

Molekularbiologische Authentizitätsprüfung von Pflanzenextrakten

Laufzeit	01.12.2008 - 31.01.2011
Forschungsstelle	Veterinärmedizinische Universität Wien Institut für Angewandte Botanik Veterinärplatz 1 A - 1210 Wien
Projektleitung	A. Prof. Johannes Novak
Förderung	Das IGF-Vorhaben 15182 N der Forschungsvereinigung der Arzneimittel-Hersteller e.V. (FAH), Bürgerstraße 12, 53173 Bonn wurde über die AiF im Rahmen des Programms zur Förderung der industriellen Gemeinschaftsforschung und -entwicklung (IGF) vom Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie aufgrund eines Beschlusses des Deutschen Bundestages gefördert.



Problemstellung/Zielsetzung

Die Feststellung der Identität des Ausgangsmaterials zur Erzeugung von Phytopharmaka ist von großer Bedeutung, da sehr viele Pflanzenarten als Arzneimittel genutzt werden. Durch dieses Spektrum an Ausgangsmaterialien kann es oft zu Verwechslungen bzw. Verfälschungen kommen. Die derzeit üblichen, auf morphologischen, physikalischen und chemischen Kriterien basierenden Untersuchungsmethoden der Drogen und Extrakte sind für eine eindeutige Artbestimmung oftmals unzureichend.

Die wissenschaftlich-technische Zielsetzung dieses Projektes ist die eindeutige Identifizierung von ausgewählten Arzneipflanzen der Gattungen *Helleborus*, *Populus*, *Epilobium*, *Gelsemium* und *Baptisia* anhand der DNA-Sequenz in Drogen und Extrakten (Urtinkturen). Die momentan spärlich vorhandenen DNA-Sequenzinformationen dieser Arzneipflanzen sollen ergänzt und molekularbiologische Methoden zur Artidentifikation entwickelt werden. Zusätzlich sollen Methoden der DNA-Extraktion und Analyse aus Urtinkturen entwickelt werden, damit diese Methoden bei den ausgewählten Arten bald zum Routineeinsatz kommen können.

Außerdem soll ein Ansatz zur Quantifizierung von Mischungszusammensetzungen von Extrakten mit Hilfe der quantitativen PCR (qPCR) erarbeitet werden, um die Grundlagen einer praktischen Anwendung zu erarbeiten. Eine mengenmäßige Erfassung von Verunreinigungen/Verfälschungen bzw. Mischungsverhältnissen würde die Anwendbarkeit der Methodik der DNA-Identitätsprüfung über rein qualitative Nachweise (vorhanden/nicht vorhanden) hinaus erweitern.

Ergebnisse

Im Projekt wurden ca. 550 Proben verschiedenster Arten der Gattungen *Helleborus*, *Populus*, *Epilobium*, *Gelsemium* und *Baptisia* und nahe verwandter Außengruppen von verschiedenen Institutionen und im Freiland gesammelt.

Für alle Gattungen ausgenommen *Baptisia* konnte ein HRM-Assay (High-Resolution-Melt-Analysis = Hochauflösende Schmelzkurvenanalyse von PCR-Produkten) entwickelt werden, das die Identifikation der jeweiligen Zielarten erlaubt.

Bei der Gattung *Helleborus* (Ranunculaceae) ermöglichten DNA-Sequenzen des *matK* Gens und des *trnL-trnF* Intergenabstandes (beides DNA-Abschnitte aus den Plastiden) eine eindeutige Identifizierung der Zielart *Helleborus niger*. *Helleborus foetidus* und einige anderen Arten konnten mit dieser Methode ebenfalls identifiziert werden.

Versuche zur Unterscheidung von *Populus tremula* und *Populus tremuloides* (Salicaceae) zeigten anhand der Plastidensequenzen *trnL-trnF* und *matK* gute Erfolge. Die beiden genannten Arten waren deutlich voneinander unterscheidbar, und *Populus tremuloides* konnte eindeutig identifiziert werden. *Populus tremula* konnte von den in Mitteleuropa beheimateten Pappeln (*Populus alba* und *Populus nigra*) unterschieden werden, zeigte aber gleiche HRM-Kurven wie wenige chinesische Pappel-Arten, die aber in der Praxis kein Problem der Verwechslung sind.

Innerhalb der Gattung *Epilobium* sind *Epilobium angustifolium* und *Epilobium parviflorum* (Onagraceae) von besonderem pharmazeutischen Interesse. Beide Arten waren anhand von Sequenzunterschieden der Kernregion ITS (internal transcribed spacer) und den Plastidenabschnitten *matK* und *trnL-trnF* deutlich von den anderen mitteleuropäischen *Epilobium*-Arten zu unterscheiden. Durch die Anwendung zusätzlicher *matK*-Primer konnten andere *Epilobium*-Arten entweder eindeutig identifiziert oder als Kleingruppen erkannt werden. Beim Sammeln der Proben im Freiland fiel auf, dass auf einem Standort meist drei oder sogar vier *Epilobium*-Arten gemeinsam vorkommen und offensichtliche Hybriden nicht selten sind.

Die Zielart *Gelsemium sempervirens* (Gelsemiaceae/Loganiaceae) konnte anhand von Sequenzabschnitten der nuklearen External Transcribed Spacer Region und des Plastidengens *ndhF* deutlich von der ebenfalls amerikanischen, aber tetraploiden Verwandten *Gelsemium rankinii* und der asiatischen *Gelsemium elegans* unterschieden werden.

