Über die Einsatzmöglichkeiten der HPLC und HPLC/MS und ihre Adaptierung im Rahmen eines On-Line-Hochdurchsatzscreenings von Naturstoffextrakten

DISSERTATION

Zur Erlangung des Doktorgrades der Universität Hamburg Fachbereich Chemie

vorgelegt von

Lawrence Oshinowo

aus Hamburg

Hamburg 2004

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom September 1999 bis Februar 2004 unter der Leitung von

Herrn PD Dr. W. Schultze

am Institut für Pharmazie, Abteilung Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie der Universität Hamburg angefertigt.

- 1. Gutachter: PD Dr. W. Schultze
- 2. Gutachter: Prof. Dr. W. Francke

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2004

Danksagung

Herrn **PD Dr. W. Schultze** danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, die freie Bearbeitung und die stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn **Prof. Dr. W. Francke** (Institut für Organische Chemie der Universität Hamburg) danke ich herzlich für seine freundliche Übernahme des Korreferats.

Weiteren Dank richte ich an

Herrn Prof. Dr. P. Heisig für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. J. B. Mielck und Herrn Prof. Dr. M. Korth für die freundliche Bereitschaft die Prüfungen in den Nebenfächern zu übernehmen.

die Fa. Evotec OAI Hamburg für die gute Kooperation innerhalb des Projektes.

Herrn Dr. S. Franke aus der Organischen Chemie für die Durchführung der MS/MS-Experimente.

Herrn Preusse aus der Organischen Chemie für die (EI)MS-Messungen.

Herrn Dr. C. Goebel, Frau A. Lübbe, Frau Dr. K. Orbanz und Herrn C. Stork für das Lesen der Korrektur.

Frau Dr. A. Sievers für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima während der gemeinsamen Promotionszeit.

die Fa. VWR International für die Bereitstellung der ChromSword[®]Auto-Software und Herrn B. Oldenburg für die Beratung und Betreuung rund um die HPLC. die Fa. Waters GmbH in Eschborn für die Nutzung des Integrity-Systems und Herrn Dr. J. Burg und Dr. A. Röndigs für die Einarbeitung und Hilfe bei den Particle Beam-Messungen.

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Steinhart aus der Lebensmittelchemie für die Nutzung des HPLC/MS-Systems und Frau Dr. A. Schäfer für die Einarbeitung und Hilfe bei den HPLC/(ESI)- und HPLC/(APCI)-Messungen.

Frau E. Ban, Frau T. Claußen und Herrn K. Haacker-McLaughlin für die vielen kleinen Laborarbeiten.

alle die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern für ihre uneingeschränkte Unterstützung während meines Studiums und der Promotion.

Zu guter Letzt möchte ich meiner lieben Stefanie danken. Deine Geduld und Deine aufmunternden Worte waren mir eine große Hilfe bei der Fertigstellung dieser Arbeit.

Abkürzungsverzeichnis

APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionisation		
ATP	Adenosintriphosphat		
AU	Absorbance Unit		
bezügl.	bezüglich		
bzw.	beziehungsweise		
ca.	circa		
CI	Chemical Ionisation		
CAD	collision activated dissociation		
CID	collision induced dissociation		
DAD	Dioden-Array-Detektor		
DC	Dünnschichtchromatographie		
DLI	Direct Liquid Introduction		
EI	Electron Impact		
ESI	Electrospray Ionisation		
eV	Elektronenvolt		
Fa.	Firma		
FCS	Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie		
FI	Feldionisation		
FIDA	Fluorescence Intensity Distribution Analysis		
G	Genin = Aglykon		
Gal	Galaktose		
GC	Gaschromatographie		
ggf.	gegebenenfalls		
Glu	Glucose		
GPC	Gelpermeationschromatographie		
GV	Gradientenvorschlag		
Н	Wasserstoff		
H ₂ O	Wasser		
HIR	Human-Insulin-Rezeptor		
HPLC	Hochleistungs Flüssigchromatographie		
HTS	High-Throughput-Screening		
ID.	Innendurchmesser		
IEC	Ionenaustausch-Chromatographie		

IR	Infrarotspektroskopie
Int.	Intensität
IRK	Insulin-Rezeptor-Kinase
IRS	Insulin-Rezeptor-Substrat
IV	isokratischer Vorschlag
k	Retentionsfaktor
kV	Kilovolt
L/min	Liter-pro-Minute
LC	Flüssigchromatographie
Lit.	Literaturstelle
Lsgm.	Lösungsmittel
Μ	Molekül
m/z	Masse-zu-Ladungsverhältnis
MeCN	Acetonitril (Methylcyanid)
МеОН	Methanol
mg	Milligramm
min	Minute
ml/min	Milliliter-pro-Minute
mm	Millimeter
M _r	relative Molekülmasse
MS	Massenspektrometrie
Ν	Trennstufenzahl
N_2	Stickstoff
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMR	Kernresonanzspektroskopie
NPC	Normal-Phase-Chromatographie
PB	Particle Beam
PBM	Probability Based Matching
PDA	Photodioden-Array-Detector
RI	Brechungsindex
RPC	Reversed-Phase-Chromatographie
R _s	Auflösung
Rha	Rhamnose
RT	Retentionszeit
S.	siehe

s.a	siehe auch
S.O.	siehe oben
s.u.	siehe unten
$\mathbf{S}_{\mathbf{x}}$	Zucker _{Nummer}
SC	Säulenchromatographie
SEC	Size-Exclusion Chromatographie
SPE	Solid Phase Extraction
Sym	Symmetriefaktor
Syn.	Synonym
Т	Zeit
THF	Tetrahydrofuran
TIC	Totalionenstrom Chromatogramm
t _m	Totzeit
TOF	Time-of-Flight
t'r	Nettoretentionszeit
t _r	Gesamtretentionszeit
TSI	Thermospray-Ionisation
u.	und
u.a.	unter anderem
u.U.	unter Umständen
uHTS	ultra High-Throughput-Screening
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
z. Zt.	zur Zeit
α	Trennfaktor
λ	Wellenlänge
°C	Grad Celsius
μl	Mikroliter
μVs	Mikrovolt-Sekunde

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung / Zielsetzung	5
	1.1 Einleitung	5
	1.2 Zielsetzung	13
2.	HPLC-Untersuchungen	18
	2.1 Instrumentelle Voraussetzung	20
	2.1.1 Elutionsmittel	21
	2.1.2 Probenaufgabesystem	23
	2.1.3 Pumpe	23
	2.1.4 Trennsäulen	24
	2.1.5 Detektoren	26
	2.1.6 Datenerfassung und Steuerung	26
	2.2 Probleme der Naturstoffanalytik im Hochdurchsatzscreening (HTS)	27
	2.3 Computergestützte HPLC-Trennoptimierung	32
	2.3.1 Kenngrößen der Chromatographie	32
	2.3.2 Die Trennoptimierungssoftware ChromSword [®] Auto	36
	2.3.2.1 Virtuelle Methodenentwicklung	38
	2.3.2.2 Empirische Methodenentwicklung	39
	2.3.2.3 Vollautomatische Methodenentwicklung	40
	2.3.3 Kriterien für die Substanzauswahl	41
	2.3.3.1 Vorversuche zur Substanzauswahl	45
	2.3.3.2 Ergebnis der Naturstoffstandard-Kriterien	47
	2.3.4 Vollautomatische Trennoptimierung mit ChromSword [®] Auto	66
	2.3.4.1 Vollautomatische Trennoptimierung einer Cumarin-Mischung	00
	2.5.4.2 Parameter für die vonautomatische Trennoptimierung einer	60
	2 2 4 2 Ergebnig der vollautomatischen Trennentimierung der	09
	2.5.4.5 Elgeonis del vonationationen Trennopunierung del	 81
	235 Virtuelle Trennontimierung mit experimentellen Daten	04 87
	2.3.5 Virtuelle Tremoptimerung int experimentenen Daten	07
	mit ChromSword [®] Auto	95
	2.3.6 Simulation mit ChromSword [®] Auto nach virtuellem Sorbentienwechsel	96
	2.3.6.1 Ergebnis des virtuellen Sorbentienwechsels mit ChromSword [®] Auto	101
	2.3.7 Vollautomatische Trennoptimierung eines bioaktiven Pilzextraktes	
	durch ChromSword [®] Auto	. 102
	2.3.7.1 Auswahl des Extraktes für die vollautomatische Trennoptimierung	
	mit ChromSword [®] Auto	. 102
	2.3.7.1.1 Human-Insulin-Rezeptor-Kinase (HIR)-Assay	. 106
	2.3.7.2 Auswahl der Naturstoffstandards für die vollautomatische	
	Trennoptimierung mit ChromSword [®] Auto	. 107
	2.3.7.3 Parameter für die HPLC-Trennoptimierung eines Extraktes	
	von Lenzites betulina mit ChromSword [®] Auto	. 109
	2.3.7.4 Ergebnis der vollautomatischen Trennoptimierung eines	
	bioaktiven Pilzextraktes	. 129
	2.3.8 Diskussion und Ausblick der computergestützten	
	HPLC-Trennoptimierung	. 131

3.	Massenspektrometrische Untersuchungen	134
	3.1 Instrumentelle Voraussetzung für die Massenspektrometrie	136
	3.1.1 Interface und Ionenquelle	137
	3.1.1.1 Off-Line-Technik	137
	3.1.1.1.1 Direkt-Einlaß	137
	3.1.1.2 On-Line-Techniken	137
	3.1.1.2.1 Electrospray-Ionisation (ESI)	138
	3.1.1.2.2 Atmospheric-Pressure-Chemical-Ionisation (APCI)	140
	3.1.1.2.3 Particle Beam (PB)	142
	3.1.1.2.4 Direct Liquid Introduction/MS (DLI/MS)	144
	3.1.2 Analysator und Detektor	145
	3.2 HPLC/(PB)MS-Untersuchungen	146
	3.2.1 Einfluß der mobilen Phase	147
	3.2.2 Flußrate, Temperatur des Nebulizers und der Expansion Region	148
	3.2.3 Temperatur der Ionenquelle	151
	3.3 Wiley-Datenbank	152
	3.4 Massenspektrometrische Particle Beam-Untersuchungen ausgewählter	
	Naturstoffstandards	156
	3.4.1 Zusammenfassung der Particle Beam-Untersuchungen ausgewählter	
	Naturstoffstandards	165
	3.5 Massenspektrometrische Untersuchungen ausgewählter Naturstoffstandards	172
	3.5.1 Massenspektrometrische Untersuchungen des Cumarins	174
	3.5.1.1 HPLC/(PB)MS-Messungen	174
	3.5.1.2 Direkteinlaß/(EI)MS-Messungen	174
	3.5.1.3 HPLC/(ESI)MS- und HPLC/(APCI)MS-Messungen	175
	3.5.1.4 DLI/(ESI)MS ⁿ -Messungen	176
	3.5.1.5 Zusammenfassung der massenspektrometrischen Untersuchungen	
	des Cumarins	176
	3.5.2 Massenspektrometrische Untersuchungen des Digitoxins	178
	3.5.2.1 HPLC/(PB)MS-Messungen	178
	3.5.2.2 Direkteinlaß/(EI)MS-Messungen	186
	3.5.2.3 HPLC/(ESI)MS- und HPLC/(APCI)MS-Messungen	186
	3.5.2.4 DLI/(ESI)MS ^a -Messungen	190
	3.5.2.5 Zusammenfassung der massenspektrometrischen Untersuchungen	104
	des Digitoxins	194
	3.5.3 Massenspektrometrische Untersuchungen des Robinins	19/
	$3.5.3.1 \qquad \text{HPLC/(PB)MS-Messungen}$	19/
	3.5.3.2 Direkteiniab/(EI)MS-Messungen	200
	3.5.3.5 HPLC/(ESI)MS- und HPLC/(APCI)MS-Messungen	200
	3.5.3.4 DLI/(ESI)MS - Messungen	204
	3.5.5.5 Zusämmentassung der massenspektrometrischen Omersuchungen	207
	2.5.4 Maggangnaktromatrische Unterguehungen des Sonnegide P	200
	2.5.4 Massenspektrometrische Untersuchungen des Sennosids B	209
	2.5.4.1 HPLC/(PD)MS-Messungen	209
	2.5.4.2 DITEKTETITIAD/(E1)IVIO-IVIESSUIIGETI	213
	3.5.4.7 DI I/(ESI)MS ⁿ Massungan das Sannasida P	213 216
	3.5.4.4 DLI/(ESI)MS ⁻¹ Messungen im Desity Modus	210 217
	3.5.4.4.1 DLI/(LSI)/VIS -IVICSSUIGCII IIII FUSILV-IVICUUS	217 210
	3.5.4.4.2 DLI/(LSI)/VIS -IVIESSUIIgEII III INEgaliv-IVIOUUS	219
	des Sennosids R	225
		440

	3.5.5 Massenspektrometrische Untersuchungen des Visnadins	227
	3.5.5.1 HPLC/(PB)MS-Messungen	227
	3.5.5.2 Direkteinlaß/(EI)MS-Messungen	232
	3.5.5.3 HPLC/MS(ESI) und HPLC/MS(APCI)-Messungen	233
	3.5.5.4 DLI/(ESI)MS ⁿ -Messungen	235
	3.5.5.5 Zusammenfassung der massenspektrometrischen Messungen	
	des Visnadins	238
	3.6 Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchungen von ausgewählten	
	Naturstoffstandards	240
4.	Zusammenfassung	241
5.	Summary	247
6	Material und Methoden	253
υ.	6.1 Geräte und Software (Kanitel 2)	253
	6.2 Bestimmung der Totzeit	254
	6.3 Gradientenverzögerungszeit (Dwell-Time)	254
	6.4 Vorversuche zur Substanzauswahl (Kapitel 2.3.3.1)	256
	6.5 ChromSword [®] Auto Trennoptimierung der Cumarine (Kapitel 2.3.4)	
	6.5.1 Herstellung der Lösungen	
	6.5.2 Parameter für die vollautomatische Trennoptimierung einer	
	Cumarin-Mischung (Kapitel 2.3.4.1).	257
	6.5.3 Virtuelle Trennoptimierung der experimentellen Daten (Kapitel 2.3.5)	259
	6.5.4 Simulation mit ChromSword [®] Auto nach virtuellem Sorbentienwechsel	
	(Kapitel 2.3.6)	260
	6.6 Vollautomatische Trennoptimierung eines bioaktiven Pilzextraktes durch	
	ChromSword [®] Auto (Kapitel 2.3.7)	260
	6.6.1 Pilzmaterial	260
	6.6.2 Pilzextraktion	261
	6.6.3 NACONA-Standardmethode	261
	6.6.4 Parameter für die HPLC-Trennoptimierung eines Extraktes von	
	Lenzites betulina mit ChromSword [®] Auto (Kapitel 2.3.7.3)	262
	6.7 HPLC/MS-Untersuchungen (Kapitel 3.2)	265
	6.7.1 HPLC/(PB)MS-System	265
	6.7.2 HPLC/(ESI)MS- und HPLC/(APCI)MS-Messungen	266
	6.7.3 DLI/(ESI)MS ^{*-} Messungen	
	6.7.4 (EI)MS-Messungen (Direkteinlaß)	267
7.	Formeln und UV-Spektren	268
8.	Literaturverzeichnis	285
9.	Anhang: Gefahrstoffe	289

1. Einleitung / Zielsetzung

1.1 Einleitung

Seit Jahrtausenden verwenden Menschen Pflanzen, um sich deren heilende Wirkung zunutze zu machen und ihre Leiden zu lindern [1]. Von der auf über 400.000 Arten geschätzten Pflanzenwelt werden ca. 12.000 Arten als Arzneipflanzen verwendet [2]. Diese finden nach Trocknung als Droge oder nach Aufarbeitung in Form von Extrakten oder daraus isolierten Einzelsubstanzen Verwendung.

Von den ca. 500.000 geschätzten sekundären Inhaltsstoffen, sind erst ca. 20 % der Substanzen strukturell aufgeklärt [3]. Die Bioaktivität (Beispiele: Tabelle 1-1) ist nur von einem Bruchteil der isolierten Stoffe bekannt und für die pharma-kologische Therapie nutzbar.

Pflanze	Pflanze Pflanzenteil		pharmakol. Wirkung	
Salix alba u. andere	Rinde	Salicylsäure	analgetisch, antiphlogistisch antipyretisch	
Papaver somniferum	Milchsaft der Fruchtkapsel	Morphin	analgetisch	
Galanthus woronowii	Knolle	Galanthamin	antidementiv	
Taxus brevifolia	Rinde	Taxol	zytostatisch	
Atropa belladonna	Kraut	Atropin	parasympatholytisch	

Tabelle 1-1: Beispiele für isolierte, bioaktive Pflanzeninhaltsstoffe

Häufig kann nicht nur eine einzelne Substanz für die Wirkungen verantwortlich gemacht werden. Meistens kommt eine biologische Aktivität erst durch ein Zusammenwirken (synergistische Wirkung) verschiedener Pflanzeninhaltsstoffe zustande. Dabei herrscht oft noch Unklarheit über die eigentlichen Wirkstoffkomponenten (Beispiele Tabelle: 1-2).

Pflanze	Pflanzenteil	Wirksubstanz	pharmakol. Wirkung	
		Hypericine		
Hypericum perforatum	Kraut	Flavonoide	antidepressiv	
		Hyperforin		
		Valepotriate		
Valeriana officinalis	Wurzelstock	Baldrinale	sedativ	
		Sesquiterpene		

Tabelle 1-2: Beispiele für synergistische Wirkungen nach [2, 4]

Welchen Vorteil die Isolierung von biologisch aktiven Substanzen, im Gegensatz zur Verwendung der Ganzdroge bzw. Extrakte bietet, zeigt die nachfolgende Tabelle 1-3.

Tabelle 1-3: Vorteil der Isolierung biologisch aktiver Substanzen nach [4, 5]

	Einzelsubstanz	Ganzdroge / Extrakt
Reproduzierbare, genaue Dosierung in Therapie- und Testsystemen	++	-
Beeinflussung der Wirksamkeit oder unerwünschte Neben- wirkungen durch Begleitstoffe	-	++
Biologische Analysierbarkeit und Normierbarkeit	++	+
Möglichkeit der (Partial-)Synthese	++	-

Auf der Suche nach neuen pharmazeutischen Wirkstoffen wird, neben der chemischen Synthese und der biotechnologischen Herstellung, pflanzliches Material genutzt.

Die kombinatorische Chemie ist heute in der Lage, große Substanzdatenbanken zu synthetisieren und die Biotechnologie konnte in den letzten Jahren neue Wirkstoffe erzeugen, physiologische Prozesse aufklären und entsprechende Zielstrukturen (Targets) bereitstellen.

Obwohl die Strukturen der kombinatorischen Chemie sehr variationsreich sind, ist die Ausbeute an potenten Wirkstoffen (Hits), welche den Weg bis in die Entwicklungsphase finden, meist gering (Bild 1-1).



Bild 1-1: Substanzen in der Entwicklung aus Lit.[6]

Daher versucht man, durch eine große Menge an Substanzproben und Testsystemen (Assays), die Ausbeuten an möglichen Hits zu erhöhen [7].

Hier haben die Naturstoffe mit ihrer Strukturvielfalt wieder an Bedeutung gewonnen, weil ihre strukturelle Vielfalt die synthetischen Substanzdatenbanken sehr gut ergänzen [8, 9].

Durch diese Faktoren entstehen variationsreiche "Test-Pools" mit einer immensen Anzahl von Substanzen. Um diese möglichst schnell testen zu können, bedarf es eines entsprechenden "Such-Systems" (Screening-Systems) mit hohem Durchsatz: dem High-Throughput-Screening (HTS). Die von der Firma EVOTEC OAI entwickelte Screening-Technologie EVOscreen[®] (Bild 1-2) stellt hier ein sehr leistungsfähiges System für das uHTS (ultra-HTS) bereit.



Bild 1-2: EVOscreen[®] aus Lit.[10]

Mit dieser Technologie können pro Tag mehr als 100.000 Proben mit einem Volumen $\leq 10 \ \mu$ l gemessen werden. Der hohe Durchsatz wird durch Miniaturisierung und dem Einsatz der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie erreicht. Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie läßt sich auf Verbindungen mit geringem Molekulargewicht, bis hin zu Zellen anwenden. Die Messung wird in wenigen Sekunden durchgeführt und es ist nur ein sehr kleines Probenvolumen (Femtoliter) notwendig.

Die Miniaturisierung gelingt durch Verwendung von Microtiterplatten, so genannten Nanocarriern[™] (Bild 1-4), und erbringt neben dem hohen Durchsatz eine Ersparnis an Probenmenge und Assay (Messung im Microliter- bzw. Submicroliter-Maßstab). Daraus resultiert zusätzlich eine erhebliche Kostenminimierung [11].

Die Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie ist eine Technik, die zur Analyse molekularer Wechselwirkungen in Lösungen dient. Mit ihrer Hilfe werden die Bewegungen von Molekülen in Lösungen registriert, die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekennzeichnet sind und durch einen fokussierten Laser bestrahlt werden. Bewegen sich die fluoreszenzmarkierten Moleküle durch den Laserfokus, werden sie zur Fluoreszenzemission angeregt (Bild 1-3).





Bild 1-4: Microtiterplatten aus Lit.[10]

Bild 1-3: Schematische Darstellung der Fluoreszenzanregung durch den Laser aus Lit.[12]

Die Bewegungen geben Auskunft über die Diffusionseigenschaften eines fluoreszenzmarkierten Moleküls und sind direkt abhängig von der Teilchenmasse.

Die Erhöhung der Masse eines Biomoleküls führt zu einer Erhöhung der Diffusionszeit und kann damit Informationen über die Wechselwirkung mit einem zweiten Molekül liefern.

Auf Basis dieser innovativen Technologie wurde von der Firma Evotec OAI als Projektkoordinator das BMBF Leitprojekt "Validierte Lead/Target Systeme - Eine horizontal integrierte Verbundstruktur zur automatisierten Pharma-Wirkstofffindung ("Drug Discovery Machine")" - initiiert. In den verschiedenen Teilprojekten wurden Targets und Compounds entwickelt bzw. zur Verfügung gestellt und diese im High-Throughput-Screening zusammengeführt. In dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Teilprojekt: "Pharmakologisch wirksame Inhaltsstoffe einheimischer Pflanzen" wurde Pflanzenmaterial¹ aufgearbeitet, um bioaktive Komponenten bzw. Leitstrukturen zu finden.

Um von dem entsprechenden Pflanzenmaterial zu einer isolierten bioaktiven Substanz zu gelangen, sind verschiedene Schritte notwendig (Bild 1-5 bis 1-7 siehe Seite 15 - 17 [13, 14]):

Zunächst wird auf Basis der zur Verfügung stehenden Targets eine Auswahl an möglichen Untersuchungsobjekten zusammengestellt (Bild 1-5(a)).

Deren Auswahl erfolgt durch Hinweise aus:

- der Ethnomedizin: Positive und negative Erfahrungen der Volksmedizin.
- Datenbankrecherchen: z.B. Medline, SciFinder.
- ökologischen Beobachtungen: Lebensbedingungen der Pflanzen und Interaktion mit ihrer Umwelt.
- phytochemischen/chemotaxonomischen Kenntnissen: Auswahl von Pflanzenarten/Pflanzenfamilien nach ihrem Inhaltsstoffspektrum.

¹ Hierunter werden zur Vereinfachung sowohl Pilze, als auch Höhere und Niedere Pflanzen verstanden.

Daneben kann eine zufällige Objektauswahl getroffen werden, d.h. es werden unspezifische, bisher nicht untersuchte pflanzliche Organismen einem Screening unterworfen.

Dieser Ansatz wurde zum Teil auch von uns verfolgt; insbesondere bei den Targets, wo keine anderen Informationsquellen als sinnvolle Objektauswahlkriterien hinzugezogen werden konnten.

Nach Auffindung, Bestimmung und Dokumentation (Fundort, Menge, Photographie; Bild 1-5(b)) wurden die Rohextrakte (Bild 1-5(c)) von den verschiedenen Pflanzenorganen mit Extraktionsmitteln unterschiedlicher Polarität hergestellt.

Extrakte und Fraktionen (Bild 1-5(d)) der Pflanzenorgane dienten als Grundlage für erste chromatographische Vorprüfungen und Biotests:

- Biotests der Rohextrakte und Biotests nach chromatographischer insbesondere dünnschichtchromatographischer Auftrennung lieferten uns erste Anhaltspunkte hinsichtlich der Bioaktivität (Bioautographie) [15-17].
- Vorauswahl durch erste Vortests der Rohextrakte in verschiedenen Bioassays.

Die Dokumentation der DC-Auftrennung erfolgte mittels Videodokumentation (ProViDoc; Fa. Desaga).

Weitere analytische Untersuchungen mit der HPLC (Bild 1-6(e)) an den positiv bewerteten bioaktiven Extrakten und Fraktionen folgten, um sie für das Screening (Bild 1-6(f)) und die analytischen On-Line-Verfahren (Bild 1-6(g)) zu optimieren:

 Die Präoptimierung unter verschiedenen HPLC-Bedingungen mittels einer automatischen Optimierungssoftware (ChromSword[®]Auto siehe Kapitel 2.3) sollte zu einer maximalen Peakauftrennung führen. Die Peak-Bioaktivitäts-Zuordnungen grenzen im Falle einer Bioaktivität den näher zu untersuchenden Bereich im Chromatogramm weiter ein. Auf Grund der komplexen Zusammensetzung der verschiedenen Extrakte und deren wechselnden Inhaltsstoffspektren, ist eine optimale Auftrennung (möglichst geringe Peaküberlappung) Voraussetzung für ein erfolgreiches "Chemisches Screening²" (z.B. HPLC/UV, HPLC/MS). Hier können vorab strukturelle Informationen generiert werden, um zeitaufwendige Untersuchungen von schon bekannten Substanzen zu vermeiden (siehe Kapitel 3). In diesem Bereich war ein Schwerpunkt meiner Arbeit angesiedelt.

