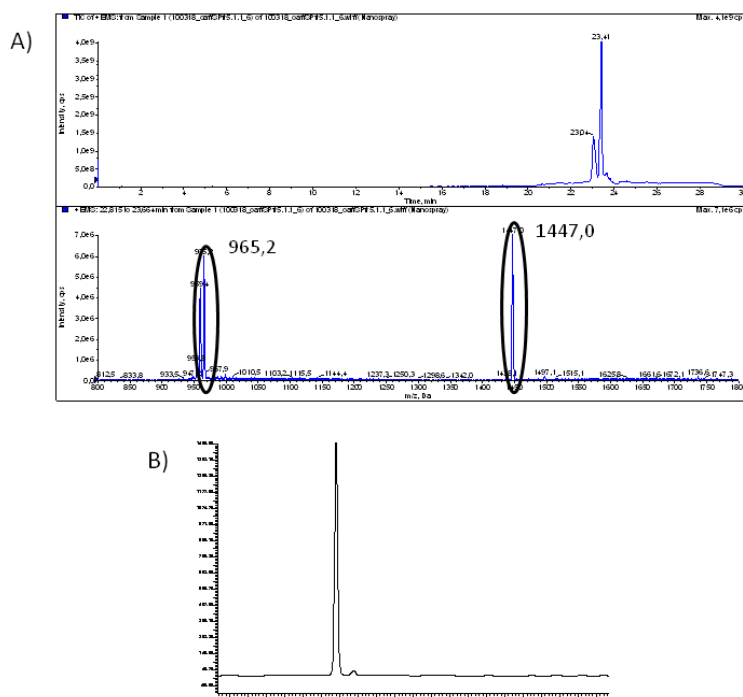


Abb. 15: LC/MS Analyse und analytische HPLC der Fraktion 5.1.1 von *O. affinis*

A) LC/MS Chromatogramm, mit +2 und +3 geladenen Ion (m/z) eines Zyklotids, welches nach Suche in der Cybase Datenbank als Kalata B1 identifiziert wurde B) Chromatogramm der analytischen HPLC der Fraktion 5.1.1

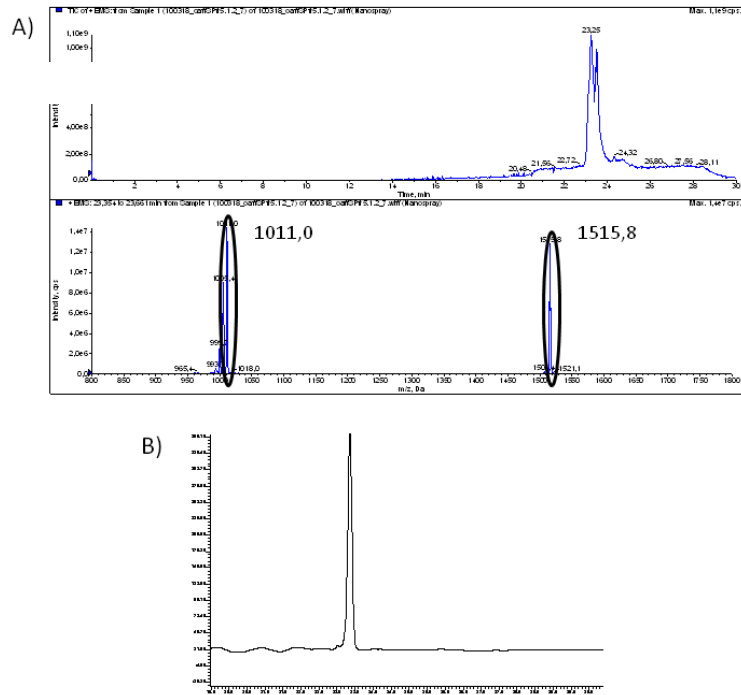


Abb. 16: LC/MS Analyse und analytische HPLC der Fraktion 5.1.2 von *O. affinis*
 A) LC/MS Chromatogramm, mit +2 und +3 geladenen Ion (m/z) eines Zyklotids, welches nach Suche in der Cybase Datenbank als Kalata B2 identifiziert wurde B) Chromatogramm der analytischen HPLC der Fraktion 5.1.2

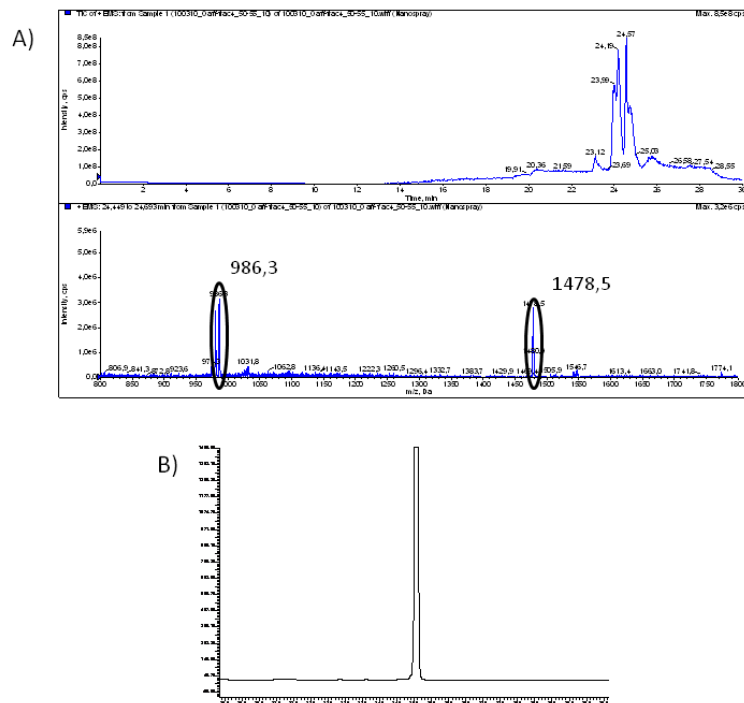


Abb. 17: LC/MS Analyse und analytische HPLC der Fraktion 4.1 von *O. affinis*
 A) LC/MS Chromatogramm, mit +2 und +3 geladenen Ion (m/z) eines Zyklotids, welches nach Suche in der Cybase Datenbank als Kalata B6 identifiziert wurde B) Chromatogramm der analytischen HPLC der Fraktion 4.1

2.3.4 Testung der biologischen und pharmakologischen Aktivität von Zyklotiden

Da *V. tricolor* eine reichhaltige Quelle neuer Zyklotide ist (vgl. Kapitel 2.1.1, S. 7), stellt neben der Untersuchung hinsichtlich der Findung neuer Zyklotide (vgl. Kapitel 2.3.2, S. 22) der Nachweis ihrer biologischen Aktivitäten eine interessante Aufgabe dar. Es sind jedoch bisher nur wenige Peptide beschrieben, außerdem fehlen Nachweise für deren uterotonische Aktivität. Zusätzlich konnten Struktur- und Sequenzähnlichkeiten einzelner Peptide mit humanem Oxytocin (OT) aufgezeigt werden (Abb. 18, vgl. Kapitel 2.1.1, S. 7).

Die durch Peptidaufreinigung erhaltenen Fraktionen können nun auf ihre pharmakologische Wirkung auf zelluläre Rezeptoren getestet werden. Besonderes Interesse liegt wie oben erwähnt auf der Untersuchung der uterotonischen Wirkung. Wie neue Ergebnisse zeigen, weisen einige Peptide, wie Kalata B1 aus *O. affinis*, oder auch Tricyclon A und B aus *V. tricolor* Sequenz- und Strukturähnlichkeiten mit den aktiven Regionen des OT auf (Abb. 18).

human-oxytocin	C	YIQN	—————	CPLG		9
tricyclon-A	C	YGTN	GGTIFDCGES	CFLG	TCYTKGCSCGEWKL	33
tricyclon-B	C	YGEN	GGTIFDCGES	CFLG	TCYTKGCSCGEWKL	33

Abb. 18: Oxytocin-ähnliche Sequenz der Viola-Peptide

Aminosäuresequenzen des OT und der Viola Peptide, Angabe der gleichen Aminosäuren (rot) sowie der Sequenzähnlichkeit (kasten), übernommen aus Gruber et al., 2010

Die Hypophysenhinterlappenhormone OT und Vasopressin (AVP) sind multifunktionale Nonapeptide, die ihre Wirkung über G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) unter anderem auch auf die glatten Muskelzellen des Uterus haben. Untersuchungen hinsichtlich der uterotonischen Wirkung dieser

Peptide auf OT und AVP Rezeptoren sollen klären, ob deren biologische Aktivität, durch Aktivierung (Agonist) oder Blockierung (Antagonist) der OT/AVP Rezeptoren erfolgt oder über andere Signalwege wie Prostaglandin-, α -Adreno-, Acetylcholin- oder Endothelin-Rezeptoren oder aber auch durch nicht-rezeptorinduzierte Kalziumströme.

Die Kollagen Kontraktilitätsassays ermöglichen es, *in vitro* Tests auf die uteruskontrahierende Wirkung durchzuführen, bevor man auf menschliche primär-Zellen oder Uterus Muskelpräparationen übergeht (Abb. 19).

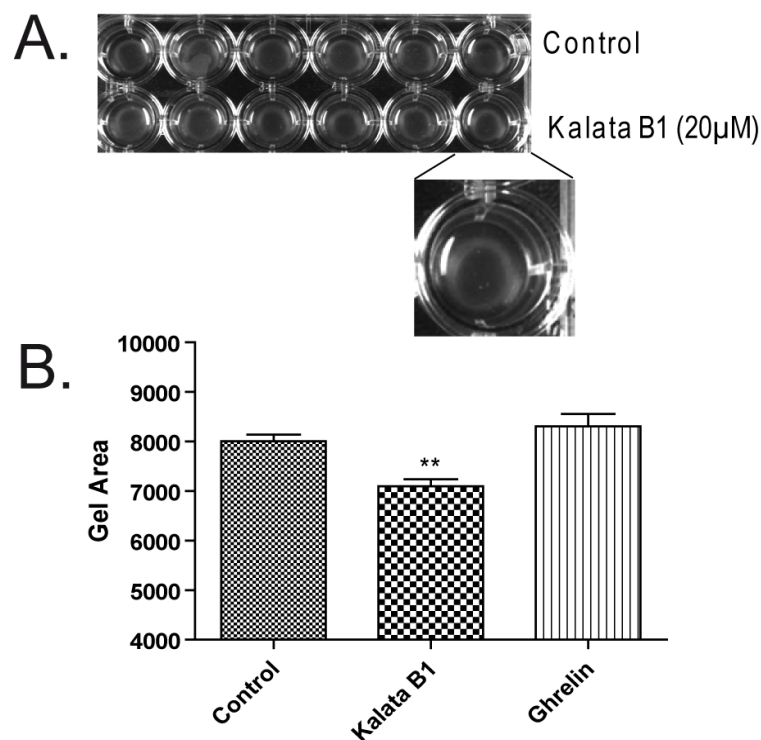


Abb. 19: Uterusmuskel - Kontraktilitätsassay mit Kalata B1

(A.) Repräsentatives Kontraktilitätsexperiment von hTERT-HM Zellen (kultiviert in DMEM/ 10% Serum) wurde in Serum freiem Medium durch Inkubation mit 20 μ M Kalata B1, Ghrelin (negative Kontrolle, Uterus-Muskel-Entspannungswirkstoff) oder links ohne Zugabe des Peptids durchgeführt. Die Experimente wurden mit N=6 Zell/Kollagen Gele für jede Behandlung und Kontrollen durchgeführt. Die Kollagenkontraktion wurde als Reduktion in Zell/Kollagen Gelfläche, als Anzahl der Pixel in bestimmter Region von Interesse, mittels Fluorchem Software gemessen

(B.) Kalata B1 kontrahierte glatte Uterusmuskelzellen signifikant um etwa 13% nach 5 h ($P < 0.01$) im Vergleich zum Ausgangszustand.

(Experimente durchgeführt und Abbildung erhalten von Margaret O'Brien, Galway, Irland)

Für Kalata B1 konnte die biologische Aktivität bereits nachgewiesen werden (Abb. 19, S. 33, Gran et al., 2000.) Die Wirkung der applizierten Substanzen auf das Kollagennetz stellt dabei ein Modell für die Gewebskontraktion des Uterus dar.

Einige Fraktionen der preparativen HPLC Aufreinigung wurden bereits zu dieser pharmakologischen Testung der uterotonischen Wirkung an die Kollaborateurin in Irland (Margaret O'Brien, Galway Irland) geschickt. Die weitere Charakterisierung der pharmakologischen Wirkung und der Nachweis, dass die zyklotidinduzierten Uteruskontraktionen über GPCRs erfolgen, kann durch Anwendung bekannter GPCRs Antagonisten (Indomethacin, COX-2 Hemmer, Atosiban, Nifedipin oder β -Agonisten) vor Applikation der Peptide erfolgen. Neben der anti-Neurotensin Wirkung von Cyclopsychotrid A (Witherup et al., 1994) wären dies die ersten Zyklotide, für die eine Wirkung auf GPCRs beschrieben wird. GPCRs stellen eine große Gruppe an Angriffspunkten für verschiedene Arzneistoffe dar - etwa die Hälfte aller verwendeten Arzneistoffe wirkt über diese Rezeptoren - jedoch werden lediglich ca. 60 Rezeptoren medizinisch genutzt.

Weitere pharmakologische Tests von einzelnen Fraktionen oder gereinigten Peptiden wie „one-point“ oder „full radio-ligand“ Bindungsstudien und Luciferase-Reporter-Gen Assays können im 96/384-Loch Platten durchgeführt werden, um Aussagen über die Funktionalität (agonistisch/antagonistisch) der an GPCRs angreifenden Proben treffen zu können. Im Rahmen dieser Experimente können auch noch andere GPCRs leicht in die Testung miteinbezogen werden.

Die Untersuchung hinsichtlich der uterotonischen Wirkung dieser Peptide bringt auch pharmako-ökonomische Aspekte mit sich, da uterotonische und tokolytische Substanzen in der Schwangerschaft und während der Geburt häufig eingesetzt werden. Es werden zur Zeit β_2 -Agonisten wie Ritodrin und Terbutalin, PG-Synthesehemmer, Kalziumantagonisten oder OT Antagonisten angewendet. Die Gefahren und Nebenwirkungen, vor allem kardiovaskuläre Zwischenfälle der aktuell verwendeten Arzneistoffe sind jedoch für Mutter und Kind zum Teil beträchtlich. Es besteht also eine große Nachfrage nach Substanzen mit selektiver Wirkung auf die glatten Muskelzellen des Uterusgewebes.

Uterotonisch aktive Zyklotide stellen somit, nicht zuletzt auch aufgrund ihrer enormen Stabilität und Strukturvielfalt, potenzielle neue Leitsubstanzen für die Entwicklung neuer Arzneimittel dar.

3 ÜBERARBEITUNG DER ARZNEIBUCHMONOGRAPHIEN KOLAEXTRAKT UND KOLAFLUIDEXTRAKT

3.1 Einleitung

3.1.1 Kola – Botanik und Inhaltsstoffe

Die Gattung Cola, zu der etwa 50-60 Arten gezählt werden, gehört zur Familie der Malvaceae (*Malvengewächse*), Untergattung Sterculioideae. Heimat dieser bis zu etwa 20 m hohen Bäume ist das tropische Afrika, insbesondere - als weltweit größter Produzent - Nigeria. Durch den Anbau wurden jedoch einige Arten weit verbreitet und kommen auch in tropischen Teilen Süd- und Mittelamerikas sowie Indiens und Ostasiens vor (Seitz et al., 1992; Wichtl und Löw, 2009). Die drogenliefernden Arten sind vor allem *Cola nitida* (VENT.) SCHOTT et ENDL. und *Cola acuminata* (P. BEAUV.) SCHOTT et ENDL. welche auch als Stammpflanzen im Europäischen

Arzneibuch (Ph. Eur.) genannt werden. Weitere Arten sind *C. anomala* K.SCHUM., *C. ballayi* CORNU ex HEKKEL, *C. cordifolia* R.BR., sowie *C. sphaerocarpa* A.CHEVAL und *C. verticillata* STAPF ex CHEV., die vor allem in Afrika lokale Bedeutung als Kult-, Arznei- und Genussmittel besitzen (Rätsch, 2007; Seitz et al., 1992).

Verwendete Pflanzenteile sind die Samen,

fälschlicherweise oftmals als Kolanüsse bezeichnet, da hier die größten Mengen an Alkaloiden zu finden sind. Auch die Unterscheidung der am



Abb. 20: Kolasamen (übernommen aus Niemenak et al, 2008)

häufigsten verwendeten Arten *C. nitida* und *C. acuminata* erfolgt über die morphologischen Charakteristika der Samen (Abb. 20, S. 36)

Hauptinhaltsstoffe der Samen und wirksamkeitsbestimmend sind die Purinalkaloide Koffein und Theobromin. Weiters enthalten sind Polyphenole und große Mengen an Stärke. Der Gehalt an Purinalkaloiden (Abb. 21) liegt zwischen 0,6 bis 3,7%, wobei der Hauptanteil auf Koffein fällt. Die Ph. Eur. schreibt daher für die Monographie Kolasamen einen Mindestgehalt von 1,5% Koffein vor.

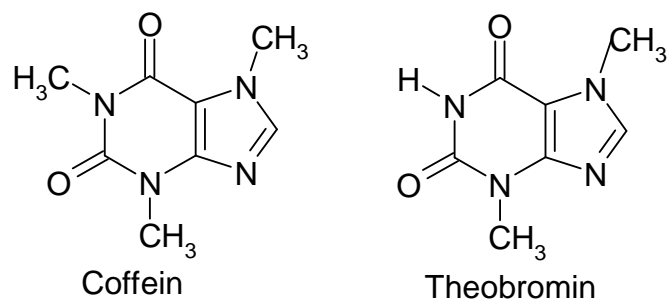


Abb. 21: In Kola enthaltene Purinalkaloide - Koffein und Theobromin

Da Koffein vor allem in den noch nicht getrockneten Nüssen als Komplex mit Catechinen vorliegt, wurde es früher oftmals fälschlicherweise als Colanin bezeichnet (Seitz et al., 1992).

Polyphenolische Komponenten sind vor allem (+)-Catechin und (-)-Epicatechin (Abb. 22), die Procyanidine B₁ und B₂ (Atawodi et al., 2007) sowie daraus weiter kondensierte Gerbstoffe unterschiedlichen Polymerisationsgrades.

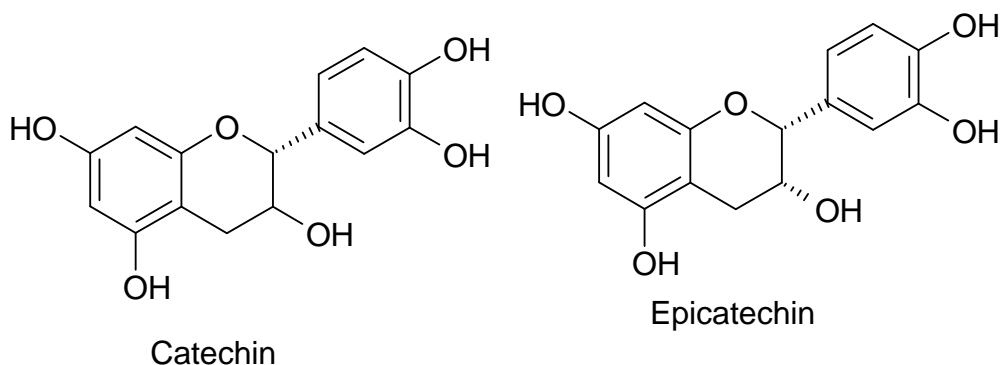


Abb. 22: In Kola enthaltene Polyphenole - Catechin und Epicatechin

Neben bis zu 45% Stärke findet man auch noch geringe Mengen an Zucker, Proteinen und Mineralstoffen (Niemenak et al., 2008; Seitz et al., 1992; Wichtl und Löw, 2009).

3.1.2 Anwendung, Wirkungen und pharmakologische Daten

Die wichtigste Wirkung und damit auch die häufigste Anwendung von Kolasamen und seiner Zubereitungen ist die anregende, ZNS-stimulierende Wirkung des enthaltenen Koffeins. Pharmakologisch gesehen greift Koffein auf Adenosin A₁ und A₂ Rezeptoren an und wirkt dort antagonistisch. Vereinfacht gesehen wird dadurch die zentral hemmende Wirkung von Adenosin auf die Ausschüttung von Acetylcholin, Noradrenalin, Dopamin, GABA und Serotonin aufgehoben und so eine ZNS-Anregung erreicht. Die sich daraus ergebende Anwendung zur Anregung bei Müdigkeit und Steigerung der Aufmerksamkeit ist lange bekannt und wird weltweit geschätzt (Hänsel und Sticher, 2010).

Der zweite wichtige Wirkmechanismus der Methylxanthine ist die Hemmung der Phosphodiesterasen (PDEs), deren Aufgabe der Abbau von cyclischem Adenosinmonophosphat (cAMP), einem wichtigem sekundären Botenstoff, ist. Bei Hemmung des Abbaus ist die Wirkung von cAMP verstärkt, was zu einer Erschlaffung der glatten Muskulatur führt, wodurch es zu einer Weitstellung der Bronchien und peripheren Gefäßen kommt. Dieser Effekt ist jedoch bei Koffein weit schwächer ausgeprägt als der Adenosinantagonismus.

Die Hemmung der PDEs führt auch zu einer gesteigerten Magensäuresekretion (Hänsel und Sticher, 2010).