Für *Baptisia tinctoria* (Fabaceae) konnte kein zuverlässiges Identifizierungssystem erstellt werden. Die Sammlung der Referenzproben aus Herbarien scheint für eine eindeutige Identifizierung nicht ausreichend verlässlich bzw. ausreichend umfangreich zu sein. Einerseits wiesen die Sequenzen der verschiedenen Arten zum Teil sehr geringe Unterschiede zueinander auf, andererseits waren die Sequenzen v.a. von *B. tinctoria* so unterschiedlich, dass die Vermutung nahe liegt, dass ein Teil der Referenzen (Herbarproben und publizierte Sequenzen) falsch bestimmt waren. Für eine zuverlässige Aussage müssten insgesamt mehr Proben vom Wildstandorten gesammelt und analysiert werden, um alle Arten der Gattung abzudecken und die Variabilität innerhalb der Arten abklären zu können.

Im Bereich der quantitativen Analyse von DNA-Vermischungen konnten für den Nachweis von Verfälschungen neuartige Multiplex-HRM-Assays entwickelt werden. Es wurden zwei methodische Ansätze verfolgt, wobei in beiden Fällen *Helleborus niger* als Zielart gewählt wurde: Als erstes wurde die Detektion und Messung einer Beimischung einer bestimmten Art, die oft als Verwechslung vorkommt oder als Verfälschung zur Droge beigesetzt wird, zur Arzneidroge

simuliert. Als bekannte Verfälschung bzw. Verwechslung wurde *Veratrum nigrum* gewählt, da der Schwarze Germer im Englischen wie *Helleborus niger* als „black hellebore“ bezeichnet wird. Beim zweiten Versuchsansatz wurde eine Kontamination durch eine Mischung unbekannter Arten verfolgt. Hier wurden gleichzeitig neun verschiedene Pflanzenarten zur Zielart zugesetzt.

Die entwickelten Assays stellen eine der ersten Anwendungen der HRM für quantitative Analysen dar. Die erzielten Ergebnisse sind insbesondere bei der Detektion einer bekannten Verfälschung vielversprechend. Selbst in einer Mischung von 200.000:1 konnte *Veratrum nigrum* noch nachgewiesen werden. Allerdings sind vor einem Routineeinsatz noch Fragen der DNA-Extraktionseffizienz in unterschiedlichen Pflanzenarten und ähnliche Fragestellungen abzuklären.

Der Projektbereich DNA-Extraktion aus Urtinkturen wurde durch Entwicklung und Testung verschiedener Extraktionsprotokolle bearbeitet. Dabei standen neben der vorhergehenden Anreicherung von eventuell vorhandenen Zellresten drei grundlegende Extraktionsmethoden im Vordergrund: eine Standard-CTAB-Methode, die Extraktion mit einem kommerziellen Kit und die Extraktion mit „Magnetic Beads“. Die Ergebnisse zeigten, dass in Urtinkturen nur sehr geringe Spuren von DNA vorhanden sind. Bei der Verarbeitung von nur 1-3 ml verschiedener Urtinkturen konnte nur in sehr wenigen Fällen DNA nachgewiesen werden. Eine zusätzliche Vermehrung der DNA durch eine wiederholte PCR brachte keine Verbesserung der Ergebnisse.

Bei der DNA-Extraktion aus einer *Helleborus*-Urtinktur konnte aus 50 ml gerade ausreichend DNA für eine positive Identifizierung mittels HRM extrahiert werden. Bei der verwendeten *Gelsemium*-Urtinktur reichten bereits 25 ml für einen sicheren DNA-Nachweis aus.

In einem DNA-Extraktionsversuch wurden aus neun kommerziell erhältlichen Arzneidroge mit fünf verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden (drei kommerziell erhältliche Extraktionskits und zwei Extraktionsmethoden aus der Fachliteratur) DNA isoliert. Anschließend wurden PCRs mit zwei Primerkombinationen, die häufig für DNA-barcoding eingesetzt werden, in drei Verdünnungsstufen (unverdünnte DNA, 1:50 und 1:500 verdünnte DNA) durchgeführt, um die Qualität und die Brauchbarkeit der verschiedenen DNA-Extraktionsmethoden beurteilen zu können. Die Ergebnisse zeigten, dass die DNA-Extraktqualität eher vom Ausgangsmaterial als von der Extraktionsmethode beeinflusst wird und dass keine generelle Empfehlung für eine der fünf Extraktionsmethoden gegeben werden kann. Nur ein Extraktionskit mit einem vereinfachten, schnellen Protokoll erzielte signifikant schlechtere Ergebnisse. Aus Wurzeln, Rinden und Beeren wurden im allgemeinen eher geringe DNA-Mengen extrahiert, in vielen Fällen kam deswegen kein brauchbares PCR-Produkt zustande. Aus Blättern, Blüten und Fenchelfrüchten wurde generell zwar mehr DNA extrahiert, aber auch mehr sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die auf die PCR inhibierend wirkten. Bei diesen Proben funktionierte die PCR der unverdünnten DNA deswegen generell schlechter als die der verdünnten Proben. Aus reiner Droge aus den Apotheken konnte grundsätzlich DNA von besserer Qualität extrahiert werden als aus Produkten von Drogeriemärkten.

Projektbezogene Veröffentlichungen

Schmiderer, C.; Mader, E.; Novak, J.

DNA-based Identification of *Helleborus niger* by High-Resolution-Melting Analysis (HRM)
Planta Medica (2010), 76, 1934-1937

Mader, E.; Ruzicka, J.; Schmiederer, C.; Novak, J.
Quantitative high-resolution melting analysis for detecting adulterations
Analytical Biochemistry (2011), 409, 153-155

Mader, E.; Novak, J.
Detection and quantification of admixtures to medicinal drugs by multiplex PCR with High Resolution Melting Analysis (HRM)
Poster auf dem 58th International Congress and Annual Meeting of the Society for Medicinal Plant and Natural Product Research vom 29.8.-1.9.2010 in Berlin