Über die NACONA-Einheit (siehe Kapitel 2.2) wurden erste Peak-Bioaktivitäts-Zuordnungen der Extrakte und Fraktionen (Bild 1-6(h)) vorgenommen.

Parallel zur Isolierung der unbekannten, bioaktiven Komponenten (Bild 1-7(i)) können weitere Untersuchungen durchgeführt werden:

- Strukturaufklärungen, Synthese und/oder Strukturmodifikationen der gefundenen Substanzen, um letztlich eine permanente Versorgung unabhängig vom Pflanzenmaterial zu gewährleisten.
- Sekundärassays und In-Vitro-Toxizitätsprüfungen die ebenfalls in miniaturisierter Form auf der EVOscreen[®]-Plattform durchgeführt werden können, damit potentielle Risiken rechtzeitig erkannt und aufwendige pharmakologische Tests vermieden werden.

die Trotz der geringen Substanzmengen, für die Messungen im EVOscreen[®]-System notwendig sind, muß eine ausreichende Versorgung mit Pflanzenmaterial gesichert sein. Die bioaktiven Substanzen kommen teilweise nur in geringen Mengen vor, so daß genügend Lagerkapazität benötigt wird, um eine schnelle, ausreichende Verfügbarkeit des Pflanzenmaterials auch zu einem Zeitpunkt sicherzustellen. Das Versiegen einer potentiellen späteren Wirkstoffquelle auf Grund von Wachstumsperioden, jahreszeitlichen oder

² Strukturinformationen durch spektrale Daten: LC/UV; LC/MS, MSⁿ; LC/NMR

ökologischen Veränderungen, kann einen möglicherweise potenten Wirkstoff weiteren Tests für immer vorenthalten. Dieser Lage kann man nur durch chemische Synthese, sofern möglich, entgehen. Aber auch in diesem Fall muß zunächst genügend Substanz für die strukturelle Aufklärung gewonnen werden können.

Kritische Punkte beim HTS liegen demnach aus mehreren Gründen **nach** der - sehr schnell möglichen - Determinierung von bioaktiven Komponenten in einem HPLC-Chromatogramm, wobei an erster Stelle die Notwendigkeit zu nennen ist, möglichst schnell, d.h. durch den Einsatz von On-Line-Kopplungstechniken Strukturinformationen von diesen bioaktiven Verbindungen zu erhalten.

Für ein effizientes Weiterarbeiten ist z.B. eine umgehende Entscheidung, ob es sich bei diesen Substanzen um bereits bekannte - und gegebenenfalls sogar schon pharmakologisch getestete - Naturstoffe handelt, von essentieller Bedeutung.

An dieser Schnittstelle ist die vorliegende Arbeit thematisch angesiedelt.

1.2 Zielsetzung

Im Rahmen dieser HPLC/HTS-Analysen bzw. deren Vorbereitung kristallisierten sich sehr schnell zwei grundlegende Probleme heraus:

 Zum einen erforderte die Vielzahl der heterogenen und in ihrer Zusammensetzung sehr unterschiedlichen Naturstoffextrakte jeweils eine an diese Verhältnisse angepaßte schnelle Optimierung der HPLC-Trennparameter. Hierbei sollte die Eignung einer computergestützten HPLC-Trennoptimierung bei der Auffindung von geeigneten Chromatographiebedingungen für Pflanzenextrakte im HTS untersucht werden. Insbesondere sollte geprüft werden, ob hiermit eine generelle Beschleunigung bei der Methodenentwicklung zu erreichen war. Zum anderen müssten nach der Determinierung einer bioaktiven "Hitkomponente" mittels HPLC/HTS möglichst umgehend strukturelle Informationen über diese Verbindung generiert werden. Es ist in diesem Zusammenhang einleuchtend, daß es keinen Sinn macht, einerseits Bioaktivitätsbestimmungen von mehreren 100 HPLC-Peaks pro Tag mittels der HPLC/HTS-Kopplung durchführen zu können, auf der anderen Seite aber viele Tage auf Strukturinformationen von nur einer einzigen Hitkomponente warten zu müssen. Hierzu sollte unter Anwendung verschiedener massenspektrometrischer Techniken (Particle Beam, ESI, APCI und z.T. auch ESI/MSⁿ) Leistungsfähigkeit und Grenzen der HPLC/MS-Kopplung als On-Line-Sreening-System ("Chemisches Screening") bei der Analyse ausgewählter Naturstoffgruppen untersucht werden.



Bild 1-5: Vom Pflanzenmaterial zur isolierten Substanz aus Lit.[14]



Bild 1-6: Vom Pflanzenmaterial zur isolierten Substanz aus Lit.[14]

16



Bild 1-7: Vom Pflanzenmaterial zur isolierten Substanz aus Lit.[14]

2. HPLC-Untersuchungen

Seit der Trennung von Pflanzenfarbstoffen mit Hilfe der Säulenchromatographie durch Tswett im Jahre 1906 [18], sind die Chromatographietechniken stetig weiterentwickelt und verbessert worden. Die Entwicklung der Geräte für die HPLC begann Mitte der 70er Jahre und ist heute noch vor der Gaschromatographie die am meisten genutzte Chromatographietechnik. Die weite Verbreitung der HPLC und die Nutzung in ca. 75% aller Analytik-Labore ist auf mehrere Faktoren zurückzuführen [19]:

- Die Anzahl, Qualität und Verfügbarkeit der hochreinen Elutionsmittel für die HPLC ist gestiegen.
- Die Pumpensysteme wurden im Laufe der Jahre soweit verbessert, daß ein zuverlässiger Betrieb bei verschiedenen Flußraten, bei hohem Druck und im Gradientensystem möglich ist.
- Die Entwicklung von automatisierten Probenaufgabesystemen, in Verbindung mit einem Datenerfassungssystem, die für ein unbeaufsichtigtes Arbeiten notwendig sind.
- Die Anzahl und Verfügbarkeit von HPLC-Säulen mit unterschiedlichen Längen, Durchmessern und Packungsmaterialien hat sich stark erhöht.
- Die Anzahl der kompatiblen On-Line-Detektoren hat sich vergrößert.

Gegenüber der GC hat die HPLC den Vorteil der wesentlich geringeren thermischen Probenbelastung, d.h. das Risiko von entsprechenden Umlagerungen oder einer Zerstörung des Moleküls ist deutlich vermindert.

Hinzu kommt - bedingt durch die viel weitere Spannbreite der Polarität und des Molekulargewichts der Verbindungen - der wesentlich größere Arbeitsbereich der HPLC (Bild 2-1). Zudem besteht die Möglichkeit, die Probenlösungen schwer flüchtiger Substanzen direkt zu injizieren, ohne Derivatisierungs- oder Extraktionsschritte vorzuschalten. Dadurch kommt es zu einer Zeitersparnis und einem höheren Probendurchsatz.

Ein weiterer Vorteil liegt im leichteren Handling des Eluats, wodurch im Anschluß an die Chromatographie Fraktionen für das Screening bereitgestellt werden können. Insbesondere dadurch ist die HPLC in Kombination mit der NACONA nicht nur die bevorzugte sondern zur Zeit auch einzig mögliche Technik.



Bild: 2-1: Arbeitsbereich der GC und LC aus Lit.[20]

2.1 Instrumentelle Voraussetzung

Die Module einer HPLC-Apparatur (Bild 2-2) bestehen grundsätzlich aus einem Elutionsmittelvorrat, einer Pumpe (Gradientensystem), einem Probenaufgabesystem (Autosampler), einer Trennsäule, einem Detektor und einem Datenerfassungs- und Steuerungssystem.



Bild 2-2: Schematischer Aufbau einer HPLC-Apparatur

2.1.1 Elutionsmittel

Die Elutionsmittel für die HPLC nehmen einen wichtigen Platz in der Chromatographie ein. Sie haben als mobile Phase, ebenso wie das Säulenmaterial (stationäre Phase), einen besonderen Einfluß auf die Trennung der zu untersuchenden Substanzen. Auf Grund der hohen Säulenpreise, stehen häufig nur eine kleine Anzahl von unterschiedlichen Säulen für verschiedene chromatographische Probleme zur Verfügung. Der vergleichsweise geringe Preis und die Kombinationsmöglichkeit der Elutionsmittel sorgt für eine schnelle Anpassung an neue Bedingungen, so daß hier zunächst durch Variation der Eluentenzusammensetzung eine Verbesserung der Chromatographiebedingungen erzielt werden kann.

In der Reversed-Phase-Chromatographie finden hauptsächlich Mischungen von Wasser mit verschiedenen organischen Flüssigkeiten Anwendung. Die am häufigsten genutzten organischen Flüssigkeiten sind Acetonitril (MeCN), Methanol (MeOH) und Tetrahydrofuran (THF). Zusätzlich finden Puffer (Phosphatpuffer und Acetatpuffer) und Säuren (Phosphorsäure, Schwefelsäure, Trifluoressigsäure, Ameisensäure, Essigsäure) als Modifier Verwendung, um ionische oder ionisierbare Substanzen zu chromatographieren [21]. In den von mir durchgeführten Versuchen wurde Acetonitril als Laufmittel verwendet. Für die Chromatographie spielt weiterhin die Elutionskraft, die Stabilität, der UV-"Cutoff" und die Viskosität des betreffenden Elutionsmittels eine wichtige Rolle. Nähere Angaben über die Elutionskraft (eluotrope Reihe) sind in Lit.[22] tabelliert. Wird THF verwendet, ist auf Peroxidbildung zu achten, die sich störend auf die Chromatographie auswirkt. Trotz der höheren Toxizität des MeCN, ist der Vorteil gegenüber MeOH und THF in der HPLC zu erkennen. MeCN hat einen niedrigeren UV-"Cutoff", wodurch Substanzen mit schwachem Chromophor der Messung über den Dioden-Array-Detektor in niedrigeren UV-Bereichen zugänglich gemacht werden können (Bild 2-3).

Die niedrigere Viskosität der MeCN-Wasser-Mischungen (Bild 2-4) erlaubt die Chromatographie im Gradientenbetrieb bei höheren Flußraten mit geringerem Druck. Dies führt zu kürzeren Analysezeiten und einem erhöhten Probendurchsatz. Durch diese Eigenschaften ist Acetonitril für die computergestützte Trennoptimierung (Kapitel 2.3.2) und die HPLC/HTS-Kopplung am besten geeignet.



Bild 2-3: UV-"Cutoff" von MeCN; MeOH; THF aus Lit.[19]



Bild 2-4: Viskosität von Wasser in Abhängigkeit der Konzentration von MeCN, MeOH und THF aus Lit.[19]

2.1.2 Probenaufgabesystem

Der Autosampler ist bei hohem Probendurchsatz unverzichtbar für die unbeaufsichtigte Probenaufgabe und die computergestützte Trennoptimierung. Durch die computergesteuerte Injektion werden reproduzierbarere Analysendaten erhalten.

2.1.3 Pumpe

Die Pumpen in der HPLC sorgen bei einem Druck von 40 bis 400 bar für einen konstanten Fluß (0,05 bis 100 ml/min) der Elutionsmittel im Verlauf der Trennung. Hierdurch erreicht man eine gute Reproduzierbarkeit.

Über die Pumpe erfolgt die Steuerung der Eluentenzusammensetzung in einem bestimmten Zeitintervall. Während bei der isokratischen Elution über den gesamten Zeitraum die Chromatographie mit identischer Elutionsmittelzusammensetzung durchgeführt wird, wird bei der Gradientenelution die Zusammensetzung der Eluenten in Abhängigkeit von der Zeit geändert. Der Vorteil der Gradientenelution, im Vergleich zur isokratischen Elution, ist die kürzere Analysenzeit bei akzeptabler Trennung und die Möglichkeit, auch komplex zusammengesetzte Mischungen wie z.B. Naturstoffextrakte in einem Analysenlauf auftrennen zu können. Die Nachteile sind längere Equilibrierungszeiten, Basisliniendrift durch die Änderung der Eluentenzusammensetzung und die Nichtverwendbarkeit eines Brechungsindex-Detektors.

Trotz dieser Nachteile und Beschränkungen ist die Zeitersparnis in der Gradientenelution meist groß und gerade bei heterogenen Multikomponentengemischen die bevorzugte Methode.

2.1.4 Trennsäulen

In der HPLC stehen - je nach analytischer Aufgabe - Trennsäulen unterschiedlicher Länge und Durchmesser zur Auswahl, die mit Packungsmaterial (dessen Oberfläche die stationäre Phase darstellt/trägt) unterschiedlicher Größe, Form und Siebfraktion gefüllt sind. Sie werden in verschiedene Klassen eingeteilt (vgl. Tabelle 2-1).

Klasse	Durchmesser [mm]	Länge [cm]	Partikelgröße [µm]	Inj.Vol	Fluß [ml/min]
Microbore	< 1	5 - 25	< 2	< 1 µl	< 0,05
Narrowbore	2 - 3	3 - 30	1,5 - 5	1 - 10 µl	0,05 - 2
Analytisch	3,5 - 5	5 - 30	3 - 10	5 - 50 µl	0,5 - 5
Semi- präparativ	5 - 25	10 - 100	10 - 50	100 μl - 100 ml	2 - 100

Tabelle 2-1: Einteilung der Trennsäulen aus Lit.[19]

In der HPLC kommen als stationäre Phasen hauptsächlich chemisch modifizierte Kieselgele (Bonded Phase) zum Einsatz. Kieselgele mit Oberflächen-Silanolgruppen können mit einer monofunktionellen organischen Verbindung zur Reaktion gebracht werden. Dadurch ist die Erzeugung einer monomeren Schicht mit organischen Molekülgruppen möglich, die die Oberfläche bedeckt.

Je nach eingesetzter funktioneller Gruppe erhält man eine stationäre Phase mit polarem, mittelpolarem oder apolarem Charakter. Werden Nitrophenyl- oder Polyolgruppen eingeführt, bekommt die stationäre Phase einen polaren Charakter. Die Verwendung der polaren Aminopropylgruppen kann durch den basischen Charakter schon als Übergang zur Ionenaustausch-Chromatographie gesehen werden [21], welche normalerweise über ein Sulfonsäure- oder Ammoniumgruppen tragendes Harz durchgeführt wird. Die Einführung von Cyanopropyl- oder Diolgruppen erbringt eine mittelpolare Phase.

Die genannten Bereiche können als Normal-Bonded-Phasen zuvor zusammengefasst werden, während die Modifizierung mit Phenyl- oder Alkylgruppen zu einer "Apolarisierung" führt, d.h. die Polarität wird umgekehrt (Reversed-Bonded-Phase) [19]. Ein Vorteil dieser Modifizierungen, insbesondere der Normal-Bonded-Phasen, ist sowohl die mögliche Verwendung unter Bedingungen der Normal-Phasen-Chromatographie (NPC), als auch der Reversed-Phase-Chromatographie (RPC).

Trotz der dualen Verwendbarkeit der Normal-Bonded-Phasen ist die RPC mit apolaren stationären Phasen das am häufigsten genutzte Säulenmaterial [19] mit breiter Anwendungsmöglichkeit (Tabelle 2-2) in der HPLC.

Ergänzend soll hier noch die Größenausschlusschromatographie (Size-Exclusion Chromatographie = SEC) genannt werden. In der Ausschlusschromatographie werden vernetzte Polymer- und Kieselgele aber auch andere Materialien mit definierter Porengröße verwendet. Die Trennung erfolgt durch die Fähigkeit der Moleküle, in Abhängigkeit von ihrer Größe, in die Poren des Packungsmaterials einzudringen. Näheres findet sich in Lit.[23, 24].

Molekulare Masse der Analyten							
	M	< 2000	$M_{\rm r} > 2$		> 2000		
wasserlöslich			1	1			
nicht- ionisch	nicht- ionisch ionisch		wasserunlöslich	wasserlöslich	wasserunlöslich		
	basisch	sauer					
RPC	Ionenaustausch Chromatographie		RPC	SEC			
Normal			Normal Bonded				
Bonded	Ionenpaar		Phase				
Phase	Chromatographie		NPC				
SEC	RPC		SEC				

Tabelle 2-2: Trennmöglichkeiten der HPLC nach Lit.[25]

2.1.5 Detektoren

Für die Methodenentwicklung in der HPLC ist der Dioden-Array-Detektor (DAD) sehr gut geeignet, da er im Gegensatz zum Brechungsindex-Detektor (RI) unter den Bedingungen der Gradientenelution betrieben werden kann. Durch seine Meßtechnik ist er in der Lage, umgehend spektrale Informationen über die detektierten Peaks zu liefern.

Die aufgenommenen Spektren können in Datenbanken abgelegt und bei Bedarf für die Identitätsprüfung herangezogen werden. Nachteile dieser Meßtechnik sind die oft geringe Selektivität (s. Seite 64; Bild 2-8, Umbelliferon und Visnadin) und das Unvermögen, Substanzen ohne Chromophor zu erfassen. Als universellere, chromophorunabhängige und quasi komplementäre Technik ist in der Gradientenelution eine massenspektrometrische Detektion in Form einer Kopplung mit unterschiedlichen MS-Systemen einsetzbar.

2.1.6 Datenerfassung und Steuerung

Die Steuerung der einzelnen HPLC-Module erfolgt über einen Computer. Dieser steuert die Pumpe, den Autosampler und den Detektor in Abhängigkeit von der Methode. Die Daten des Detektors werden an den Computer gesendet, wo sie dann zur weiteren Verarbeitung und Auswertung zur Verfügung stehen. Besonders bei der unbeaufsichtigten Probenaufgabe kann durch die Verwendung der Computersteuerung gleichzeitig eine Überwachung des Systems erfolgen. Zudem übernimmt der Computer bei der computergestützten Trennoptimierung (siehe Kapitel 2.3) die Berechnungen der Optimierungsschritte.

2.2 Probleme der Naturstoffanalytik im Hochdurchsatzscreening (HTS)

Da das HTS - nicht nur in Kopplung mit der vorgeschalteten HPLC sondern auch allein - instrumentell, meßtechnisch sowie bezüglich der Datenauswertung sehr arbeitsaufwendig ist, sollte zunächst versucht werden, mit einfachen Methoden eine Vorprüfung der zu untersuchenden Extrakte auf Bioaktivität durchzuführen.

Dies kann im Rahmen von In-Situ-Bioassays direkt auf der Dünnschichtplatte (Bioautographie) [15, 16, 26-29] erfolgen, entweder am Gesamtextrakt oder an säulenchromatographisch vorgetrennten Fraktionen.

Die auf diese Weise als bioaktiv determinierten Extrakte, Fraktionen oder DC-Banden können dann mit größeren Erfolgsaussichten (bei entsprechender Assay-Übertragbarkeit) dem HTS zugeführt werden.

Um die Naturstoffextrakte dem HTS in dem speziellen Screening-System der Fa. EVOTEC OAI (EVOscreen[®]) zugänglich zu machen, müssen sie auf Nanocarrier[™] (1536/2080-Wells³ mit 1 µl - 5 µl Volumen pro Well) übertragen werden. Das Pipettieren der Extrakte und der Assays kann bei kleiner Probenanzahl und großformatigen Titerplatten (96-Wells mit 200 µl Volumen) von Hand durchgeführt werden; wobei das Pipettieren oder Umformatieren einer größeren Probenanzahl auf das Nanocarrier[™]-Layout jedoch nur automatisch zu bewältigen ist. Die Titerplatten können in der EVOTEC-Einheit MITONA mit Hilfe von piezoelektronisch gesteuerten Dispensern vom 96-Well- oder 336-Well-Format in das Nanocarrier[™] Format überführt werden und stehen dann, nach Zusetzung des Assays für die Messung in der Screening-Einheit SCARINA zur Verfügung.

Für die automatische Isolierung von Fraktionen aus Naturstoffextrakten gibt es verschiedene Ansätze [7]. In jüngster Zeit ist der Fa. EVOTEC OAI eine besondere gerätetechnische Entwicklung gelungen, die die Analytik bzw.

³ Vertiefungen der Titerplatten

Wirkstoff-Findung in komplexen Substanzmischungen wie z.B. Pflanzen- oder Pilzextrakten revolutionieren wird und die Thematik meiner Arbeit maßgeblich bestimmte. Es handelt sich dabei um die direkte Kopplung einer vorgeschalteten HPLC-Anlage mit der EVOscreen[®]-Einheit (NACONA).

Der Vorteil dieser Technologie liegt darin, daß damit die Bioaktivität eines Extraktes direkt einzelnen Komponenten zugeordnet werden kann und diese folglich viel gezielter und ökonomischer zu isolieren sind, da aufwendige Isolierungsarbeiten unwirksamer Substanzen vermieden werden können.

Die von EVOTEC OAI entwickelte EVOscreen[®]NACONA (Bild 2-5) ist in der Lage, die Fraktionierung der Extrakte über die HPLC unbeaufsichtigt durchzuführen. Nach der Injektion wird der Gesamtextrakt über die HPLC im Gradientenbetrieb in einem definierten Zeitfenster getrennt. Die Detektion erfolgt über einen Dioden-Array-Detektor. Das Eluat wird gesplittet (80% werden verworfen) und über piezoelektrisch gesteuerte Dispenser in definierten Samplingraten mit Tröpfchengrößen < 1 nl auf die Nanocarrier[™] im 2080-Well-Format gesprüht. Anschließend wird das Elutionsmittel im Vakuum bei 30 °C im Stickstoffstrom entfernt.



Bild 2-5: EVOscreen® NACONA

Jetzt können die Fraktionen bei -20 °C bis +4 °C gelagert werden oder stehen, nachdem sie wieder in Lösung gebracht und der gewünschte Assay zugesetzt wurde, für die Messung in der SCARINA bereit. Die EVOscreen[®]-Messung erfolgt durch Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (siehe Kapitel 1) und die Aktivität kann dem HPLC-Peak über das entsprechende Well zugeordnet werden.

Obwohl eine vollständige Trennung des Extraktes über die HPLC oft nicht möglich ist [7], erbringt sie eine erhebliche Zeitersparnis bei der Suche nach bioaktiven Substanzen in Naturstoffextrakten, da die aufwendigen Vorfraktionierungen nicht mehr durchgeführt werden müssen und die Suche auf bestimmte Abschnitte des HPLC-Chromatogramms beschränkt bleibt, d.h. wesentlich gezielter erfolgt.

Die optimale Abstimmung der einzelnen EVOscreen[®]NACONA-Module läßt Veränderungen der Säulendimension und der Eluentenzusammensetzung nur bedingt zu. Die Dispenser müssen mit definierten Flußraten arbeiten und können Fraktionen bis zu 1 µl auf jedes Well der Titerplatte verteilen.

Die Eluentenzusammensetzung hat erheblichen Einfluß auf die Fluidität und damit auf die Dispensierung des Eluats. Durch Änderung der Fluidität können die Dispensiereinheiten keine optimalen Tröpfchen bilden und auf die einzelnen Wells versprühen, d.h. es ändert sich die dosierte Menge. Dadurch kann es zu Fehlern bei der Peakzuordnung zwischen dem HPLC-Signal und den fluoreszenzspektroskopischen Daten kommen, da jedem Well ein Abschnitt im Chromatogramm zugeordnet wird. Daher ist bei einem Elutionsmittelwechsel eine erneute Grundeinstellung des gesamten Systems nötig. Ein Säulentausch ist möglich, sofern gleiche Flußraten (0,2 - 0,6 ml/min) genutzt werden können und eine Trennung der Probe in einem vorgegebenen Zeitfenster abgeschlossen werden kann. Eine Verringerung der Analysenzeit durch Flußerhöhung ist durch die Samplingrate der Dispensiereinheit begrenzt.
Eine Steigerung der Trennleistung kann hier nur durch Änderung der stationären Phase oder der Temperatur (Säulenofen) und nicht durch eine Verlängerung der Säulen (dies hätte Druckerhöhung, Änderung der Tot- und Analysenzeit zur Folge) erzielt werden.

Die Veränderung der Säulentemperatur ist nur begrenzt möglich, da diese wiederum Einfluß auf die Fluidität der Eluenten und damit auf die Dispensiergenauigkeit hat.

Die schonende Vakuumtrocknung des Eluats kann leicht flüchtige Verbindungen der Messung entziehen; ferner zeigte sich, daß die Einengung insbesondere bei komplexen Naturstoffextrakten zur Bildung von schwer löslichen Niederschlägen führen kann. Der Zusatz von Lösungsvermittlern kann diesem Effekt zwar entgegenwirken; diese sind aber nur einsetzbar, wenn sie die Funktionalität der zu applizierenden Assays nicht beeinträchtigen. Zusätze von nicht-flüchtigen Puffern sind nicht möglich, auch wenn es zu einer Verbesserung der Trennung führt. Die bei der Trocknung ausfallenden Salze könnten dann ebenso wie die schwerlöslichen Niederschläge der Extrakte nicht wieder in Lösung gebracht werden oder den Assay zerstören und die Messung in der SCARINA behindern. Daher werden dem Elutionsmittel nur geringe Mengen an Ameisensäure zugesetzt.

Eine Aussage über die Konzentrationsverhältnisse der enthaltenen Substanzen kann bei unbekannter Extraktzusammensetzung auf Grund sehr unterschiedlicher physiko-chemischer Eigenschaften nur grob-annähernd über die Signalintensitäten der detektierten Komponenten erfolgen. Diese sind wegen der unterschiedlichen Absorptionsstärken der einzelnen Chromophore mit dem routinemäßig eingesetzten UV-Detektor (z.B. DAD) nur unter bestimmten Voraussetzungen vergleichbar; Verbindungen ohne Chromophor sind auf diese Weise gar nicht nachweisbar.

Entsprechend fehlerbehaftet sind auch quantitative Aussagen über die Mengen einzelner Inhaltstoffe, die durch beziehen der Signalfläche auf die Gesamtmenge des zur Trockne eingeengten Extraktes erhalten werden. Ein weiteres Problem ergibt sich aus den großen Konzentrationsunterschieden einzelner Komponenten in vielen pflanzlichen Rohextrakten.