In der traditionellen afrikanischen Medizin werden daher auch die frischen Samen nicht nur zur Anregung bei Müdigkeit, zur Unterdrückung von Hunger

und Durst, sondern auch zur Steigerung der Magensaftsekretion vor Mahlzeiten gekaut. Die gemahlene Samen werden aufgrund ihres hohen Gehalts an den aus Catechinen polymerisierten Procyanidinen gegen Diarrhoe eingenommen und auch bei Wunden oder Entzündungen aufgelegt. Neben dieser Bedeutung als Arznei- und Genußmittel besitzt die Droge eine bedeutende Rolle im kultischen und rituellen Leben der Einheimischen (Rätsch, 2007; Seitz et al., 1992).

Fern ihrer tropischen Heimat werden Extrakte aus Kolasamen ebenso geschätzt und in bekannten Genussmitteln gerne konsumiert, darunter in verschiedene Cola-Limonaden, als weltweit bekanntestes Beispiel Coca-Cola®, aber auch in österreichischen Produkten wie Vöslauer® Balance Limette-Kolanuss, Willi Dungal Rauchfreie Pause Tee, Octain Brainbar, um nur einige Beispiele zu nennen. Bei diesen nicht-medizinischen Anwendungen steht die anregende und konzentrationssteigernde Wirkung von Koffein im Vordergrund. Auch in zahlreichen Arzneibüchern findet man immer wieder Monographien von verschiedenen Zubereitungen aus Kolasamen, wie Trocken- und Fluidextrakte, Tinkturen oder Weine (Seitz et al., 1992). Fertigarzneimittel und Phytopharmaka sind derzeit nicht auf dem Markt.

3.2 Material und Methoden

3.2.1 Material

3.2.1.1 Zubereitungen

Die Untersuchungen wurden an den dankenswerterweise von den Firmen Gatt-Koller und Pharmonta aus Österreich und von Finzelberg GmbH (Deutschland) zur Verfügung gestellten, industriell gefertigten Zubereitungen (Tab. 5 und Tab. 6) durchgeführt.

Tab. 5: Untersuchungsmaterial Kolaextrakt

Nr.:	Herkunft	Chargen- bzw.	Ablaufdatum
1	Gatt-Koller	0647/0307	02 2009
2	Gatt-Koller	5952/0109	01 2010
3	Gatt-Koller	2316/0608	06 2009
4	Gatt-Koller	5028/1107	11 2008
5	Gatt-Koller	1739/0508	05 2009
6	Gatt-Koller	2344/0609	06 2010
7	Finzelberg	09010469	k. A.
8	Finzelberg	08018847	k. A.

Tab. 6: Untersuchungsmaterial Kolafluidextrakt

Nr.:	Herkunft	Chargen- bzw. Kontrollnummer	Ablaufdatum
1	Gatt-Koller	4493/1008 1109	04 2009
2	Gatt-Koller	2767/0708 1109	01 2009
3	Gatt-Koller	0759/0309 1209	09 2009
4	Gatt-Koller	4946/1105 1209	05 2006
5	Gatt-Koller	3194/0808 1109	02 2009
6	Gatt-Koller	4265/0909 3809	03 2010
7	Pharmonta	PH-094/09	02 2009
8	Pharmonta	PH-482/09	05 2010

Da diese Zubereitungen nicht mehr stark verbreitet angewendet werden und somit meist nur wenige Chargen pro Jahr produziert werden, wurden im Hinblick auf eine bessere statistische Aussagekraft auch Proben verwendet, deren Mindesthaltbarkeitsdatum schon überschritten war.

3.2.1.2 Reagenzien

Für die Herstellung der Proben- und Referenzlösungen für die Dünnschichtchromatographie (DC) sowie der mobilen Phasen der DC und HPLC wurden folgende Reagenzien verwendet:

- Aqua dest.
- Koffein, Fluka (Buchs, Schweiz)
- Ethanol 96%, VWR
- Ethylacetat, VWR
- Methanol, VWR
- Iod
- Kaliumiodid
- Salzsäure, Gatt-Koller

Alle verwendeten Reagentien entsprechen bezüglich Reinheit und Gehalt den Anforderungen des Ph. Eur. Für die DC und HPTLC Prüfungen wurden Platten mit Kieselgel 60 F₂₅₄, Korngröße 10-12 µm (DC) und 5-7 µm (HPTLC) der Firma Merck (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

3.2.2 Methoden

3.2.2.1 Dünnschichtchromatographie (DC)

Zur Prüfung auf Identität wurde die Methode der Dünnschichtchromatographie herangezogen, eine in der Ph. Eur. etablierte Methode, die Identität festzustellen, mit der sich auch Verfälschungen leicht identifizieren lassen. Als Vorlage diene das System der Monographie Kolasamen (Ph. Eur. 6.). Die Prüfung erfolgt gemäß Arzneibuch sowohl auf DC als auch High Performance Thin Layer Chromatography (HPTLC) Platten.

„Untersuchungslösung: 1,0 g pulverisierte Droge (355) (2.9.12)... wird ...mit 5 ml Ethanol 60 % R versetzt... und ...anschließend abfiltriert.

Referenzlösung a: 25 mg Coffein R werden in 10 ml Ethanol 60 % R gelöst.

Referenzlösung b: 50 mg Theobromin R werden in 10 ml Fließmittel gelöst. Die Lösung wird filtriert.

Platte: DC-Platte oder HPTLC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ R

Fließmittel: Wasser R, Methanol R, Ethylacetat R (10:13:77 V/V/V)

Auftragen: 20 µl oder 5 µl; bandförmig

Laufstrecke: 10 cm oder 8 cm

Trocknen: 5 min lang an der Luft

Detektion A: im ultravioletten Licht bei 254 nm

Detektion B: Die Platte wird mit einer Mischung gleicher Volumteile Ethanol 96 % R und Salzsäure R und danach mit einer unmittelbar vor Gebrauch hergestellten Lösung von 1 g Iod R und 1 g Kaliumiodid R in 100 ml Ethanol 96% R besprüht (Ph. Eur. 6)

Entsprechend 1,00 g Droge werden 0,15 g Kolaextrakt bzw. 1,0 g Kolafluidextrakt verwendet.

3.2.2.2 Flüssigchromatographie (HPLC)

Die Gehaltsbestimmung wurde mit Hilfe der HPLC durchgeführt. Es wurde das System der Monographie Kolasamen (Ph. Eur. 6) verwendet. Für die Untersuchungen wurde an folgendem HPLC-Gerät gearbeitet (Tab. 7):

Tab. 7: Technische Daten für die HPLC-Gehaltsbestimmung von Koffein

Pumpe	Shimadzu LC-10AD
Detektor	Shimadzu SPD-M10A
Degasser	Shimadzu DGU-14A
Auto-Injektor	Shimadzu SIL-10AD
System-Controller	Shimadzu SCL-10A
Software	LC solution
Säule	Thermo Hypersil Keystone BDS C18 (5µm)

„Untersuchungslösung: 1,00 g (m1) pulverisierte Droge (355) (2.9.12)... wird in Methanol R gelöst und ...mit Methanol R zu 200,0 ml verdünnt. 20,0 ml Lösung... werden ...mit der mobilen Phase zu 50,0 ml verdünnt.

Referenzlösung: 30,0 mg (m2) Coffein CRS und 15,0 mg Theobromin R werden in einem 100-ml-Messkolben in der mobilen Phase zu 100,0 ml gelöst. 10,0 ml Lösung werden in einem 100-ml-Messkolben mit der mobilen Phase zu 100,0 ml verdünnt.

Säule

– Größe: $l = 0,25 \text{ m}$, $\varnothing = 4,6 \text{ mm}$

– Stationäre Phase: octadecylsilyliertes Kieselgel zur Chromatographie R (5 µm)

Mobile Phase: Methanol R, Wasser R (25:75 V/V)

Durchflussrate: $1 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$

Detektion: Spektrometer bei 272 nm (Ph. Eur. 6)“

Entsprechend 1,00 g Droge werden 0,15 g Kolaextrakt bzw. 1,00 g Kolafluidextrakt verwendet.

3.2.2.3 Ethanolgehalt

Die Bestimmung des Ethanolgehalts über die Bestimmung der relativen Dichte mittels Pyknometer wurde nach der allgemeinen Monographie 2.9.10 Ethanolgehalt und Ethanolgehaltstabelle (Ph. Eur. 6) in Form einer Doppelbestimmung durchgeführt.

„... In den Destillationskolben werden 25,0 ml der bei $20 \pm 0,1$ °C abgemessenen Zubereitung gegeben, mit 100 bis 150 ml destilliertem Wasser R verdünnt und mit einigen Siedesteinchen versetzt. Nach Anbringen des Vorstoßes und Aufsetzen des Kühlers werden mindestens 90 ml in einen 100-ml-Messkolben destilliert. Das auf $20 \pm 0,1$ °C gebrachte Destillat wird mit destilliertem Wasser R von $20 \pm 0,1$ °C zu 100,0 ml verdünnt. Die relative Dichte wird bei $20 \pm 0,1$ °C mit Hilfe eines Pyknometers bestimmt... (Ph. Eur. 6)“

3.2.2.4 Trocknungsverlust

Der Trocknungsverlust wurde nach der allgemeinen Monographie 2.8.17 Trocknungsverlust von Extrakten (Ph. Eur. 6) in Form einer Doppelbestimmung durchgeführt.

„In ein Wägegglas mit flachem Boden von etwa 50 mm Durchmesser und etwa 30 mm Höhe werden rasch 0,50 g des fein pulverisierten Trockenextrakts eingewogen. Nach 3 h langem Trocknen im Trockenschrank bei 100 bis 105 °C wird der Rückstand im Exsikkator über Phosphor(V)-oxid R oder Silicagel R

erkalten gelassen und gewogen. Das Ergebnis wird in Prozent (m/m) berechnet.

(Ph. Eur. 6)“

3.3 Ergebnisse und Diskussion

3.3.1 Ergebnisse

Die dünnschichtchromatographische Prüfung auf Identität wurde sowohl auf DC als auch HPTLC Platten durchgeführt. Wie in den Abbildungen zu sehen ist, erreicht man mit dem verwendeten Fließmittelsystem (MeOH:EtOAc:H₂O; 13:77:10; V/V/V) eine gute Auftrennung zwischen Theobromin und Koffein. (Abb. 23 und Abb. 24) Sowohl bei Detektion A unter UV₂₅₄ als auch bei Detektion B unter Tageslicht sieht man die jeweils erwarteten Zonen.

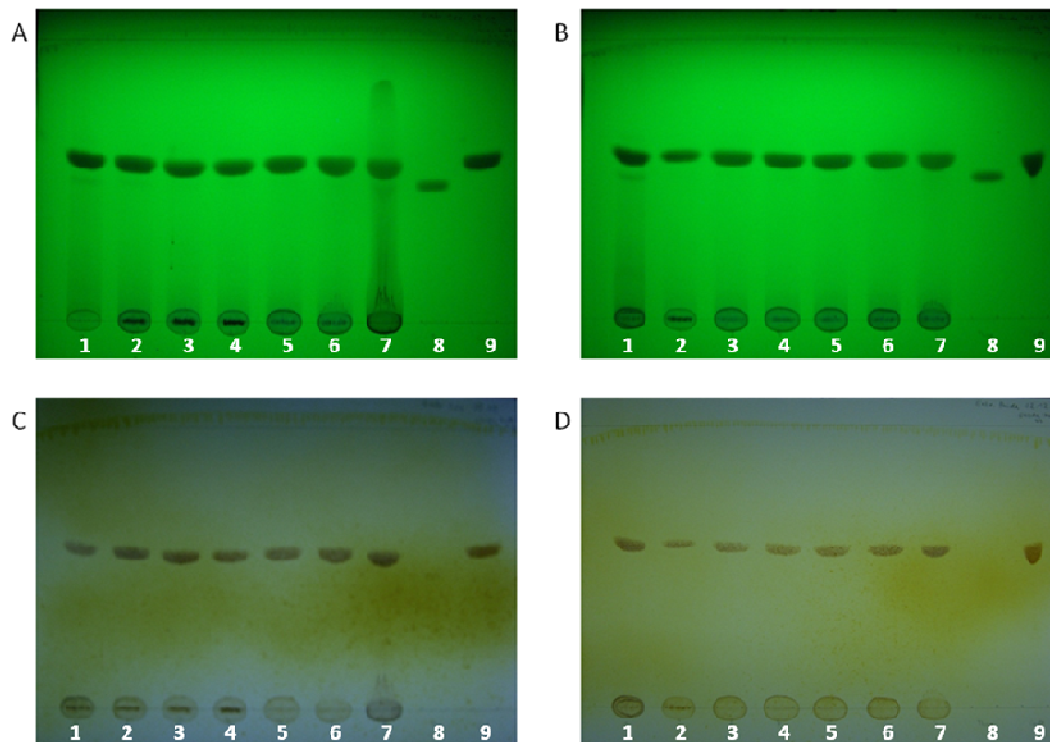


Abb. 23: DC-Chromatogramme der Trocken- und Fluidextrakte

FM: MeOH:EtOAc:H₂O (13:77:10); Auftragemenge jeweils 20 µl (A) Trockenextrakte 1-7 Detektion A UV₂₅₄; (B) Fluidextrakte 1-7 Detektion A UV₂₅₄; (C) Trockenextrakte 1-7 Detektion B nach Besprühen mit Iodlösung im Tageslicht; (D) Fluidextrakte 1-7 Detektion B nach Besprühen mit Iodlösung im Tageslicht

1-7: Kolaextrakte Nr. 1-7 (0,03 mg/ml) bzw. Kolafluidextrakte Nr. 1-7 (0,2 mg/ml)

8: Referenzlösung Theobromin (5 mg/ml)

9: Referenzlösung Koffein (2,5 mg/ml)

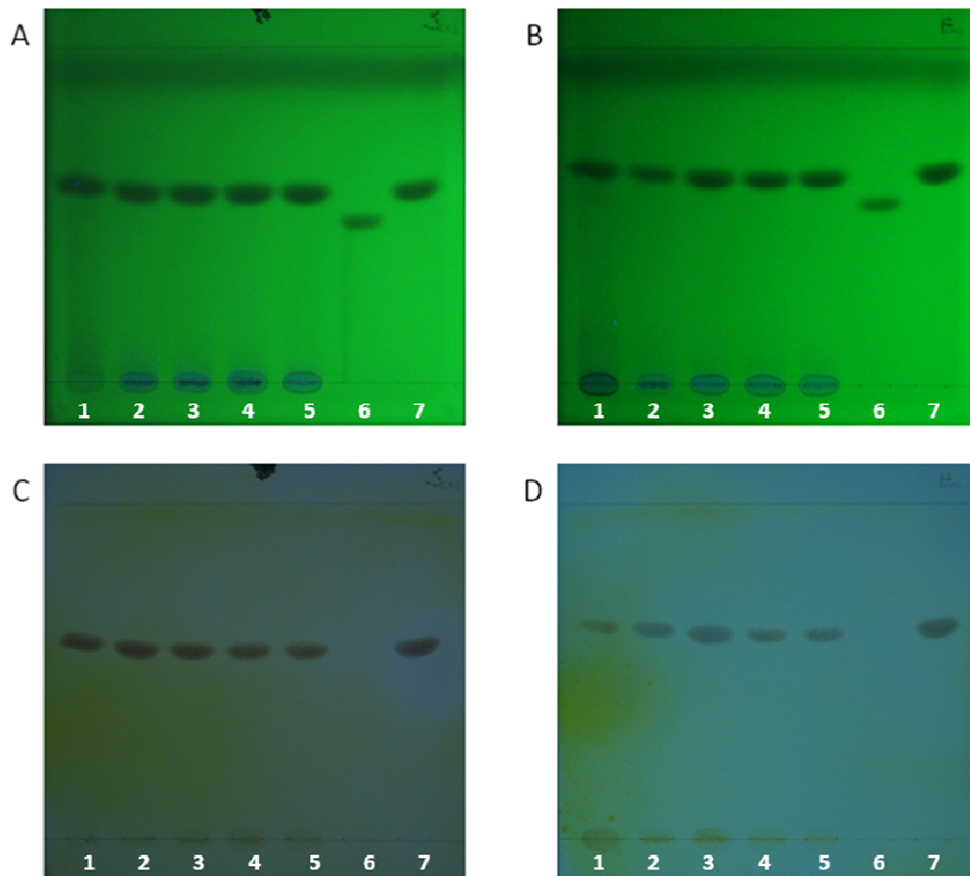


Abb. 24: HPTLC-Chromatogramme der Trocken- und Fluidextrakte

FM: MeOH:EtOAc:H₂O (13:77:10); Auftragemenge jeweils 5 µl (A) Trockenextrakte 1-5 Detektion A UV₂₅₄; (B) Fluidextrakte 1-5 Detektion A UV₂₅₄; (C) Trockenextrakte 1-5 Detektion B nach Besprühen mit Iodlösung im Tageslicht; (D) Fluidextrakte 1-5 Detektion B nach Besprühen mit Iodlösung im Tageslicht

1-5: Kolaextrakte Nr. 1-7 (0,03 mg/ml) bzw. Kolafluidextrakte Nr. 1-7 (0,2 mg/ml)

6: Referenzlösung Theobromin (5 mg/ml)

7: Referenzlösung Koffein (2,5 mg/ml)

Nach der Prüfung auf Identität der untersuchten Proben, erfolgte die Gehaltsbestimmung nach dem in der Ph. Eur. angegebenen Verfahren zur Bestimmung von Koffein und Theobromin in Kolasamen und lieferte folgende Werte, die aus nachstehenden Tabellen (Tab. 8 und Tab. 9, S. 49) zu entnehmen sind. In den Chromatogrammen der Referenzlösung (Abb.25, S. 48) und des Kolafluidextrakts K.Nr. 4493 (Abb. 26, S. 48) sieht man sehr schön die Auftrennung zwischen den Peaks von Theobromin (RT~5.6 min) und Koffein (RT~14.1 min).

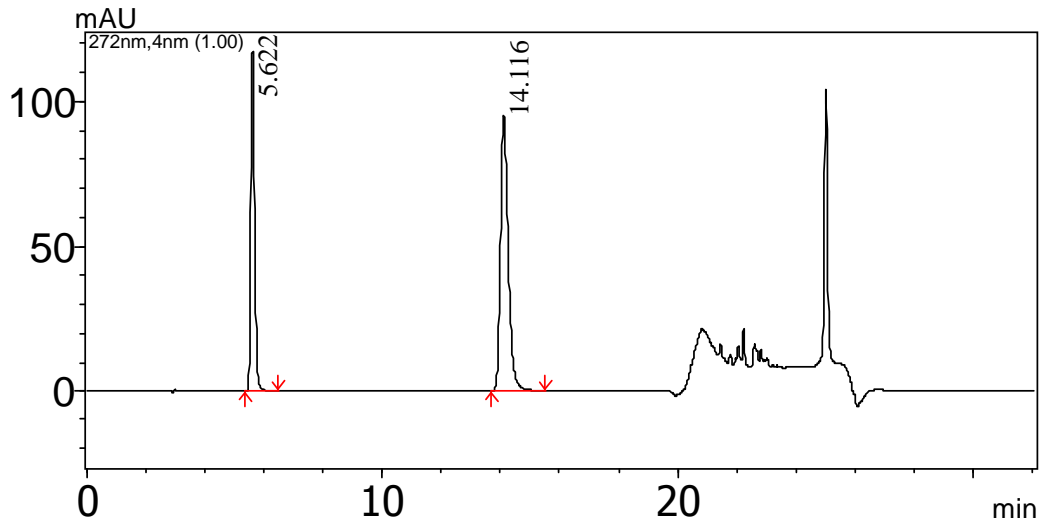


Abb. 25: HPLC-Chromatogramm der Koffein-Gehaltsbestimmung der Referenzlösung Koffein und Theobromin

Koffein: 0,03 mg/ml; Theobromin: 0,0015 mg/ml; mobile Phase: 25% Methanol, isokratisch

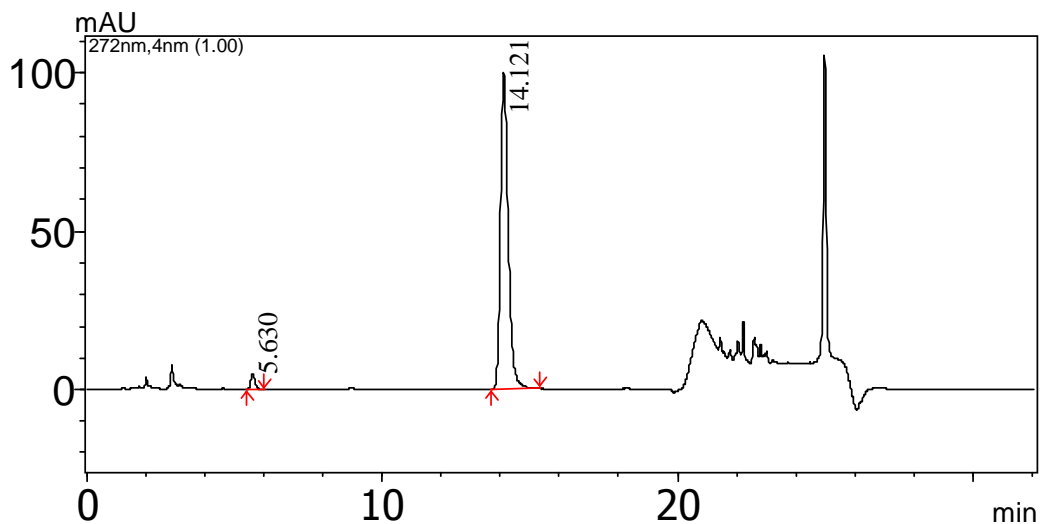


Abb. 26: HPLC-Chromatogramm der Koffein-Gehaltsbestimmung des Kolafluidextrakts K.Nr. 4493

Kolafluidextrakt: 0,002 mg/ml, mobile Phase: 25% Methanol, isokratisch

Die Chromatogramme der durchgeführten Doppelbestimmung aller Trocken- und Fluidextrakte sind dem Anhang zu entnehmen (S. xxi bis xxiv).