Eine Überladung der HPLC-Säule oder zu starke Detektorsignale hochkonzentrierter Extrakte müssen durch Verdünnung ausgeglichen werden. Eine notwendige Verdünnung erbringt zwar eine Reduzierung des stärksten Signals im Chromatogramm, es besteht aber die Gefahr, daß eine potentiell aktive Komponente durch diese Konzentrationserniedrigung bei der Bioaktivitätsprüfung in der nachgeschalteten Screeningeinheit als unwirksam erscheint, weil sie unter die Nachweisgrenze des eingesetzten Assays fällt.

Ein Aktivitätsverlust der Fraktionen im Vergleich zum Gesamtextrakt kann auch auf den Verlust eines synergistischen Effektes hinweisen; dieser läßt sich bei komplexen Gemischen jedoch fast nie aufklären.

Auch im Rahmen des Screenings werden bei der (vorgeschalteten) HPLC-Analyse in der NACONA-Einheit Substanzen, die nicht UV-aktiv sind oder nur einen schwachen Chromophor besitzen, nur im Falle eines positiven Signals in der Screeningeinheit erkannt. Dies war auch im Falle des Extraktes von Lenzites betulina zu beobachten. Entsprechend könnte eine Kopplung der EVOscreen[®]NACONA an einen parallelgeschalteten MS-Detektor, der das verworfenen Eluat analysiert, zusätzliche Informationen auch von nicht UV-aktiven Substanzen liefern.

Die Untersuchung verschiedener, unbekannter Naturstoffextrakte erfordert auf Grund der komplexen und heterogenen Zusammensetzung eine ständige Optimierung und Adaptierung der chromatographischen Bedingungen. Es war deshalb ein Ziel meiner Arbeit, zu untersuchen, in wieweit die Einschränkung der apparativen Optimierungsmöglichkeiten der EVOscreen[®]NACONA durch die Verwendung einer vorgeschalteten computergestützten Trennoptimierung auszugleichen war. Diese automatisierte Trennoptimierung soll eine optimierte Auflösung im Sinne einer maximalen Peakanzahl erzielen und auf die vorgegebenen Parameter der EVOscreen[®]NACONA übertragen werden mit dem Ziel, Bioaktivitätsinformationen von möglichst einheitlichen (d.h. nicht überlagerten) Peaks zu erhalten.

2.3 Computergestützte HPLC-Trennoptimierung

2.3.1 Kenngrößen der Chromatographie

Das Ziel chromatographischer Untersuchungen ist die vollständige Auftrennung einer Mischung, um eine qualitative und ggf. auch quantitative Analyse vorzunehmen.

Die Chromatographie wird mit Hilfe verschiedener Kenngrößen beschrieben:

• Totzeit t_m:

Die Zeit einer nicht verzögerten Substanz zwischen Injektion und Peakmaximum. Dies entspricht der Zeit, die eine mobile Phase benötigt, um durch die Trennsäule zu gelangen.

- Gesamtretentionszeit t_r: Die Zeit zwischen der Injektion und dem Peakmaximum einer retardierten Substanz. Zwei unterschiedliche Stoffe werden dann getrennt, wenn ihre Retentionszeiten verschieden sind.
- Nettoretentionszeit t_r' = t_r t_m:
 Dies ist die Aufenthaltszeit einer Substanz in der stationären Phase.
 Getrennte Stoffe unterscheiden sich durch die Nettoretentionszeit. Je länger eine Substanz in der stationären Phase verweilt, desto später wird sie eluiert.
- Retentions faktor (= Kapazitäts faktor) $k = \frac{t_r t_m}{t_m}$:

Dieser stellt das Verhältnis der Nettoretentionszeit einer Substanz zur Totzeit dar. Er ist zur Charakterisierung einer Substanz geeignet, da er von der Säulenlänge und Fließgeschwindigkeit der mobilen Phase unabhängig ist. • Trennfaktor (= relative Retention) $\alpha = \frac{k_2}{k_1}$ (k₂ > k₁):

Das Verhältnis der Retentionsfaktoren zweier Substanzen. Dies ist ein Maß für die Eigenschaft des chromatographischen Systems, zwei Substanzen trennen zu können, d.h. seine Selektivität.

• Trennstufenzahl (= TZ) [30] N = 5,54 × $\left(\frac{t_r}{b_{0,5}}\right)^2$: b_{0,5}: Peakbreite in halber Peakhöhe

Die Anzahl der abgeschlossenen Trennschritte in einer Säule. Der Begriff beschreibt eine Modellvorstellung, welche die tatsächlich ablaufenden Prozesse nicht korrekt widerspiegelt. Er wird trotzdem benutzt um die Trennleistung eines chromatographischen Systems zu beschreiben. Eine Säule mit hoher TZ kann Komponenten trennen, die sich in ihrem Trennfaktor α nur wenig unterscheiden.

• Symmetriefaktor [30]
$$\frac{b_{0,05}}{2A}$$
:

- A: Entfernung zwischen der durch das Maximum des Peaks gezogenen Senkrechten und dem aufsteigenden Kurvenast bei einem Zwanzigstel der Peakhöhe.
- b_{0,05}: Peakbreite bei einem Zwanzigstel der Peakhöhe

Das Tailing eines benachbarten Peaks kann zu einem Fehler in der Berechnung der Peakfläche führen (Bild 2-6 A u. B) und die anschließende Peakzuordnung über die Fläche erschweren.



Bild: 2-6: Beeinflussung der Peakfläche durch Tailing aus Lit.[19]

• Auflösung [30] R_s=1,18 ×
$$\frac{t_{r_2} - t_{r_1}}{b_{0,5_2} + b_{0,5_1}}$$
 (tr2>tr1):

Die Auflösung beschreibt die Qualität der Trennung zweier Substanzen 1 und 2

Zusammenfassend ist die Auflösung in Abhängigkeit des Trennfaktors, des Retentionsfaktors und der Trennstufenzahl in der Fundamentalgleichung der Chromatographie dargestellt:

$$R_{s} = 0,25 \times \frac{\alpha - 1}{\alpha} \times \frac{k}{1 + k} \times \sqrt{N}$$

Term 1 Term 2 Term 3

Eine Verbesserung der Auflösung kann somit durch die Variation der einzelnen unabhängigen Terme 1 bis 3 erzielt werden [25]:

- Eine Änderung des Selektivitätsterms (Term 1) kann durch einen Wechsel des Eluenten und/oder der stationären Phase erfolgen.
- Der Verzögerungsterm (Term 2) kann durch Änderung der Polarität der mobilen Phase bzw. der Aktivität der stationären Phase (bei Absorptionsprozessen) beeinflußt werden oder durch die Temperatur (bei Verteilungsprozessen).
- Der Dispersionsterm (Term 3) gibt den Einfluß der Trennleistung auf die Auflösung wieder, d.h. er wird durch Säulenlänge, Partikelgröße, u.a. beeinflußt.

Die Veränderung der Terme 1 bis 3 beeinflußt neben der Auflösung auch weitere chromatographische Parameter, wie den Druck, die Flußrate und die Analysenzeit:

Eine längere Säule erhöht die Trennleistung. Dies führt bei identischem Durchmesser und gleicher Flußrate aber zu einer Druckerhöhung und zu längeren Analysenzeiten. Durch die Reduzierung der Partikelgröße werden die Trennleistung und der Druck erhöht.

Der Druckanstieg macht, falls der maximale Systemdruck erreicht wird, eine Verringerung der Flußrate notwendig.

Die Reduzierung der Flußrate erhöht die Analysenzeit. Die Steigerung der Elutionskraft führt durch Erniedrigung des Retentionsfaktors zu kürzeren Analysenzeiten.

Eine Erhöhung des Trennfaktors wird nur durch den Wechsel des Elutionsmittels oder der stationären Phasen erzielt.

Die Optimierung der einzelnen Terme wird mit zunehmender Komplexität der Mischung immer aufwendiger. Es wird immer ein Kompromiß zwischen optimaler Trennung und Analysenzeit in Abhängigkeit vom gewählten Fließmittel und der stationären Phase notwendig sein. Eine Änderung der Säulendimension, der Partikelgröße, des Packungsmaterials oder der stationären Phase ist nur durch die Anschaffung einer neuen Säule zu erreichen, also mit entsprechenden Kosten verbunden. Daher wird bei der Methodenentwicklung zunächst versucht, die Optimierung über das Fließmittelsystem oder den Elutionstyp zu bewältigen. Dieses Vorgehen steht auch bei der Optimierung der Naturstoffextrakte für die EVOscreen[®]NACONA im Vordergrund, da andere Parameter nur begrenzt variierbar sind (siehe Kapitel 2.2).

2.3.2 Die Trennoptimierungssoftware ChromSword[®]Auto

Die Entwicklung von Methoden in der HPLC ist häufig ein zeitaufwendiges Unterfangen. Sofern nicht auf schon bekannte Methoden zurückgegriffen werden kann, ist die Auswahl von Säulentyp, Sorbens und Laufmittel zu treffen. Ebenso muß über Verwendung von Puffern, Temperatur und Elutionstyp entschieden werden. Die Möglichkeiten sind vielfältig und ein Testen aller Kombinationen ist aus zeitlichen und finanziellen Gründen nicht durchführbar.

Während die Chromatographiebedingungen für Standardsubstanzen häufig schnell aufzufinden sind, ist für die Auftrennung von Substanzmischungen bzw. Naturstoffextrakten oft ein beträchtlicher Zeitaufwand erforderlich. Insbesondere Substanzen mit ähnlichen physikalisch-chemischen Eigenschaften und Naturstoffextrakte unbekannter Zusammensetzung stellen hohe Anforderungen an das chromatographische System, da eine schnelle isokratische Trennung meist nicht möglich ist.

Die in den letzten Jahren gestiegene Rechenleistung der Computer ließ die Entwicklung von Computerprogrammen zu, die in der Lage sind, chromatographische Experimente zu simulieren und dadurch eine Zeitersparnis in der Entwicklung von Methoden zu erzielen. Neben DryLab[®] (Fa. LC Resources) [31] ist ChromSword[®]Auto (Fa. Merck) eines dieser Computerprogramme.

Mit ChromSword[®]Auto ist die Möglichkeit gegeben, in der NPC, IEC und RPC computergestützte HPLC-Trennoptimierungen durchzuführen (Tabelle 2-3). Insbesondere die vollautomatische Trennoptimierung (siehe Kapitel 2.3.2.3) in der RPC ist bisher einzigartig und wurde von mir für die Methodenentwicklung genutzt.

	NPC	IEC	RPC
Eluentenzusammensetzung	+	-	+
Säulentemperatur	+	+	+
Pufferkonzentration	-	+	-
pH-Wert der Eluenten	-	-	+
Gradientenprofile	-	-	+
Vollautomatische Methodenentwicklung	-	-	+
Säulenschaltung	_	_	+

Tabelle 2-3: Optimierungsmöglichkeiten mit ChromSword[®]Auto nach Lit.[32]

Zusätzlich können die Optimierungsmöglichkeiten der RPC miteinander kombiniert werden (2-dimensionale Methodenentwicklung). Die RPC ist durch ihre vielseitige Verwendbarkeit (siehe Tabelle 2-2 Kapitel 2.1.4) das am besten geeignete Säulenmaterial für die Methodenentwicklung und die computergestützte Trennoptimierung mit ChromSword[®]Auto (Tabelle 2-3). Daher wird im Folgenden nur auf die Optimierung in der RPC eingegangen, zumal diese auch bei der HPLC-Auftrennung in der NACONA-Einheit verwendet wird.

Drei Arten der Methodenentwicklung für die RPC mit ChromSword[®]Auto sind zu unterscheiden:

- Virtuelle Methodenentwicklung
- Empirische Methodenentwicklung
- Vollautomatische Methodenentwicklung

2.3.2.1 Virtuelle Methodenentwicklung

Die virtuelle Methodenentwicklung berechnet zunächst isokratische Retentionsmodelle für die Proben in Abhängigkeit von der Strukturformel und der gewählten Kombination aus der stationären Phase und dem Elutionsmittel. Als Laufmittel kommen MeOH, MeCN, THF und Wasser in Frage.

Die Berechnung erfolgt auf Grundlage der Gleichung für die Retention einer Substanz in der RPC [32-35]:

ln k = a ×
$$\sqrt[3]{V^2}$$
 + b × (ΔG) + c
k: Retentionsfaktor
V: molekulare Volumen des Analyten
 ΔG : Interaktionsenergie des Analyten mit Wasser
a, b, c: Charakteristika des Packungsmaterials und des
Eluenten

V und Δ G werden durch Eingabe der Strukturformel in ChromSword[®]Auto berechnet. Die Werte der Variablen a, b und c gehen entweder durch die eigene Säulenkalibrierung mit Referenzstandards [33] in die Berechnung ein oder werden aus der enthaltenen Säulendatenbank entnommen. Das virtuelle Retentionsmodell berechnet an Hand dieser Werte die optimalen Startbedingung für die Trennoptimierung. Nachdem die Methode entsprechend der virtuellen Daten erstellt wurde, können die empirischen Daten (siehe Kapitel 2.3.2.2 Empirische Methodenentwicklung) der anschließenden realen Läufe für die weitere Optimierung von V und Δ G genutzt werden [36]. Durch die Simulation mit den in der Datenbank enthaltenen Säulen-Eluenten-Systemen sind theoretische Voraussagen über das Verhalten der Substanzen möglich.

Die Datenbank kann somit auch bei der Suche nach einer geeigneten Säule oder eines Fließmittels für ein bestimmtes Trennproblem helfen, ohne diese kaufen oder installieren zu müssen. Der Hauptvorteil liegt in einer Reduzierung der experimentellen Chromatographieläufe im Gegensatz zur empirischen Methodenentwicklung, da ChromSword[®]Auto die Startbedingungen anhand der virtuellen Daten vorgibt.

Als Fazit läßt sich somit feststellen, daß der Einsatz der virtuellen Methodenentwicklung zu einer beträchtlichen Zeit- und oft auch Kostenersparnis bei der HPLC-Analytik führen kann; in manchen Fällen ist sie zudem der rein empirisch-experimentellen Ermittlung einer optimalen Trennmethode überlegen.

Ihre erfolgreiche Anwendung setzt allerdings voraus, daß Informationen über die Strukturen der zu trennenden Substanzen vorliegen.

Dies war bei den von uns untersuchten Pflanzen- und Pilzextrakten nur sehr selten der Fall, so daß die beiden folgenden Verfahren der Methodenentwicklung, insbesondere die vollautomatische Version, von größerer Bedeutung waren.

2.3.2.2 Empirische Methodenentwicklung

Diese Methode der Optimierung empfiehlt sich bei Substanzen mit unbekannter Struktur oder wenn das gewünschte Säulen-Eluenten-System nicht verfügbar ist. Der empirischen Methodenentwicklung mit ChromSword®Auto gehen zunächst zwei experimentelle Chromatographieläufe der Proben bei selbst gewählten, unterschiedlichen HPLC-Bedingungen voraus. Nach manueller Eingabe der experimentellen Retentionszeiten wird ein isokratisches Retentionsmodell berechnet. Danach werden die berechneten Modelle durch weitere experimentelle Chromatogramme abgesichert. Die erhaltenen, experimentellen Retentionsdaten gehen nach Eingabe erneut in die Berechnung weiterer Retentionsmodelle ein, bis eine akzeptable chromatographische Trennung erzielt wird.

Als Grundlage der Berechnung dienen die experimentell erzeugten Retentionszeiten, die in Abhängigkeit von der Konzentration des verwendeten organischen Anteils im Laufmittel erhalten wurden.

Die Berechnungen werden, je nach Anzahl der Läufe mit Polynomen verschiedenen Grades [32] durchgeführt, um das Retentionsverhalten der Analyten vorherzusagen.

Die über ChromSword[®]Auto berechneten virtuellen und empirischen Retentionsmodelle können für die weitere Entwicklung von Methoden mit linearen oder mehrstufigen Gradienten verwendet werden.

Gegenüber der vollautomatischen Methodenentwicklung (s.u.) ist eine direkte Kopplung der HPLC-Anlage an einen Computer nicht notwendig. Somit ist eine Methodenentwicklung unabhängig vom Ort und der HPLC-Anlage möglich.

2.3.2.3 Vollautomatische Methodenentwicklung⁴

Mit der vollautomatischen Methodenentwicklung ist die Möglichkeit gegeben, die Trennoptimierung wie in der virtuellen Methodenentwicklung (siehe Kapitel 2.3.2.1), ausgehend von der Strukturformel und dem gewählten Säulen-Eluenten-System nur durch den Computer durchführen zu lassen.

Die automatische Optimierung ist auch mit Substanzen unbekannter Struktur durchführbar. Hier werden in Anlehnung an die empirische Methodenentwicklung, Chromatographieläufe bei unterschiedlichen HPLC-Bedingungen vorgenommen.

Die Startbedingungen werden vom Computer gewählt und es erfolgt schrittweise die Ermittlung der optimalen Trennbedingungen nach den unten genannten Kriterien. Der Computer dient dabei gleichzeitig der Steuerung der HPLC-Anlage, der Datenerfassung und -verarbeitung.

⁴ Zur Zeit nur mit Merck-Hitachi LaChrom[®]HPLC-Systemen möglich.

Die experimentell gewonnenen Daten fließen automatisch in die Berechnung weiterer Optimierungsschritte ein. Die Software erzeugt auf Basis der Berechnung eine neue Methode und optimiert sie nach jedem experimentellen Chromatographielauf durch die eigenständige Steuerung der Probeninjektion über den Autosampler.

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Verarbeitung der hier erzeugten Daten in der virtuellen Methodenentwicklung.

Das Ziel von ChromSword[®]Auto ist es, im virtuellen und empirischen Betrieb Chromatographiebedingungen zu finden, die eine Auflösung von $R_s \ge 1,5$ liefern. Im vollautomatischen Betrieb wird nach einer Methode mit einer Auflösung von $R_s \ge 1,7$ und einem Retentionsfaktor $k \le 10$ (isokratisch) bzw. $k \le 25$ (Gradient) für den letzten Peak gesucht. Mischungen, bei denen nicht alle Substanzen bekannt sind, werden auf maximale Peakanzahl optimiert.

2.3.3 Kriterien für die Substanzauswahl

Damit eine automatische Optimierung mit bekannten Substanzen durchgeführt werden kann, sind Lösungen der Einzelsubstanzen (Standard-Lösung) und eine Mischung der verwendeten Substanzen (Standard-Mischung) herzustellen. Hierbei müssen die Konzentrationen der Komponenten in der Standard-Mischung denen der einzelnen Standard-Lösungen gleichen, da die Zuordnung der Komponenten über die jeweiligen Flächenwerte erfolgt. Die den unten aufgeführten Kriterien entsprechenden Naturstoffstandards sollten in zweifacher Hinsicht dazu benutzt werden, eine optimierte Auftrennung der komplex zusammengesetzten Pilz- und Pflanzenextrakte, die rein experimentell nur unter sehr großem Zeitaufwand zu bewerkstelligen ist, vollautomatisch durchzuführen. Zum einen wurden Extrakte, die für die EVOscreen[®]NACONA bestimmt waren, unter möglichst optimalen Trennbedingungen (d.h. unter Erzeugung einer maximalen Peakanzahl, also minimaler Überlagerung) analysiert, um die anschließende Bioaktivitätsbestimmung so spezifisch wie möglich zu gestalten (vgl. hierzu aber Einschränkungen Kapitel 2.2). Andererseits ist es auch für nachfolgende Substanzidentifizierungen z.B. von bioaktiven Komponenten bei der Anwendung von On-Line-Kopplungstechniken (HPLC/MS, HPLC/NMR etc.) sehr hilfreich, wenn die zu analysierenden HPLC-Peaks möglichst einheitlich sind.

Folgende Kriterien der Substanzen und der Elutionsmittel müssen für die automatische Trennoptimierung mit ChromSword[®]Auto erfüllt sein [32]:

- Reinheit: Die Standards müssen bei der gewählten Wellenlänge 80 % der Peakfläche ausmachen, da sonst möglicherweise Verunreinigungen optimiert werden und nicht die eigentliche Testsubstanz.
- Konzentration: Die Substanz sollte bei gewählter Wellenlänge eine Peakfläche zwischen 250.000 und 2.500.000 μVs liefern. Eine zu hohe Konzentration kann zu einer Überladung der Säule und zur Bildung von Doppelpeaks oder Schultern führen (Bild 2-7). ChromSword[®]Auto deutet diese als separate Peaks und während der weiteren Testläufe ist eine Verschmelzung des Doppelpeaks oder der Schulter nicht auszuschließen und die Optimierung wird gestört.
- Elutionsmittel: Durch die Verwendung von speziellen Elutionsmitteln für die HPLC soll das Auftreten von störenden Peaks von Verunreinigungen vermieden werden.



Bild 2-7: Vermeidung von Doppelpeaks und Schultern (1) durch 1:10 Verdünnung (2)

Während der Optimierung darf sich die Konzentration der Stabilität: Probenlösung nur innerhalb definierter Grenzen (+/- 10 %) verändern. Veränderungen der Peakflächen über diese Grenzen, machen eine Zuordnung der Komponenten für die Software unmöglich. Eine Zersetzung einzelner Substanzen und die daraus resultierende Änderung der Peakflächen läßt eine vollautomatische Optimierung meist nicht mehr zu, da unter Umständen der minimale Flächenwert nicht mehr und erreicht wird sich zudem möglicherweise das chromatographische Verhalten ändert.

Zusätzlich zu den von ChromSword[®]Auto geforderten Kriterien sollten die Standardsubstanzen weitere Eigenschaften besitzen:

- Mit den verwendeten Einzelsubstanzen muß eine möglichst hochkonzentrierte Stammlösung herstellbar sein, um daraus die Standard-Lösungen und Standard-Mischungen anzufertigen, d.h. in dem verwendeten Lösungsmittel müssen alle Substanzen sehr gut lösbar sein. Hochkonzentrierte Stammlösungen ermöglichen die Herstellung von Standard-Mischungen mit einer hohen Anzahl von Einzelsubstanzen.
- Weiterhin ist wünschenswert, daß die verwendeten Substanzen möglichst mehrere Absorptionsmaxima besitzen, denn ChromSword[®]Auto verfolgt, trotz der Detektion über den DAD, während der Trennoptimierung nur eine Wellenlänge. Mehrere Absorptionsmaxima lassen die Optimierung und den Einsatz einer Substanz bei verschiedenen Wellenlängen und in unterschiedlichen Standard-Mischungen zu. Allerdings sind auch Substanzen geeignet, die bei einer vom Maximum abweichenden Wellenlänge eine ausreichende Peakfläche liefern. Bei der gewählten Konzentration und Wellenlänge sollte dann unabhängig vom Absorptionsmaximum eine Peakfläche von mindestens 250.000 μVs erreicht werden.

Trotz der einschränkenden Vorgabe von ChromSword[®]Auto sind Peakflächen größer 2.500.000 μ Vs akzeptabel, wenn ein Auftreten von Doppelpeaks nicht stattfindet und der Meßbereich des Detektors nicht überschritten wird. • Ein weiteres Kriterium ist die Verfügbarkeit der Substanzen. Diese sollten käuflich erwerbbar oder leicht mit hoher Reinheit isolierbar sein. Bei käuflichen Verbindungen ist die Reinheit in der Regel gewährleistet, d.h. es ist meist nicht mit störenden Verunreinigungen zu rechnen. Obwohl diese bei der Trennoptimierung unerwünscht sind, lassen sie sich in gewissen Grenzen tolerieren, denn die für eine Optimierung störenden Flächen können über die Voreinstellung des Parameters "Rejection-Level" in der ChromSword[®]Auto-Software ausgeschlossen werden.

2.3.3.1 Vorversuche zur Substanzauswahl

Als Standardsubstanzen standen Naturstoffe aus der Gruppe der Cumarine, Flavonoide, Anthrachinone und Herzglykoside zur Verfügung. Die Stammlösungen der Naturstoffe wurden mit Acetonitril oder Methanol in gewünschter Konzentration hergestellt. Ein Injektionsvolumen von 5 µl bzw. 10 µl einer 0,01 %igen Lösung entsprach einer Substanzmenge von 500 bzw. 1000 ng pro Injektion. Diese Konzentrationen wurden auch bei den massenspektrometrischen Untersuchungen verwendet. Die angestrebte Konzentration von 0,15 % je Stammlösung würde eine Standard-Mischung von maximal 15 - 30 Standards ermöglichen. Stammlösungen, die eine geringere Konzentration als die Geforderte aufweisen, können für die Herstellung von Standard-Mischungen mit entsprechend weniger Substanzen dienen.

Die Herstellung der Lösungen entsprechender Konzentration erfolgte mit Laufmitteln in HPLC-Qualität. Zuerst wurde versucht, die Substanzen für die Stammlösungen in MeCN zu lösen. Durch MeCN als Lösungsmittel sollte eine Anpassung an das Elutionsmittel erfolgen, um einen möglichst kleinen Einspritzpeak zu erhalten. Der Einspritzpeak würde sonst in die Optimierung einbezogen werden und sich störend auf die Berechnungen von ChromSword[®]Auto für früh eluierende Substanzen auswirken. Eine mögliche Folge wäre die unerwünschte Verlängerung der Analysenzeit, da der Injektionspeak seine RT nicht ändert und eine coeluierende Substanz mit $t_r = t_0$ zu einer späteren RT verschoben werden müßte.

Die in Acetonitril schwerlöslichen Substanzen wurden in der angestrebten Konzentration (Stammlösung 0,15 %) in Methanol gelöst.

Methanol zeigte einen noch tolerierbaren Einspritzpeak bei dem angestrebten Injektionsvolumen von 5 µl bzw. 10 µl.

Für die hier durchgeführte qualitative Trennoptimierung wurden keine exakten Quantifizierungen im herkömmlichen Sinne anhand von Kalibriergeraden durchgeführt.