Für die Zubereitungen ‚Kolaextrakt‘ liegen die ermittelten Werte zwischen 9,42 und 10,75 Prozent Koffein. Die aktuellen Grenzen des ÖAB sind 9,75 bis 10,25 Prozent Gesamtalkaloide, bestimmt als Koffein.

Tab. 8: Ergebnis der HPLC-Gehaltsbestimmung von Koffein der Kolaextrakte
m(coff)...Einwaage Koffein der Referenzlösung, PA(probe)...Peakfläche der Probe, 50...Aliquotierungsfaktor, m(probe)...Einwaage, PA(coff)...Peakfläche Koffein

K.Nr.:	m(coff)	PA(probe)	50	m(probe)	PA(coff)	Gehalt (%)	Mittelwert	gerundet
Ch.Nr. 08018847	0,03045	2063609	50	0,1649	1761807	10,8144821	10,752766	10,75
	0,03045	2035107	50	0,1645	1761807	10,6910489		
Ch. Nr. 09010469	0,03045	2040107	50	0,168	1761807	10,494038	10,500557	10,5
	0,03045	1970906	50	0,1621	1761807	10,5070758		
K.Nr.2344	0,03045	1684762	50	0,1535	1761807	9,48482121	9,4210717	9,42
	0,03045	1751988	50	0,1618	1761807	9,35732212		
K.Nr.5952	0,03045	1832326	50	0,1652	1761807	9,58499016	9,5531665	9,55
	0,03045	1792614	50	0,1627	1761807	9,52134279		
K.Nr.2316	0,03045	1689501	50	0,1536	1761807	9,5053083	9,6127535	9,61
	0,03045	1808682	50	0,1608	1761807	9,72019869		
K.Nr.0647	0,03045	1905117	50	0,1605	1761807	10,2575959	10,28565	10,29
	0,03045	1947762	50	0,1632	1761807	10,313705		
K.Nr.1739	0,03045	1734369	50	0,1594	1761807	9,40269081	9,6290431	9,63
	0,03045	1826996	50	0,1602	1761807	9,85539544		
K.Nr.5028	0,03045	1757690	50	0,1592	1761807	9,54109431	9,4945223	9,49
	0,03045	1814875	50	0,166	1761807	9,44795031		

Die ermittelten Werte der Zubereitungen Kolafluidextrakt liegen zwischen 1,4 und 1,6 Prozent Koffein mit einer Ausnahme (K.Nr.4265). Die aktuellen Grenzen des ÖAB sind 1,4 bis 1,6 Prozent Gesamtalkaloide, bestimmt als Koffein.

Tab. 9: Ergebnis der HPLC-Gehaltsbestimmung von Koffein der Kolafluidextrakte
m(coff)...Einwaage Koffein der Referenzlösung, PA(probe)...Peakfläche der Probe, 50...Aliquotierungsfaktor, m(probe)...Einwaage, PA(coff)...Peakfläche Koffein

m in (g)	m(coff)	PA(probe)	50	m(probe)	PA(coff)	Gehalt (%)	Mittelwert	gerundet
PH-482/09	0,03045	1815794	50	1,124	1761807	1,39604442	1,397152	1,4
	0,03045	1786638	50	1,1042	1761807	1,39825955		
K.Nr.4265	0,03045	1063135	50	1,1032	1761807	0,83278546	0,8367498	0,8
	0,03045	1112463	50	1,1435	1761807	0,84071419		
K.Nr.2767	0,03045	2104074	50	1,1575	1761807	1,57086542	1,5699382	1,6
	0,03045	1848673	50	1,0182	1761807	1,56901095		
K.Nr.0759	0,03045	1825871	50	1,0288	1761807	1,53369183	1,5353829	1,5
	0,03045	1960452	50	1,1022	1761807	1,537074		
K.Nr.3194	0,03045	2020499	50	1,1187	1761807	1,5607882	1,5675309	1,6
	0,03045	1999336	50	1,0975	1761807	1,57427365		
K.Nr.4493	0,03045	2114531	50	1,1984	1761807	1,52479418	1,5288206	1,5
	0,03045	2029737	50	1,1443	1761807	1,53284711		
PH-094/09	0,03045	1793302	50	1,1169	1761807	1,38751636	1,391542	1,4
	0,03045	1831969	50	1,1344	1761807	1,39556758		
K.Nr.4946	0,03045	1959864	50	1,1305	1761807	1,49814669	1,5004873	1,5
	0,03045	2125980	50	1,2225	1761807	1,502828		

Die Ergebnisse des Trocknungsverlusts sind aus nachstehender Tabelle (Tab. 10) zu entnehmen. Die aktuellen Grenzen des ÖAB liegt, wie jene der Monographie Extracta (Ph. Eur. 6) bei maximal 5% Trocknungsverlust.

Tab. 10: Ergebnis der durchgeführten Doppelbestimmung des Trocknungsverlust der Kolaextrakte

Probe	Einwaage (g)	Auswaage (g)	Trocknungsverlust (%)
K.Nr. 1739*	0,5086	0,4876	4,13
	0,5228	0,4985	4,65
K.Nr. 0647*	0,504	0,4887	3,04
	0,5463	0,5288	3,2
K.Nr. 5952	0,5065	0,4962	2,03
	0,5083	0,4973	2,16
K.Nr. 2316*	0,5013	0,4868	2,89
	0,5179	0,5031	2,86
K.Nr. 5028*	0,5197	0,4895	5,83
	0,5208	0,4916	5,61
Ch.Nr.08018847	0,5014	0,4779	4,69
	0,5167	0,4929	4,61
Ch.Nr.09010469	0,5085	0,4917	3,30
	0,5025	0,4850	3,48
K.Nr. 2344	0,5089	0,4906	3,56
	0,5013	0,4838	3,49

Die Werte der Ethanolgehaltsbestimmung sind aus nachfolgender Tabelle (Tab. 11) zu entnehmen. Die Prüfung konnte jedoch nur für 2 Proben durchgeführt werden, da die anderen Proben in zu geringen Mengen vorhanden waren. Das ÖAB fordert einen Mindestgehalt von 48,0 % (v/v) Ethanol.

Tab. 11: Ergebnis der durchgeführten Doppelbestimmung des Ethanolgehalts der Kolafluidextrakte

Probe	Ethanolgehalt %(v/v)
PH-482/09	51,8
	51,8
K.Nr. 4265	49,4
	49,3

3.3.2 Diskussion

Anstelle des nasschemischen Nachweises der Alkaloide werden nach Ph. Eur. 6 die Purinalkaloide Koffein und Theobromin mit einer dünnschichtchromatographischen Prüfung nachgewiesen. Wie in den Abbildungen (Abb. 23, S. 46 und Abb. 24, S. 47) ersichtlich ist, eignet sich das beschriebene DC-System der Monographie Kolasamen Ph. Eur. auch für die Identitätsprüfung der untersuchten Zubereitungen, sowohl bei Verwendung von DC (Abb. 24, S. 46) als auch HPTLC (Abb. 25, S. 47) Platten. Alle Proben zeigen bei Detektion A die erwarteten fluoreszenzmindernden Zonen auf Höhe des Koffeins bzw. Theobromins der Referenzlösungen. Wie aus den Chromatogrammen zu sehen ist, kann die Theobrominzone in den Probelösungen zu sehen sein, muss jedoch nicht. Besonders auf HPTLC-Platten mit einer Auftragemenge von lediglich 5 µl ist der Theobromingehalt aller Proben zu gering für eine Detektion. Die Detektion mittels Besprühen mit Iodlösung (Detektion B) zeigt, wie erwartet, bei allen Chromatogrammen lediglich eine braungefärbte Zone auf Höhe der Referenzlösung Koffein.

Im Gegensatz zur bisher im ÖAB angeführten gravimetrischen Bestimmung des Gesamtalkaloidgehaltes wurde zur Gehaltsbestimmung eine HPLC-Quantifizierung von Koffein herangezogen. Aufgrund der erhaltenen Werte und da laut Ph. Eur. 6 für die Droge Kolasamen lediglich ein Mindestgehalt von 1,5% Koffein gefordert ist, kann diese Methode auch für Zubereitungen dieser Droge angewendet. Eine Einstellung des Koffeingehalts der Zubereitungen ist nötig, da Coffein eine pharmakologisch stark wirksame Substanz ist. Daher wurden aufgrund der Ergebnisse der HPLC-Läufe und in Absprache mit der ÖAB-Expertenkommission die Grenzen für die Zubereitung ‚Kolaextrakt‘ mit 9,5

bis 10,5 Prozent Coffein neu gesetzt. Für die Zubereitung ‚Kolafluidextrakt‘ werden die Grenzen von 1,4 bis 1,6 Prozent beibehalten, jedoch beziehen sich die Werte nicht mehr auf den Gesamtalkaloidgehalt, sondern ausschließlich auf die Menge an Koffein.

Die Reinheitsprüfung der Trockenextrakte erfolgt durch Bestimmung des Trocknungsverlustes. Der Unterschied zwischen der Bestimmung nach ÖAB und der Bestimmung nach Ph. Eur. liegt lediglich in der Dauer der Trocknungszeit. Während das ÖAB ein Trocknen bis zur Gewichtskonstanz vorschreibt, sieht das Ph. Eur. ein einmaliges Trocknen für drei Stunden vor. Wie den in Tabelle 10 (S. 50) angeführten Werten zu entnehmen ist, eignet sich jedoch auch die Trocknungsdauer von 3 Stunden für diese Prüfung.

Die Reinheitsprüfung der Fluidextrakte wird über die Ethanolgehaltsbestimmung durchgeführt. Während man nach ÖAB die absolute Dichte bestimmt, ist es nach Ph. Eur. die relative Dichte. Des Weiteren wird die Prüfung mit anderen Volumina an Probe durchgeführt. An der Art und Weise der Durchführung selbst ändert sich hingegen nichts, daher sollte zur Anpassung der ÖAB Monographien der Ethanolgehalt in Zukunft nach Ph. Eur. bestimmt werden

Die Prüfung auf die Verunreinigungen Methanol und Isopropanol wurde bereits an die Ph. Eur. angepasst und musste daher nicht weiter bearbeitet werden.

In Anlehnung an den Aufbau der Monographien der Ph. Eur. werden die Punkte ‚Zubereitungen‘ und Dosierung in den neuen Monographien gestrichen. Die aktuellen Monographien des ÖAB sowie der Ph. Eur. sind dem Anhang zu entnehmen.

3.3.3 Vorschlag für die neuen Monographien

In Anlehnung an die Form und den Aufbau der Monographien der Ph. Eur. und aufgrund der erhaltenen Resultate der Identitäts- und Reinheitsprüfungen sowie der Gehaltsbestimmung ergeben sich die überarbeiteten Monographien, die zur Vorlage an die ÖAB-Kommission weitergeleitet wurden. Die Änderungen zu den bisherigen Monographien wurden bei der letzten Sitzung der ÖAB-Expertengruppe am 17. 02. 2010 im Bundesministerium für Gesundheit, Familie und Jugend besprochen.

3.3.3.1 Vorschlag für die neue Monographie „Eingestellter Kolaextrakt“

ÖAB 2010/045

Eingestellter Kolaextrakt
Colae extractum siccum normatum
Extractum Colae normatum

Definition

Eingestellter Kolaextrakt wird aus **Kolasamen (Colae semen, Ph. Eur.)** hergestellt.

Gehalt: 9,5 – 10,5 Prozent Coffein ($C_8H_{10}N_4O_2$; M_r 194,2).

Herstellung

Der Extrakt wird aus Kolasamen und einer Mischung aus Ethanol 96 % *R* und Wasser *R* nach einem geeigneten Verfahren hergestellt.

Eigenschaften

Beschreibung: Braunes Pulver.

Mischbarkeit: Kolaextrakt ist in Ethanol 70 % *R* klar löslich; in Ethanol 96 % *R* oder Wasser *R* löst es sich nicht klar.

Prüfung auf Identität

Dünnschichtchromatographie (Ph. Eur. 2.2.27)

Untersuchungslösung: 0,15 g Kolaextrakt wird in 5 ml Ethanol 60% R gelöst.

Referenzlösung a: 25 mg Coffein R werden in 10 ml Ethanol 60% R gelöst.

Referenzlösung b: 50 mg Theobromin R werden in 10 ml Fließmittel gelöst. Die Lösung wird filtriert.

Platte: DC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ R (5 bis 40 µm) [oder DC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ R (2 bis 10 µm)]

Fließmittel: Wasser R, Methanol R, Ethylacetat R (10:13:77, V/V/V)

Auftragen: 20 µl; bandförmig (10 mm) [oder 5 µl; bandförmig (7 mm)]

Laufstrecke: 10 cm [oder 8 cm]

Trocknen: 5 min lang an der Luft

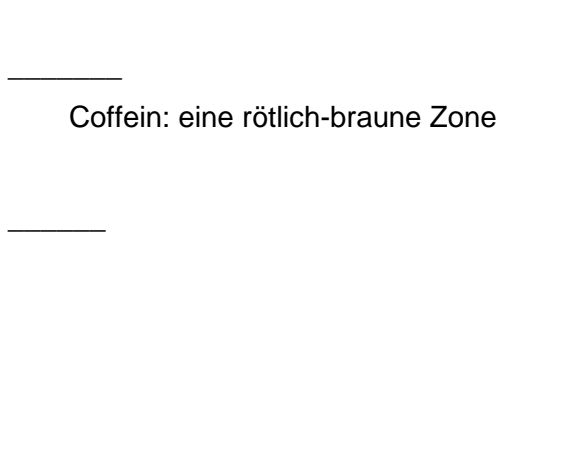
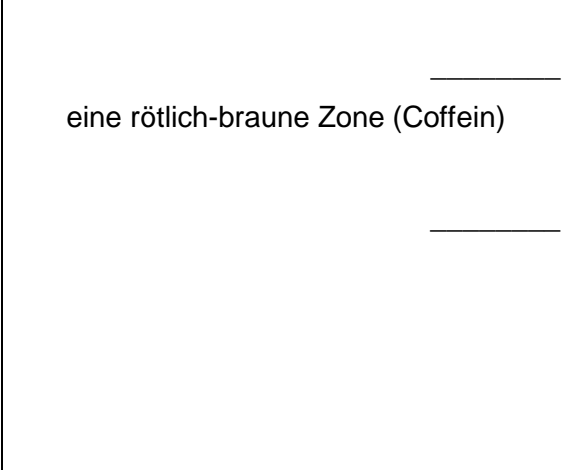
Detektion A: im ultravioletten Licht bei 254 nm

Ergebnis A: Die Zonenfolge in den Chromatogrammen der Referenzlösungen und der Untersuchungslösung ist aus nachstehender Abbildung ersichtlich. Die fluoreszenzmindernde Zone des Theobromins in der Untersuchungslösung kann, muss jedoch nicht unbedingt vorhanden sein.

Oberer Plattenrand	
_____	_____
Coffein: eine fluoreszenzmindernde Zone	eine fluoreszenzmindernde Zone (Coffein)
Theobromin: eine fluoreszenzmindernde Zone	eine fluoreszenzmindernde Zone (Theobromin)
_____	_____
Referenzlösungen	Untersuchungslösung

Detektion B: Die Platte wird mit einer Mischung gleicher Volumenteile Ethanol 96% R und Salzsäure R und danach mit einer unmittelbar vor Gebrauch hergestellten Lösung von 1 g Iod R und 1 g Kaliumiodid R in 100 ml Ethanol 96% R besprüht.

Ergebnis B: Das Chromatogramm der Untersuchungslösung zeigt eine rötlichbraune Hauptzone, die in Bezug auf Lage und Farbe der Zone im Chromatogramm der Referenzlösung a entspricht.

Oberer Plattenrand	
 <p>Coffein: eine rötlich-braune Zone</p>	 <p>eine rötlich-braune Zone (Coffein)</p>
Referenzlösung	Untersuchungslösung

Prüfung auf Reinheit

Trocknungsverlust (2.8.17): Höchstens 5,0 %

Gehaltsbestimmung

Flüssigchromatographie (Ph. Eur. 2.2.29):

Untersuchungslösung: 0,15 g Extrakt wird in Fließmittel zu 50,0 ml gelöst.

Referenzlösung: 30,0 mg Coffein CRS und 15,0 mg Theobromin R werden in einem 100 ml Meßkolben in der mobilen Phase zu 100,0 ml gelöst. 10,0 ml Lösung werden in einem 100 ml Messkolben zu 100,0 ml verdünnt.

Säule:

- Größe: $l = 0,25 \text{ m}$, $\varnothing = 4,6 \text{ mm}$
- Stationäre Phase: octadecylsilyliertes Kieselgel zur Chromatographie R (5 μm)

Mobile Phase: Methanol R, Wasser R (25:75, V/V)

Durchflussrate: 1,0 ml·min⁻¹

Detektion: Spektrometer bei 272 nm

Einspritzen: 20 µl

Der Prozentgehalt an Coffein wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{m_2 \cdot A_1 \cdot 50 \cdot p}{m_1 \cdot A_2}$$

A_1 = Fläche des Coffein-Peaks im Chromatogramm der Untersuchungslösung

A_2 = Fläche des Coffein-Peaks im Chromatogramm der Referenzlösung

m_1 = Einwaage des Extraktes in der Untersuchungslösung in Gramm

m_2 = Einwaage von Coffein CRS in der Referenzlösung in Gramm

p = Prozentgehalt an Coffein in Coffein CRS

Lagerung

Vor Licht geschützt, in gut schließenden Gefäßen.

3.3.3.2 Vorschlag für die neue Monographie „Eingestellter Kolafluidextrakt“

ÖAB 2010/046

Eingestellter Kolafluidextrakt
Colae extractum fluidum normatum
Extractum Colae fluidum normatum

Definition

Eingestellter Kolafluidextrakt wird aus **Eingestelltem Kolaextrakt (Colae extractum siccum normatum, ÖAB)** hergestellt.

Gehalt: 1,4 – 1,6 Prozent Coffein (C₈H₁₀N₄O₂; M_r 194,2).

Herstellung

Der Fluidextrakt wird aus 15 Teilen Kolaextrakt, 39 Teilen Wasser *R* und 46 Teilen Ethanol 96% *R* durch ein geeignetes Verfahren hergestellt.

Eigenschaften

Beschreibung: Klare, dunkel rotbraune Flüssigkeit.

Mischbarkeit: Kolafluidextrakt ist in Ethanol 70 % *R* klar löslich; in Ethanol 96 % *R* oder Wasser *R* löst es sich nicht klar.

Prüfung auf Identität

Dünnschichtchromatographie (2.2.27):

Untersuchungslösung: 1,0 g Kolafluidextrakt wird in 5 ml Ethanol 60% *R* gelöst.

Referenzlösung a: 25 mg Coffein *R* werden in 10 ml Ethanol 60% *R* gelöst.

Referenzlösung b: 50 mg Theobromin *R* werden in 10 ml Fließmittel gelöst. Die Lösung wird filtriert.

Platte: DC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ *R* (5 bis 40 µm) [oder DC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ *R* (2 bis 10 µm)]

Fließmittel: Wasser *R*, Methanol *R*, Ethylacetat *R* (10:13:77, V/V/V)

Auftragen: 20 µl; bandförmig (10 mm) [oder 5 µl; bandförmig (7 mm)]

Laufstrecke: 10 cm [oder 8 cm]

Trocknen: 5 min lang an der Luft

Detektion A: im ultravioletten Licht bei 254 nm

Ergebnis A: Die Zonenfolge in den Chromatogrammen der Referenzlösungen und der Untersuchungslösung ist aus nachstehender Abbildung ersichtlich. Die fluoreszenzmindernde Zone des Theobromins in der Untersuchungslösung kann, muss jedoch nicht unbedingt zu sehen sein.

Oberer Plattenrand	
<p>_____</p> <p>Coffein: eine fluoreszenzmindernde Zone</p> <p>Theobromin: eine fluoreszenzmindernde Zone</p> <p>_____</p>	<p>_____</p> <p>eine fluoreszenzmindernde Zone Coffein)</p> <p>eine fluoreszenzmindernde Zone (Theobromin)</p> <p>_____</p>
Referenzlösungen	Untersuchungslösung

Detektion B: Die Platte wird mit einer Mischung gleicher Volumenteile Ethanol 96% *R* und Salzsäure *R* und danach mit einer unmittelbar vor Gebrauch hergestellten Lösung von 1 g *Iod R* und 1 g *Kaliumiodid R* in 100 ml Ethanol 96% *R* besprüht.

Ergebnis B: Das Chromatogramm der Untersuchungslösung zeigt eine rötlichbraune Hauptzone, die in Bezug auf Lage und Farbe der Zone im Chromatogramm der Referenzlösung a entspricht.

Oberer Plattenrand	
<p>_____</p> <p>Coffein: eine rötlich-braune Zone</p> <p>_____</p>	<p>_____</p> <p>eine rötlich-braune Zone (Coffein)</p> <p>_____</p>
Referenzlösung	Untersuchungslösung

Prüfung auf Reinheit

Ethanolgehalt (2.9.10): Mindestens 48,0 Prozent (V/V)

Methanol, 2-Propanol (2.9.11): Höchstens 0,05 Prozent (V/V) Methanol und höchstens 0,05 Prozent (V/V) 2-Propanol

Gehaltsbestimmung

Flüssigchromatographie (2.2.29):

Untersuchungslösung: 1,0 g Fluidextrakt wird in Fließmittel zu 50,0 ml gelöst.