Jeweils 5 µl und 10 µl der 0,01 %igen Standard-Lösung wurden unter isokratischen Bedingungen chromatographiert, um anschließend die Maxima der Absorptionsspektren und die korrespondierenden Peakflächen zu bestimmen. Die Absorptionsspektren (Kapitel 6) wurden im jeweiligen Peakmaximum bestimmt und in einer eigenen Spektrenbibliothek gespeichert, um für die Festlegung geeigneter Detektionswellenlängen Verwendung zu finden. Zusätzlich können sie bei der Identifizierung der Standard-Peaks als Referenzen eingesetzt werden. Die gespeicherten Chromatogramme dienten der Bestimmung der Peakfläche in Abhängigkeit von der gewählten Wellenlänge. Hierdurch kann im Voraus überprüft werden, ob bei einer ausgewählten Wellenlänge die notwendige Mindest-Peakfläche erzielt wird.

Für die Berechnung der Kenngrößen (siehe Kapitel 2.3.1) wurden die in ChromSword[®]Auto geforderten Standardeinstellungen benutzt.

2.3.3.2 Ergebnis der Naturstoffstandard-Kriterien

Alle verwendeten Naturstoffstandards waren käuflich verfügbar und ihre Beschaffung daher problemlos. Mit den Standards der Tabelle 2-4 konnten die Stammlösungen in der gewünschten Konzentration hergestellt werden.

Die Naturstoffstandards aus Tabelle 2-5 sind durch die begrenzte Löslichkeit in den gewünschten Lösungsmitteln nur für Mischungen mit einer geringeren Anzahl von Substanzen geeignet, da bei größerer Anzahl von Standard-Lösungen und der damit zunehmenden Verdünnung die minimal geforderte Konzentration nicht erzielt werden kann. Die einzelnen Substanzen lieferten in ihren Absorptionsmaxima eine Peakfläche größer 250.000 µVs und wiesen mit Ausnahme der Herzglykoside (Convallatoxin, Digitoxin, Digoxin, g-Strophanthin, Gitoxin) ein Absorptionsspektrum auf, das neben der Messung im Maximum auch eine Detektion bei anderen Wellenlängen zuläßt. Die Substanzen sind unter chromatographischen Bedingungen rein und stabil. Sie zeigen, abgesehen von Apiin, Aloin, Hyperosid, Naringin, Neohesperidin und Isorhoifolin, keine Doppelpeaks oder Anzeichen von Zersetzungsprodukten. Die beobachteten Abweichungen bei diesen glykosidischen Standards können theoretisch von einer Interaktion des Lösungsmittels (Methanol), einer Zersetzung der Substanz oder von einer zu hohen Konzentration der Standard-Lösung herrühren. Da die betreffenden Verbindungen sowohl bei der 10 µl als auch bei der 5 µl Injektion Doppelpeaks mit ähnlichen Flächenverhältnissen zwischen dem ersten und zweiten Peak aufwiesen, ist eine zu hohe Beladung der Säule auszuschließen. Auch eine Zersetzung der Substanz in Form einer teilweisen oder vollständigen Abspaltung der Zucker scheidet aus, da dann die Peaks der Aglykone zu höheren Retentionszeiten verschoben sein würden (vergl. z.B. Retentionszeit von Quercetin als Aglykon des Hyperosids). Daher sind unerwünschte Interaktionen der Komponenten mit dem Lösungsmittel und/oder Laufmittel zu vermuten.

Für die Trennoptimierung sind die Substanzen Apiin, Aloin, Hyperosid, Naringin, Neohesperidin und Isorhoifolin auf Grund der Ausbildung von Doppelpeaks nicht geeignet.

Mit Einschränkung können die in Tabelle 2-5 aufgeführten schwer löslichen Substanzen aber für die automatische Trennoptimierung verwendet werden. Diese können für die Optimierung von Standards geringerer Anzahl oder Konzentration zum Einsatz kommen.

Die Substanzmenge pro Injektion betrug 0,5 mg bzw. 1 mg. Die Peakflächen wurden bei den Wellenlängen der Absorptionsmaxima im Peakmaximum ermitteltet (Einzelheiten vgl.Text). Tabelle 2-4: Vorversuche zur HPLC-Auftrennung der Naturstoffstandards mit einer Konzentration der Stammlösung von 0,15 %.

Bedingungen: (Isokratisch (50/50), Laufmittel A: Wasser/MeCN (95/5) + 0,1 % Ameisensäure I aufmittel B: MaCN/Wasser (05/5) + 0.1 % Amaisansäura Flussrata: 0.25 ml/m

Lauin	nttel B: MeCN/Was	ser (92/2) + 0,1 % Ameis	sensaure, Flussrate: U	(uim/im cz,(
Naturstoffstandard	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung [%]	Substanzmenge pro Injektion [mg]	Wellenlängen der Absorptionsmaxima im Peakmaximum [nm]	Fläche [µVs]	RT [min]
				225	5294038	
			1	253	2968429	
1 0 Dibuduomonthuodinon		015		419	1343392	
1,0-ыпушгохуаншгасынын	INICON	0,10		225	2385609	77,000
			0,5	253	1473682	
				419	663275	
				269	2784958	
			1	278	2780918	
A Unduceroning and	NOCN	015		302	2006812	2 70
4-11JULOAJCUIIIALIII	INICON	0,10		269	1503268	۲2,C
			0,5	278	1507072	
				302	1081785	

Naturstoffstandard	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung [%]	Substanzmenge pro Injektion [mg]	Wellenlängen der Absorptionsmaxima im Peakmaximum	Fläche [µVs]	RT [min]
			-	276	3147721	
		0.15	_	319	1436255	C 0 3
o-Meinylcumarin	MECIN	C1,U	2 2	276	1538502	<i>cv</i> ,c
			C, Û	319	709887	
			-	284	2827481	
		015	_	310	2311956	273
		C1,U	2 0	284	1455241	10,C
			C,U	310	1189858	
				267	507720	1,88
				267	1006781	2,29
41.5		015	.	296	502538	1,88
AIUII		0,10	_	296	1173739	2,29
				352	551790	1,88
				352	1451646	2,29

Naturstoffstandard	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung [%]	Substanzmenge pro Injektion [mg]	Wellenlängen der Absorptionsmaxima im Peakmaximum Inml	Fläche [µVs]	RT [min]
				267	152779	1,91
				267	497952	2,31
Aloin		015	2 U	296	154763	1,91
AIUII		0,10	C,D	296	572588	2,31
				352	170288	1,91
				352	705616	2,31
			-	267	2393694	
		015	_	311	889082	0 05
CIITYSII		0,10	0 5	267	1124609	ςυ,ο
			د,0	311	577289	
Convollatovin	MaCN	015	1	UCC	591227	7 1 S
Сопуанациан		0,10	0,5	077	296070	4,1J
			-	273	2630353	
, in our c		015	Т	307	1424208	765
Cumarin		0,10	5 U	273	1403272	4,00
			۲,0	307	764022	

51

Naturstoffstandard	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung [%]	Substanzmenge pro Injektion [mg]	Wellenlängen der Absorptionsmaxima im Peakmaximum [nm]	Fläche [μVs]	RT [min]
			-	261	1029689	
Danhnatin		015	_	321	1834081	95 C
паршени		0,10	20	261	559022	2,00
			C,U	321	968942	
Dicitoriu		015	1		603762	2 60
DIGIOXIII		0,10	0,5	077	295476	00,0
Discoutin		015	1	ULC	223441	2,45
DIgUAIII		C1,U	0,5	077	192840	2,48
Dibriducentin		015	1		483997	2 00
Duryurocumarın		0,10	0,5	C17	244372	<i>و</i> 0, c
			-	234	2065325	
Dibuduoffcotin		015	Т	276	1832135	07 C
Duryunouscun		0,10	0 2	234	1091837	1,40
			C,D	276	967626	

)					
Naturstoffstandard	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung [%]	Substanzmenge pro Injektion [mg]	Wellenlängen der Absorptionsmaxima im Peakmaximum [nm]	Fläche [µVs]	RT [min]
			-	288	1906761	
Dibuduo automotin	NOCN	015	_	230	2105076	096
Dunyaroquerceum	INICON	0,10	0 E	288	970148	2,00
			С,О	230	1062617	
			F	234	1474256	300
Dibuduouohinotin	NOCN	015	Τ	276	1153611	62,2
Dunyarorobineun	INICON	C1,U	7 7	234	807130	
			٠,0	276	630721	17,7
				223	1827392	
			-	267	1005733	16 11
			_	287	1079436	10,11
Tmodin	MaOH	0.15		434	537829	
		0,10		223	905696	
			20	267	499656	1616
			۲,0	287	502546	10,10
				434	266698	

	che RT Vs] [min]	5912	600 7 5 5	673 2,33	2624	762	264 7.40	105 2,43	348	5807		775 27,32	775 27,32 0230	775 27,32 0230 8824	775 27,32 1230 27,32 1230 8824 623 27,07
er	ima Fläc im [μV	1575	5806	8366	1552	101	/ 1 1 / 1	2362	2362 3121	2362 3121 5943	721/ 2362 3121 5943 5943 22355	7077	7077	/ 11/ 2362 3121 5943 5943 5943 5943 507 707 1138	7077 1138 5943 5943 5943 7077 1138 1138 3586
Wellenlängen d	Absorptionsmax im Peakmaximu [nm]	228	257	297	344	228		257	257 297	257 297 344	257 297 344 230	257 257 297 344 230 294	257 257 297 344 230 230 294 339	257 257 297 230 230 230 294 339 230	257 257 297 230 230 294 294 339 294 230 230
	Substanzmenge pro Injektion [mg]		-	-				2 0	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
	Konzentration der Stammlösung [%]				015	0,10							v 	0,15	0,15
	Lösungsmittel					MICCIN								MeCN	MeCN
	Naturstoffstandard				Tendotia	Esculeun								Esculetindibenzylether	Esculetindibenzylether

/)					
Naturstoffstandard	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung [%]	Substanzmenge pro Injektion [mg]	Wellenlängen der Absorptionsmaxima im Peakmaximum Inml	Fläche [µVs]	RT [min]
			-	225	1153719	
		015	1	331	965927	1 00
ESCUIII	INEQU	0,10	2 (225	527899	1,90
			C,U	331	441490	
			-	251	2832923	
		015	Π	294	3348640	10.45
r la voll		0,10	0 5	251	1517277	10,40
			C,U	294	1782087	
				225	2284084	
			1	263	1397048	6,16
Duananiin A		015		429	719265	
		0,10		225	1033341	
			0,5	263	668086	5,97
				429	343275	

55

	1					
Naturstoffstandard	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung [%]	Substanzmenge pro Injektion [mg]	Wellenlängen der Absorptionsmaxima im Peakmaximum [nm]	Fläche [µVs]	RT [min]
Conjectorius	NOON	015	1	750	3877741	101
Gemstein		0,10	0,5	<i>K</i> C7	1988544	4 ,04
a Cturnhauthin	NOON	015	1	UCC	792323	1 0.0
		0,10	0,5	077	405267	1,00
			-	225	1654319	VVV
Unanomotin	NoOH	015	Π	285	1366736	+,++
		0,10	20	225	624094	1 <i>1</i> 1
			٠,0	285	518586	4,41
				285	2033698	
Uamoniodiotuol	NOON	015	Π	228	2458851	4,40
TIMINGI IMICIAN		0,10	20	285	1069377	1 22
			<i>.</i> ,0	228	1313425	t U

	0					
Naturstoffstandard	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung [%]	Substanzmenge pro Injektion [mg]	Wellenlängen der Absorptionsmaxima im Peakmaximum	Fläche [µVs]	RT [min]
				255	378585	1,97
			-	255	551887	2,24
			_	355	307165	1,97
Linour II		0.15		355	443272	2,24
ny perosia	INEQU	C1,U		255	136809	2,01
			20	255	212442	2,19
			C,D	355	107443	2,01
				355	167243	2,19
			-	248	4117054	
Immonotonia		0.15	1	299	2143853	12 10
TIIIDEFALOFIII		0,10	0 5	248	2045827	0+,01
			د,0	299	1068926	
			-	265	1784439	
[7] Wännfouol		0.15	Т	364	2150018	111
Namplel of		0,10	2 0	265	965867	4,11
			0,0	364	1080602	

Naturstoffstandard	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung [%]	Substanzmenge pro Injektion [mg]	Wellenlängen der Absorptionsmaxima im Peakmaximum [nm]	Fläche [µVs]	RT [min]
				246	5669581	
L'hollin	MOON	0.15	Т	331	694140	C3 V
		0,10	50	246	3178324	4,74
			с , 0	331	385696	
			-	253	1948820	
Ttoolin		0.15	l	344	2348657	
гисопп	INCOLL	0,10	0 5	253	948916	07,0
			ر,ں	344	1141297	
			-	225	2994954	101
		0.15	I	287	2104573	4,41
		0,10	0 5	225	1621456	3C V
			C,U	287	1130035	4,20
			-		321647	1,91
Nonincin		0.15	Π	190	370294	2,24
	INCOLL	0,10	50	107	124005	1,96
			<i>.</i> ,0		83646	2,17

58

				, ., ,, ,,,		
Naturstoffstandard	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung [%]	Substanzmenge pro Injektion [mg]	Wellenlången der Absorptionsmaxima im Peakmaximum Inml	Fläche [µVs]	RT [min]
				acc	694619	1,93
			-	077	654294	2,32
			I	COC	361949	1,93
		0 1 5		607	540937	2,24
Neonesperian	INICOLI	C1,U		000	303515	1,93
			20	077	281731	2,32
			с , 0	200	151434	1,99
				C07	184368	2,19
			-	255	1433406	2 3 J
Ouronotin		0 15	Т	367	1455880	2C,C
Auercenn		0,10	0 E	255	706644	322
			د,0	367	718440	<i><i>vc</i>,<i>c</i></i>
			-	265	479939	
Dahinin		0 15	Т	346	411605	L T T
		0,10	20	265	130121	1,//
			٠,0	346	113350	

59

Naturstoffstandard	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung [%]	Substanzmenge pro Injektion [mg]	Wellenlängen der Absorptionsmaxima im Peakmaximum [nm]	Fläche [μVs]	RT [min]
				257	786518	
D		0.15	Π	352	664860	1 00
		0,10	50	257	385423	1,00
			0,0	352	325949	
				267	616270	
			1	305	324995	
Connocid D		0.15		357	386859	1 9.0
Selliosid D		0,10		267	271271	1,00
			0,5	305	150386	
				357	186799	
			-	240	2078785	9 00
Cinomotin		0.15	Π	327	2482944	0,09
		0,10	2 0	240	984722	203
			ر,0	327	1183073	0,07
IImhallifouan	NOOM	0.15	1	100	2856255	3,13
		0,10	0,5	170	1512791	3,01

Naturstoffstandard	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung [%]	Substanzmenge pro Injektion [mg]	Wellenlängen der Absorptionsmaxima im Peakmaximum [nm]	Fläche [μVs]	RT [min]
Vienadin	NUCN	J1 U	1	201	2220142	26,23
V ISHAUIH	IMECIN	0,10	0,5	170	1145271	26,63
			-	243	6379989	L9 V
1/5cm2cm		0 15	T	323	782554	4,0/
V ISHAGIII	INICON	0,10	0 E	243	3440585	(3 V
			0,0	323	396698	4,74
			-	246	3996318	5 Q7
Vanthatarin		0.15	T	299	2102761	10,0
Valuation	INICON	0,10	2 U	246	2054657	2 00
			<u>ر</u> , ر	299	1080022	70,0

kleiner 0,15 %. Die Substanzmenge pro Injektion betrug 0,5 mg bzw. 1 mg. Die Peakflächen wurden bei den Wellenlängen der Tabelle 2-5: Vorversuche zur HPLC-Auftrennung der schwerlöslichen Naturstoffstandards mit einer Konzentration der Stammlösung Absorptionsmaxima im Peakmaximum ermittelt (Einzelheiten vgl.Text).

Laufmittel B: MeCN/Wasser (95/5) + 0,1 % Ameisensäure; Flussrate: 0,25 ml/min) Bedingungen: (Isokratisch (50/50), Laufmittel A: Wasser/MeCN (95/5) + 0,1 % Ameisensäure

		~		~		
Naturstoffstandard	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung [%]	Substanzmenge pro Injektion [mg]	Wellenlängen der Absorptionsmaxima im Peakmaximum [nm]	Fläche [µVs]	RT [min]
				225	2882436	
			1	257	1785699	
Aloo Emodin		0.02		423	818565	
	INCOL	co, o		225	1431218	17,1
			0,5	257	890849	
				423	405328	
			-	267	1306338	
Aniconin	ΠΟΩΜ	010	L	334	1537591	4,0/
Apigemi	INCON	0,10	50	267	762307	111
			C, D	334	899202	4,11

		Konzentration der	Substanzmenge	Wellenlängen der Absorptionsmaxima	Fläche	RT
Naturstoffstandard	Losungsmittel	Stammlosung [%]	pro Injektion [mg]	im Peakmaximum [nm]	[µVs]	[min]
				LYC	589341	1,84
				707	851235	2,40
		0,04	Π	766	705674	1,84
				000	1032288	2,40
Apul				LYC	230345	1,91
			20	707	337418	2,29
		0,04	C,U	766	274441	1,91
				066	388129	2,29
				225	5944336	
			1	257	3637505	34,24
Chursonhoneönne				424	1644935	
Cur ysopnausaure		0,02		225	1686405	
			0,5	257	1069091	34,84
				424	474928	

Naturstoffstandard	Lösungsmittel	Konzentration der Stammlösung [%]	Substanzmenge pro Injektion [mg]	Wellenlängen der Absorptionsmaxima im Peakmaximum Inml	Fläche [µVs]	RT [min]
			-	257	290041	
			-	388	683287	ى, 04
r iseun	MEOH	c0,0	2 (257	138244	
			C,U	388	344875	4,79
U:tooti	NoOH	0.01	1		652169	3,53
		0,01	0,5	077	316615	3,40
				LJC	443168	1,81
			-	107	464254	2,40
			-	100	533568	1,81
سنامنتماسم		0.05		400	520365	2,40
TSOFILOHOULI		c0,0		LYC	219801	1,88
			2 0	107	223140	2,24
			C,U	331	263808	1,88
				+ 00	257468	2,24

64

		Konzontration dar	Substanzmanca	Wellenlängen der		
Naturstoffstandard	Lösungsmittel	Stammlösung [%]	pro Injektion [mg]	Absorptionsmaxima im Peakmaximum	Fläche [µVs]	RT [min]
				550	2139522	2,72
			Ŧ	C C7	426041	3,28
			-	ULC	2447326	2,72
M		C - C		0/0	449649	3,28
TATALICECIII		0,12		753	1192015	2,71
			2 0	007	247558	3,28
			С,О	ULC	1366079	2,72
				0/0	264078	3,28
				231	2370213	
			1	257	1319382	7,68
Dhain	HOOM	00.0		424	6655234	
		60 <u>,</u> 0		231	1261837	
			0,5	257	695475	8,13
				424	352961	
Um das Vorgehen bei der Optimierung eines unbekannten Naturstoffextraktes mit ChromSword[®]Auto zu beschreiben, soll zuerst die Vorgehensweise am Beispiel einer Standard-Mischung aus Cumarinen dargelegt werden.

2.3.4.1 Vollautomatische Trennoptimierung einer Cumarin-Mischung

Zunächst wurden die Absorptionsspektren der ausgewählten Standards für die Auffindung einer gemeinsamen Detektionswellenlänge untersucht. Hierfür dienen die Spektren aus den Vorversuchen. Als Richtwellenlänge für die Detektion muß eine Wellenlänge gewählt werden, die für alle Substanzen einen Flächenwert größer 250.000 μ Vs liefert. Zunächst werden anhand der Absorptionsspektren gemeinsame Wellenlängenbereiche gesucht: In Bild 2-8 sind die Absorptionsspektren der für die Trennoptimierung ausgewählten Cumarin-Standards für die Bestimmung der Detektionswellenlänge übereinandergelegt. Aus diesem Bild ist ersichtlich, daß eine Detektionswellenlänge $\lambda > 290$ nm nicht möglich ist, da Dihydrocumarin hier keine Absorption zeigt. Ebenso ist der Bereich um das Minimum (232 nm bis 255 nm) wegen der geringen Absorption des Dihydrocumarins nicht geeignet. Somit muß die Detektionswellenlänge auf die Bereiche zwischen 220 nm und 232 nm oder 255 nm und 290 nm eingegrenzt werden.

Die Detektionswellenlänge wurde auf 270 nm festgelegt, da hier dicht am Maximum des Dihydrocumarins gemessen wird. Obwohl einige Standards hier ein Minimum bzw. eine geringere Absorption aufweisen, erreichten sie den notwendigen Flächenwert größer 250.000 μ Vs (Tabelle 2-6). Die im Vorversuch gewonnen Chromatogramme dienten zur Überprüfung der Flächenwerte bei der gewählten Wellenlänge.



Bild 2-8: Absorptionsspektren der Cumarin-Standards im HPLC-Peakmaximum zum Auffinden der optimalen Detektionswellenlänge. (Injektionsvolumen: 10 µl einer 0,01%igen Lösung; Wellenlängenbereich: 218 nm bis 400 nm, s.a. Kapitel 6) Tabelle 2-6: Auflistung der in den Vorversuchen ermittelten Flächenwerte der Cumarin-Standards (Injektionsvolumen: 10 μl einer 0,01%igen Lösung; Detektionswellenlänge: 270 nm). Der für eine vollautomatische Trennoptimierung nötige Flächenwert muß größer als 250.000 μVs sein.

Substanz-Nr.	Naturstoffstandard	Fläche [μVs]
1	Esculetin	607.872
2	Daphnetin	652.425
3	Umbelliferon	655.880
4	Dihydrocumarin	562.908
5	4-Hydroxycumarin	3.617.503
6	Cumarin	3.262.013
7	Khellin	1.372.945
8	Visnagin	1.284.188
9	7-Methylcumarin	2.639.028
10	Xanthotoxin	2.079.708
11	6-Methylcumarin	3.450.272
12	Imperatorin	1.126.529
13	Visnadin	327.074
14	Esculetindibenzylether	412.208

2.3.4.2 Parameter für die vollautomatische Trennoptimierung einer Cumarin-Mischung

Die Eingabe der Optimierungsparameter über die Funktion "Auto Wizard" ist in den Bildern 2-9 bis 2-14 angegebenen.

Die gezeigten Daten dienen zur Trennoptimierung der Cumarin-Mischung.

1. Für die automatische Trennoptimierung mit ChromSword[®]Auto werden zunächst die Namen der Substanzen und die dazugehörigen Strukturformeln über den integrierten Formeleditor eingegeben (Bild 2-9). Die Strukturformeln dienen der Software als Anhaltspunkt für die Berechnung der Anfangsbedingungen (virtuelle Optimierung).

Chrom Sword - C:\P	Program	ne\Merck\ChromS	word 2.0\C	umarinAgl	lyka.SMP tandard Grad T	
ChromSword	-Comp Add	oound Insert Delete	e Edit	Param	StrCopy	Auto Wizard
Filter	Num	Compound Aesculetin	Edit Comp	ound	_	
Select	2	Cumarin	но	\triangleleft	\sim	Analyze
Retention	3 4	Dihydrocumari Xanthotoxin				Retent
Analyze	5	4-Hydroxycum Visnadin	но			,
About	7	Daphnetin				
🤊 Help	8 9	Umbelliferon Imperatorin	Compoun	d Aeso	culetin	✓ ок
	10	6-Methylcuma 7-Methylcuma	Label Comment			? Help
	12	Visnagin				
	13 14	Khellin Aesculetindibe	nzylether			
Sample	15				_	
LaChrom		New B Ope	n 🖹 Re	open 🕞	-] Find 🛛 🖺 S	ave 🛱 Save As
Compounds (First G	uess <u>(</u> M	ethods Base <u>(</u> Fit	Structure P	arameters	∕Calibrate Colu	mn /

Bild 2-9 aus Lit.[37]

2. Im nächsten Schritt (Bild 2-10) wird über die Art der Optimierung entschieden. Entweder erfolgt eine Optimierung mit einer Säule und einem organischen Elutionsmittel oder mit mehreren Säulen über eine Säulenschaltung bzw. Elutionsmittelschaltung. Letztere Möglichkeit stand uns nicht zur Verfügung.



Bild 2-10 aus Lit.[37]

3. Auswahl des Optimierungstyps (Bild 2-11):

Hier wird über die Art der automatischen Optimierung entschieden. Virtuelle oder empirische Trennoptimierung (siehe Kapitel 2.3.2.1 und Kapitel 2.3.2.2)



Bild 2-11 aus Lit.[37]

4. Als nächstes (Bild 2-12) erfolgt die Abfrage der verfügbaren Standards: Sind alle Standards verfügbar oder nur einige. Außerdem können eventuelle, in geringer Konzentration auftretende, Verunreinigungen über den Flächenwert eliminiert werden. Dazu wird der "Rejection-Level" für Peakflächen angegeben, die nicht in die Optimierung einbezogen werden sollen.

Auto Wizard
How many standards do you have?
All Standards
C Only some standards
Rejection level for Mixture: 50000
< Back Next > Finish Cancel

Bild 2-12 aus Lit.[37]

5. Die Auswahl des Säulen-Elutionsmittel-Systems (Bild 2-13) erfolgt aus der Datenbank.

Auto Wizard	×
Select Column and Eluent:	
Superspher 100 RP18,4um A(ACN - Water, 10-100%)	•
Superspher 100 RP18,4um A(ACN - Water, 10-100%) Superspher 100 RP18,4um M(Methanol-Water, 10-100%) LiChrospher100 RP18,5um M(Methanol-Water, 10-100%) LiChrospher100 RP18,5um A(Acetonitril-Water,10-100%) LiChrospher100 RP18,e5um M(Methanol-Water, 10-100%) LiChrosorb RP-18,5um A(Acetonitrile-Water,0-100%) LiChrosorb RP-18,5um M(Methanol-Water, 20-100%) LiChrosorb RP-18,5um A(Acetonitril-Water,10-100%)	•
< Back Next > Finish	Cancel

Bild 2-13 aus Lit.[37]

6. Im letzten Schritt (Bild 2-14) werden die Parameter des HPLC-Systems eingegeben und der zu optimierende Elutionstyp festgelegt. Soll eine Gradientenoptimierung vorgenommen werden, muß die Gradientenverzögerungszeit (Dwell-Time) experimentell bestimmt werden (siehe Kapitel 6.3). Dies ist die Zeit, welche das Laufmittelgemisch im Gradientenbetrieb benötigt, um die Säule zu erreichen.

Auto Setup			×
Parameters History			Close
Temperature, °C ZeroTime, min Injection Volume, μI Flow, ml/min	23 1.63 10 0.25	Development Programme C Isocratic Method C Gradient Method Isocratic or Gradient C Isocratic-Optimize Temp	GO
No. of Vials Wave Length, nm	14 270		Stop
Column Equil. Time, min	18	Conc. (% B)	
System Name:		Run Time(min) 18,0 Eq.Time(min) 9,0	
			Save Settings

Bild 2-14 aus Lit.[37]

Die Totzeit wurde experimentell bestimmt (siehe Kapitel 6.2). Zusätzlich wird unter dem Parameter "Elution Test Parameters" die Elutionsmittelzusammensetzung (Conc. (% B) = MeCN/Wasser (95/5) + 0,1 % Ameisensäure) eingegeben, unter denen die Substanzen mit Sicherheit eluiert werden. Diese dient nach jedem Lauf als Konzentration für die Spülschritte. Für die Optimierung wurde die Säule 1 (Superspher / 250-2 / RP18e, 4 µm) gewählt, da durch deren Säulenlänge und die Partikelgröße eine verbesserte Trennung der Substanzen im Vergleich zur Säule 2 (LiChrospher100 / 125-2 / RP18e, 5 µm), zu erwarten ist. Dies führt zu längeren Optimierungszeiten, da die Spülschritte und Equilibrierungszeiten jeweils ein Vielfaches der Totzeit ausmachen. Anschließend wurden die gewonnenen Daten für die virtuelle Optimierung genutzt.

Die vollautomatische Trennoptimierung der Cumarin-Mischung mit 14 Standardkomponenten dauerte 62,3 Stunden. Sie lieferte vier Vorschläge für Gradientenelution (GV) und zwei Vorschläge für isokratische Elution (IV) mit den dazugehörigen Chromatogrammen. Bezüglich der genauen Laufmittelzusammensetzungen siehe Kapitel 6.5.2.

Die Peakzuordnung der Substanzen erfolgte über die im Vorversuch erstellte UV-Spektrenbibliothek. Bei Coelution und Problemen der Spektrenzuordnung (z.B. 6-Methylcumarin und 7-Methylcumarin) wurden die jeweiligen Standard-Lösungen unter den gleichen Elutionsbedingungen injiziert. Anhand der Retentionszeiten und der Summe der Peakflächen konnte anschließend die Zuordnung vorgenommen werden.

Die erzeugten Werte wurden auf Basis der Standard-Integrationsparameter der ChromSword[®]-Software berechnet und dem ChromSword[®]Report-Viewer entnommen. Falls die Berechnungen über die Standard-Integrationsparameter mißlang (z.B. durch Peaküberlappung, siehe Kapitel 2.3.1), wurden diese nachträglich in der HPLC-Systemsoftware (HSM Manager) vorgenommen. Die Kennzahlen Symmetriefaktor (Sym), Trennfaktor (α) und die Trennstufenzahl (N) spielen bei der automatischen Trennoptimierung mit ChromSword[®]Auto eine untergeordnete Rolle und sind nur der Vollständigkeit halber aufgeführt. Sie konnten nicht immer berechnet werden, da eine Bestimmung von b_{0,5} und b_{0,05} wegen einer unzureichenden Basislinientrennung zum Teil nicht möglich war.

Die Substanzen (siehe Tabelle 2-6) 1 bis 4; 1 bis 5; 9 bis 11; 13 und 14 zeigten bei den einzelnen Optimierungen häufig Coelution.

Daher sind die Summen der Peakflächen zu den Chromatogrammen zusätzlich aufgeführt, um die an der Coelution beteiligten Verbindungen im Vergleich mit den anderen Chromatographien zeigen zu können. Coeluierende Substanzen werden als ein Peak für die Berechnung der oben genannten Kennzahlen genutzt.



Bild 2-15: Chromatogramm der Cumarin-Mischung nach vollautomatischer Trennoptimierung (Gradientenvorschlag 1) durch die ChromSword[®]-Software. Bezüglich der Peaknumerierung und Kennzahlen siehe Tabelle 2-7. Einzelheiten vgl. Text.



Bild 2-16: Chromatogramm der Cumarin-Mischung nach Gradientenvorschlag 2. Bezüglich der Peaknumerierung und Kennzahlen siehe Tabelle 2-8 (vgl. Bild 2-15). Einzelheiten vgl. Text.

Tabelle 2-7: Kennzahlen des experimentellen Chromatogramms der Cumarin-Mischung (Bild 2-15) nach Gradientenvorschlag 1. Einzelheiten vgl. Text.

	·····								
Substanz-Nr.	Substanz	Retentionszeit [min]	Fläche [µVs]	k	\mathbf{R}_{s}	α	α_1	Sym	Ν
1	Esculetin	7,84	536947	3,81			ł	ł	303
2	Daphnetin	9,01	725390	4,53	1,77	1, 19	ł	}	1
3	Umbelliferon	13,49	726857	7,28	4,5	1,61		0,69	2943
4	Dihydrocumarin	15,81	569285	8,70	2,32	1,20	ł		3971
5	4-Hydroxycumarin	20,08	4016055	11,32	4,13	1,30			5733
6	Cumarin	22,08	3225819	12,55	2,18	1, 11			12963
7	Khellin	27,84	1612631	16,08	8,84	1,28	-	0,73	44561
8	Visnagin	29,04	1437829	16,82	2,13	1,05			37688
6	7-Methylcumarin	30,13	3882932	17,49	1,49	1,04	ļ	1	1
11	6-Methylcumarin	30,43	2182712	17,67	0,40	1,01			ł
10	Xanthotoxin	31,84	2353449	18,53	1,82	1,05			26882
12	Imperatorin	47,07	1091521	27,88	32,67	1,50		0,89	1473909
13	Visnadin	UV OV	1 2 4 7 4 4	07 OC			5		1064464
14	Esculetindibenzylether	40,40	1/040/	20,09	1,10	1,00	د ₀ ,1	U,94	1004404
		Gesamtfläche	23145798						
		7 -1	2558479						
		1-5	6574534						
		<i>L</i> -9	4838450						
		9-11	8419093		() H	3erech	gunu	nicht	möglich
		13-14	784371						

Tabelle 2-8: Kennzahlen des experimentellen Chromatogramms der Cumarin-Mischung (Bild 2-16) nach Gradientenvorschlag 2. Einzelheiten vol. Text.

7									
Substanz-Nr.	Substanz	Retentionszeit [min]	Fläche [μVs]	k	R	α	α_1	Sym	N
1	Esculetin	32,32	522216	18,83		1	ł		246138
2	Daphnetin	32,88	650818	19,17	1,78	1,02		1	126363
3	Umbelliferon	34,48	745527	20,15	3,12	1,05		1	44195
4	Dihydrocumarin	35,39	556085	20,71	1,91	1,03	1		235978
5	4-Hydroxycumarin	36,77	4029160	21,56	3,87	1,04		0,68	119467
6	Cumarin	38,11	3311120	22,38	3,10	1,04		0,71	123314
7	Khellin	41,36	1572659	24,37	7,50	1,09		0,76	145982
8	Visnagin	42,29	1433858	24,95	2,14	1,02	-	0,88	147535
6	7-Methylcumarin	43,81	3733571	25,88	3,58	1,04	1		-
10	Xanthotoxin	44,00	2418569	25,99	0,44	1,00		1	1
11	6-Methylcumarin	44,59	1960188	26,35	1,36	1,01			170483
12	Imperatorin	48	1100461	28,45	11,41	1,08	1	1,01	1331309
13	Visnadin	10.00	701657	12.00	20.0	ł	1	1 00	600020
14	Esculetindibenzylether	49,89	/ 018/	79,01	66,6	1,00	1,04	1,00	660808
		Gesamtfläche	22815889						
		1-4	2474646						
		1-5	6503806						
		<i>L</i> -9	4883779						
		9-11	8112328		() I	3erech	nung	nicht	möglich
		13-14	781657						



Bild 2-17: Chromatogramm der Cumarin-Mischung nach Gradientenvorschlag 3. Bezüglich der Peaknumerierung und Kennzahlen siehe Tabelle 2-9 (vgl. Bild 2-15). Einzelheiten vgl. Text.



Bild 2-18: Chromatogramm der Cumarin-Mischung nach Gradientenvorschlag 4. Bezüglich der Peaknumerierung und Kennzahlen siehe Tabelle 2-10 (vgl. Bild 2-15). Einzelheiten vgl. Text.

Tabelle 2-9: Kennzahlen des experimentellen Chromatogramms der Cumarin-Mischung (Bild 2-17) nach Gradientenvorschlag 3. Einzelheiten vgl. Text

-									
Substanz-Nr.	Substanz	Retentionszeit [min]	Fläche [µVs]	k	\mathbf{R}_{s}	α	α_1	Sym	Ζ
1	Esculetin	13,28	572823	7,15	1		1		1
2	Daphnetin	13,39	577945	7,21	0,48	1,01	1	-	1
3	Umbelliferon	14,08	811702	7,64	2,95	1,06	1	-	1
4	Dihydrocumarin	14,24	519647	7,74	0,67	1,01	1	-	1
S	4-Hydroxycumarin	14,69	3973357	8,01	1,85	1,04	1	0,78	57546
9	Cumarin	15,89	3295461	8,75	4,83	1,09	1	0,74	63779
L	Khellin	16,43	1495225	9,08	2,08	1,04	1	0,82	62896
8	Visnagin	16,88	1442673	9,36	1,73	1,03	1	0,98	65703
6	7-Methylcumarin					-			
10	Xanthotoxin	18,08	8609844	10,09	3,76	1,00	1,08	0,93	37204
11	6-Methylcumarin					1,00			
12	Imperatorin	28,32	1120732	16,37	23,49	1,62	1	0,91	52007
13	Visnadin	37,09	342292	21,76	13,84	1,33	1	1,28*	37022
14	Esculetindibenzylether	40,85	457788	24,06	4,68	1,11	1	0,99	38314
		Gesamtfläche	23219489						
		1-4	2482117						
		1-5	6455474						
		6-7	4790686						
		9-11	8609844	<u> </u>) Bered	chnung nic	ht möglich		
		13-14	800080						

Tabelle 2-10: Kennzahlen des experimentellen Chromatogramms der Cumarin-Mischung (Bild 2-18) nach Gradientenvorschlag 4. Einzelheiten vol Text

	1120111011011 ABI. 1041.								
Substanz-Nr.	Substanz	Retentionszeit [min]	Fläche [µVs]	k	R	a	α1	Sym	Z
1	Esculetin	9,28	720562	4,69			1		1
2	Daphnetin	9,63	541877	4,91	1,11	1,05	1		1
S	Umbelliferon	11,12	722112	5,82	4,14	1,19	1		15230
4	Dihydrocumarin	11,55	582442	6,08	1,27	1,04	1		21975
5	4-Hydroxycumarin	12,27	3946782	6,53	2,51	1,07		0,72	35359
9	Cumarin	13,47	3280315	7,26	4,84	$1,\!11$	-	0,73	52660
7	Khellin	14,08	1440409	7,64	2,72	1,05		0,92	67560
8	Visnagin	14,48	1407024	7,88	1,88	1,03		0,93	77669
6	7-Methylcumarin								
10	Xanthotoxin	15,25	8473125	8,36	3,47	1,00	1,06	0,99	66156
11	6-Methylcumarin					1,00			
12	Imperatorin	20,43	1139202	11,53	19,86	1,38	-	0,92	83008
13	Visnadin	25,09	335675	14,39	11,99	1,25		1,03	41182
14	Esculetindibenzylether	26,11	455226	15,02	2,11	1,04		1,03	50616
		Gesamtfläche	23044751						
		1-4	2566993						
		1-5	6513775						
		6-7	4720724						
		9-11	8473125		L) Berech	nung nicht	möglie	ch
		13-14	790901						



Bild 2-19: Chromatogramm der Cumarin-Mischung nach Isokratischem Vorschlag 1. Bezüglich der Peaknumerierung und Kennzahlen siehe Tabelle 2-11 (vgl. Bild 2-15). Einzelheiten vgl. Text.



Bild 2-20: Chromatogramm der Cumarin-Mischung nach Isokratischem Vorschlag 2 Bezüglich der Peaknumerierung und Kennzahlen siehe Tabelle 2-12 (vgl. Bild 2-15). Einzelheiten vgl. Text.

Tabelle 2-11: Kennzahlen des experimentellen Chromatogramms der Cumarin-Mischung (Bild 2-19) nach Isokratischem Vorschlag 1. Einzelheiten vgl. Text.

	0								
Substanz-Nr.	Substanz	Retentionszeit [min]	Fläche [µVs]	k	R	α	α_1	Sym	Z
1	Esculetin	196	0073221	U EN					1176
2	Daphnetin	2,01	0040/01	0,00		1,00	:	1	1140
3	Umbelliferon	с ^т с	1768713	0.01		1	1 57		
4	Dihydrocumarin	3,12	C+700/1	U,YI	7,0,7	1,00	1,02	1	:
5	4-Hydroxycumarin	3,36	3546233	1,06	0,91	1,16			2610
9	Cumarin	U Z V	2132021	1 0 1	SC V		171		2112
7	Khellin	4,04	6400014	1,01	4,70	1,00	1,/1	1	C14C
œ	Visnagin	4,96	1479010	2,04	1,19	1,13	1	1	3973
6	7-Methylcumarin								
10	Xanthotoxin	6,03	8701209	2,70	2,42	1,00	1,32	0,75	1810
11	6-Methylcumarin					1,00			
12	Imperatorin	14,93	1113192	8,16	12,96	3,03		0,81	5475
13	Visnadin	25,63	324612	14,72	10,22	1,80		1,16	6375
14	Esculetindibenzylether	30,45	451224	17,68	3,53	1,20	!	0,87	7028
		Gesamtfläche	23544674						
		1-4	3143651						
		1-5	6689884						
		6-7	4785543						
		9-11	8701209		() Ber	echnung	g nicht n	nöglich	
		13-14	775836						

Tabelle 2-12: Kennzahlen des experimentellen Chromatogramms der Cumarin-Mischung (Bild 2-20) nach Isokratischem Vorschlag 2. Einzelheiten vgl. Text.

Substanz-Nr.	Substanz	Retentionszeit [min]	Fläche [μVs]	k	R	α	\mathfrak{a}_1	Sym	Ν
1	Esculetin	07 C	1169901	<i>U</i> 5 0					1101
2	Daphnetin	4,40	1400074	0, 22		1,0		1	1011
Э	Umbelliferon	2 O C	1780404	C L U	1 02		1 11		
4	Dihydrocumarin	2,00		c/,U	٥٥,1	1,0	1,41		
2	4-Hydroxycumarin	2,99	3498803	0,83	0,80	1,13		1	
9	Cumarin	c0 c	1200150	7	73 L	1,0	1 60		7501
7	Khellin	3,72	7016604	T T	00,0	1,0	1,09		1000
æ	Visnagin	4,21	1587831	1,58	1,12	1,13	-	1	4171
6	7-Methylcumarin	4 64	2178593	1 85	1 34	-	1 17		-
10	Xanthotoxin	2		1,00	5,1	1,00	1 - 6 -		
11	6-Methylcumarin	4,88	6439847	1,99	0,72	1,00	1,08		3396
12	Imperatorin	9,79	1115357	5,0	10,8	2,51		0,86	4664
13	Visnadin	15,89	318027	8,75	8,98	1,75	-	1,03	6524
14	Esculetindibenzylether	17,47	446571	9,72	1,75	1,11	1	0,87	4774
		Gesamtfläche	23533479						
		1-4	3249298						
		1-5	6748101	-					
		6-7	4699152	-					
		9-11	8618440		Ľ) Berec	thnung r	nicht mö	glich
		13-14	764598	-					

2.3.4.3 Ergebnis der vollautomatischen Trennoptimierung der Cumarin-Mischung

Unter den gewählten Voraussetzungen (siehe Kapitel 2.3.4.2) wurden von der ChromSword[®]-Software Vorschläge für vier Methoden im Gradienten und zwei Methoden im isokratischen Betrieb mit den dazugehörigen Chromatogrammen erzeugt. Dabei sollte für die Optimierung im vollautomatischen Betrieb (siehe Kapitel 2.3.2.3) nach einer Auflösung von $R_s \ge 1,7$ und einem Retentionsfaktor $k \le 10$ (isokratisch) bzw. $k \le 25$ (Gradient) für den letzten Peak gesucht werden.

Gradientenvorschläge

<u>GV1 (Bild 2-15 Tabelle 2-7):</u>

Die geforderte Auflösung von $R_s \ge 1,7$ zwischen den Substanzpaaren 11/9; 9/8 konnte, ebenso wie der Retentionsfaktor von $k \le 25$ für den letzten Peak (13/14), nicht erzielt werden. Die Substanzen 13/14 zeigten Coelution.

GV2 (Bild 2-16 Tabelle 2-8):

Hier wurde für den letzten Peak (13/14) nur ein Retentionsfaktor von k > 25 erreicht. Die Auflösung von $R_s \ge 1,7$ für die Substanzpaare 10/9; 11/10 wurde nicht erzielt. Die Substanzen 13/14 coeluierten.

GV3 (Bild 2-17 Tabelle 2-9):

Der Retentionsfaktor des letzten Peaks (14) von k \leq 25 wurde erzielt. Die Auflösung von R_s \geq 1,7 konnte für die Substanzpaare 2/1 und 4/3 nicht erreicht werden. Die Substanzen 9/10/11 zeigten Coelution.

<u>GV4 (Bild 2-18 Tabelle 2-10):</u>

Der Retentionsfaktor des letzten Peaks (14) von $k \le 25$ wurde erzielt. Die Auflösung von $R_s \ge 1,7$ konnte für die Substanzpaare 2/1 und 4/3 nicht erreicht werden. Die Substanzen 9/10/11 wurden coeluiert.

Im GV2, konnte im Gegensatz zu GV1 für das Substanzpaar 9/8 eine Auflösung $R_s > 1,7$ erzielt werden. Allerdings kam es im GV2 zu einer Verschlechterung der Auflösung der Substanzpaare 10/9; 11/10, im Vergleich zu GV1. Im GV3 und GV4 erfolgte, gegenüber GV1 und GV2, eine Trennung des Substanzpaares 13/14 ($R_s > 1,7$). Die Auflösung ($R_s > 1,7$) der Substanzpaare 2/1; 4/3 und 9/10/11 verschlechterte sich im GV3 und GV4, im Vergleich zu GV1 bzw. GV2.

Isokratische Vorschläge:

<u>IV1 (Bild 2-19 Tabelle 2-11):</u>

Der angestrebte Retentionsfaktor von $k \le 10$ des letzten Peaks konnte im IV1 nicht erzielt werden. Hier kommt es zur Coelution der Substanzen 1/2; 3/4; 9/10/11. Die Auflösung von $R_s \ge 1,7$ wurde in beiden Vorschlägen bei den Substanzpaaren 2/1; 4/3; 8/(7/6) und 5/(4/3) nicht erreicht.

IV2 (Bild 2-20 Tabelle 2-12):

Im IV2 wird der angestrebte Retentionsfaktor des letzten Peaks von $k \le 10$ erzielt. Hier kommt es zur Coelution der Substanzen 1/2, 3/4, 9/10/11. Die Auflösung von $R_s \ge 1,7$ wurde in beiden Vorschlägen bei den Substanzpaaren 2/1; 4/3; 5/(4/3); 8/(7/6) und (9/10/11)/8 nicht erzielt.

Der Versuch ChromSwords[®] eine isokratische Trennung durchzuführen ging, im Vergleich zu den GV mit einem Verlust an Auflösung einher. Dies führte zu einer vermehrten Coelution von Substanzen. Gegenüber den GV1 und GV2 hat sich die Auflösung der Substanzen 13/14 verbessert. Mit Hilfe der Flächenwerte (siehe Tabelle 2-7 bis 2-12) aus den GV ist eine Substanzzuordnung zu den Peaks denkbar. Im IV1 eluierte die letzte Substanz (14) mit 17,47 min am schnellsten. Die Summe der Peakflächen von den Substanzen 1-5, 6-7 und 9-11 zeigten vergleichbare Flächenwerte wie bei den Gradientenvorschlägen.

Der Flächenwert des Substanzpaares 3/4 ist in IV1 (siehe Tabelle 2-11) und IV2 (siehe Tabelle 2-12) im Vergleich zu den GV erhöht. Es kann davon ausgegangen werden, daß Substanz 5 an dem erhöhten Flächenwert von dem Substanzpaar 3/4 beteiligt ist. Die Summe der Flächenwerte von den Substanzen 1-5 deuten ebenso wie im IV1 darauf hin, daß es zur Coelution der Substanzen 1/2, 3/4 kommt. Im IV2 ist eine genaue Peakzuordnung trotz einer teilweisen Aufsplittung der Substanzen 9/10/11, nicht möglich. Die Summe der Peak-flächen 9 bis 11 ist vergleichbar zu den vorhergehenden Chromatographien.

Obwohl die Laufzeiten in den Vorschlägen sehr hoch waren, war die eigentliche Trennung nach ca. der Hälfte bzw. 2/3 der Zeit abgeschlossen. Auch wenn die angestrebten Parameter, wie Retentionsfaktor und Auflösung nicht immer erzielt wurden, kann die von ChromSword[®]Auto durchgeführte vollautomatische Trennoptimierung als gute Grundlage für weitere Optimierungsschritte dienen.

2.3.5 Virtuelle Trennoptimierung mit experimentellen Daten

Basierend auf den bei der vollautomatischen Trennoptimierung generierten Daten, können mit ChromSword[®]Auto virtuelle Chromatogramme, denen andere Prozeßparameter zugrunde liegen, erzeugt werden. Dieses Vorgehen kann bei der Methodenentwicklung hilfreich sein, um geänderte Trennbedingungen (z.B. Säulenwechsel, Laufmittelzusammensetzung, Gradienten) zunächst am Computer zu simulieren. Diese Simulation kann bei der Anpassung der Methoden an die EVOscreen[®]NACONA genutzt werden. Die Prozeßparameter (Bild 2-21) und das gewünschte Trennergebnis (Bild 2-22), auf deren Basis ChromSword[®]Auto die weiteren theoretischen Berechnungen vornimmt, können vorgegeben werden [32]. Für diese sind die in Bild 2-21 und Bild 2-22 gezeigten Werte als Startparameter verwendet worden.

Prozeßparameter:

Search Process Parameters		×
Complete Set Short Set		
Concentration Increment, %	ΔC	10
Time Increment, min	∆t	10
Mean Deviation	м	1,000
Optimization Mode 0 5-		_
Nodes	N	2
Gradient Completion Time, min	Tmax	20,00
Starting Concentration, %	CO	0,00
Final Concentration, %	C1	100,00
Dwell Time, min	Tau	2,72
Zero Time, min	Tm	1,63
✓ OK X Cancel	?	Help

Bild 2-21: Prozeßparameter aus Lit.[37]

Erklärung der Prozeßparameter:

1.	Concentration Increment:	Maximaler Konzentrationsschritt pro Stufe bei der Optimierung von mehrstufigen Gradienten.
2.	Time Increment:	Maximaler Zeitschritt pro Stufe bei der Optimierung von mehrstufigen Gradienten.
3.	Mean Deviation:	Der Gradientenprofilbereich, der für die Auffindung optimaler Trennbedingungen abgesucht wird.
4.	Optimization Mode:	Die Nutzung der Optimierungstypen 1 bis 5 ist abhängig von der Rechenleistung des Computers. In dem genutzten Mode 5 wird, ausgehend von den vorgegebenen Para- metern, schrittweise nach komplexeren Gradienten gesucht. Die Parameter 1 bis 3 und 5 werden während der Berechnung automatisch von der Software verändert.
5.	Nodes:	Anzahl der Stufen bei mehrstufigen Gradienten.
6.	Gradient Completion Time:	Maximale Analysendauer
7.	Starting Concentration:	Startkonzentration des organischen Lauf- mittels
8.	Final Concentration:	Endkonzentration des organischen Lauf- mittels.
9.	Dwell Time:	Gradientenverzögerungszeit
10.	Zero Time:	Totzeit

Die Prozeßparameter werden bei dem genutzten Mode 5, bis auf die Felder 6. bis 10., in den Standardeinstellungen belassen, da diese während der Optimierung eigenständig durch die Software angepaßt werden. Die Laufzeit wurde in Anlehnung an das einzuhaltende Zeitfenster der HPLC-Einheit des HTS-Systems EVOscreen[®]NACONA, mit der die Naturstoffextrakte fraktioniert werden sollten, auf 20 min begrenzt. Die Gradientenverzögerungszeit und die Totzeit wurden den experimentell ermittelten Daten entnommen (siehe Kapitel 6.2 und Kapitel 6.3).