Referenzlösung: 30,0 mg Coffein CRS und 15,0 mg Theobromin R werden in einem 100 ml Meßkolben in der mobilen Phase zu 100,0 ml gelöst. 10,0 ml Lösung werden in einem 100 ml Messkolben zu 100,0 ml verdünnt.

Säule:

- Größe: $l = 0,25 \text{ m}$, $\varnothing = 4,6 \text{ mm}$

- Stationäre Phase: octadecylsilyliertes Kieselgel zur Chromatographie R (5 μm)

Mobile Phase: Methanol R, Wasser R (25:75, V/V)

Durchflußrate: $1,0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$

Detektion: Spektrometer bei 272 nm

Einspritzen: 20 μl

Der Prozentgehalt an Coffein wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{m_2 \cdot A_1 \cdot 50 \cdot p}{m_1 \cdot A_2}$$

A_1 = Fläche des Coffein-Peaks im Chromatogramm der Untersuchungslösung

A_2 = Fläche des Coffein-Peaks im Chromatogramm der Referenzlösung

m_1 = Einwaage des Extraktes in der Untersuchungslösung in Gramm

m_2 = Einwaage von Coffein CRS in der Referenzlösung in Gramm

p = Prozentgehalt an Coffein in Coffein CRS

Lagerung

Vor Licht geschützt, in gut schließenden Gefäßen.

4 ALLGEMEINE DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden phytochemische Grundlagenuntersuchungen am Beispiel von *Viola tricolor L.* sowie Experimente zur Erstellung von Arzneibuchmonographien anhand von Kolasamen Ph. Eur. durchgeführt.

Zuerst wurden 28 Pflanzenspezies hinsichtlich des Vorkommens bekannter und neuer zyklischer Peptide, so genannten Zyklotiden, untersucht. Wie durch LC/MS gezeigt wurde, konnten 3 zyklotidhaltige Pflanzen identifiziert werden. Für 8 weitere Pflanzen wurden erste Hinweise für das Vorkommen dieser Peptide gefunden. Zyklotide haben ein Molekulargewicht von etwa 2,5-4 kDa und zeichnen sich durch ihren hydrophoben Charakter aus, was zu einer späten Elution bei C18 RP-HPLC führt. Zudem besitzen sie 6 Cystein-Aminosäuren (CYS), welche durch Reduktion der ausgebildeten Disulfidbrücken und anschließender Alkylierung durch einen Massenshift bei LC/MS Analyse nachgewiesen werden können. Durch die Experimente mit LC/MS konnte gezeigt werden, dass bei den Vertretern *O. affinis* und zwei Arten von *Viola sp.* Massesignale auftraten, welche dem Molekulargewicht von Zyklotiden entsprechen und eine den Zyklotiden ähnliche Hydrophobizität aufweisen. Das Vorhandensein von 6 CYS konnte durch Analyse der reduzierten und alkylierten Extrakte dieser Pflanzen gezeigt werden. Weitere Pflanzen, nämlich *Morinda citrifolia*, *Rauwolfia tetraphylla*, *Psychotria deflexa*, *P. mortomiana*, *P. macrophylla*, *P. poeppigiana*, *P. capitata* und *P. solitudinum* lieferten erste Hinweise für das Vorhandensein von Zyklotiden in den unbehandelten Pflanzenextrakten, da ebenso Masse- bzw. Retentionssignale auftraten, welche dem Molekulargewicht und der Hydrophobizität der Zyklotide entsprechen. Eine Bestätigung durch den auftretenden Massenshift in der LC/MS Analyse nach

Reduzierung und Alkylierung lieferte keine Aussage, ob die Pflanzen wirklich Zyklotide enthalten. Mögliche Erklärungen für die fehlende Aussagekraft der Ergebnisse sind einerseits störende Verunreinigungen in den Rohextrakten der Pflanzen, andererseits der Bedarf von alternativen Analysemethoden. Weitere Experimente, wie der Einsatz alternativer Methoden der Reduzierung und Alkylierung oder die Analyse mit MALDI-TOF MS sind nötig, um eine genaue Aussage treffen zu können (Gruber et al., 2008).

Die durchgeführte Peptidaufreinigung von Rohextrakten der zyklotidhaltigen Pflanzen *V. tricolor* und *O. affinis* lieferte insgesamt 9 gereinigte Fraktionen, die für weitere Analysen zur Verfügung stehen. Neben den bekannten Peptiden Kalata B1, Kalata B2 und Kalata B6 aus dem Rohextrakt von *O. affinis* konnten 6 Peptidfraktionen aus dem Extrakt von *V. tricolor* aufgereinigt werden, welche Peptide mit bisher noch unbekanntem Molekulargewicht enthalten. Zwar weisen die Chromatogramme dieser Fraktionen bei eingesetzter UV-Detektion der analytischen HPLC nur ein einziges Signal auf, jedoch zeigt die hoch-sensitive LC/MS Analyse, dass mehrere Peptidsignale und somit ein Peptidgemisch vorhanden sein muss. Für den Erhalt reiner Peptide sind daher weitere HPLC Aufreinigungen und der mögliche Einsatz anderer Trennmethode nötig. Die gereinigten Fraktionen von *V. tricolor* können dann vor allem hinsichtlich der Struktur darin enthaltener Zyklotide untersucht werden. Durch Ermittlung der Aminosäuresequenz kann einerseits der definitive Nachweis von Zyklotiden erbracht werden, andererseits die Primärstruktur des Peptids ermittelt werden. Für die weitere Bestimmung der dreidimensionalen Struktur sind in weiterer Folge auch NMR-Experimente nötig. Des Weiteren können diese Fraktionen und die bereits bekannten Peptide von *O. affinis* für weitere pharmakologische

Tests auf dem Gebiet der uterotonischen und insektiziden Wirkung verwendet werden, um so neben Informationen über Struktur und Wirkung von Zyklotiden auch die dahinter stehenden Wirkmechanismen zu erklären. Während auf dem Gebiet der Grundlagenforschung der Inhaltsstoffe von *Viola tricolor* in Zukunft noch weitere Untersuchungen benötigt werden, sind die Inhaltsstoffe der Droge Kolasamen und der daraus hergestellten Zubereitungen sowie die phytochemischen Prüfungen schon lange bekannt und in Arzneibüchern monographiert.

Die phytochemischen Untersuchungen der im ÖAB monographierten Zubereitungen ‚Kolaextrakt‘ und ‚Kolafluidextrakt‘ wurden im Sinne einer Modernisierung und europaweiten Harmonisierung durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass die Prüfungen für die Ausgangsdroge Kolasamen Ph. Eur. auch für die daraus hergestellten Zubereitungen zu verwenden sind. So zeigten sowohl die dünnschichtchromatographische Prüfung auf Identität als auch das HPLC-Verfahren der Gehaltsbestimmung sowie die durchgeführten Reinheitsprüfungen bezüglich des Ethanolgehalts von Fluidextrakten und des Trocknungsverlusts von Trockenextrakten die erwarteten Ergebnisse und ersetzen die bisher nasschemischen und gravimetrischen Bestimmungen. Die so erstellten überarbeiteten Monographien können nun durch die ÖAB-Kommission begutachtet und in die neue Ausgabe des ÖAB übernommen werden.

Letztendlich konnten durch die Analyse von Pflanzen hinsichtlich des Vorkommens von Zyklotiden neue Erkenntnisse zum weiteren Verständnis der Verbreitung, Strukturvielfalt, der biologischen Aktivitäten und der Analytik dieser Stoffgruppe gewonnen werden, andererseits stellen die Vorschläge der

überarbeiteten Monographien Grundlagen für den Einsatz neuer Methoden zur Prüfung der Qualität pharmazeutischer Zubereitungen.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen phytochemischer Untersuchungen von traditionellen und gegenwärtig verwendeten Heil- und Arzneipflanzen sowie deren Zubereitungen steht zunächst die Analyse der Inhaltsstoffe im Vordergrund. Sind diese definiert und die Methoden der Prüfung bekannt, können Qualitätsstandards festgesetzt werden, welche in den Arzneibuchmonographien erfasst werden.

Die Identifizierung von Zyklotiden in Pflanzen, cysteinhaltigen cyclischen Peptiden, welche vor allem in Familien der Violaceen, Rubiaceen und Apocynaceen auftreten, beinhaltet die Extraktion, Aufreinigung und LC/MS Analyse von Pflanzenextrakten. Es wurden *Viola tricolor* L., eine traditionell verwendete Arzneipflanze sowie weitere Pflanzen – ausgewählt aufgrund ihrer botanischen Verwandtschaft oder ähnlicher ethnopharmakologischen Anwendung – hinsichtlich des Vorkommens von Zyklotiden untersucht.

Wie die LC/MS Analysen der 28 untersuchten Pflanzenspezies zum Vorkommen von neuen Zyklotiden zeigen, konnten in 3 Spezies aus den Familien der Rubiaceen und Violaceen Zyklotide nachgewiesen werden. Des Weiteren wurden für 8 Pflanzen der Familien der Rubiaceen, Apocynaceen und Violaceen positive Hinweise für Zyklotide erhalten, jedoch war eine genaue Aussage noch nicht möglich und es werden weitere Experimente, wie Peptidsequenzierung sowie alternative MS Methoden (MALDI-TOF) benötigt.

Darüber hinaus wurden mittels preparativer und semipreparativer HPLC aus Rohextrakten von *V. tricolor* und *Oldenlandia affinis* DC. Peptide gereinigt. Wie durch analytische HPLC und LC/MS bestätigt wurde, konnten insgesamt 9 Fraktionen gereinigt werden, welche in weitere Folge einerseits für Sequenzanalysen und Strukturaufklärung, andererseits für pharmakologische

Tests zur Klärung ihrer Wirkmechanismen und biologischen Aktivität verwendet werden können. Während *V. tricolor* hinsichtlich der Inhaltsstoffe untersucht wurde, wurden zwei Zubereitungen aus der Droge Kolasamen, deren Inhaltsstoffe schon seit langem bekannt sind, hinsichtlich der phytochemischen Prüfungen ihrer Arzneibuchmonographien überarbeitet.

Die Überarbeitung der ÖAB Monographien ‚Kolaextrakt‘ und ‚Kolafluidextrakt‘ umfasste die Modernisierung der für diese Zubereitungen vorgesehenen phytochemischen Prüfungen und eine Harmonisierung mit der Ph. Eur. Es konnte gezeigt werden, dass alle Prüfvorschriften der Monographie Kolasamen Ph. Eur., welche die Ausgangsdroge darstellt, auch für die Zubereitungen Kolaextrakt und Kolafluidextrakt geeignet sind und in den neuen Monographien verwendet werden können.

Somit wurden die ÖAB-Monographien erfolgreich an die Ph. Eur. angeglichen. Des Weiteren ist es in dieser Arbeit gelungen, neue zyklotidhaltige Pflanzen zu identifizieren und einzelne Peptidfraktionen aufzureinigen.

6 SUMMARY

The analysis of plant constituents is immensely important in the context of phytochemical investigations of medicinal plants. Once the active compounds are defined and methods for examination are known, quality standards can be assessed, which are represented in the monographs of the pharmacopoeias.

The identification of circular, cystine-rich plant peptides, so called cyclotides, which occur mainly in the family of Violaceae, Rubiaceae and Apocynaceae, includes the extraction, the purification and LC/MS analysis of plant extracts.

Viola tricolor L., a traditionally used medicinal plant, and other plants that have a botanical relation or similar ethnopharmacological use were investigated.

In total 28 plant species were analysed by LC/MS for the occurrence of cyclotides. Three species of the families of Violaceae and Rubiaceae could be identified to contain peptides similar molecular weight, hydrophobicity and cysteine content compared to cyclotides and another 8 plant species of the families of the Violaceae, Rubiaceae and Apocynaceae do contain peptides with molecular weights similar to cyclotides. It is likely that all 11 identified species contain cyclotides, but a definite conclusion cannot be made at this stage and further experiments, such as peptide sequencing and alternative MS methods (MALDI-TOF) will be needed.

Furthermore it was attempted to purify cyclotides using preparative and semipreparative HPLC out of crude extracts from *V. tricolor* and *Oldenlandia affinis* DC. As shown by analytical HPLC and LC/MS analyses, altogether 9 peptide fractions could be purified, which can be used further for sequence analysis and structure elucidation, or for pharmacological and biological experiments to characterize their mode-of-action and their activity. While *V.*

tricolor was investigated with respect to its contents, two preparations of the drug 'Kolasamen' of which its contents are known for a long time, were revised with respect to their phytochemical assays of their monographs.

The revision of the ÖAB-monographs 'cola extract' and 'cola fluidextract' included the modernization of the phytochemical investigations of these preparations and the harmonization to the European Pharmacopoeia. It could be demonstrated that all assays of the monograph 'Kolasamen Ph. Eur. ', which is the original drug, are applicable also for the preparations 'cola extract' and 'cola fluidextract' and can be used in the new monographs.

Thus the ÖAB-monographs could be successfully adapted to the European Pharmacopoeia. Furthermore, new cyclotide-containing plants were identified and several peptide-fractions were purified.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Atawodi, S.E., Pfundstein, B., Haubner, R., Spiegelhalder, B., Bartsch, H. and Owen, R.W., 2007. Content of polyphenolic compounds in the Nigerian stimulants *Cola nitida* ssp. *alba*, *Cola nitida* ssp. *rubra* A. Chev, and *Cola acuminata* Schott & Endl and their antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 55, 9824-9828

Colgrave, M.L. and Craik, D.J., 2004. Thermal, Chemical, and Enzymatic Stability of the Cyclotide Kalata B1: The Importance of the Cyclic Cystine Knot. *Biochemistry* 43, 5965-5975.

Craik, D.J., Cemazar, M. and Daly, N.L., 2006. The cyclotides and related macrocyclic peptides as scaffolds in drug design. *Current Opinion in Drug Discovery and Development* 9, 251-260.

Craik, D.J., Daly, N.L., Bond, T. and Waite, C., 1999. Plant cyclotides: A unique family of cyclic and knotted proteins that defines the cyclic cystine knot structural motif. *Journal of Molecular Biology* 294, 1327-1336.

Göransson, U., Broussalis, A.M. and Claesson, P., 2003. Expression of *Viola* cyclotides by liquid chromatography-mass spectrometry and tandem mass spectrometry sequencing of intercysteine loops after introduction of charges and cleavage sites by aminoethylation. *Analytical Biochemistry* 318, 107-117.

Gran, L., Sandberg, F. and Sletten, K., 2000. *Oldenlandia affinis* (R and S) DC: A plant containing uteroactive peptides used in African traditional medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 70, 197-203.

Gruber, C.W., 2010. Global cyclotide adventure: A journey dedicated to the discovery of circular peptides from flowering plants. *Biopolymers*, in press.

Gruber, C.W., Cemazar, M., Anderson, M.A. and Craik, D.J., 2007. Insecticidal plant cyclotides and related cystine knot toxins. *Toxicon* 49, 561-575.

Gruber, C.W., Elliott, A.G., Ireland, D.C., Delprete, P.G., Dessen, S., Göransson, U., Trabi, M., Wang, C.K., Kinghorn, A.B., Robbrecht, E. and Craika, D.J., 2008. Distribution and evolution of circular miniproteins in flowering plants. *Plant Cell* 20, 2471-2483.

Gruber, C.W., Muttenthaler, M. and Freissmuth, M., 2010. Ligand-based peptide design and combinatorial peptide libraries to target G-protein-coupled receptors. *Current Pharmaceutical Design*, in press.

Gruber, C.W. and O'Brien, M., 2010. Uterotonic plants from nature: An overview of traditionally used medicines and their bioactive components. *Planta Medica*, submitted.

Hänsel, R. und Sticher, O., 2010. Pharmakognosie Phytopharmazie. 9.Auflage, Springer Medizin Verlag, Heidelberg, 1449-1459

Ireland, D.C., Wang, C.K.L., Wilson, J.A., Gustafson, K.R. and Craik, D.J., 2008. Cyclotides as natural anti-HIV agents. *Biopolymers* 90, 51-60.

Lindholm, P., Göransson, U., Johansson, S., Claesson, P., Gullbo, J., Larsson, R., Bohlin, L. and Backlund, A., 2002. Cyclotides: A novel type of cytotoxic agents. *Molecular Cancer Therapeutics* 1, 365-369.

Mulvenna, J.P., Sando, L. and Craik, D.J., 2005. Processing of a 22 kDa Precursor Protein to Produce the Circular Protein Tricyclon A. *Structure* 13, 691-701.

Niemenak, N., Onomo, P.E., Fotso, Lieberei, R. and Ndoumou, D.O., 2008. Purine alkaloids and phenolic compounds in three Cola species and Garcinia kola grown in Cameroon. *South African Journal of Botany* 74, 629-638.

Rätsch, C., 2007. Enzyklopädie der psychoaktiven Pflanzen. 8. Auflage, AT Verlag, Aarau/Schweiz, 177-180

Schöpke, T., Hasan Agha, M.I., Kraft, R., Otto, A. and Hiller, K., 1993. Hämolytisch aktive Komponenten aus *Viola tricolor* L. und *Viola arvensis* Murray. *Scientia Pharmaceutica* 61, 145-153.

Seitz, R., Gehrman, B. und Kraus, L., 1992. In: Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis: Drogen A-D. Band 5, 5. Auflage Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 940-946

Svangard, E., Göransson, U., Hocaoglu, Z., Gullbo, J., Larsson, R., Claeson, P. and Bohlin, L., 2004. Cytotoxic Cyclotides from *Viola tricolor*. *Journal of Natural Products* 67, 144-147.

Teuscher, E., Melzig, M.F. und Lindequist, U., 2004. Biogene Arzneimittel: Ein Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie. 6. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart, 1-27

Wichtl, M. und Löw, D., Kolasamen, 2009. In M. Wichtl: Teedrogen und Phytopharmaka. 5. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, Stuttgart, 186-187

Witherup, K.M., Bogusky, M.J., Anderson, P.S., Ramjit, H., Ransom, R.W., Wood, T. and Sardana, M., 1994. Cyclopsychotride A, a biologically active, 31-residue cyclic peptide isolated from *Psychotria longipes*. *Journal of Natural Products* 57, 1619-1625.

CURRICULUM VITAE

Persönliche Daten:

Name: Johannes Köhbach

Geburtsdatum: 10. 01. 1986

Staatsangehörigkeit: Österreich

Familienstand: ledig

Ausbildung:

09/1996 – 06/2004 BGRG 8 Albertgasse, Wien

10/2005 – 06/2010 Studium der Pharmazie, Universität Wien

Berufliche Erfahrung:

08/2006 – Praktikum Bahnhofapotheke, Wiener Neustadt

07/2007 – Praktikum Apotheke zum Schutzengel, Wien 21

07/2008 – Praktikum Andromeda Apotheke, Wien 22

07-08/2009 – Praktikum Andromeda Apotheke, Wien 22

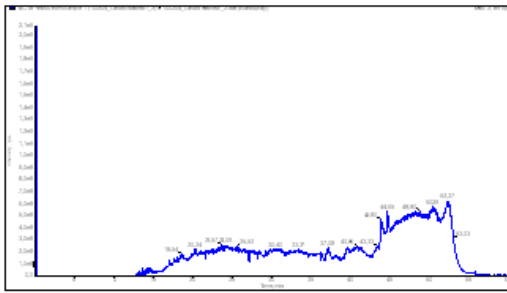
seit 2002 – Judotrainer bei JC Post-Nippon und JC Yama-Arashi

seit 03/2010 – geringfügige Beschäftigung Andromeda Apotheke, Wien 22

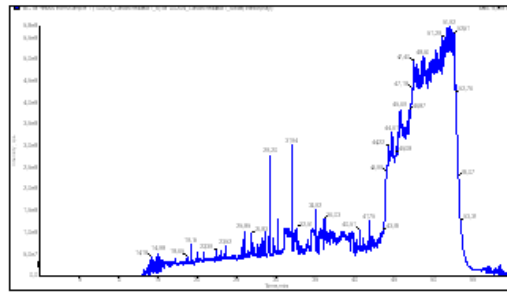
ANHANG

1. ERGEBNIS DER LC/MS ANALYSEN DES ZYKLOTID SCREENINGS	ii
2. CHROMATOGRAMME DER ANALYTISCHEN HPLC ANALYSEN ALLER FRAKTIONEN DER PEPTIDAUFREINIGUNG DES ROHEXTRAKTS VON V. <i>TRICOLOR</i>	viii
3. CHROMATOGRAMME DER ANALYTISCHEN HPLC ANALYSEN ALLER FRAKTIONEN DER PEPTIDAUFREINIGUNG DES ROHEXTRAKTS VON O. <i>AFFINIS</i>	xiii
4. MONOGRAPHIE KOLAEXTRAKT, ÖAB 2009.....	xvi
5. MONOGRAPHIE KOLAFLUIDEXTRAKT, ÖAB 2009	xviii
6. MONOGRAPHIE KOLASAMEN, PH. EUR. 6	xix
7. HPLC-CHROMATOGRAMME DER COFFEIN-GEHALTSBESTIMMUNG DER UNTERSUCHTEN KOLAEXTRAKTE UND KOLAFLUIDEXTRAKTE..	xxi

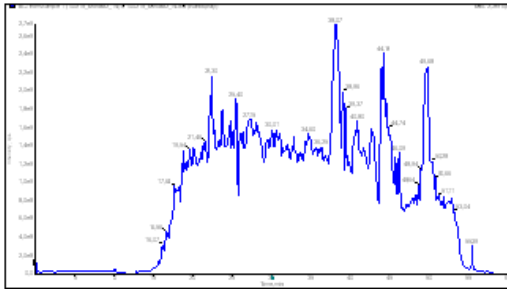
1. Ergebnis der LC/MS Analysen des Zyklotid Screenings



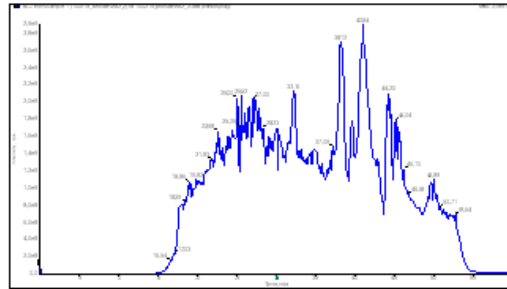
1 *Carissa bispinosa* native



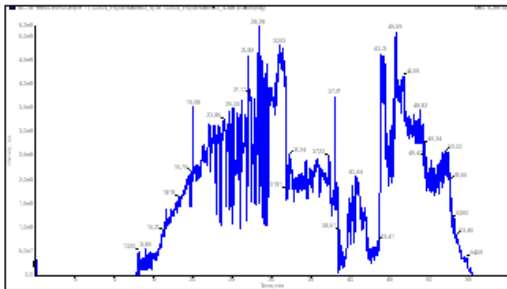
1 *Carissa bispinosa* red./alk.