Gewünschtes Trennergebnis:



Bild 2-22: Gewünschtes Trennergebnis aus Lit.[37]

Erklärung der Fachtermini des Fensters "Desired Separation Results":

- $T_{opt}: \qquad \mbox{Minimaler einzuhaltender Zeitabstand (vorzugebender Parameter)} \\ zwischen zwei Peaks, damit diese von der Software noch als \\ getrennt angesehen werden. Das Ziel ist eine Zeitdifferenz \\ zwischen den Peaks von <math>\Delta t \geq T_{opt}$ und nach Möglichkeit eine Auflösung von $R_s \geq 1,7$
- $T_{min}: \qquad \mbox{Die minimale Retentionszeit des ersten Peaks. Die Auflösung} zwischen den ersten beiden Peaks soll nach Möglichkeit R_s <math display="inline">\geq 1,7$ sein.
- W_{min}: Ein Wert, der die Einhaltung des Parameters T_{min} in Abhängigkeit von der Totzeit beeinflußt.
 W_{min}-Werte von 0,01 bis 9000 (Je höher der Wert, desto wichtiger ist die Einhaltung der Vorgabe für T_{min})
- $T_{max}: \qquad \mbox{Die maximale Retentionszeit des letzten Peaks. Die Auflösung} zwischen den letzten beiden Peaks soll nach Möglichkeit R_s <math display="inline">\geq 1,7$ sein.
- W_{max} : Ein Wert, der die Einhaltung des Parameters T_{max} beeinflußt. W_{max} -Werte von 0,01 bis 9000 (Je höher der Wert, desto wichtiger ist die Einhaltung der Vorgabe für T_{max}).

Im Bereich des gewünschten Trennergebnisses ist T_{opt} mit 0,1 min sehr gering eingestellt, so daß Überlappungen oder Coelutionen stattfinden dürfen. Dadurch sollte gewährleistet werden, daß die Optimierung nicht auf Grund eines nicht einzuhaltenden Zeitabstandes abgebrochen wird. Die nicht notwendige Einhaltung von T_{min} wird durch den Parameter W_{min} = 0,01 bestimmt. Dadurch soll ChromSword[®]Auto bei der Berechnung die Möglichkeit gegeben werden, einen Substanzpeak mit $t_r \ge t_0$ eluieren zu lassen bzw. den ersten Substanzpeak zu höheren Retentionszeiten zu verschieben.

Diese Einstellungen erfolgten im Hinblick auf die gewünschte Einhaltung von T_{max} , bestimmt durch $W_{max} = 9000$, die einen Gradienten über eine Zeit von maximal 20 min fordert.

Zusätzlich können noch Vorgaben zur Einhaltung von T_{opt} zwischen ausgewählten Peaks über den Parameter "Weights" (Bild 2-22) vorgenommen werden. Auf diese Eingabe wurde verzichtet, da alle Substanzen gleichberechtigt sein sollten.

Die Berechnung der gewünschten Trennoptimierung wurde beim Erreichen der 8. Stufe (Node) gestoppt und die vom Programm empfohlene Anzahl von drei Gradientenstufen wurde übernommen. Für diese theoretische Trennoptimierung benötigte ChromSword[®]Auto ca. 2 min.

Die Retentionsprognose auf Basis der experimentellen Daten aus der vollautomatischen Trennoptimierung (Bild 2-23) wurde anschließend mit einer Chromatographie (Bild 2-24) der Cumarin-Mischung experimentell überprüft. Die Prognose lieferte die Retentions- und die $b_{0,5}$ -Daten. Auf Grundlage dieser Daten erfolgte die Berechnung (sieh Kapitel 2.3.1) der Kennzahlen k, R_s und α , um später die Kennzahlen der experimentellen Chromatographie mit denen der Prognose zu vergleichen. Bei der Betrachtung des Chromatogramms ist ersichtlich, daß $b_{0,5}$ anhand eines idealisierten Peaks berechnet wurde der hier aber nicht vorlag (Coelution/Tailing). Die hier erhaltenen Werte werden für die Beurteilung der Prognose in Bezug auf die gewünschten Trennparameter und zum Vergleich mit der anschließenden experimentellen Chromatographie







Bild 2-24: Experimentelles Chromatogramm im Anschluß an die Retentionsprognose. Bezüglich der Peaknumerierung und Kennzahlen siehe Tabelle 2-14 (vgl. Bild 2-23). Einzelheiten vgl. Text.

Substanz-Nr	Substanz	Retentionszeit [min]	b _{0,5}	k	Rs	α
1	Esculetin	5,77	1,04	2,54		
2	Daphnetin	6,95	0,57	3,26	0,87	1,29
3	Umbelliferon	9,09	0,16	4,58	3,43	1,40
4	Dihydrocumarin	9,51	0,17	4,83	1,50	1,06
5	4-Hydroxycumarin	9,77	0,19	4,99	0,86	1,03
6	Cumarin	10,31	0,18	5,33	1,71	1,07
7	Khellin	12,16	0,22	6,46	5,42	1,21
8	Visnagin	12,66	0,23	6,77	1,31	1,05
9	7-Methylcumarin	13,09	0,27	7,03	1,00	1,04
10	Xanthotoxin	13,58	0,30	7,33	1,00	1,04
11	6-Methylcumarin	13,91	0,26	7,53	0,69	1,03
12	Imperatorin	17,02	0,15	9,44	9,05	1,25
13	Visnadin	18,28	0,16	10,21	4,84	1,08
14	Esculetindibenzylether	18,69	0,17	10,47	1,47	1,02

Tabelle 2-13: Kennzahlen der virtuellen Trennoptimierung (Retentionsprognose; Bild 2-23) auf Basis der experimentellen Daten (Säule 1). Einzelheiten vgl. Text.

(---) Berechnung nicht möglich

Tabelle 2-14: Kennzahlen des experimentellen Chromatogramms (Bild 2-24, Säule 1) im Anschluß an die virtuelle Trennoptimierung (Retentionsprognose). Einzelheiten vgl. Text.

Substanz-Nr.	Substanz	Retentionszeit [min]	Fläche [µVs]	k	Rs	α	α_1	Sym	Ν
1	Esculetin	0 11	1305057	9L V		-			20406
2	Daphnetin	2,41		, 'o		1,00			06400
3	Umbelliferon	00 0	1116000	5 07		-	1 06		10072
4	Dihydrocumarin	9,09	1440900	10,0	۲,44	1,00	1,00		C1 664
5	4-Hydroxycumarin	10,13	3773179	5,22	1,40	1,03			59333
9	Cumarin	10,93	3263214	5,71	4,04	1,09			1
7	Khellin	11,07	1366403	5,79	0,67	1,01			ł
8	Visnagin	11,39	1386932	5,99	1,55	1,03			48858
6	7-Methylcumarin								
10	Xanthotoxin	12,03	8391564	6,38	2,23	1,0	1,07	0,69	17036
11	6-Methylcumarin					1,0			
12	Imperatorin	16,03	1092044	8,83	13,09	1,38		0,87	70075
13	Visnadin	18,61	309037	0,42	9,20	1,18			
14	Esculetindibenzylether	18,85	428383 1	0,57	0,84	1,01			
		Gesamtfläche	22842796						
		1-4	2832040						
		1-5	6605219						
		2-9	4629617						
		9-11	8391564		() B	erechr	1 gunu	nicht r	nöglich
		13-14	737420						

2.3.5.1 Ergebnis der virtuellen Trennoptimierung mit empirischen Daten mit ChromSword[®]Auto

ChromSword[®]Auto konnte eine Retentionsprognose mit den gewünschten Trennparametern T_{opt} und T_{max} generieren.

Die Retentionsprognose (Bild 2-23, Tabelle 2-13) zeigte einen Retentionsfaktor des letzten Peaks von k = 10,47. Dieser liegt weit unter dem geforderten Wert von 25 für den Gradientenbetrieb. Für die Substanzpaare 3/2; 6/5; 7/6; 12/11 und 13/12 konnte eine Auflösung von $R_s > 1,7$ ermittelt werden.

Im experimentellen Chromatogramm im Anschluß an die virtuelle Trennoptimierung (Bild 2-24, Tabelle 2-14) wurden die Auflösung, Retentionszeiten und Retentionsfaktoren (Ausnahme: Substanz 13 und 14) nicht bestätigt; trotzdem stimmen die Chromatogramme in Bezug auf Peakreihenfolge und Peakintensitäten gut miteinander überein. Eine Ausnahme zeigten hier die Substanzen 9 und 10. Hier kam es zu einem Tausch in der Elutionsreihenfolge. Die Retentionsfaktoren der Substanzen 13 und 14 zeigten eine gute Übereinstimmung mit der Retentionsprognose. Die Substanzen 1/2; 4/5 und 9/11 zeigten, im Vergleich zu der Peaküberlappung in der Retentionsprognose, Coelution. Ebenso führte die in der Retentionsprognose gezeigte Trennung der Substanzen 6/7 zu einer Überlappung im experimentellen Chromatogramm und die im experimentellen Chromatogramm erzielte Trennung der Substanzen 8/9 wurde in der Retentionsprognose als Peaküberlappung angezeigt.

Die Verschlechterung der Auflösungen ist mit Blick auf die GV1 bis GV4 und IV1 und IV2 (siehe Kapitel 2.3.4.2) zu tolerieren, denn durch die Nachbearbeitung der Daten konnte die Analysenlaufzeit der Methoden (GV1 bis GV4, IV1 und IV2) um das 2- bzw. 4-fache reduziert werden. Unter Berücksichtigung der experimentellen Daten aus der vollautomatische Trennoptimierung konnte ChromSword[®]Auto, für die Cumarin-Mischung eine Anpassung an die Parameter der EVOscreen[®]NACONA berechnen.

Hiermit kann bei der Änderung oder Übertragung von Methoden zuvor eine Beurteilung der zu erwartenden chromatographischen Trennung erfolgen.

Durch die Verwendung der experimentellen Daten bei der Entwicklung von HPLC-Methoden wird eine Ersparnis an Zeit, Probenmenge und Laufmittel erzielt, da nur eine minimale Anzahl an experimentellen Chromatographieläufen durchgeführt werden muß.

2.3.6 Simulation mit ChromSword[®]Auto nach virtuellem Sorbentienwechsel

Mit ChromSword[®]Auto ist es möglich einen virtuellen Sorbentienwechsel vorzunehmen. Hierbei können verschiedene Sorbentien-Laufmittel-Syteme aus der in die ChromSword[®]-Software, integrierten Sorbentiendatenbank gewählt werden, um das Verhalten der Substanzen unter verschiedenen Bedingungen zu simulieren. Bei häufig wechselnden und komplex zusammengesetzten Proben kann die Datenbank - wie im Falle unserer Naturstoffextrakte - bei der Trennoptimierung den zeitaufwendigen Austausch oder den Neuerwerb einer Säule ersparen.

Bei dem vorgenommenen virtuellen Sorbentienwechsel wurde das Säulenmaterial der Säule 2 (LiChrospher100 / 125-2 / RP18e, 5 µm; Laufmittelsystem: MeCN/Wasser) gewählt. Dies entsprach, mit Ausnahme des Säurezusatzes, dem verwendeten Sorbens-Laufmittel-System der EVOscreen®NACONA. Es besteht die Möglichkeit, die eigene Säule bzw. das Säulenmaterial nach Kalibrierung mit Referenzsubstanzen in die Sorbentiendatenbank aufzunehmen und für spätere Optimierungen zu verwenden. Auf eine Kalibrierung wurde verzichtet, obwohl ein direkter Vergleich der Säulen nur möglich ist, wenn die Kalibrierung mit den gleichen Referenzsubstanzen und dem gleichen Sorbens-Laufmittel-System durchgeführt wurde. Trotzdem kann die Säulendatenbank eine Hilfe bei der Entwicklung und Säulenauswahl darstellen.

Der Parameter für die Totzeit wurde auf Grund der unterschiedlichen Säulendimension entsprechend auf 0,61 Minuten geändert.

Der berechnete Gradient aus der Retentionsprognose (siehe Kapitel 6.5.3) mit Säule 1 (Superspher / 250-2 / RP18e, 4 μ m) wird beibehalten (vgl. Bild 2-23 und Bild 2-24).

Diese Simulation soll Auskunft über die Möglichkeit geben, ChromSword[®]Auto bei einem Transfer einer Methode von Säule 1 auf Säule 2 zu benutzen (Bild 2-25 und Bild 2-26).

Die Berechnung von ChromSword[®]Auto liefert die Retentionszeiten, der einzelnen Komponenten der Cumarin-Mischung und die Werte für $b_{0,5}$. Aus diesen Daten werden die Kennzahlen k-, R_s und α -Werte berechnet (siehe Kapitel 2.3.1). Die erhaltenen Werte werden für die Beurteilung der Simulation in Bezug auf die gewünschten Trennparameter und zum Vergleich des realen Laufes verwendet.



Bild 2-25: Simuliertes Chromatogramm der Cumarin-Mischung durch die ChromSword[®]-Software nach virtuellem Sorbentienwechsel von Säulenmaterial 1 (Superspher RP18e, 4μm) auf Säulenmaterial 2 (LiChrospher100 / RP18e, 5 μm) unter Verwendung des Gradienten der Retentionsprognose (Säule 1, vgl. Bild 2-23 und Bild 2-24). Bezüglich der Peaknummerierung und Kennzahlen siehe Tabelle 2-15. Einzelheiten vgl. Text.



Bild 2-26: Experimentelles Chromatogramm (Säule 2) nach virtuellem Sorbentienwechsel (vgl. Bild 2-25). Bezüglich der Peaknummerierung und Kennzahlen siehe Tabelle 2-16. Einzelheiten vgl. Text.

Substanz- Nr.	Substanz	Retentionszeit [min]	b _{0,5}	k	R _s	α
1	Esculetin	3,47	0,62	4,69		
2	Daphnetin	4,28	0,35	6,02	0,98	1,28
3	Umbelliferon	7,43	0,13	11,18	7,68	1,86
4	Dihydrocumarin	7,72	0,06	11,66	1,75	1,04
6	4-Hydroxycumarin	7,73	0,07	11,67	0,09	1,00
5	Cumarin	7,79	0,06	11,77	0,55	1,01
7	Khellin	8,49	0,06	12,92	6,78	1,10
8	Visnagin	8,58	0,06	13,07	0,86	1,01
9	7-Methylcumarin	8,74	0,08	13,33	1,29	1,02
10	Xanthotoxin	8,89	0,08	13,57	1,06	1,02
11	6-Methylcumarin	8,99	0,07	13,74	0,75	1,01
12	Imperatorin	14,11	0,21	22,13	21,33	1,61
13	Visnadin	14,63	0,05	22,98	2,41	1,04
14	Esculetindibenzylether	14,79	0,05	23,25	2,01	1,01

Tabelle 2-15: Kennzahlen nach virtuellem Sorbentienwechsel von Säulenmaterial 1 auf Säulenmaterial 2 (Bild 2-25). Einzelheiten vgl. Text.

Tabelle 2-16: Kennzahlen des experimentellen Chromatogramms (Bild 2-26) im Anschluß an den Wechsel von Säule 1 auf Säule 2. Einzelheiten vgl. Text.

Substanz-Nr.	Substanz	Retentionszeit [min]	Fläche [µVs]	k	\mathbf{R}_{s}	n	α_1	Sym	N
1	Esculetin	6 61	1772701	100					
2	Daphnetin	0,01	124/001	7,04				ł	!
e	Umbelliferon					ł			
4	Dihydrocumarin	6,80	4899264	10,15	1,26	1,0	1,03	ł	33779
S	4-Hydroxycumarin					1,0			
6	Cumarin	7,04	3254080	10,54	1,51	1,05	1,04	1	1
7	Khellin	1 1	1001000		770	1	5		
8	Visnagin	C1,/	4001607	10,72	0,00	1,0	1,02		
6	7-Methylcumarin					ł			
10	Xanthotoxin	7,49	8485196	11,28	2,05	1,0	1,05	0,85	31499
11	6-Methylcumarin					1,0			
12	Imperatorin	10,16	1093175	15,65	10,80	1,39		0,89	73258
13	Visnadin	11 20	750511	1767	10.79		1 1 2	90 U	VLLY
14	Esculetindibenzylether	۲۲, ۲۱	140601	1 / ,0 / 1	10,/0	1,0	C 1,1	0,00	0//4
		Gesamtfläche	22630751						
		1-4							
		1-5	6146925						
		9-11	8485196		() B	erechnu	ing nic	cht mö	glich
		13-14	769541						

2.3.6.1 Ergebnis des virtuellen Sorbentienwechsels mit ChromSword[®]Auto

ChromSword[®]Auto konnte nach dem virtuellen (Säulen-)Sorbentienwechsel unter Beibehaltung des Gradienten eine Simulation mit dem geforderten Retentionsfaktor k < 25 für den Gradientenbetrieb berechnen. Dies erfolgte innerhalb einer Minute. Diese Erhöhung des Retentionsfaktors ist durch die Verringerung der Totzeit bedingt. Der gewünschte Trennparameter T_{opt}, mit einer Zeit von mindestens 0,1 Minuten zwischen den benachbarten Peaks, konnte bei den Substanzpaaren 6/4; 5/6 und 8/7 nicht eingehalten werden. Die gewünschte Auflösung R_s von mindestens 1,7 wurde zwar für die Substanzpaare 3/2; 4/3; 7/5; 12/11; 13/12 und 14/13 erlangt, nicht aber für das Substanzpaar 2/1(Daphnetin/Esculetin).

Das experimentelle Chromatogramm konnte die Auflösungen, Retentionszeiten und Retentionsfaktoren der Simulation nicht bestätigen. Die Chromatogramme sind aber in Bezug auf Peakreihenfolge und Peakintensitäten miteinander vergleichbar.

Die Substanzen 1/2; 3/4/5; 7/8; 9/10/11 und 13/14 zeigten Coelution im Vergleich zur Simulation. Obwohl die Simulationen des virtuellen Sorbentienwechsels auf den experimentellen Retentionsdaten der Säule 1 beruhen, kann das mit der Säule 2 erhaltene experimentelle Chromatogramm als eine gute Vorschau angesehen werden.

Durch die Verwendung der Sorbentiendatenbank kann bei der Methodenentwicklung auf einen zeitaufwendigen Austausch oder den Neuerwerb einer Säule verzichtet werden. Insbesondere bei häufig wechselnden oder komplex zusammengesetzten Proben ist über die Sorbentiendatenbank eine Auswahl von geeigneten Säulenmaterialien möglich. Weiterhin können vorhandene Säulen zunächst über den virtuellen Sorbentienwechsel auf ihre mögliche Verwendung hin getestet werden, ohne einen zeitaufwendigen Wechsel der Säulen vorzunehmen. Auch hier ist eine Ersparnis an Zeit, Proben und Laufmittel zu erzielen, da nur eine minimale Anzahl an experimentellen Chromatographien durchgeführt werden muß.
ChromSword[®]Auto benötigt für die Trennoptimierung mindestens zwei bekannte Standards mit oder ohne strukturelle Information. Da diese bei der Optimierung eines unbekannten Extraktes nicht verfügbar sind, soll aus den im Vorversuch verwendeten Standards eine Auswahl getroffen werden, um sie der Extraktprobe als Hilfs-Standards zuzusetzen. Dieses Verfahren dient dazu, bei unbekannten Extrakten die notwendigen bekannten Bezugssubstanzen einzubringen, um ChromSword[®]Auto für die Optimierung nutzen zu können. Diese werden anhand ihrer Retentionszeit, der Absorptionswellenlänge und entsprechend der Löslichkeit im Extraktionsmittel ausgewählt. Die Substanzen werden der Extrakt-Probe in gleicher Konzentration wie in den Standard-Lösungen (siehe Kapitel 6.6.4) zugemischt. Die Trennoptimierung sollte mit einem in der EVOscreen[®]NACONA als positiv bewerteten Pilzextrakt erfolgen, um einen Vergleich zwischen dem von der ChromSword[®]-Software optimierten und dem von Evotec verwendeten Laufmittelgradienten zu ziehen.

2.3.7.1 Auswahl des Extraktes für die vollautomatische Trennoptimierung mit ChromSword[®]Auto

Wie in Kapitel 1 erwähnt, kommt der Vorauswahl des Pflanzenmaterials bei der Suche nach aktiven Substanzen eine große Rolle zu. Daneben werden Pilze in der traditionellen chinesischen Medizin schon seit Jahrhunderten bei der Heilung von Krankheiten eingesetzt [38, 39].

Einige Basidiomyceten zeigen neben zytostatischen und immunmodulatorischen Effekten unter anderem hypotensive, cholesterinsenkende, antivirale, antimikrobielle, antientzündliche und hypoglykämische Wirkungen. Die Verwendungen und Wirkungen einiger Basidiomyceten sind in Tabelle 2-17 aufgeführt. Lenzites betulina (Syn.: Trametes betulina; Birken-Blättling, Birken-Tramete), ein auf der Nordhalbkugel verbreiteter Saprophyt, der auf Stümpfen von Birken, Eichen und Buchen zu finden ist [40], wies bisher immunsuppressive [41], antioxidative [42] und kardiovaskuläre Wirkungen [43] auf.

In dem von der Firma EVOTEC OAI für das im Diabetes-Typ-II-Target entwickelten Human-Insulin-Rezeptor-Kinase-Assay (siehe Kapitel 2.3.7.1.1) zeigte der Ethylacetat-Extrakt von Lenzites betulina biologische Aktivität. Der Extrakt wurde bei der Firma EVOTEC unter den Standardbedingungen der EVOscreen[®]NACONA (siehe Kapitel 6.5.2) chromatographiert und zur Bioaktivitätsbestimmung fluoreszenzkorrelationsspektroskopisch vermessen. HPLC-Peaks fluoreszenzkorrelations-Die Korrelation der mit dem spektroskopischen Profil des Ethylacetat-Extraktes von Lenzites betulina zeigt Bild 2-27. Bezüglich des Problems der Aktivitätsdeterminierung an einer signalfreien Position im HPLC-Chromatogramm vgl. Kapitel 2.2.



Bild 2-27: Bestimmung der Bioaktivität eines Ethylacetat-Extraktes des Baumpilzes Lenzites betulina mittels HPLC/EVOscreen[®]-Kopplung Lit.[10]. Gemessen wurde die kompetitive Hemmung (rote Kurve) der Bindung des fluoreszenzmarkierten Peptids mit dem Antikörper, der durch die HIR-Kinase phosphorylierten IRS (Diabetes-Typ-II-Target, Bild 2-28). Daneben sind das zugehörige HPLC-Chromatogramm (blaue Kurve) und die Wellenlängeninformation (schwarze Kurve) dargestellt.

	ntifungal	ntiinflammatory	ntitumor	ntiviral (e.g.anti-HIV)	ntibacterial & Antiparasitic	lood pressure regulation	ardiovascular disorders	ypercholesterolemia, hyperlipidemia	ntidiabetic	nmunomodulating	idney tonic	epatoprotective	erve tonic	exual potentiator	hronic bronchitis
Auriculariales	V	V	V	A	◄	B	0	Η	V	IJ	K	Η	Z	S	0
Auricularia auricula-judae (Bull.) Wellst.			+			+	Х	X							X
Tremellales															
Tremella fuciformis Berk.		+	+					+	+	+		+			Х
Tremella mesenterica Rits.:Fr.						+									+
Polyporales															
Schizophyllum commune Fr.:Fr.		Х	Х		Х					Х	Х	Х			
Dendropolyporus umbellatus (Pers.:Fr.) Jül.			X							X		X			Х
Grifola frondosa (Dicks.:Fr.) S.F. Gray	+		Х	X	Х	X			Х	Х		+			+
Fomes formentarius (L.:Fr.) Fr.			+		+										
Fomitopsis pinicola (Schw.:Fr.) P. Karst.		+	+		+							+			
Trametes versicolor (L: Fr.) Lloyd			Х	Х	Х						Х	Х			
Piptoporus betulinus (Bull.:Fr.) P. Karst.	+		+		+										
Hericium erinaceus (Bull.:Fr.) Pers.			+							Х			Х		Х
Inonotus obliquus (Pers.:Fr.) Bond.et Sing.		Х	Х							Х		X			
Lenzites betulina (L.:Fr.) Fr.			+				+								
Laetiporus sulphureus (BulLFr.) Murr.	+		+												
Ganodermatales															
Ganoderma lucidum (Curt.:Fr.) P.Karst		Х	Х	X	Х	X	Х			Х	Х	X	X	X	X
Ganoderma applanatum (Pers.) Pat.			+	+	+					+					
X = commercially developed mushro (drug or dietary Supplement)	om	pro	duct	t		+ =	noi mi	n co 1shr	mm oon	erci 1 pro	ally oduc	' dev et.	elo	ped	

Tabelle 2-17: Verwendung und Wirkung einiger Basidiomyceten aus Lit.[4	[3]
--	-----

	Antifungal	Antiinflammatory	Antitumor	Antiviral (e.g.anti-HIV)	Antibacterial & Antiparasitic	Blood pressure regulation	Cardiovascular disorders	Hypercholesterolemia, hyperlipidemia	Antidiabetic	Immunomodulating	Kidney tonic	Hepatoprotective	Nerve tonic	Sexual potentiator	Chronic bronchitis
Agaricomycetideae															
Agaricales s.l.															
Pleurotaceae															
Lentinus edodes (Berk.) Sing.		Х	Х	Х	Х	Х		Х	Х	Х	Х	Х		Х	
Pleurotus ostreatus (Jacq.:Fr.) Kumm.			+	+	+			+					+		
Pleurotus pulmonarius (Fr.: Fr.) Quel	+		+					+							
Tricholomataceae															
Flammulina velutipes (Curt.:Fr.) P.Karst.	+	Х	Х	+						Х					
Oudemansiella mucida (Schrad.:Fr.) v.Höhn.	X														
Armillariella mellea (VahLFr.) P.Karst.	+					X	X						X		
Hypsizygus marmoreus (Peck) Bigel.			Х												
Marasmius androsaceus (L.:Fr.) Fr.		Х											Х		
Agaricaceae															
Agaricus Wate/ Murr.			Х												
Agaricus bisporus (J.Lge.) Imbach			+							Х	Х				
Pluteaceae															
Volvariella volvacea (BulLFr.) Sing.			+	+	+			+							
Bolbitiaceae															
Agrocybe aegerita (Brit.) Sing.	+		+			1		+					+		
X = commercially developed mushroo	om p	orod	uct			+ =	noi	1 co	mm	erci	ally	dev	/elo	ped	
(drug or dietary Supplement)							mu	shro	om	pro	duc	t.			