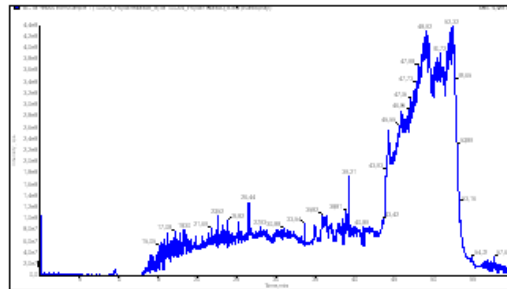
2 *Morinda citrifolia* native



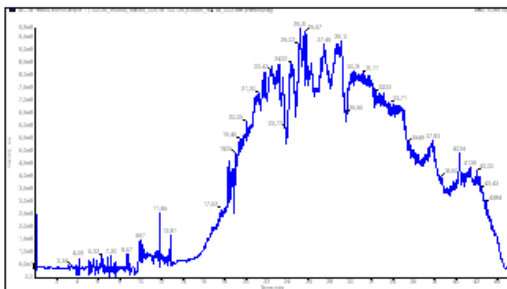
2 *Morinda citrifolia* red./alk.



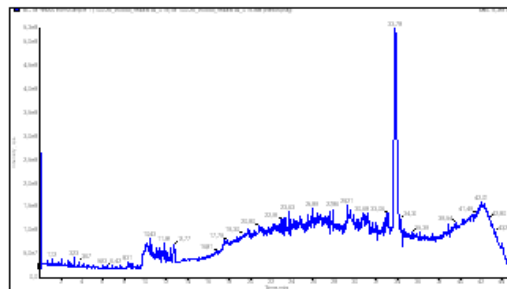
3 *Psychotria* sp. native



3 *Psychotria* sp. red./alk.

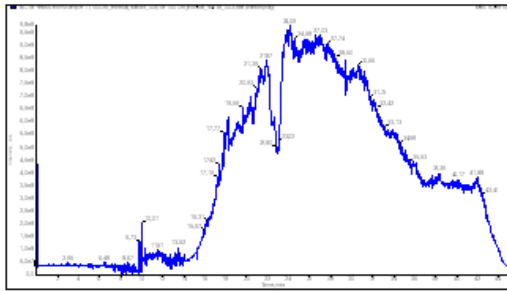


4 *Acokanthera oblongifolia* native

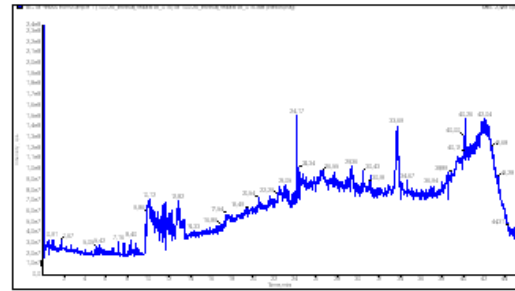


4 *Acokanthera oblongifolia* red./alk.

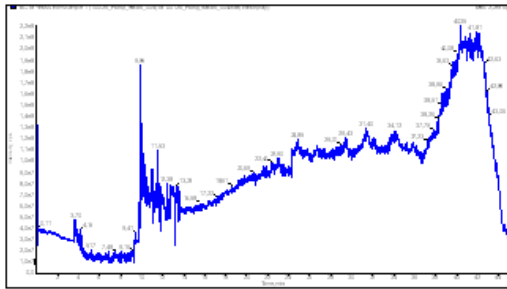
native: unbehandelten Extrakte
red./alk.: Proben nach Reduzierung und Alkylierung



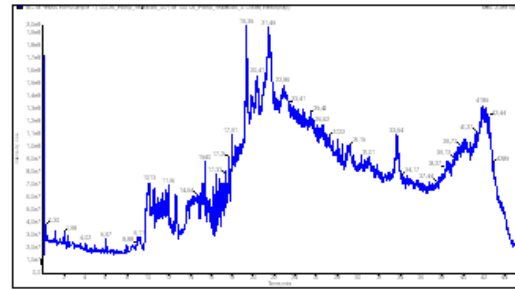
5 Bonsai tree native



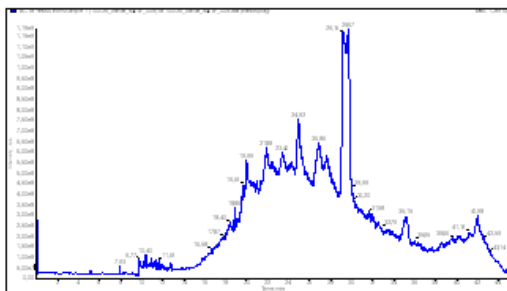
5 Bonsai tree red./alk



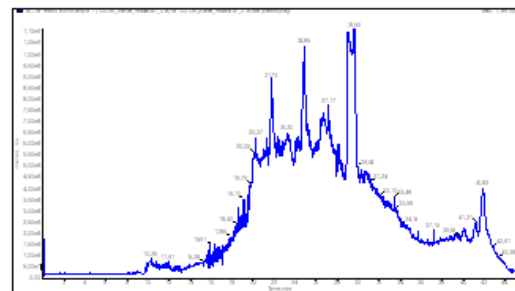
6 Hibiscus sp. native



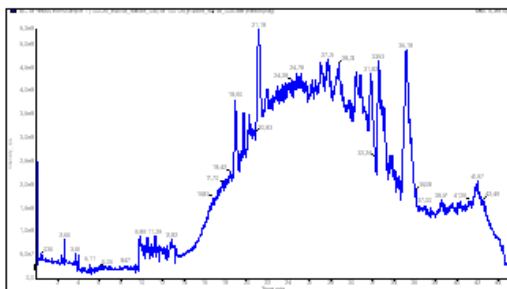
6 Hibiscus sp. red./alk.



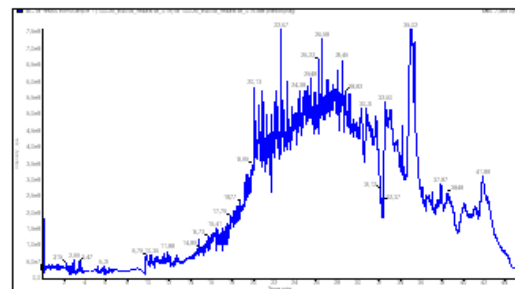
7 Sarcocephalus latifolia native



7 Sarcocephalus latifolia red./alk.

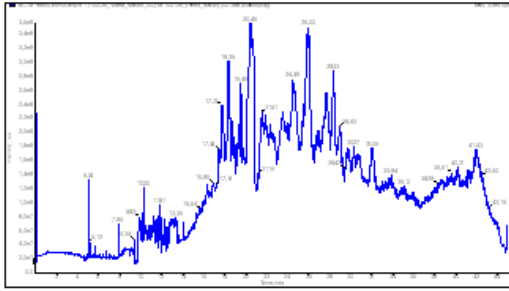


8 Euclinia longiflora native

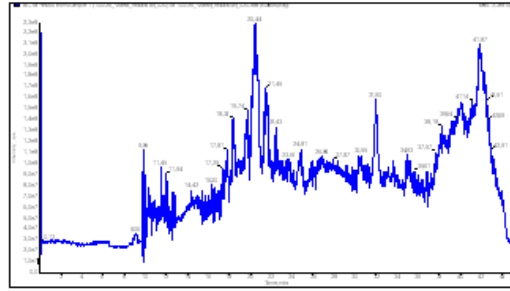


8 Euclinia longiflora red./alk.

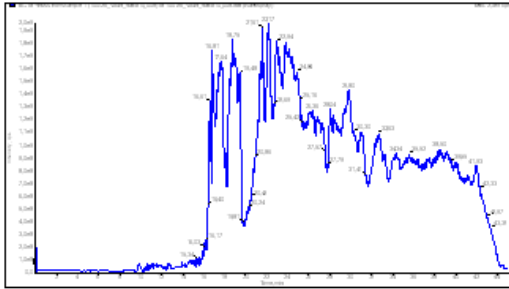
native: unbehandelte Extrakte
 red./alk.: Proben nach Reduzierung und Alkylierung



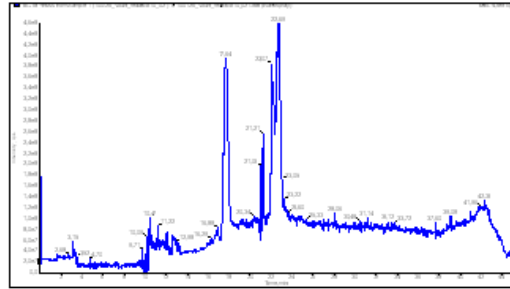
9 *Viola* sp. native



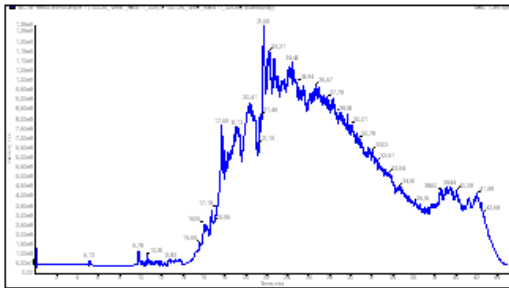
9 *Viola* sp. red./alk.



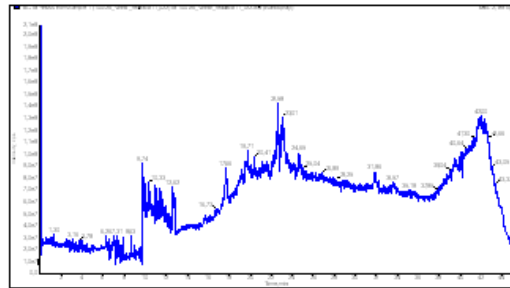
10 *Viola* sp. native



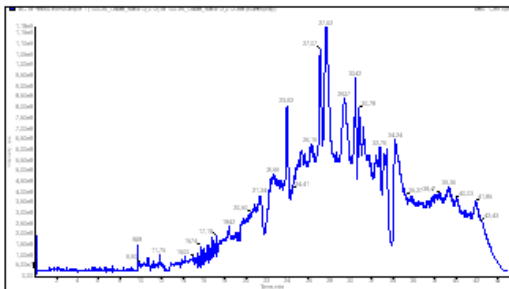
10 *Viola* sp. red./alk.



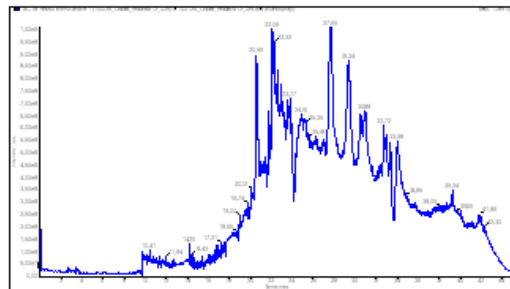
11 *Vincetoxicum hirundinaria* native



11 *Vincetoxicum hirundinaria* red./alk.

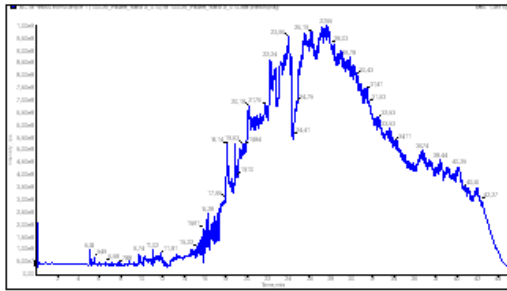


12 *Oldenlandia affinis* native

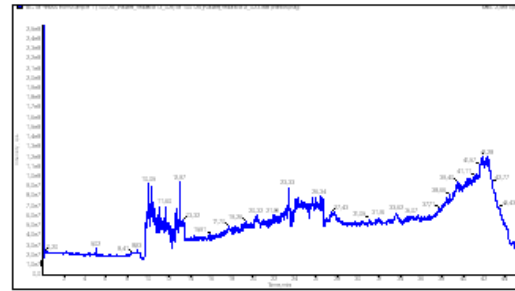


12 *Oldenlandia affinis* red./alk.

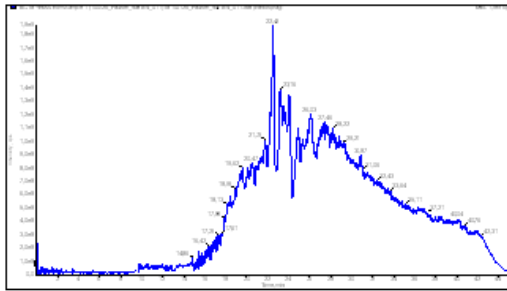
native: unbehandelte Extrakte
 red./alk.: Proben nach Reduzierung und Alkylierung



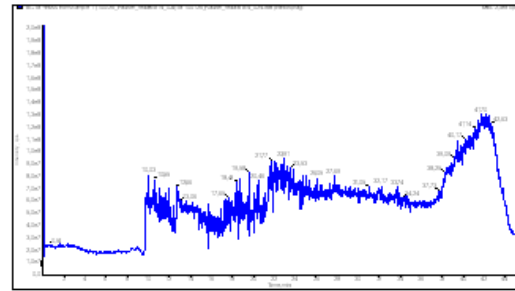
13 *Rauwolfia tetraphylla* native



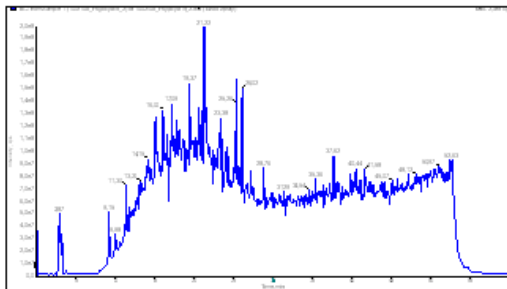
13 *Rauwolfia tetraphylla* red./alk.



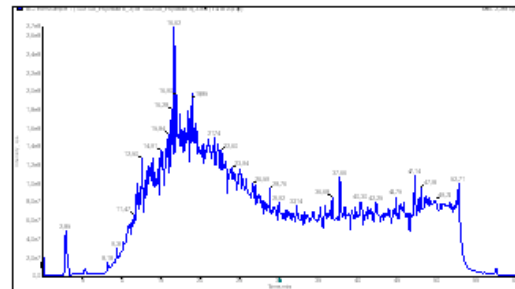
14 *Rauwolfia serpentina* native



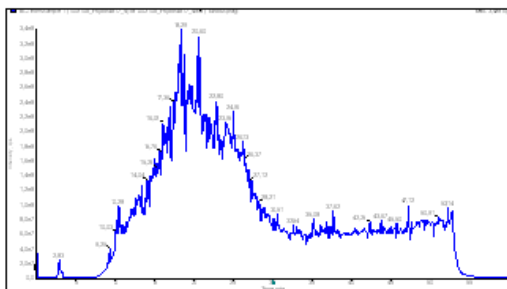
14 *Rauwolfia serpentina* red./alk.



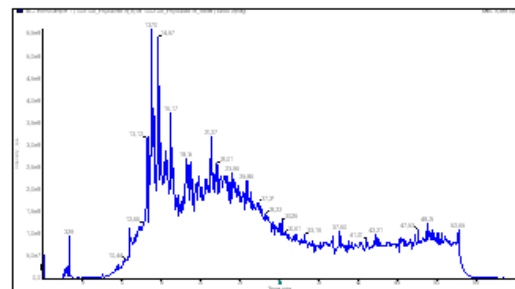
15 *Psychotria polyphlobia* native



16 *Psychotria chiapensis* native



17 *Psychotria borucana* native

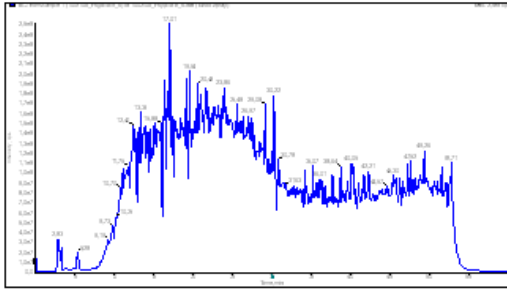


18 *Psychotria buchtienii* native

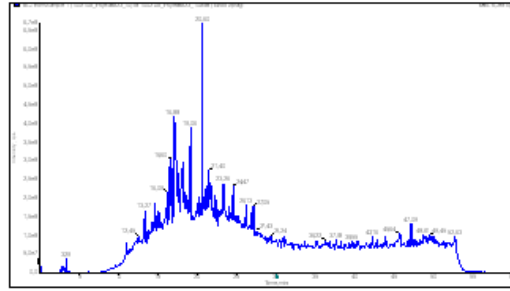
native: unbehandelte Extrakte

red./alk.: Proben nach Reduzierung und Alkylierung

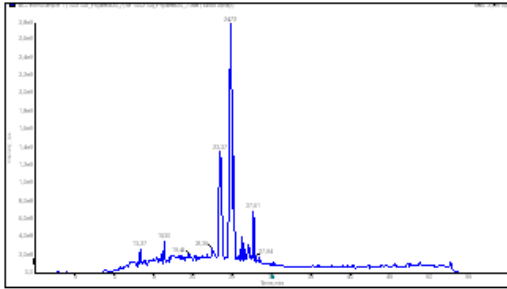
Pflanzen Nr. 15-18: keine Reduzierung und Alkylierung durchgeführt, da Spektren der unbehandelten Proben keine Hinweise für Zyklotide zeigten



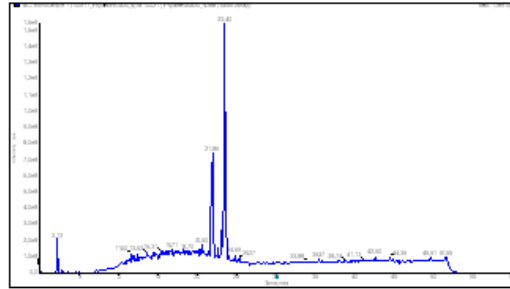
19 *Psychotria pillosa* native



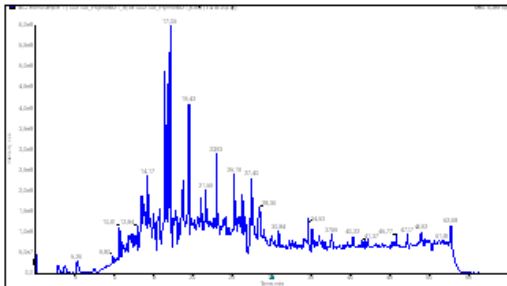
23 *Psychotria elata* native



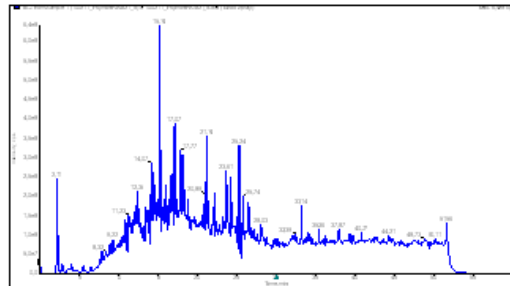
20 *Psychotria deflexa* native



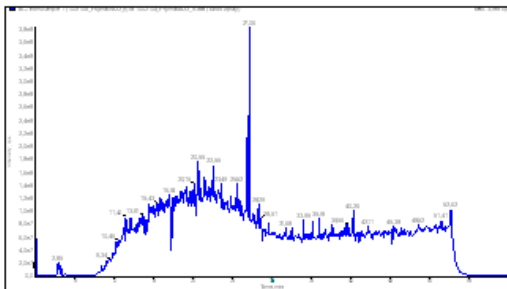
20 *Psychotria deflexa* red./alk.



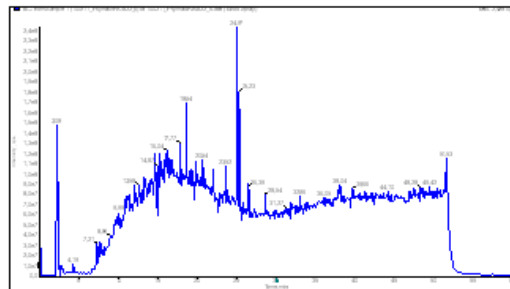
21 *Psychotria mortomiana* native



21 *Psychotria mortomiana* red./alk.



22 *Psychotria macrophylla* native

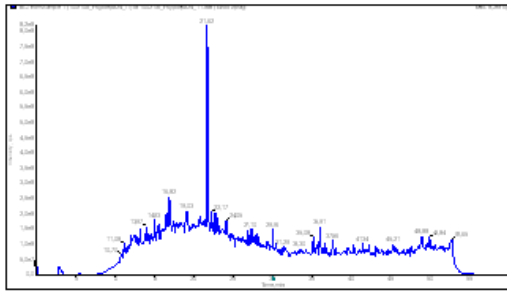


22 *Psychotria macrophylla* red./alk.

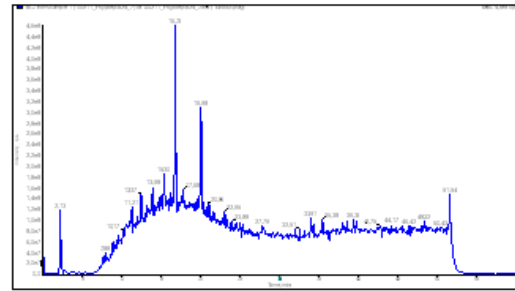
native: unbehandelte Extrakte

red./alk.: Proben nach Reduzierung und Alkylierung

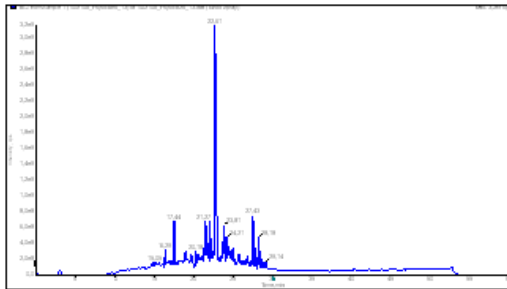
Pflanzen Nr. 19 und 23: keine Reduzierung und Alkylierung durchgeführt, da Spektren der unbehandelten Proben keine Hinweise für Zyklotide zeigten



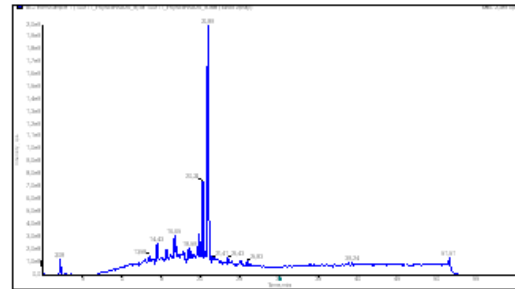
24 *Psychotria poeppigiana* native



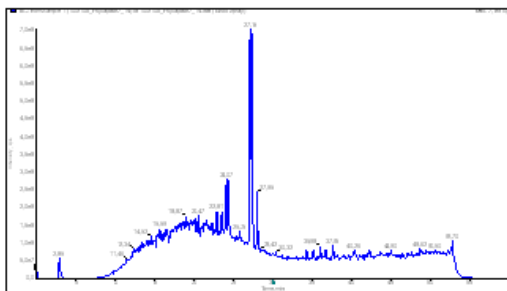
24 *Psychotria poeppigiana* red./alk.



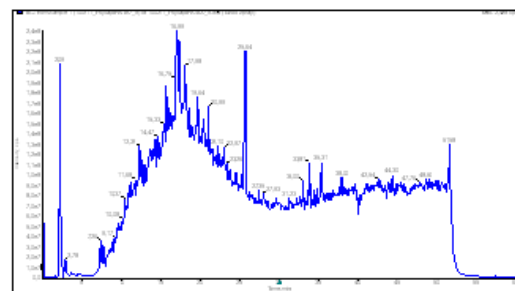
26 *Psychotria solitudinum* native



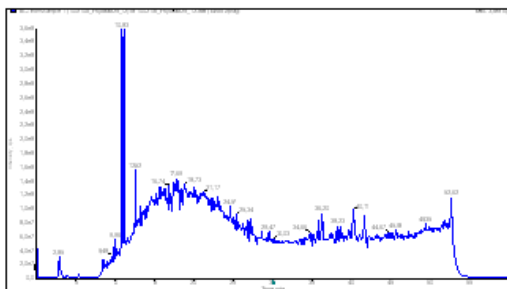
26 *Psychotria solitudinum* red./alk.



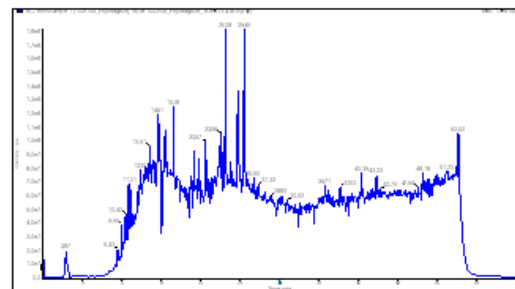
27 *Psychotria capitata* native



27 *Psychotria capitata* red./alk.



25 *Psychotria bifaria* native



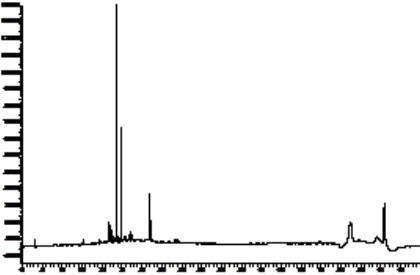
28 *Psychotria chagrensis* native

native: unbehandelte Extrakte

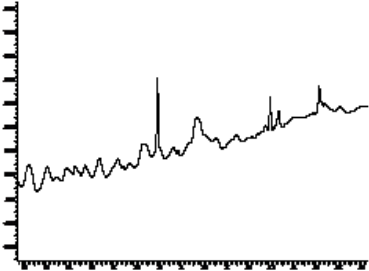
red./alk.: Proben nach Reduzierung und Alkylierung

Pflanzen Nr. 25 und 28: keine Reduzierung und Alkylierung durchgeführt, da Spektren der unbehandelten Proben keine Hinweise für Zyklotide zeigten

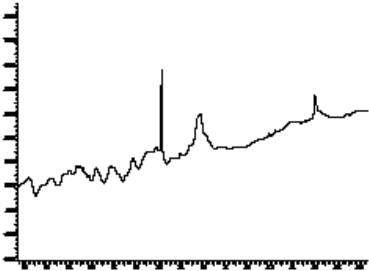
2. Chromatogramme der analytischen HPLC Analysen aller Fraktionen der Peptidaufreinigung des Rohextrakts von *V. tricolor*



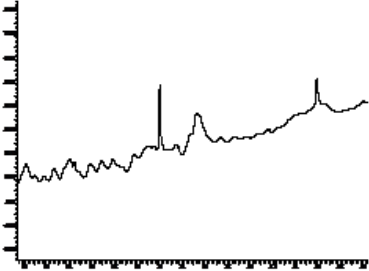
V.tricolor Rohextrakt



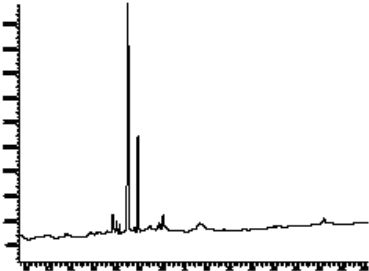
V.tricolor prep. 40-50 min



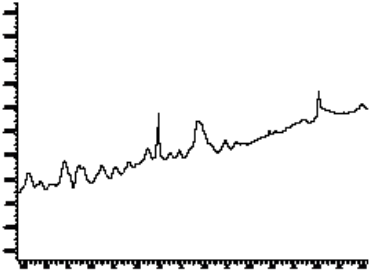
V.tricolor prep. 10-20 min



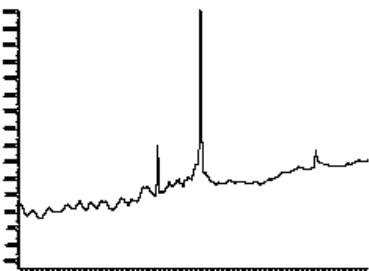
V.tricolor prep. 50-60 min



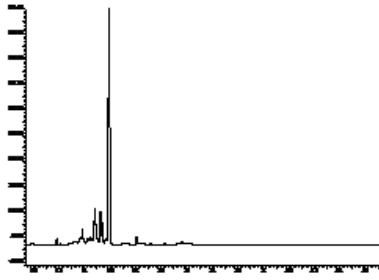
V.tricolor prep. 20-30 min



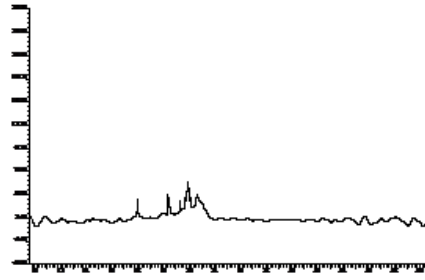
V.tricolor prep. 60-70 min



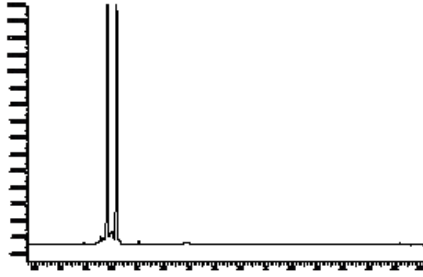
V.tricolor prep. 30-40 min



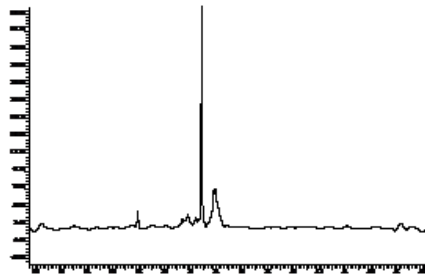
V.tricolor semiprep. 20-30-1



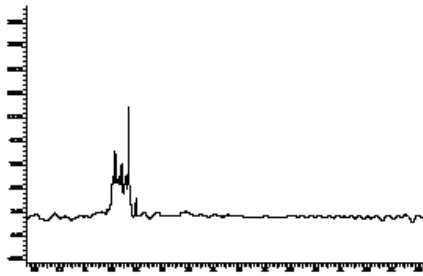
V.tricolor semiprep. 30-40-1



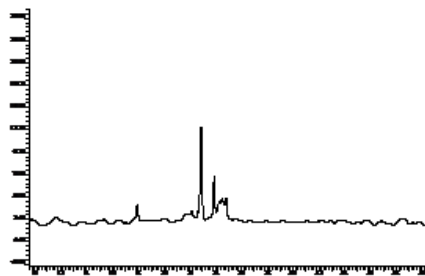
V.tricolor semiprep. 20-30-2



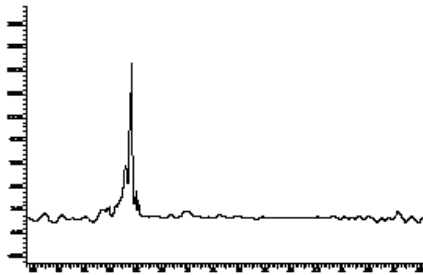
V.tricolor semiprep. 30-40-2



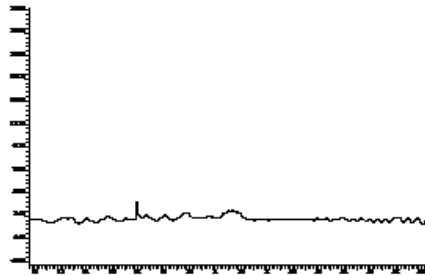
V.tricolor semiprep. 20-30-3



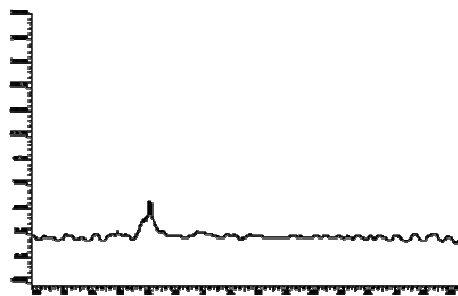
V.tricolor semiprep. 30-40-3



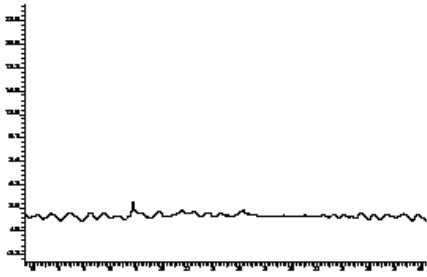
V.tricolor semiprep. 20-30-4



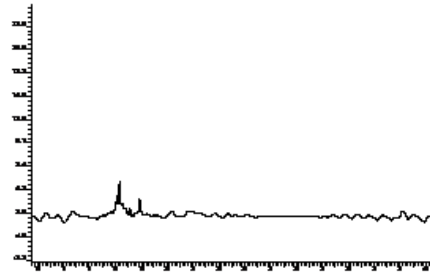
V.tricolor semiprep. 30-40-4



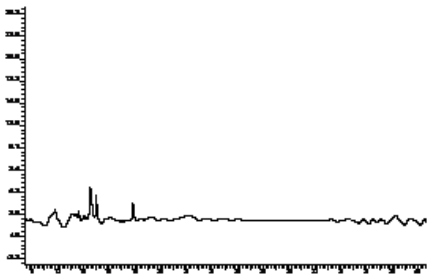
V.tricolor semiprep. 20-30-5



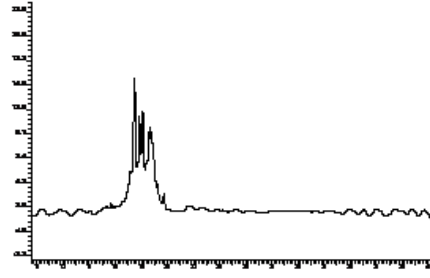
V.tricolor semiprep. 30-40-5



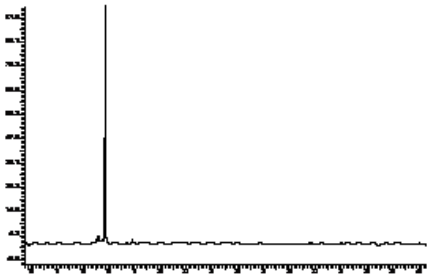
V.tricolor semiprep. 40-50-2



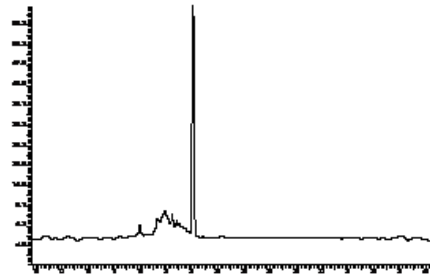
V.tricolor semiprep. 30-40-6



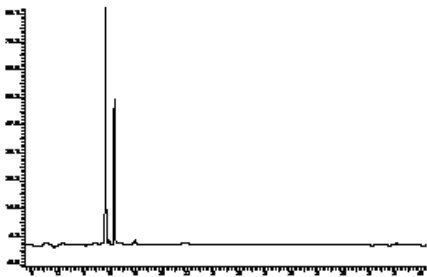
V.tricolor semiprep. 40-50-3



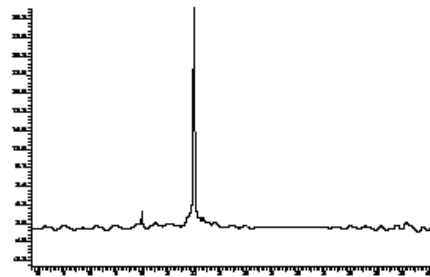
V.tricolor semiprep. 30-40-7



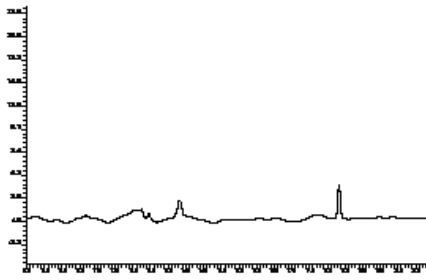
V.tricolor semiprep. 40-50-4



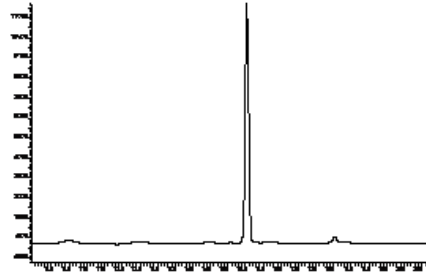
V.tricolor semiprep. 40-50-1



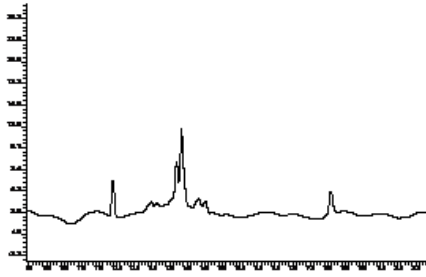
V.tricolor semiprep. 40-50-5



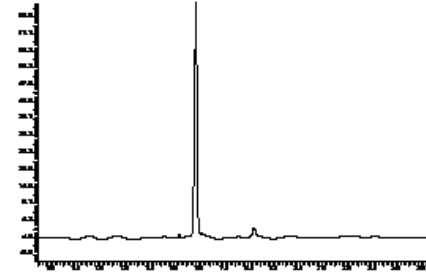
V.tricolor semiprep. 20-30-1-1



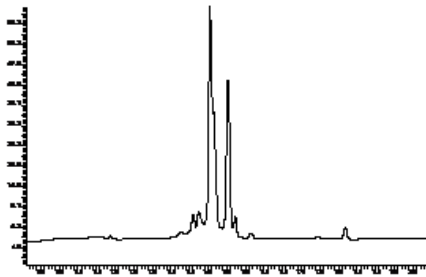
V.tricolor semiprep. 20-30-1-5



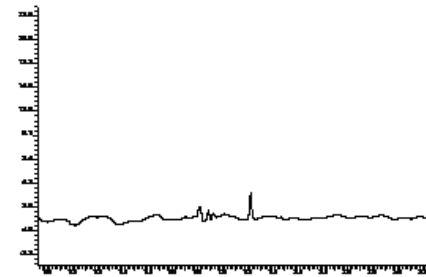
V.tricolor semiprep. 20-30-1-2



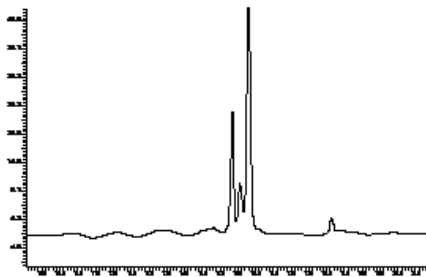
V.tricolor semiprep. 40-50-1-1



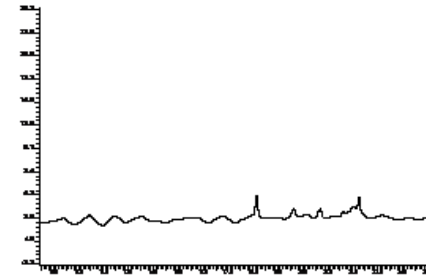
V.tricolor semiprep. 20-30-1-3



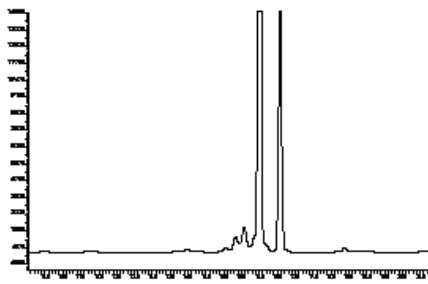
V.tricolor semiprep. 40-50-1-2



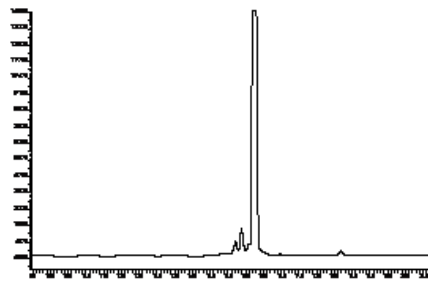
V.tricolor semiprep. 20-30-1-4



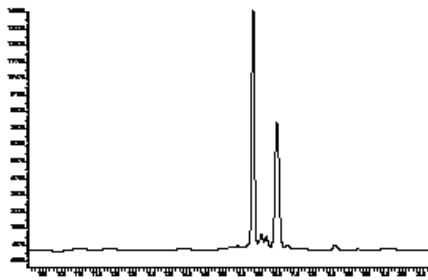
V.tricolor semiprep. 40-50-1-3



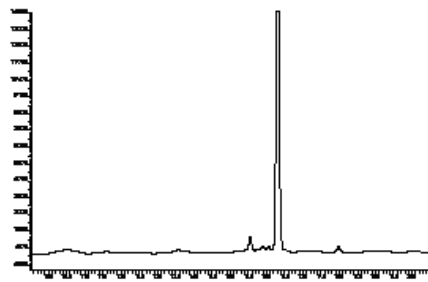
V.tricolor semiprep. 20-30-2-1



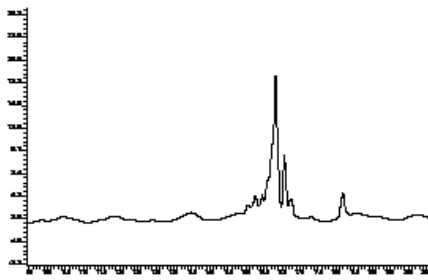
V.tricolor semiprep. 20-30-2-1-1



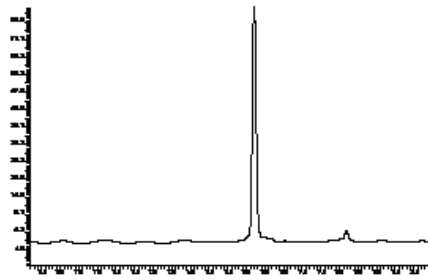
V.tricolor semiprep. 20-30-2-2



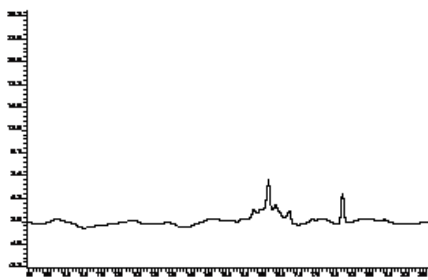
V.tricolor semiprep. 20-30-2-1-2



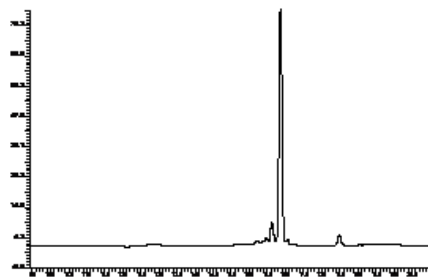
V.tricolor semiprep. 20-30-2-3



V.tricolor semiprep. 20-30-2-2-1

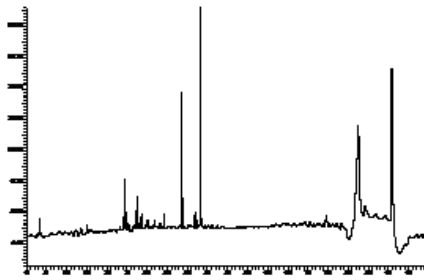


V.tricolor semiprep. 20-30-2-4

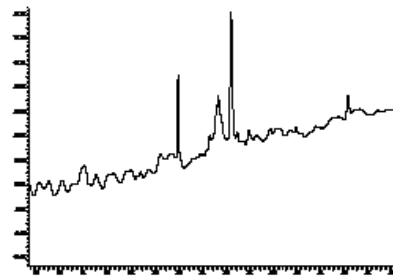


V.tricolor semiprep. 20-30-2-2-2

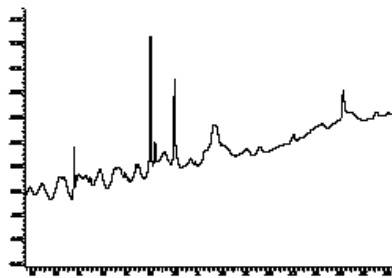
3. Chromatogramme der analytischen HPLC Analysen aller Fraktionen der Peptidaufreinigung des Rohextrakts von *O. affinis*