Fortsetzung Tabelle 2-17: Verwendung und Wirkung einiger Basidiomyceten

2.3.7.1.1 Human-Insulin-Rezeptor-Kinase (HIR)-Assay

In der menschlichen Zelle wird die Aufnahme der Glucose durch die Bindung von Insulin an die Insulin-Rezeptoren ausgelöst. Hierbei kommt es im Zellinneren zur Aktivierung der HIR. Deren Ziel ist es unter anderem, die Insulin-Rezeptor-Substrat-Proteine (IRS), die an der Steuerung des Glucosetransports beteiligt sind, zu phosphorylieren. Beim Diabetes Typ-II besteht häufig ein Mangel in der Phosphorylierung dieser IRS. Ziel der Fa. EVOTEC OAI bei der Entwicklung dieses Assays war es, einen HIR-Aktivator zu finden, der unabhängig von der Insulinausschüttung oder Insulinantwort eine Bildung von Glucose-transportern bewirkt.

Prinzip des HIR-Assays (Bild 2-28) [10]:



Bild 2-28: Prinzip des HIR-Assays [10]: Unter Verbrauch von ATP werden die Peptidsubstrate durch die HIR (hier IRK) phosphoryliert und konkurrieren anschließend mit den fluoreszenzmarkierten Peptiden um die Bindung an den Antikörpern. Einzelheiten vgl. Text. Der Assay beruht auf der indirekten Bestimmung der Phosphorylierung eines Peptidsubstrates durch die Human-Insulin-Rezeptor-Kinase (HIR).

Im Assay befindet sich ein fluoreszenzmarkiertes, phosphoryliertes Peptid, daß das Signal erzeugt und in Abwesenheit des HIR-Produkts an einen Antikörper bindet. Diese Bindung kann nur ungestört erfolgen, wenn das Peptidsubstrat nicht durch die HIR phosphoryliert wird. Kann die HIR durch eine Testsubstanz aktiviert und das Peptidsubstrat unter Verbrauch von ATP phosphoryliert werden, konkurrieren diese anschließend mit den fluoreszenzmarkierten Peptiden um die Bindung an den Antikörpern (Bild 2-28). Mit Hilfe der Fluoreszenzkorrelationsspektroskopie (siehe Kapitel 1) wird der Grad an fluoreszenzmarkiertem Peptid, das eine Bindung mit dem Antikörper eingegangen ist, gemessen. Je geringer das Signal des fluoreszenzmarkierten Peptid-Antikörper-Komplexes ist, desto mehr Peptidsubstrat wurde phosphoryliert und um so höher ist die Aktivität der Testsubstanz.

2.3.7.2 Auswahl der Naturstoffstandards für die vollautomatische Trennoptimierung mit ChromSword[®]Auto

Für die Optimierung des Extraktes wurde aus den im Vorversuch verwendeten Standards eine Auswahl getroffen, um sie der Extrakt-Probe als Bezugsstandards zuzusetzen. Diese sollte ChromSword[®]Auto für die Optimierung als Bezugssubstanzen nutzen, während die Substanzen des Extraktes von ChromSword[®]Auto als "Verunreinigungen" betrachtet werden und somit eine nach den Kriterien in Kapitel 2.3.3 (Stabilität, Reinheit etc.), nicht zu optimierende Substanz darstellt.

Hierbei wurden die Standards auch in Bezug auf ihre Zugehörigkeit zu den verschiedenen Naturstoffgruppen ausgewählt. Aus den Retentionszeiten der Vorversuche konnte von unterschiedlichen Polaritäten und einem ausreichenden Trennfaktor der Standards Genistein (Flavonoid), Xanthotoxin (Cumarin) und 1,8-Dihydroxyanthrachinon (Anthrachinon) ausgegangen werden.

Die Standards konnten in entsprechender Konzentration (siehe Kapitel 6.6.4) in Ethylacetat gelöst werden und erbrachten bei einem Injektionsvolumen von 5 μ l und der Wellenlänge von 260 nm eine ausreichend große Peakfläche (Tabelle 2-17a). Die Auswahl der Wellenlänge für die Trennoptimierung erfolgte anhand der UV-Spektren der Naturstoffstandards (Bild 2-29) und dem Chromatogramm des Extraktes von Lenzites betulina. Obwohl eine kleinere Detektionswellenlänge (250 nm) eine größere Peakfläche von 1,8-Dihydroxyanthrachinon und Xanthotoxin im Chromatogramm erzeugen würde, wurde auf Grund des damit verbundenen Anstiegs der Basislinie (Extrakt-Matrix) davon abgesehen.



Bild 2-29: Absorptionsspektren der ausgewählten Naturstoffstandards als Bezugssubstanzen für die Extrakt-Optimierung mit ChromSword[®]Auto. Die schwarze senkrechte Linie markiert die Wellenlänge, bei der die Peakflächen integriert wurden (siehe Tabelle 2-17a).

Tabelle 2-17a: Flächenwerte der ausgewählten Naturstoffstandards aus den Vorversuchen mit jeweils 0,5 mg pro Injektion (siehe Kapitel 2.3.3.2, Tabelle 2-4 u. 2-5). Die Integration der Peakflächen erfolgte bei 260 nm (siehe Bild 2-29).

Substanz-Nr.	Naturstoffstandard	Fläche [μVs]
1	Genistein	1153915
2	Xanthotoxin	1983544
3	1,8-Dihydroxyanthrachinon	1315357

2.3.7.3 Parameter für die HPLC-Trennoptimierung eines Extraktes von Lenzites betulina mit ChromSword[®]Auto

Die Optimierungsparameter aus der vollautomatischen Trennoptimierung der Cumarine wurden übernommen (siehe Kapitel 2.3.4.2). Da der Extrakt sehr konzentriert war, wurde das Injektionsvolumen auf 5 µl verringert. Die Detektion fand bei einer Wellenlänge von 260 nm (vgl. Bild 2-29) statt. Es wurde ausschließlich eine Gradientenoptimierung gefordert, da eine isokratische Methode bei komplexen Naturstoffmischungen selten zum Erfolg führt. Zusätzlich erfolgte eine Reduzierung des Parameters "Rejection-Level" auf den Wert 5000 μ Vs, um auch kleine Peaks mit einzubeziehen. Die gewünschte Fläche von mindestens 250.000 μ Vs wurde im Chromatogramm nicht von allen Extrakt-Peaks erreicht. Dies war, anders als bei Standardsubstanzen, von untergeordneter Bedeutung, da hier auf eine maximale Peakanzahl optimiert wurde. Für die Optimierung wurde die Säule 1 (Superspher 250-2 / RP18e, 4 μ m) gewählt, da durch deren Säulenlänge und die Partikelgröße eine verbesserte Trennung der Substanzen im Vergleich zur Säule 2 (LiChrospher / 125-2 RP18e, 5 μ m) zu erwarten ist.

ChromSword[®]Auto konnte 10 Gradientenvorschläge (im Folgenden: LbeGV1 bis LbeGV10; Bild 2-31 bis 2-35) generieren. Nach der automatischen Trennoptimierung wurde zum Vergleich der Pilzextrakt ohne Standards unter den jeweiligen von ChromSword[®]Auto generierten Bedingungen injiziert. Hierdurch sollte überprüft werden, in wieweit die Standards andere Peaks des Extraktes überlagern.

Die erhaltenen Vorschläge werden in Verbindung mit dem Standardgradienten der EVOscreen[®]NACONA und der dort genutzten Säule 2 (siehe Kapitel 6.6.3) verglichen (Bild 2-36). Eine anschließende virtuelle Trennoptimierung ist nicht durchführbar, da eine genaue Zuordnung der Einzelpeaks unter den verschiedenen Gradientenbedingungen nicht möglich ist. Als Anhaltspunkt für die Beurteilung der Auflösung und des Retentionsfaktors dienen daher die zugesetzten Naturstoffstandards. Die Kennzahlen Symmetriefaktor (Sym), Trennfaktor (α) und die Trennstufenzahl (N) spielen bei der automatischen Trennoptimierung mit ChromSword[®]Auto eine untergeordnete Rolle und sind nur der Vollständigkeit halber aufgeführt. Aus Gründen des Darstellungsmaßstabes ist die Peakanzahl in den vergleichenden Chromatogrammabbildungen nicht eindeutig erkennbar. Bild 2-30 zeigt daher einen vergrößerten Chromatogrammausschnitt des Ethylacetat-Extraktes von Lenzites betulina mit dem Standardgradienten der EVOscreen[®]NACONA (siehe Bild 2-36).



Bild 2-30: Vergrößerter Chromatogrammausschnitt (10 min bis 25 min) des Ethylacetat-Extraktes von Lenzites betulina (siehe Seite 116, Bild 2-36).



Bild 2-31: Chromatogramme (Säule 1) des Ethylacetat-Extraktes von Lenzites betulina nach vollautomatischer Trennoptimierung durch die ChromSword[®]-Software. Gradientenvorschläge 1 und 2 mit Standards (LbeGV1, LbeGV2) und ohne Standards (LbeGV1a, LbeGV2a). Die Peaknumerierung entspricht der in Tabelle 2-17a. Kennzahlen siehe Tabelle 2-18 u. 2-19. Einzelheiten vgl. Text.



Bild 2-32: Chromatogramme (Säule 1) des Ethylacetat-Extraktes von Lenzites betulina nach vollautomatischer Trennoptimierung durch die ChromSword[®]-Software. Gradientenvorschläge 3 und 4 mit Standards (LbeGV3, LbeGV4) und ohne Standards (LbeGV3a, LbeGV4a). Die Peaknumerierung entspricht der in Tabelle 2-17a. Kennzahlen siehe Tabelle 2-20 u. 2-21. Einzelheiten vgl. Text.



Bild 2-33: Chromatogramme (Säule 1) des Ethylacetat-Extraktes von Lenzites betulina nach vollautomatischer Trennoptimierung durch die ChromSword[®]-Software. Gradientenvorschläge 5 und 6 mit Standards (LbeGV5, LbeGV6) und ohne Standards (LbeGV5a, LbeGV6a). Die Peaknumerierung entspricht der in Tabelle 2-17a. Kennzahlen siehe Tabelle 2-22 u. 2-23. Einzelheiten vgl. Text.



Bild 2-34: Chromatogramme (Säule 1) des Ethylacetat-Extraktes von Lenzites betulina nach vollautomatischer Trennoptimierung durch die ChromSword[®]-Software.
Gradientenvorschläge 7 und 8 mit Standards (LbeGV7, LbeGV8) und ohne Standards (LbeGV7a, LbeGV8a). Die Peaknumerierung entspricht der in Tabelle 2-17a. Kennzahlen siehe Tabelle 2-24 u. 2-25. Einzelheiten vgl. Text.



Bild 2-35: Chromatogramme (Säule 1) des Ethylacetat-Extraktes von Lenzites betulina nach vollautomatischer Trennoptimierung durch die ChromSword[®]-Software.
 Gradientenvorschläge 9 und 10 mit Standards (LbeGV9, LbeGV10) und ohne Standards (LbeGV9a, LbeGV10a). Die Peaknumerierung entspricht der in Tabelle 2-17a. Kennzahlen siehe Tabelle 2-26 u. 2-27. Einzelheiten vgl. Text.



Bild 2-36: Chromatogramme (Säule 2) des Ethylacetat-Extraktes von Lenzites betulina mit dem Standardgradienten der EVOscreen[®]NACONA mit Standards (LbeNACONA1) und ohne Standards (LbeNACONA1a). Die Peaknumerierung entspricht der in Tabelle 2-17a. Kennzahlen siehe Tabelle 2-28. Einzelheiten vgl. Text.

 Tabelle 2-18: Kennzahlen (siehe Text) des experimentellen Chromatogramms des Ethylacetat-Extraktes von Lenzites betulina mit Standards nach Gradientenvorschlag 1 (Bild 2-31, LbeGV1). Die Numerierung entspricht der in Tabelle 2-17a.

Peak-	RT	Naturstoff-	Fläche	lz.	D	a	Sum	N
Anzahl	[min]	standard	[µVs]	ĸ	n _s	u	sym	1 N
	2,32		290145	0,42				2418
	2,64		26495	0,62	1,54	1,46		
	2,77		75564	0,70	0,61	1,13		
	2,88		78613	0,77	0,47	1,09		
	6,72		7977	3,12	7,24	4,07		2572
	7,17		41667	3,40	5,14	1,09		
	11,31		53359	5,94	29,72	1,75		
	11,57		183443	6,10	1,87	1,03		
	11,84		186521	6,26	1,83	1,03		
	12,00		131902	6,36	1,08	1,02		
	12,19		227911	6,48	1,25	1,02		
	12,69	1	3285605	6,79	3,25	1,05	1,32	105746
32	14,13		216658	7,67	5,11	1,13		
	14,67		183199	8,00	1,83	1,04		
	14,85		220305	8,11	0,63	1,01		
52	15,20		106073	8,33	1,14	1,03		
	15,57		182086	8,55	1,20	1,03		
	15,81		133737	8,70	0,76	1,02		
	16,19		93837	8,93	1,16	1,03		
	17,01		347738	9,44	2,44	1,06		
	18,21	2	1755500	10,17	3,31	1,08	1,02	40301
	19,57		510737	11,01	3,30	1,08		28802
	20,64		2049632	11,66	2,42	1,06	0,89	38463
	21,97		220827	12,48	2,63	1,07		
	22,40	3	1362753	12,74	0,83	1,02		30045
	26,27		200020	15,11	8,69	1,19		79573
	26,72		301584	15,39	1,25	1,02		92420
	27,17		51478	15,67	1,04	1,02		
	27,49		105636	15,87	0,72	1,01		
	30,05		19631	17,44	5,29	1,10		

Peak- Anzahl	RT [min]	Naturstoff- standard	Fläche [µVs]	k	R _s	α	Sym	Ν
31	33,41		67628	19,50	6,24	1,12		61598
52	36,29		30699	21,27	4,92	1,09		

Fortsetzung Tabelle 2-18: Kennzahlen des Chromatogramms nach LbeGV1 mit Standards.

 Tabelle 2-19: Kennzahlen (siehe Text) des experimentellen Chromatogramms des Ethylacetat-Extraktes von Lenzites betulina mit Standards nach Gradientenvorschlag 2 (Bild 2-31, LbeGV2). Die Numerierung entspricht der in Tabelle 2-17a.

Peak- Anzahl	RT [min]	Naturstoff- standard	Fläche [µVs]	k	R _s	α	Sym	Ν
	2,48		290470	0,52				
	2,85		40811	0,75	2,04	1,44		3902
	3,01		83589	0,85	0,64	1,13		1434
	6,99		17315	3,29	17,41	3,87		40964
	7,39		9805	3,53	4,11	1,07		
	8,69		11444	4,33	11,40	1,23		
	9,33		55765	4,73	5,20	1,09		
	9,73		65633	4,97	3,12	1,05		
	9,89		67082	5,07	1,23	1,02		
	10,21		90836	5,27	2,38	1,04		
	10,45		69544	5,41	1,74	1,03		
38	10,59		34530	5,49	0,96	1,02		
	10,83		31701	5,64	1,68	1,03		
	10,99	1	2651143	5,74	1,10	1,02	1,54	92103
	11,47		151673	6,03	1,34	1,05		
	11,71		94123	6,18	0,66	1,02		
	11,87		140222	6,28	0,43	1,02		
	12,16		204311	6,46	0,77	1,03		
	12,56		173944	6,71	1,02	1,04		
	12,67		192809	6,77	0,27	1,01		
	12,85		100916	6,89	0,47	1,02		
	13,01		162430	6,98	0,39	1,01		
	13,33		169612	7,18	0,77	1,03		

Peak-Anzahl	RT [min]	Naturstoff- standard	Fläche [µVs]	k	R _s	α	Sym	Ν
	13,65		334555	7,38	0,75	1,03		16441
	14,29	2	1779290	7,77	2,11	1,05		101849
	14,61		535794	7,97	1,59	1,03		68459
	14,77		121116	8,06	0,83	1,01		
	15,01		2136767	8,21	1,22	1,02		93740
	15,60		410240	8,57	0,78	1,01		67974
	16,32	3	1627949	9,01	2,90	1,05	1,77	64677
38	17,28		182554	9,60	2,96	1,07		31045
	17,57		57222	9,78	0,83	1,02		
	18,43		84633	10,3	0,76	1,04		
	17,81		220549	9,93	0,67	1,02		39626
	18,75		33811	10,5	0,39	1,02		
-	19,07		26146	10,7	0,38	1,02		
	19,39		21640	10,89	0,38	1,02		
	38,11		65738	22,38	11,18	2,05		8288

Fortsetzung Tabelle 2-19: Kennzahlen des Chromatogramms nach LbeGV2 mit Standards.

Tabelle 2-20: Kennzahlen (siehe Text) des experimentellen Chromatogramms des Ethylacetat-Extraktes von Lenzites betulina mit Standards nach Gradientenvorschlag 3 (Bild 2-32, LbeGV3). Die Numerierung entspricht der in Tabelle 2-17a.

Peak- Anzahl	RT [min]	Naturstoff- standard	Fläche [µVs]	k	R _s	α	Sym	Ν
	1,89		157150	0,16				
	2,00		165864	0,23	0,62	1,41		
	2,35		143086	0,44	1,73	1,94		
	2,53		195040	0,55	0,86	1,26		
	2,75		137866	0,69	0,91	1,24		
	3,01		204520	0,85	1,03	1,24		
	3,25		105094	1,00	0,86	1,17		
	3,36		333831	1,06	0,37	1,07		
	3,52	1	1754619	1,16	0,53	1,09		2183
	3,92		1573143	1,40	1,59	1,21		
22	6,64		608817	3,07	6,39	2,19		
	8,05		313395	3,94	2,74	1,28		
	10,40		177298	5,38	3,52	1,37		
	11,95	2	1716270	6,33	2,02	1,18	0,88	3893
	14,75		411619	8,05	3,41	1,27		4531
	16,45		2031281	9,09	2,23	1,13	0,94	10217
	17,63	3	1760624	9,81	1,82	1,08	1,31	12335
	25,49		141633	14,64	11,33	1,49		18336
	26,59		286918	15,31	1,56	1,05		26823
	27,79		135562	16,05	1,44	1,05		11914
	28,40		31749	16,42	0,67	1,02		
	58,16		58064	34,68	15,99	2,11		15628

 Tabelle 2-21: Kennzahlen (siehe Text) des experimentellen Chromatogramms des Ethylacetat-Extraktes von Lenzites betulina mit Standards nach Gradientenvorschlag 4 (Bild 2-32, LbeGV4). Die Numerierung entspricht der in Tabelle 2-17a.

Peak- Anzahl	RT [min]	Naturstoff- standard	Fläche [µVs]	k	R _s	α	Sym	Ν
	2,9		53751	0,77				
	2,98		226333	0,83	1,56	1,09		
	3,09		53633	0,90	1,51	1,08		
	8,75		9411	4,37	28,31	4,86		30698
	9,17		21590	4,63	2,35	1,06		50322
	14,70		7659	8,01	17,08	1,73		
	14,99		30804	8,19	0,89	1,02		33075
	16,19	1	2457539	8,93	4,77	1,09	1,62	138721
	17,12		227714	9,50	3,24	1,06		
	18,84		238943	10,57	5,46	1,11		56387
	19,16		134742	10,76	1,91	1,02		
24	19,58		170783	11,01	2,34	1,02		
27	20,00		62927	11,27	2,44	1,02		
	20,52		146684	11,6	2,97	1,03		
	21,18	2	1717818	11,99	3,46	1,03	1,24	209202
	21,74		556310	12,33	2,75	1,03		153849
	22,16		2028713	12,6	2,11	1,02	1,26	237249
	22,69		301837	12,92	2,62	1,03		161998
	23,13	3	1504806	13,18	1,89	1,02		166054
	24,04		204597	13,74	3,58	1,04		117767
-	24,39		262822	13,97	1,35	1,02		129852
	24,76		199243	14,18	0,82	1,02		
	32,05		68949	18,66	13,36	1,32		54939
	35,78		46670	20,96	4,79	1,12		19998

Tabelle 2-22: Kennzahlen (siehe Text) des experimentellen Chromatogramms des Ethylacetat-Extraktes von Lenzites betulina mit Standards nach Gradientenvorschlag 5 (Bild 2-33, LbeGV5). Die Numerierung entspricht der in Tabelle 2-17a.

Peak- Anzahl	RT [min]	Naturstoff- standard	Fläche [µVs]	k	Rs	α	Sym	Ν
	2,27		215309	0,39				
	2,48		44965	0,52	1,44	1,34		
	2,67		11726	0,64	1,17	1,22		
	2,83		344394	0,73	0,95	1,15		4482
	4,75		49299	1,91	6,67	2,60		2178
	5,68		18748	2,48	10,31	1,30		
	6,32		63608	2,88	6,36	1,16		
	6,56		13485	3,02	2,30	1,05		
	8,32		117134	4,10	13,28	1,36		
	8,64		93742	4,30	2,32	1,05		
	8,77		102385	4,38	0,95	1,02		
	9,07		135466	4,56	2,03	1,04		
	9,25		74171	4,68	1,27	1,03		
	9,57		109903	4,87	2,10	1,04		
36	9,73	1	2757505	4,97	1,03	1,02	1,26	63032
	10,11		176338	5,2	0,86	1,05		
	10,37		299074	5,36	0,60	1,03		
	10,83		240491	5,64	0,98	1,05		
	11,23		207307	5,89	0,83	1,04		
	11,36		211911	5,97	0,27	1,01		
	11,55		99701	6,08	0,38	1,02		
	11,76		315085	6,21	0,42	1,02		
	12,13		194972	6,44	0,72	1,04		
	12,53		387016	6,69	0,75	1,04		8747
	13,31	2	1791354	7,16	2,00	1,07		49900
	13,84		681538	7,49	1,96	1,05		32525
	14,40		2215384	7,83	1,97	1,05	0,88	48728
	15,20		383638	8,33	2,68	1,06		32607
	15,97	3	1593818	8,80	2,30	1,06	1,29	36391

Peak- Anzahl	RT [min]	Naturstoff- standard	Fläche [µVs]	k	Rs	α	Sym	Ν
	16,69		113020	9,24	1,35	1,05		
	17,60		228053	9,80	1,61	1,06		15718
	18,37		312738	10,27	1,11	1,05		7703
36	19,33		65769	10,86	1,09	1,06		
	20,43		84651	11,53	1,17	1,06		
	20,93		23490	11,84	0,53	1,03		
	51,95		47133	30,87	13,1	2,61		

Fortsetzung Tabelle 2-22: Kennzahlen des Chromatogramms nach LbeGV5 mit Standards.

Tabelle 2-23: Kennzahlen (siehe Text) des experimentellen Chromatogramms des Ethylacetat-Extraktes von Lenzites betulina mit Standards nach Gradientenvorschlag 6 (Bild 2-33, LbeGV6).
Die Numerierung entspricht der in Tabelle 2-17a.

Peak- Anzahl	RT [min]	Naturstoff- standard	Fläche [μVs]	k	R _s	α	Sym	Ν
	2,69		13613	0,65				
	2,99		294622	0,83	5,89	1,28		
	3,09		67767	0,90	2,07	1,08		
	7,87		5791	3,83	36,37	4,26		
	8,00		29617	3,91	1,00	1,02		57476
	9,71		179636	4,96	14,2	1,27		
	10,11		175810	5,2	3,20	1,05		
	10,37		132515	5,36	2,08	1,03		
27	10,59		165034	5,49	1,63	1,02		
	11,04	1	3096863	5,77	3,32	1,05	1,92	104413
	12,13		196704	6,44	7,96	1,12		
	12,37		195381	6,59	1,71	1,02		
	12,53		283417	6,69	1,13	1,01		
	12,77		312838	6,84	1,66	1,02		
	13,04		176108	7,00	1,81	1,02		
	13,28		274775	7,15	1,60	1,02		
	13,49		156668	7,28	1,40	1,02		

Peak- Anzahl	RT [min]	Naturstoff- standard	Fläche [µVs]	k	R _s	α	Sym	Ν
	13,79		1688441	7,46	1,88	1,02		124748
	13,97	2	538984	7,57	1,27	1,02		
	14,08		133118	7,64	0,72	1,01		
	14,24		2174588	7,74	1,07	1,01		144654
27	14,64		409100	7,98	2,35	1,03		93818
21	15,28	3	1680432	8,37	3,34	1,05		101822
	15,60		229101	8,57	1,05	1,02		
	15,89		388101	8,75	0,94	1,02		41540
	16,24		244676	8,96	0,66	1,02		
	27,12		48553	15,64	11,92	1,74		15068

Fortsetzung Tabelle 2-23: Kennzahlen des Chromatogramms nach LbeGV6 mit Standards.

Tabelle 2-24: Kennzahlen (siehe Text) des experimentellen Chromatogramms des Ethylacetat-Extraktes von Lenzites betulina mit Standards nach Gradientenvorschlag 7 (Bild 2-34, LbeGV7). Die Numerierung entspricht der in Tabelle 2-17a.