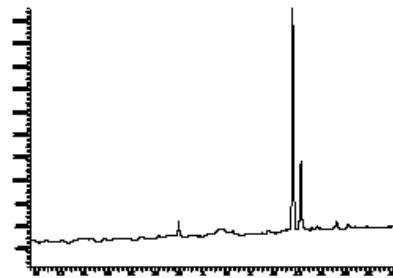
O.affinis Rohextrakt



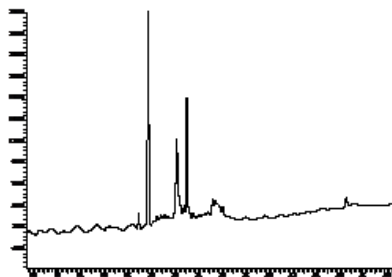
O.affinis prep. 40-45 min



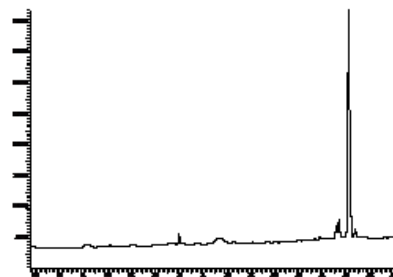
O.affinis prep. 20-30 min



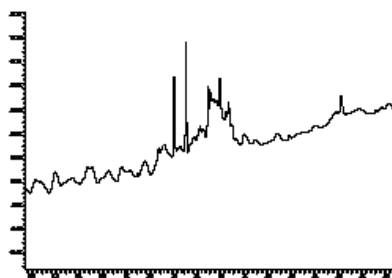
O.affinis prep. 45-50 min



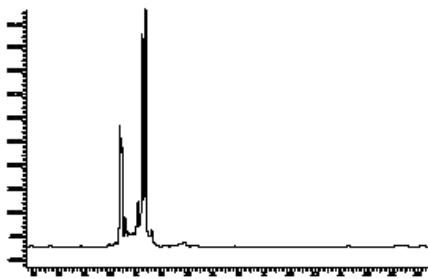
O.affinis prep. 30-35 min



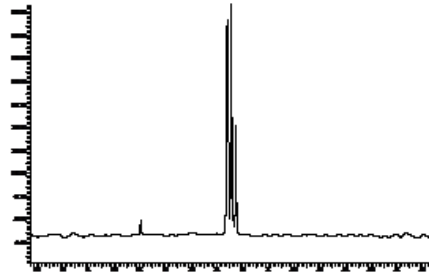
O.affinis prep. 50-55 min



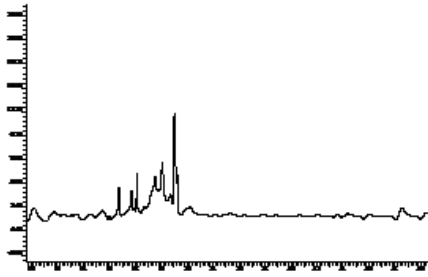
O.affinis prep. 35-40 min



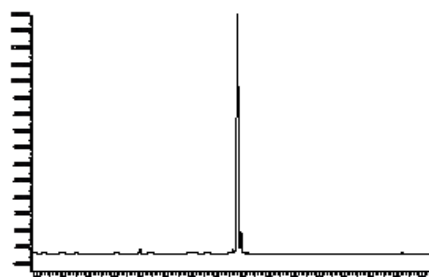
O.affinis semiprep. 30-35-1



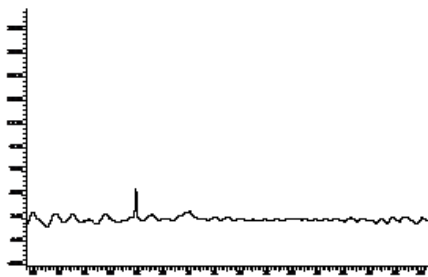
O.affinis semiprep. 50-55-3



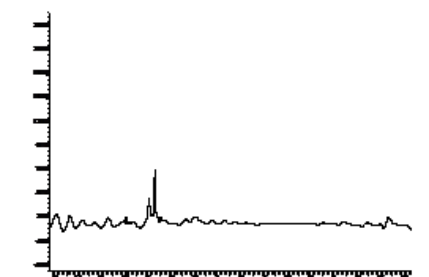
O.affinis semiprep. 30-35-2



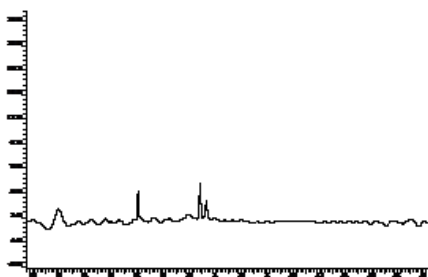
O.affinis semiprep. 50-55-4



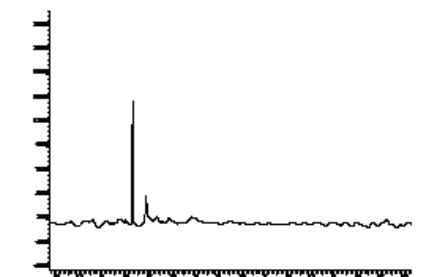
O.affinis semiprep. 30-35-3



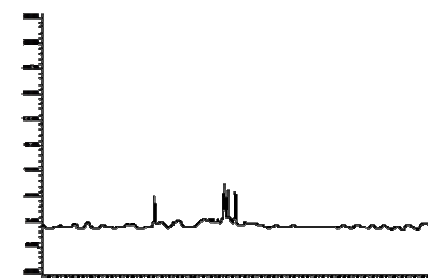
O.affinis semiprep. 45-50-1



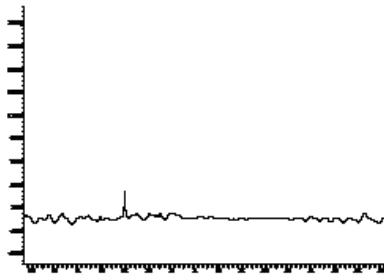
O.affinis semiprep. 50-55-1



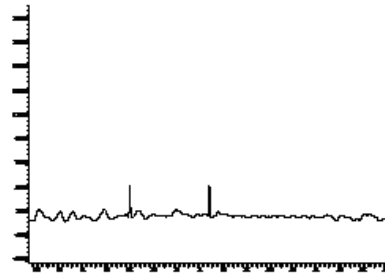
O.affinis semiprep. 45-50-2



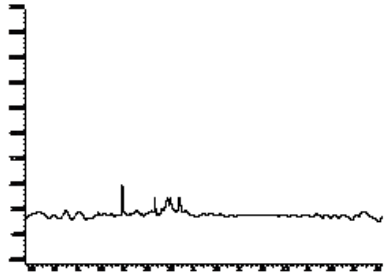
O.affinis semiprep. 50-55-2



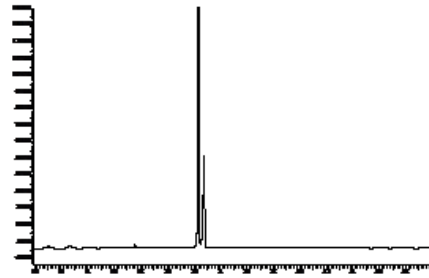
O.affinis semiprep. 45-50-3



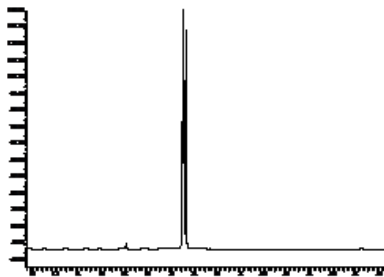
O.affinis semiprep. 45-50-7



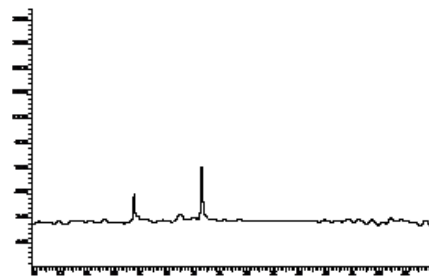
O.affinis semiprep. 45-50-4



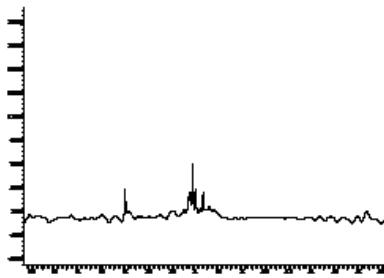
O.affinis semiprep 45-50-5-1



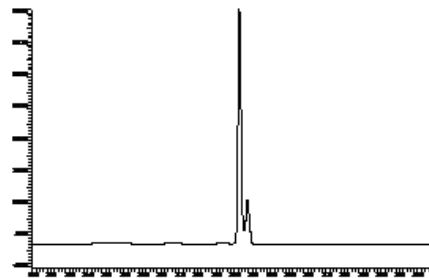
O.affinis semiprep. 45-50-5



O.affinis semiprep 45-50-5-2



O.affinis semiprep. 45-50-6



O.affinis semiprep. 50-55-4-2

Extractum Colae Kolaextrakt

Gehalt an Alkaloiden (vorwiegend Koffein neben wenig Theobromin) 9,75 bis 10,25 %.

Bereitung

Kolasame (V)	100 Teile
Äthylalkohol	nach Bedarf
Gereinigtes Wasser	nach Bedarf

Die Kolasamen werden mit einer Mischung von 46 Teilen Äthylalkohol und 54 Teilen Gereinigtem Wasser nach dem Perkulationsverfahren (ÖAB.: VI) extrahiert. Die Extraktion kann als beendet angesehen werden, wenn 0,4 ml der zuletzt abtropfenden Flüssigkeit, auf dem Wasserbad eingedampft, mit 2,5 ml heißem Wasser aufgenommen und mit 1 Tropfen konzentrierter Schwefelsäure (R) versetzt, wenn nötig, nach Filtration auf Zusatz von 1 Tropfen Kaliumwismutjodidlösung (R) höchstens eine schwache gelbe Trübung zeigen. Dies ist gewöhnlich nach Gewinnung von 3 – 4 Teilperkolaten der Fall. Man fängt 80 Teile Vorlauf getrennt auf; der Nachlauf und die filtrierte Preßflüssigkeit werden unter vermindertem Druck zur Trockene eingedampft, in etwa 20 Teilen der oben angegebenen Äthylalkohol-Wasser-Mischung aufgenommen und mit dem Vorlauf vereinigt. Der gesamte Auszug wird 48 Stunden lang bei Kühschrantemperatur stehen gelassen, filtriert, unter vermindertem Druck eingedampft und in der bei **Extracta sicca** ÖAB. angegebenen Weise zum Trockenextrakt verarbeitet.

Beschreibung

Braunes Pulver, das charakteristisch nach Kolasamen riecht und schmeckt.

Löslichkeit: Kolaextrakt ist in verdünntem Alkohol klar löslich; in Alkohol oder Wasser löst es sich nicht klar.

Prüfung auf Identität

Nachweis der Alkaloide: Etwa 0,2 g Kolaextrakt werden in 5 ml Wasser gelöst und mit 5 ml Chloroform (R) ausgeschüttelt. Die filtrierte Chloroformlösung dampft man auf dem Wasserbad zur Trockene ein. Dampf man den Rückstand mit 10 Tropfen verdünnter Wasserstoffperoxydlösung (R) und 1 Tropfen Salzsäure (R) auf dem Wasserbad wieder zur Trockene ein, so hinterbleibt ein rötlicher Rückstand, der sich beim Befeuchten mit 1 Tropfen Ammoniak (R) rotviolett färbt.

Prüfung auf Reinheit

Trocknungsverlust: Höchstens 5,0 % (ÖAB.: IX, 2, b, η).

Gehaltsbestimmung

1,000 g Kolaextrakt wird in einer 100 ml fassenden Arzneiflasche in 5 ml verdünntem Alkohol (R) gelöst und mit 60,0 g Chloroform (R) geschüttelt. Hierauf fügt man 3 ml Ammoniak (R) hinzu und läßt 15 Minuten lang unter häufigem Umschütteln stehen. Nach Zusatz von etwa 1,5 g Traganth (R) schüttelt man nochmals kräftig bis zur vollständigen Bindung des Wassers, filtriert die Chloroformlösung durch ein trockenes Filter, das während der Filtration bedeckt gehalten wird, und wägt 48,0 g der Chloroformlösung (= 0,80 g Kolaextrakt) in einen 100 ml fassenden Kolben ein. Das Lösungsmittel wird auf dem Wasserbad abdestilliert; den Rückstand trocknet man 30 Minuten lang bei 95 – 100°. Nach zweistündigem Aufbewahren im Exsikkator wird gewogen.

Das Gewicht des Rückstandes muß 0,078 – 0,082 g betragen, entsprechend einem Gehalt an Alkaloiden von 9,75 – 10,25 %.

Aufbewahrung

Vor Licht geschützt, in dicht schließenden Gefäßen, mit einem geeigneten Trocknungsmittel.

ÖAB 2009

Dosierung

Gebräuchliche Einzeldosis: 0,2 – 0,3 g.

Zubereitung

Extractum Colae fluidum.

Extractum Colae fluidum Kolafluidextrakt

Gehalt an Alkaloiden (vorwiegend Koffein neben wenig Theobromin) 1,4 bis 1,6 %.

Bereitung

Kolaextrakt	15 Teile
Äthylalkohol	39 Teile
Gereinigtes Wasser	46 Teile

Das Kolaextrakt wird in der Mischung von Äthylalkohol und Gereinigtem Wasser gelöst; nach mehrtägigem Stehen an einem kühlen Ort wird nötigenfalls filtriert.

Beschreibung

Klare, dunkel rotbraune Flüssigkeit, die charakteristisch nach Kolasamen riecht und schmeckt.

Mischbarkeit: Kolafluidextrakt ist mit verdünntem Alkohol klar, mit Alkohol oder Wasser trüb mischbar.

Prüfung auf Identität

Nachweis der Alkaloide: 1 ml Kolafluidextrakt wird auf dem Wasserbad zur Trockene eingedampft. Der Rückstand wird in 5 ml Wasser gelöst und mit 5 ml Chloroform (R) ausgeschüttelt. Die filtrierte Chloroformlösung dampft man auf dem Wasserbad zur Trockene ein. Dampf man den Rückstand mit 10 Tropfen verdünnter Wasserstoffperoxydlösung (R) und 1 Tropfen Salzsäure (R) auf dem Wasserbad wieder zur Trockene ein, so hinterbleibt ein rötlicher Rückstand, der sich beim Befeuchten mit 1 Tropfen Ammoniak (R) rotviolett färbt.

Prüfung auf Reinheit

Alkoholgehalt: Mindestens 48,0 Vol.% (ÖAB.: XII, 7).

Methylalkohol, iso-Propylalkohol: Wie bei **Extracta** Ph. Eur. beschrieben.

Gehaltsbestimmung

6,000 g Kolafluidextrakt werden in einer 100 ml fassenden Arzneiflasche mit 60,0 g Chloroform (R) geschüttelt. Hierauf fügt man 3 ml Ammoniak (R) hinzu und läßt 15 Minuten lang unter häufigem Umschütteln stehen. Nach Zusatz von etwa 1,5 g Tragant (R) schüttelt man nochmals kräftig bis zur vollständigen Bindung des Wassers, filtriert die Chloroformlösung durch ein trockenes Filter, das während der Filtration bedeckt gehalten wird, und wägt 50,0 g der Chloroformlösung (= 5,0 g Kolafluidextrakt) in einen 100 ml fassenden Kolben ein. Das Lösungsmittel wird auf dem Wasserbad abdestilliert; den Rückstand trocknet man 30 Minuten lang bei 95 – 100°. Nach zweistündigem Aufbewahren im Exsikkator wird gewogen.

Das Gewicht des Rückstandes muß 0,070 – 0,080 g betragen, entsprechend einem Gehalt an Alkaloiden von 1,4 – 1,6 %.

Aufbewahrung

Vor Licht geschützt, in gut schließenden Gefäßen, nicht länger als 6 Monate.

Dosierung

Gebräuchliche Einzeldosis: 2,0 – 5,0 g.

ÖAB 2009

6. Monographie Kolasamen, Ph. Eur. 6

2998 Raffiniertes Kokosfett

Säurezahl (2.5.1): höchstens 0,5, mit 20,0 g Substanz bestimmt

Peroxidzahl (2.5.5): höchstens 5,0

Inverseifbare Anteile (2.5.7): höchstens 1,0 Prozent, mit 5,0 g Substanz bestimmt

Alkalisch reagierende Substanzen in fetten Ölen (2.4.19): Die Substanz muss der Prüfung entsprechen.

Fettsäurezusammensetzung (2.4.22, Methode B): Vor der Probenahme ist die Substanz durch Erwärmen zu einer homogenen Flüssigkeit zu schmelzen.

Referenzlösung: 15,0 mg Tricaproin CRS, 80,0 mg Tristearin CRS, 0,150 g Tricaprin CRS, 0,200 g Tricaprylin CRS, 0,450 g Trimyristin CRS und 1,25 g Trilaurin CRS werden in einer Mischung von 2 Volumteilen Dichlormethan *R* und 8 Volumteilen Heptan *R* gelöst und mit der gleichen, auf 45 bis 50 °C erwärmten Lösungsmittelmischung zu 50 ml verdünnt. 2 ml Lösung werden in einem 10-ml-Zentrifugenröhrchen mit Schraubverschluss in einem Strom von Stickstoff *R* eingedampft. Der Rückstand wird durch Zusatz von 1 ml Heptan *R* und 1 ml Dimethylcarbonat *R* gelöst und unter schwachem Erhitzen (50 bis 60 °C) kräftig geschüttelt. Zur noch warmen Lösung wird 1 ml einer mit der notwendigen Vorsicht hergestellten Lösung von Natrium *R* (12 g · l⁻¹) in wasserfreiem Methanol *R* gegeben und die Lösung etwa 5 min lang kräftig geschüttelt. Nach Zusatz von 3 ml destilliertem Wasser *R* und etwa 30 s langem, kräftigem Schütteln wird 15 min lang bei 1500 g zentrifugiert. 1 µl der organischen Phase wird eingespritzt.

Der Prozentgehalt (*m/m*) jeder Fettsäure wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{A_{x,s,c}}{\sum A_{x,s,c}} \cdot 100$$

$A_{x,s,c}$ ist die korrigierte Peakfläche jeder Fettsäure in der Untersuchungslösung:

$$A_{x,s,c} = A_{x,s} \cdot R_c$$

R_c ist der relative Korrekturfaktor:

$$R_c = \frac{m_{x,r} \cdot A_{1,r}}{A_{x,r} \cdot m_{1,r}}$$

für die Peaks, die den Methylestern von Capron-, Capryl-, Caprin-, Laurin- und Myristinsäure entsprechen.

$m_{x,r}$ = Einwaage von Tricaproin, Tricaprylin, Tricaprin, Trilaurin oder Trimyristin in der Referenzlösung in Milligramm

$m_{1,r}$ = Einwaage von Tristearin in der Referenzlösung in Milligramm

$A_{x,r}$ = Peakflächen der Methylester von Capron-, Capryl-, Caprin-, Laurin- und Myristinsäure in der Referenzlösung

$A_{1,r}$ = Peakfläche des Stearinsäuremethylesters in der Referenzlösung

$A_{x,s}$ = Peakflächen spezifizierter oder nicht spezifizierter Fettsäuremethylester

R_c = 1 für Peaks jedes weiteren spezifizierten oder nicht spezifizierten Fettsäuremethylesters

Die Fettsäurefraktion des Fetts muss folgende Zusammensetzung haben:

- Capronsäure (Hexansäure) (R_{Rt} 0,11): höchstens 1,5 Prozent
- Caprylsäure (Octansäure) (R_{Rt} 0,23): 5,0 bis 11,0 Prozent
- Caprinsäure (Decansäure) (R_{Rt} 0,56): 4,0 bis 9,0 Prozent
- Laurinsäure (Dodecansäure) (R_{Rt} 0,75): 40,0 bis 50,0 Prozent
- Myristinsäure (Tetradecansäure) (R_{Rt} 0,85): 15,0 bis 20,0 Prozent
- Palmitinsäure (Hexadecansäure) (R_{Rt} 0,93): 7,0 bis 12,0 Prozent
- Stearinsäure (Octadecansäure) (R_{Rt} 1,00): 1,5 bis 5,0 Prozent
- Ölsäure (Octadecensäure) und Isomere (R_{Rt} 1,01): 4,0 bis 10,0 Prozent
- Linolsäure (Octadecadiensäure) (R_{Rt} 1,03): 1,0 bis 3,0 Prozent
- Linolensäure (Octadecatriensäure) (R_{Rt} 1,06): höchstens 0,2 Prozent
- Arachinsäure (Eicosansäure) (R_{Rt} 1,10): höchstens 0,2 Prozent
- Gadoleinsäure (Eicosensäure) (R_{Rt} 1,11): höchstens 0,2 Prozent

Lagerung

Vor Licht geschützt, in dem Verbrauch angemessenen, möglichst vollständig gefüllten Behältnissen

6.0/1504

Kolasamen

Colae semen

Definition

Die von der Samenschale befreiten, ganzen oder zerkleinerten, getrockneten Samen sowohl von *Cola nitida* (Vent.) Schott et Endl. (*C. vera* K. Schum.) und deren Varietäten wie auch von *Cola acuminata* (P. Beauv.) Schott et Endl. (*Sterculia acuminata* P. Beauv.)

Gehalt: mindestens 1,5 Prozent Coffein (M_r 194,2), bezogen auf die getrocknete Droge

Beachten Sie den Hinweis auf „Allgemeine Monographien“ zu Anfang des Bands auf Seite B

Ph. Eur. 6. Ausgabe, Grundwerk 2008

Prüfung auf Identität

A. Die Samenkern sind länglich, mehr oder weniger stumpf, von subtetragonaler Gestalt, durch den in der Frucht wechselseitig herrschenden Druck deformiert und an Größe und Masse variierend, wobei die Masse 5 bis 15 g betragen kann. Die Außenseite ist hart, glatt und tief dunkelbraun, die Innenseite mehr rötlich braun. Bei *C. nitida* und deren Varietäten sind die Samenkern in 2 fast plankonvexe Teile geteilt, die den Keimblättern entsprechen und in der Handelsdroge gewöhnlich getrennt vorliegen. Die Keimblätter sind 3 bis 4 cm lang, 2 bis 2,5 cm breit und 1 bis 2 cm dick. Bei *C. acuminata* sind die Keimblätter kleiner und in 4 bis 6 unregelmäßige Stücke geteilt.

B. Die Droge wird pulverisiert (355) (2.9.12). Das Pulver ist rötlich braun. Die Prüfung erfolgt unter dem Mikroskop, wobei eine 50-prozentige Lösung (V/V) von Glycerol *R* verwendet wird. Das Pulver zeigt folgende Merkmale: zahlreiche, 5 bis 25 µm große, eibis nierenförmige Stärkekörner mit konzentrischer Streifung und einem sternförmigen, etwas exzentrischen Hilum; Fragmente der Keimblätter zeigen große, dickwandige, rötliche, polygonale Zellen, die voller Stärkekörner sind; gelegentlich kommen Bruchstücke der äußeren Keimblattepidermis vor.

C. Dünnschichtchromatographie (2.2.27)

Untersuchungslösung: 1,0 g pulverisierte Droge (355) (2.9.12) wird mit 5 ml Ethanol 60 % *R* versetzt, 30 min lang bei 40 °C mechanisch geschüttelt und anschließend abfiltriert.

Referenzlösung a: 25 mg Coffein *R* werden in 10 ml Ethanol 60 % *R* gelöst.

Referenzlösung b: 50 mg Theobromin *R* werden in 10 ml Fließmittel gelöst. Die Lösung wird filtriert.

Platte: DC-Platte mit Kieselgel F₂₅₄ *R*

Fließmittel: Wasser *R*, Methanol *R*, Ethylacetat *R* (10:13:77 V/V/V)

Auftragen: 20 µl; bandförmig

Laufstrecke: 10 cm

Trocknen: 5 min lang an der Luft

Detektion A: im ultravioletten Licht bei 254 nm

Ergebnis A: Das Chromatogramm der Untersuchungslösung zeigt 2 fluoreszenzmindernde Hauptzonen, die in Bezug auf ihre Lage den Zonen in den Chromatogrammen der Referenzlösungen a und b entsprechen.

Detektion B: Die Platte wird mit einer Mischung gleicher Volumteile Ethanol 96 % *R* und Salzsäure *R* und danach mit einer unmittelbar vor Gebrauch hergestellten Lösung von 1 g Iod *R* und 1 g Kaliumiodid *R* in 100 ml Ethanol 96% *R* besprüht.

Ergebnis B: Das Chromatogramm der Untersuchungslösung zeigt eine rötlich braune Hauptzone, die in Bezug auf Lage und Farbe der Zone im Chromatogramm der Referenzlösung a entspricht.

Prüfung auf Reinheit

Fremde Bestandteile (2.8.2): Die Droge muss der Prüfung entsprechen.

Trocknungsverlust (2.2.32): höchstens 12,0 Prozent, mit 2,00 g pulverisierter Droge (355) (2.9.12) durch 2 h langes Trocknen im Trockenschrank bei 105 °C bestimmt

Asche (2.4.16): höchstens 9,0 Prozent

Gehaltsbestimmung

Flüssigchromatographie (2.2.29)

Untersuchungslösung: 1,00 g (*m*₁) pulverisierte Droge (355) (2.9.12) wird mit 50 ml Methanol *R* versetzt, 30 min lang auf dem Wasserbad unter Rückflusskühlung erhitzt und nach dem Erkalten abfiltriert. Das Filter wird mit 10 ml Methanol *R* gewaschen. Der Rückstand wird mit 50 ml Methanol *R* versetzt und der beschriebene Vorgang wiederholt. Filtrate und Waschlösungen werden in einem 200-ml-Messkolben vereinigt und mit Methanol *R* zu 200,0 ml verdünnt. 20,0 ml Lösung werden in einem Rundkolben unter vermindertem Druck zur Trockne eingedampft. Der Rückstand wird mit der mobilen Phase in einen 50-ml-Messkolben überführt und die Mischung mit der mobilen Phase zu 50,0 ml verdünnt.

Referenzlösung: 30,0 mg (*m*₂) Coffein *CRS* und 15,0 mg Theobromin *R* werden in einem 100-ml-Messkolben in der mobilen Phase zu 100,0 ml gelöst. 10,0 ml Lösung werden in einem 100-ml-Messkolben mit der mobilen Phase zu 100,0 ml verdünnt.

Säule

- Größe: *l* = 0,25 m, Ø = 4,6 mm
- Stationäre Phase: octadecylsilyliertes Kieselgel zur Chromatographie *R* (5 µm)

Mobile Phase: Methanol *R*, Wasser *R* (25:75 V/V)

Durchflussrate: 1 ml · min⁻¹

Detektion: Spektrometer bei 272 nm

Einspritzen: ein geeignetes Volumen jeder Lösung; Probenschleife

Eignungsprüfung: Referenzlösung

- Auflösung: mindestens 2,5 zwischen den Peaks von Coffein und Theobromin
- Falls erforderlich wird der Gehalt an Wasser *R* in der mobilen Phase geändert.

Der Prozentgehalt an Coffein wird nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{m_2 \cdot A_1 \cdot 50}{m_1 \cdot A_2}$$

*A*₁ = Fläche des Coffein-Peaks im Chromatogramm der Untersuchungslösung

*A*₂ = Fläche des Coffein-Peaks im Chromatogramm der Referenzlösung

*m*₁ = Einwaage der Droge in der Untersuchungslösung in Gramm

*m*₂ = Masse von Coffein *CRS* in der Referenzlösung in Gramm

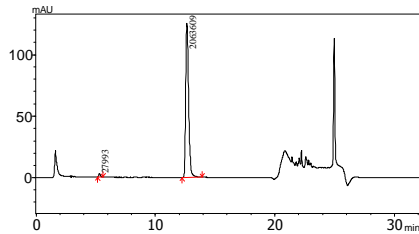
K

Monographien

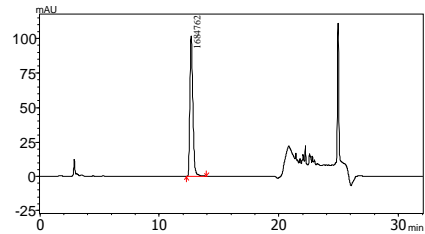
Die „Allgemeinen Vorschriften“ gelten für alle Monographien und sonstigen Texte

Ph. Eur. 6. Ausgabe, Grundwerk 2008

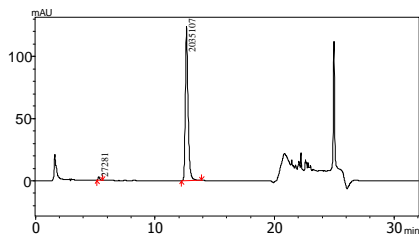
7. HPLC-Chromatogramme der Coffein-Gehaltsbestimmung der untersuchten Kolaextrakte und Kolafluidextrakte



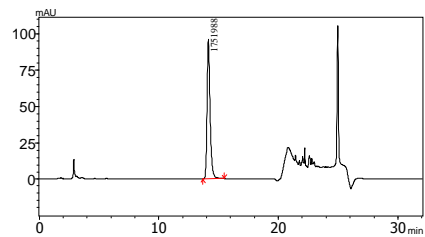
Kolaextrakt Ch. Nr. 08018847 a



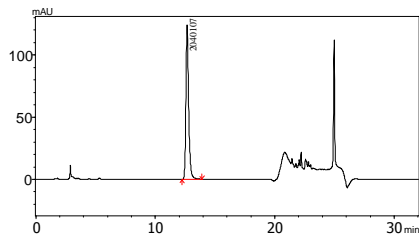
Kolaextrakt K. Nr. 2344 a



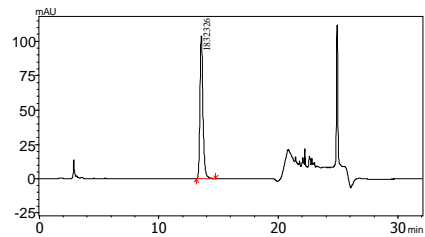
Kolaextrakt Ch. Nr. 08018847 b



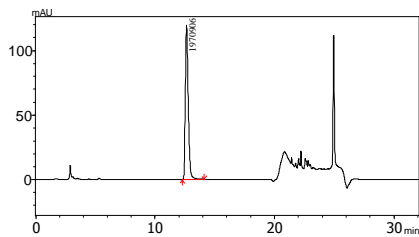
Kolaextrakt K. Nr. 2344 b



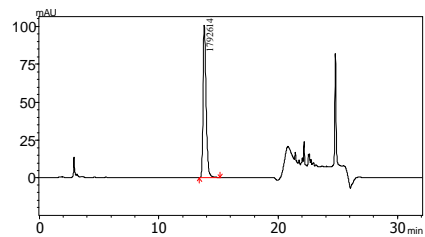
Kolaextrakt Ch. Nr. 09010469 a



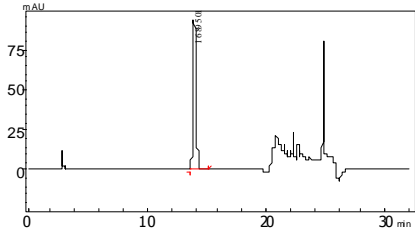
Kolaextrakt K. Nr. 5952 a



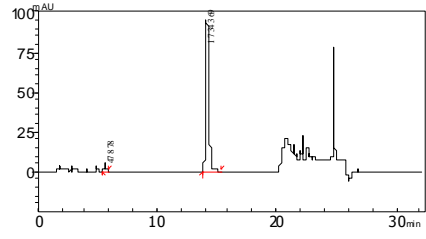
Kolaextrakt Ch. Nr. 09010469 b



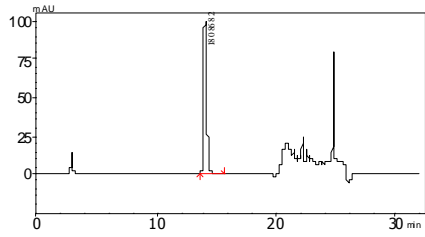
Kolaextrakt K. Nr. 5952 b



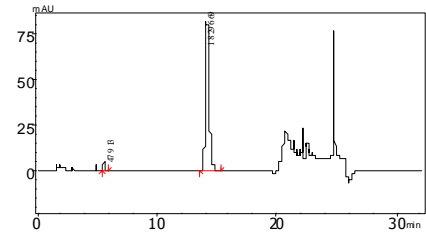
Kolaextrakt K. Nr. 2316 a



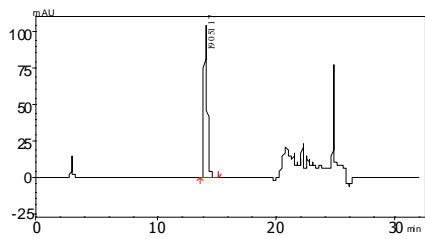
Kolaextrakt K. Nr. 1739 a



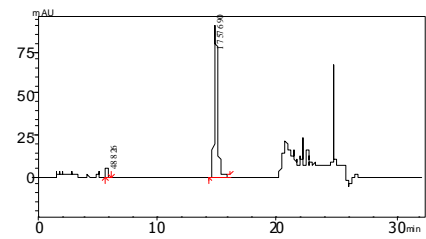
Kolaextrakt K. Nr. 2316 b



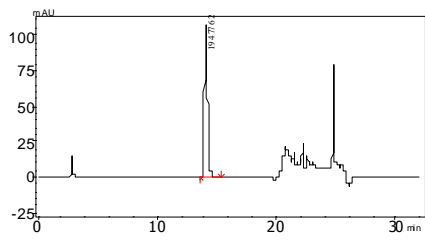
Kolaextrakt K. Nr. 1739 b



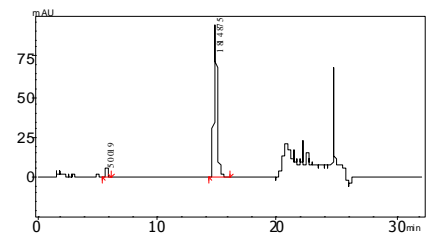
Kolaextrakt K. Nr. 0647 a



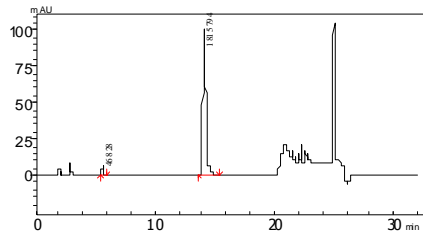
Kolaextrakt K. Nr. 5028 a



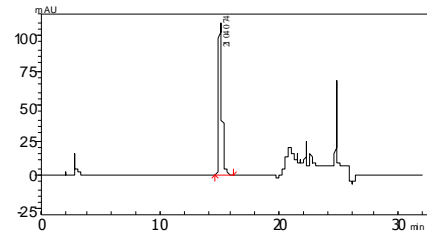
Kolaextrakt K. Nr. 0647 b



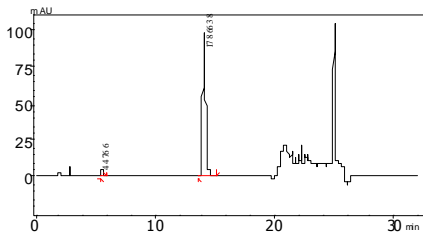
Kolaextrakt K. Nr. 5028 b



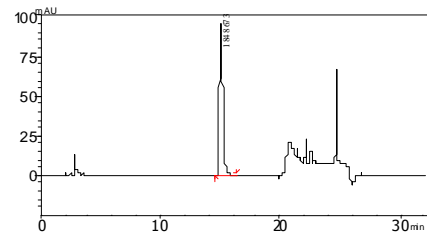
Kolafliud ekstrakt PH-482/09 a



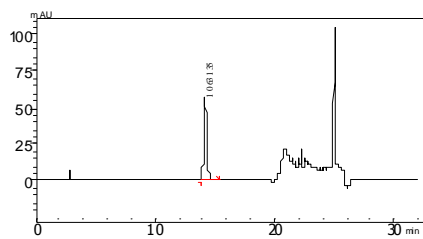
Kolafliud ekstrakt K.Nr. 2767 a



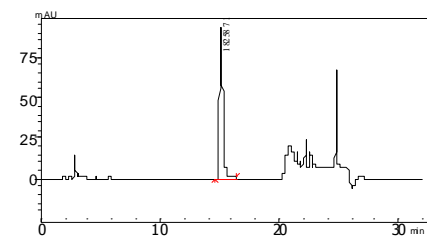
Kolafliud ekstrakt PH-482/09 b



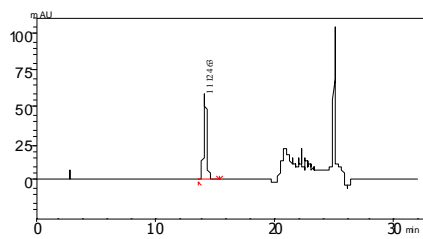
Kolafliud ekstrakt K.Nr. 2767 b



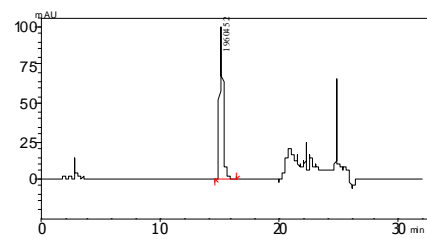
Kolafliud ekstrakt K.Nr. 4265 a



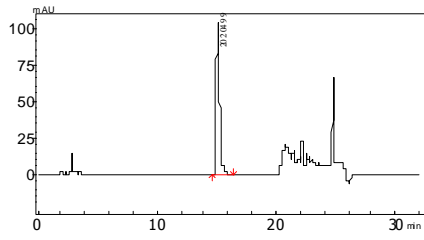
Kolafliud ekstrakt K.Nr. 0759 a



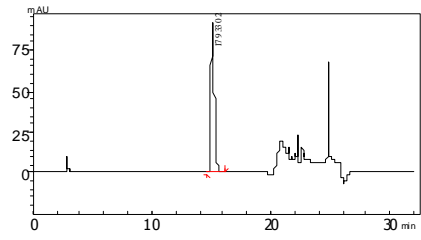
Kolafliud ekstrakt K.Nr. 4265 b



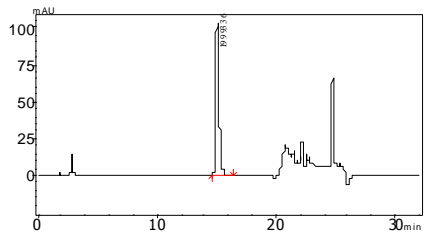
Kolafliud ekstrakt K.Nr. 0759 b



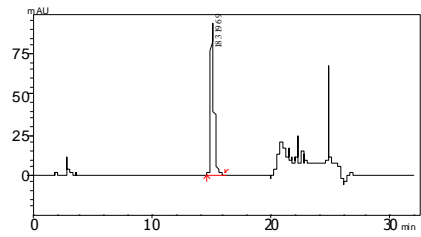
Kolafluidextrakt K.Nr. 3194 a



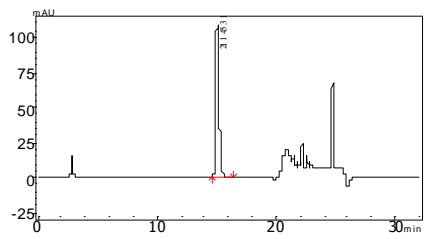
Kolafluidextrakt PH-094/09 a



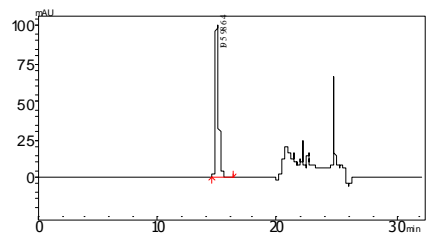
Kolafluidextrakt K.Nr. 3194 b



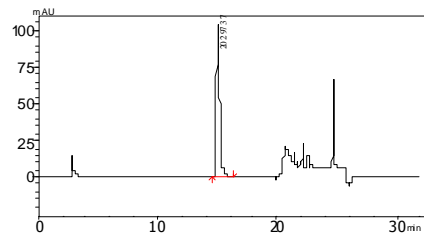
Kolafluidextrakt PH-094/09 b



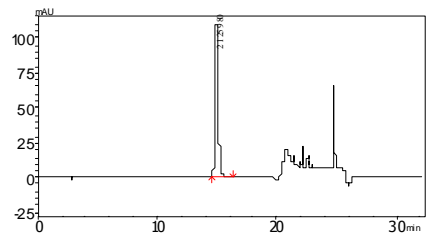
Kolafluidextrakt K.Nr. 4493 a



Kolafluidextrakt K.Nr. 4946 a



Kolafluidextrakt K.Nr. 4493 b



Kolafluidextrakt K.Nr. 4946 b