Peak- Anzahl	RT [min]	Naturstoff- standard	Fläche [µVs]	k	R _s	α	Sym	Ν
	1,92		169945	0,18				
	2,03		161177	0,24	1,30	1,37		
	2,51		251478	0,54	4,74	2,21		
	2,67		166762	0,64	1,49	1,18		
	2,88		161568	0,77	1,83	1,21		
	3,28	1	3162683	1,01	3,02	1,32		9817
	4,11		193405	1,52	3,37	1,50		
15	10,03	2	1547437	5,15	9,89	3,39		4487
	11,71		368403	6,18	2,71	1,20		5310
	12,91		1934547	6,92	1,98	1,12	0,96	8295
	14,56	3	1503296	7,93	2,84	1,15	1,06	9519
	19,23		67813	10,8	7,60	1,36		14858
	19,92		171912	11,22	1,37	1,04		44238
	20,45		67558	11,55	1,75	1,03		
	26,91		70265	15,51	16,07	1,34		71859

 Tabelle 2-25: Kennzahlen (siehe Text) des experimentellen Chromatogramms des Ethylacetat-Extraktes von Lenzites betulina mit Standards nach Gradientenvorschlag 8 (Bild 2-34, LbeGV8). Die Numerierung entspricht der in Tabelle 2-17a.

Peak- Anzahl	RT [min]	Naturstoff- standard	Fläche [µVs]	k	R _s	A	Sym	Ν
	2,53		556702	0,55				
	2,88		23289	0,77	2,28	1,38		5752
	3,04		135775	0,87	0,72	1,13		1708
	8,03		74254	3,92	20,97	4,54		31370
	8,19		9161	4,02	0,15	1,03		
	12,29		15208	6,54	2,62	1,63		987
	14,27		34136	7,75	1,69	1,19		5547
	21,65		44126	12,28	12,61	1,58		45648
	23,15		8589	13,20	2,95	1,07		23169
	23,92	1	2382747	13,67	1,73	1,04	1,33	112141
	25,95		192991	14,92	4,67	1,09		
	28,56		113684	16,52	5,48	1,11		57296
	29,15		29913	16,88	0,96	1,02		24448
27	29,65		49636	17,19	1,97	1,02		
	29,97		190581	17,39	1,23	1,01		
	30,19		287553	17,52	0,81	1,01		
	32,91	2	2718863	19,19	9,52	1,10	1,25	212233
	34,43		901356	20,12	4,97	1,05		179122
	35,28		2240386	20,64	2,77	1,03	0,95	237433
	36,11	3	2012237	21,15	2,40	1,02		130782
	39,20		125824	23,05	7,50	1,09		135754
	40,00		42640	23,54	1,80	1,02		119919
	40,45		824753	23,82	1,12	1,01		
	48,59		19929	28,81	16,80	1,21		
	52,40		62086	31,15	7,30	1,08		161090
	52,96		39996	31,49	1,06	1,01		
	56,27		6157	33,52	5,90	1,06		

 Tabelle 2-26: Kennzahlen (siehe Text) des experimentellen Chromatogramms des Ethylacetat-Extraktes von Lenzites betulina mit Standards nach Gradientenvorschlag 9 (Bild 2-35, LbeGV9). Die Numerierung entspricht der in Tabelle 2-17a.

Peak-	RT	Naturstoff-	Fläche	z	R	n	Sym	Ν
Anzahl	[min]	standard	[µVs]		INS	u	Sym	Ţ
	1,92		179275	0,18				
	2,00		149023	0,23	1,04	1,28		
	2,29		80778	0,41	3,31	1,79		
	2,59		274850	0,59	2,94	1,44		
	2,91		266673	0,78	2,85	1,33		
	3,25		104032	1,00	2,76	1,27		
	3,47		461825	1,13	1,59	1,13		10735
	3,73		139880	1,29	1,75	1,15		
	4,00	1	1618811	1,45	1,63	1,13		
	4,35	1	1312607	1,67	1,95	1,15		
	5,12		198310	2,14	3,69	1,28		
	6,35		397649	2,89	4,72	1,35		
	6,8		504757	3,17	1,63	1,10		
	7,63		416345	3,68	2,65	1,16		
29	8,85		252099	4,43	3,39	1,20		
	9,23		130498	4,66	0,99	1,05		
	9,81	2	1883841	5,02	1,46	1,08		9558
	10,88		603881	5,67	2,52	1,13		9547
	11,71		2244682	6,18	1,99	1,09	0,92	14696
	12,75		330411	6,82	2,45	1,10		12177
	13,28	3	1677806	7,15	1,21	1,05		16139
	15,39		95898	8,44	3,38	1,18		
	16,32		171761	9,01	1,41	1,07		9742
	17,44		310134	9,70	1,59	1,08		8761
	18,85		44932	10,57	3,09	1,09		
	19,6		50289	11,02	1,57	1,04		
	21,68		16726	12,3	3,95	1,12		
	47,81		68800	28,33	22,5	2,30		27123
	62,37		34485	37,27	9,56	1,32		17512

 Tabelle 2-27: Kennzahlen (siehe Text) des experimentellen Chromatogramms des Ethylacetat-Extraktes von Lenzites betulina mit Standards nach Gradientenvorschlag 10 (Bild 2-35, LbeGV10). Die Numerierung entspricht der in Tabelle 2-17a.

Peak- Anzahl	RT [min]	Naturstoff- standard	Fläche [µVs]	k	Rs	α	Sym	Ν
	1,92		138687	0,18				
	2,00		156587	0,23	0,71	1,28		
	2,43		228619	0,49	3,10	2,15		
	2,56		118323	0,57	0,92	1,17		
	2,72		167750	0,67	1,04	1,17		
	3,12	1	2865101	0,91	2,26	1,37		
	4,72		399916	1,90	5,98	2,07		
	5,68		120960	2,48	2,98	1,31		
10	8,21	2	1366439	4,04	5,44	1,63	1,46	4979
10	9,33		329598	4,73	2,19	1,17		4522
	10,29		1656129	5,31	1,89	1,12	1,11	8051
	11,52		148517	6,07	2,48	1,14		7548
	12,24	3	1078227	6,51	1,44	1,07	1,36	10908
	15,68		63061	8,62	5,61	1,32		6865
	21,55		19436	12,22	19,48	1,42		
	21,76		23508	12,35	0,70	1,01		
	24,77		13527	14,20	8,70	1,15		
	27,87		63184	16,10	7,94	1,13		81917

Tabelle 2-28: Kennzahlen (siehe Text) des experimentellen Chromatogramms mit dem Standardgradienten der EVOscreen[®]NACONA vom Ethylacetat-Extrakt von Lenzites betulina mit Standards (Bild 2-36, LbeNACONA1). Die Numerierung entspricht der in Tabelle 2-17a.

Peak- Anzahl	RT [min]	Naturstoff- standard	Fläche [µVs]	k	Rs	α	Sym	Ν
	2,93		82006	3,80				10544
	2,99		354317	3,91	0,81		1,03	57526
	11,33		122519	17,57	54,72		4,50	31676
	11,73		116195	18,23	2,06		1,04	
	11,88		72488	18,48	0,73		1,01	
	12,41		167148	19,34	2,53		1,05	56633
	12,69		123897	19,81	2,19		1,02	
	13,3	1	2986207	20,80	4,43	2,23	1,05	150755
	14,62		262109	22,97	4,12		1,10	
	15,25		433866	23,99	1,87		1,04	33296
	15,43		292307	24,30	1,49		1,01	
	15,72		225733	24,77	2,24		1,02	
25	16,45		371726	25,97	5,48		1,05	
	16,71		258639	26,39	1,86		1,02	
	16,98	2	2323149	26,84	1,98		1,02	241957
	17,31		699038	27,38	2,29		1,02	205015
	17,42		204702	27,56	0,84		1,01	
	17,63		2529732	27,91	1,65	1,15	1,01	297903
	18,05		535785	28,58	2,79		1,02	186595
	18,54	3	2383629	29,39	2,91		1,03	186521
	19,02		342925	30,18	2,19		1,03	
	19,29		562483	30,62	1,20		1,01	120389
	19,54		297255	31,03	0,35		1,01	
	19,78		215554	31,43	0,32		1,01	
	21,81		721569	34,76	2,48		1,11	11362

2.3.7.4 Ergebnis der vollautomatischen Trennoptimierung eines bioaktiven Pilzextraktes

ChromSword[®]Auto konnte 10 Gradientenvorschläge generieren. Diese zeigen mit Ausnahme von LbeGV3, LbeGV5, LbeGV8 und LbeGV9 Retentionsfaktoren des letzten Peaks von k > 25. Eine Auflösung $R_s > 1,70$ zwischen den Peaks der Standards und unbekannten Extrakt-Peaks zeigen nur LbeGV4, LbeGV7 und LbeGV8. Die Auflösung des letzten Extrakt-Peaks zum Vorherigen ist bei allen Vorschlägen $R_s > 1,70$.

Eine Auflösung von $R_s > 1,70$ zwischen den integrierten Peaks im Chromatogramm des jeweiligen Gradientenvorschlags würde bei einer optimalen Trennung (in Bezug auf die Auflösung) die

Anzahl der integrierten Peaks - 1 (1.Peak) = Anzahl der Peak-Paare mit einer Auflösung von $R_s > 1,70$

sein.

In Tabelle 2-29 werden die Anzahl der integrierten Peaks des jeweiligen Gradientenvorschlags und die Anzahl der Peak-Paare mit einer Auflösung von $R_s > 1,70$ aufgeführt (vgl. Tabelle 2-18 bis 2-28). Hieraus ist erkennbar, daß die Wahl immer ein Kompromiß zwischen Auflösung und Peakanzahl sein wird.

Tabelle 2-29	: Angegeben sind die Anzahl der integrierten Peaks des jeweiligen Gradienten-
	vorschlages und die Zahl der Peak-Paare mit einer Auflösung von R _s > 1,70
	(vgl. Tabelle 2-18 bis Tabelle 2-28).

Gradientenvorschlag	Anzahl der integrierten Peaks	Anzahl der Peak-Paare mit R _s > 1,70
LbeGV1 (Tabelle 2-18)	32	17
LbeGV2 (Tabelle 2-19)	38	12
LbeGV3 (Tabelle 2-20)	22	12
LbeGV4 (Tabelle 2-21)	24	18
LbeGV5 (Tabelle 2-22)	36	16
LbeGV6 (Tabelle 2-23)	27	13
LbeGV7 (Tabelle 2-24)	15	8
LbeGV8 (Tabelle 2-25)	27	19
LbeGV9 (Tabelle 2-26)	29	18
LbeGV10 (Tabelle 2-27)	18	12
LbeNACONA (Tabelle 2-28)	25	16

Eine hohe Anzahl an Peaks (< 30) wird mit dem linearen Gradienten LbeGV2 und mit dem Stufengradienten LbeGV1 und LbeGV5 erzielt.

Um die Gradientenvorschläge der ChromSword[®]-Software mit dem Standardgradienten der EVOscreen[®]NACONA zu vergleichen, wurde diese Chromatographie (LbeNACONA1) ebenfalls durchgeführt. Dies sollte Auskunft über einen möglichen Transfer einer der ChromSword[®]-Methoden auf das NACONA-System (Säule 2) geben.

Das Chromatogramm des Standardgradienten der EVOscreen[®]NACONA zeigt einen Retentionsfaktor des letzten Peaks k > 25 und eine Auflösung der Standard-Peaks von $R_s > 1,70$. Die von ChromSword[®]Auto generierten linearen Gradienten LbeGV2, LbeGV4, LbeGV6, LbeGV8 sind mit dem Standardgradienten der EVOscreen[®]NACONA in Bezug auf Peak-Reihenfolge und Anzahl vergleichbar. Anhand der Injektion des Extrakts ohne Standards ist ersichtlich, daß bei der gewählten Wellenlänge eine Separation der Standard-Peaks von denen des Extraktes gelungen ist.

Dies zeigt, daß die ChromSword[®]-Software in der Lage ist die Trennoptimierung von Naturstoffstandards, mit "Verunreinigungen" in Form eines Extrakts durchzuführen und somit für die Methodenentwicklung von komplex zusammengesetzten Extrakten genutzt werden kann.

Im Gegensatz zu der Trennoptimierung der Cumarin-Standards (siehe Kapitel 2.3.4.1) ist die Integration der Extrakt-Peaks über die Grundeinstellungen von ChromSword[®]Auto nicht als ausreichend anzusehen. Ein Anstieg der Basislinie sorgt hier für höhere Flächenwerte, da die Integrationsparameter nicht automatisch angepaßt werden. Durch die Verschiebungen der Peaks und unvorhergesehene Coelutionen wurde die hierfür verwendete empirische Trennoptimierung (Kapitel 2.3.2.2) der Extraktkomponenten behindert. Dies ist auch der Grund dafür, warum eine weitere virtuelle Optimierung nicht möglich ist.

2.3.8 Diskussion und Ausblick der computergestützten HPLC-Trennoptimierung

Die vollautomatische Trennoptimierung ist in der Lage bei komplexen Mischungen eine Einsparung an Zeit zu erbringen, da diese unbeaufsichtigt über Nacht und am Wochenende durchgeführt werden kann. Die Optimierungsvorschläge sind als Grundlage für weitere chromatographische Versuche nutzbar, um unter Verwendung der Säulendatenbank und der virtuellen Trennoptimierung die gewünschten Ergebnisse zu erzielen. Zudem läßt sich innerhalb von wenigen Minuten unter Nutzung von vorher experimentell ermittelten Daten ein Methodenvorschlag für die gewünschten Parameter generieren. Die teilweise langen Analysenzeiten der von ChromSword[®]Auto erzeugten Vorschläge sind auf die Säulendimensionen (250 x 2 mm) und die damit verbundenen geringen Flußraten (0,25 ml/min) zurückzuführen. Eine kürzere Säule mit identischem Säulenmaterial und Durchmesser könnte schnellere Ergebnisse im vollautomatischen Betrieb liefern.

Hier ist eine Abwägung im Hinblick auf die Kenngrößen (Auflösung und Retentionsfaktor; siehe Kapitel 2.3) erforderlich.

Für eine vollautomatische On-Line-Trennoptimierung im HTS, mit der EVOscreen[®]NACONA, ist ChromSword[®]Auto auf Grund der langen Analysenzeiten (62,3 Stunden siehe Kaptitel 2.3.4.2) nicht nutzbar. Hier ist allenfalls eine Beteiligung von ChromSword[®]Auto bei der Anpassung von Methoden denkbar, um schnell auf neue Bedingungen (z.B. Säurezusatz, Wechsel von Laufmittel und Säulenmaterial) reagieren zu können. Obwohl z. Zt. noch eine Beschränkung der EVOscreen[®]NACONA auf das vorgegebene Zeitfenster von 20 min besteht, ist eine Optimierung auf maximale Peakanzahl trotz der Teilweise langen Analysenzeiten von ChromSword[®]Auto wertvoll. Die Chromatographie eines Extraktes mit einer Laufzeit von 40 min könnte z.B. in zwei Läufe aufgeteilt werden, etwa von z. B. 0 bis 20 min und anschließend von 20 bis 40 min. Hierbei würde, unter Ausblendung der ersten 20 min eine erneute Injektion stattfinden.

Der Einsatz von ChromSword[®]Auto könnte bei der Präoptimierung von Extrakttrennungen und für den Transfer auf die EVOscreen[®]NACONA eingesetzt werden. So wäre die vollautomatische Trennoptimierung eines unbekannten Extraktes auf eine maximale Peakanzahl möglich, um anschließend diese Methode für die HPLC-Trennung der NACONA-Einheit einzusetzen.

Die automatische Trennoptimierung auf eine maximale Peakanzahl ist generell immer dann von Bedeutung, wenn es darauf ankommt, möglichst "saubere" - d.h. nicht überlagerte - HPLC-Peaks zu erhalten.

Dies ist einerseits der Fall bei HPLC-"On-line"-Kopplungen mit spektroskopischen Methoden (HPLC/MS, HPLC/NMR) und zum anderen bei präparativen Fragestellungen, wo ChromSword[®]Auto bereits im Vorfeld sehr wichtige Informationen darüber liefern kann, ob und ggf. unter welchen Bedingungen eine angestrebte Peakisolierung möglich ist (man beachte in diesem Zusammenhang auch, daß präparative HPLC-Säulen in der Anschaffung sehr teuer sind!).

Eine Schwachstelle (und potentielle Fehlerquelle) von ChromSword[®]Auto liegt sicher in der korrekten Peakzuordnung anhand der Peakflächen und Retentionszeiten, speziell im Fall von Mehrkomponentenmischungen mit zum Teil auftretenden Überlagerungen bzw. erneuter Separierung einzelner Peaks bzw. Peakgruppen. In solchen Fällen könnte die Einbeziehung der DAD-Spektren während der Trennoptimierung einen Spektrenvergleich, zumindest bei bekannten Substanzen, über eine Spektrendatenbank ermöglichen und so zu einer zuverlässigeren Peakzuordnung führen. Ebenso wäre die Integration massenspektrometrischer Daten bei der Optimierung von Vorteil, da so eine Unterscheidung der Substanzen während der Chromatographie über die Massenspektren möglich wäre. Diese Erweiterung würde hohe Anforderungen an die Rechenleistung und Speicherkapazität des Computers stellen, da dieser die gesamten erzeugten Daten mit mehreren Datenbanken (MS, DAD) abgleichen und mit den chromatographischen Datensätzen verknüpfen müßte. Für Standard-Mischungen wäre dies eher durchführbar als bei komplex zusammengesetzten Extrakten, da hier eine verläßliche Auswertung und Zuordnung der MS- und DAD-Daten durch oft auftretende Peaküberlappungen bzw. unvollständige Peakauftrennungen Probleme bereiten kann.

Für bekannte Standardsubstanzen und Extrakte mit bekannten Komponenten ist eine virtuelle oder empirische Methodenentwicklung möglich. Die hier gewonnenen Daten der Einzelkomponenten können dann für die Optimierung des Gesamtextrakts genutzt werden [44].

3. Massenspektrometrische Untersuchungen

Seit der Entdeckung der Massenspektrometrie im Jahre 1910 durch Thomson, fanden die massenspektrometrischen Techniken immer weitere Verbreitung. Insbesondere die Kopplung mit chromatographischen Systemen entwickelten sich zu einem analytischen Instrumentarium von außerordentlicher Bedeutung. Der Durchbruch der kommerziellen Verfügbarkeit für On-Line-Kopplungen von GC/MS-Systemen gelang in den siebziger Jahren. Die LC/MS-Kopplung hatte, im Gegensatz zur GC/MS mit ungleich schwierigeren Problemen zu kämpfen.

Das für die Messung notwendige Hochvakuum konnte durch die geringen Trägergasströme im GC/MS leicht durch die Vakuumpumpen der Massenspektrometer aufrecht erhalten werden. Dieses Hochvakuum konnte in der LC/MS-Kopplung bei Flußraten von 1 ml/min, von den Vakuumpumpen der Massenspektrometer nicht bewältigt werden, da beim Übergang von der flüssigen Phase in die Gasphase ein um mehrere Zehnerpotenzen höheres Volumen entsteht. Hinzu kam, daß die Analyten in der GC/MS-Kopplung flüchtig sind, während in der LC/MS überwiegend Moleküle untersucht werden die thermolabil sind oder auf Grund ihrer Größe nicht unzersetzt verdampfbar sind und somit der Ionisierung mit Standardtechniken nicht zugänglich waren.

Die Entwicklung weiterer HPLC/MS-Kopplungs-Techniken (Moving belt, Thermospray) am Anfang der achtziger Jahre führte neben dem Particle Beam-Interface zu den heute weitverbreiteten Atmospheric-Pressure-Ionisations (API)-Techniken.

Die Entwicklung der Atmospheric-Pressure-Ionisation hob die Beschränkungen in Bezug auf die Flüchtigkeit und thermische Stabilität der Substanzen weitgehend auf und konnte die MS-Kopplung einer breiteren Anwendung zugänglich machen. In der Naturstoffanalytik ist die LC/MS eine fast universell verwendbare Technik. Durch die gute Empfindlichkeit und Selektivität der MS ist man in der Lage, auch aus komplexen Mischungen das Molekulargewicht und strukturelle Informationen der Substanzen zu erhalten. Die Massenspektrometrie bleibt meist die einzige Technik, mit den Substanzen, die nur in geringen Mengen im Extrakt vorliegen, ohne vorherige Isolierung vermessen werden können, d.h. es können Strukturinformationen von diesen Komponenten erhalten werden. Insbesondere bei der Identifizierung von unbekannten Substanzen sind EI-Spektren, mit der Möglichkeit des elektronischen Datenbankvergleichs am besten geeignet. Da dieser Ionisierung nicht alle Substanzen zugänglich sind, können ESI-, APCI- oder MSⁿ-Experimente weitere nützliche Daten liefern. Die angestrebte massenspektrometrische Kopplung mit der EVOscreen[®]NACONA könnte bereits während der HPLC-Trennung massenspektrometrische Informationen über die chromatographierten und dem HTS zugeführten Extraktkomponenten liefern.

3.1 Instrumentelle Voraussetzung für die Massenspektrometrie

Eine Kopplung von chromatographischem System mit einem Massenspektrometer besteht grundsätzlich aus vier Aggregaten (Bild 3-1), diese werden in unterschiedlichen Ausführungen verwendet:



Bild 3-1: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers

• Interface Atmospheric Pressure (AP) Particle Beam (PB) Thermospray (TS) Direct Liquid Introduction (DLI)

• Analysator Sektorfeld Quadrupol Time-of-Flight (TOF) Ionenfalle Ionenquelle
 Elektrospray Ionisation (ESI)
 Atmospheric Pressure Chemical
 Ionisation (APCI)
 Elektron Impact Ionisation (EI)
 Chemical Ionisation (CI)
 Fast Atom Bombardment (FAB)
 Thermospray Ionisation (TSI)

• Detektor Electron Multiplier

Im Weiteren werden nur die für diese Arbeit genutzten Aggregate näher beschrieben (siehe 3.1.1). Angaben zu weiteren Systemkomponenten finden sich in Lit.[45, 46].

3.1.1 Interface und Ionenquelle

3.1.1.1 Off-Line-Technik

3.1.1.1.1 Direkt-Einlaß

Bei dem Direkt-Einlaß-MS wird die zuvor isolierte Probe in einen Metall- oder Glastiegel gegeben. Dieser wird am Ende einer beheizbaren Schubstange befestigt in die Ionenquelle vorgeschoben und langsam erhitzt bis die Probe verdampft ist.

Die Ionisierung der Moleküle erfolgt meist über die Elektronenstoßionisierung. Hierbei treffen die Moleküle senkrecht auf einen Elektronenstrahl (70 eV), wodurch positiv geladene Molekül-Ionen (Radikal-Kation) entstehen (Bild 3-6c, Seite 143). Der weitaus dominierende Prozeß ist dabei der Verlust von einem Elektron (Schema 3-1).

$$M + e^- \rightarrow M^{+\bullet} + 2 e^-$$
 Schema 3-1

3.1.1.2 On-Line-Techniken

Die einzelnen Aggregate der jeweiligen On-Line-Techniken sind eng miteinander verbunden, so daß die Beschreibung des Interfaces und der Ionenquelle zusammen erfolgt. Wie in Bild 3-2 zu sehen ist, kann die Erzeugung der Ionen auf unterschiedlichem Wege erfolgen. Allen gemeinsam ist das Verdampfen des Lösungs- bzw. Fließmittels, die Ionisierung der neutralen Moleküle und das Beseitigen des Lösungsmittels. Dies geschieht unter atmosphärischem Druck (AP) oder im Vakuum.


Bild 3-2: Kombinationen von Interface und Ionisationstechniken aus Lit.[20]

3.1.1.2.1 Electrospray-Ionisation (ESI)

Im Electrospray-Interface (Bild 3-3) werden die Ionen unter atmosphärischem Druck erzeugt. Der Eluent wird durch eine dünne Kapillare zur Ionenquelle befördert. An der Spitze der Kapillare kommt es durch Anlegen einer hohen Spannung (3 bis 8 kV) zur Ausbildung eines Flüssigkeitskonus, aus dem geladene Lösungsmitteltröpfchen entstehen.

Bei höheren Flußraten, wie sie bei der Kopplung mit der HPLC vorkommen, wird der Vorgang mit Stickstoff als Sprühgas (Nebulizer Gas) unterstützt. Unter Einwirkung von beheiztem Stickstoff, als sog. Drying Gas verdampfen neutrale Lösungsmittelmoleküle aus den Tröpfchen.

Wenn die Ladungsdichte bei der Verkleinerung der Tröpfchen die Oberflächenspannung übersteigt, wird das Rayleigh-Limit erreicht und es findet Tröpfchenverkleinerung durch Coulomb-Explosion statt. So wird eine große Anzahl kleiner geladener Tröpfchen gebildet (Bild 3-4).

138

Nach Entfernung der neutralen Lösungsmittelmoleküle geht die Ladung auf den Analyten (Quasi-Molekülionen [M+H]⁺) über oder der Analyt wird schon während der Verkleinerung der Tröpfchen herausgeschleudert (Schema 3-2).



Bild 3-3: Schema des ES-Interfaces und der Ionenbildung aus Lit.[47]

$$M + H_3O^+ \rightarrow [M + H]^+ + H_2O$$
 Schema 3-2



Bild 3-4: Schema der Ionenbildung aus Lit.[48]

Durch Veränderung der elektrostatischen Potentiale können auch negative Ionen (Schema 3-3) erzeugt werden.

$$MH_2 \rightarrow [MH]^- + H^+$$
 Schema 3-3

Häufig sind auch Addukte von Erdalkali-Ionen oder Wasser an der Bildung der Quasi-Molekülionen beteiligt (Schema 3-4 und Schema 3-5).

$$M + Na^{+} \rightarrow [M + Na]^{+}$$

$$M + K^{+} \rightarrow [M + K]^{+}$$
Schema 3-4
Schema 3-5

Ebenso können Multimere des Moleküls $[nM + H, K, Na]^+$, Wasseraddukte $[M + H + nH_2O]^+$ und Mehrfachaddukte $[M + nH, K, Na]^{n+}$ gebildet werden.

Es ist zu beachten, daß die Elektrospray-Ionisierung eine der schonendsten Ionisationsverfahren (keine thermische Belastung) darstellt und insbesondere für thermolabile Verbindungen geeignet ist.

Dieses Interface kann praktisch bei allen Analysatoren eingesetzt werden. Mit ihm können sowohl kleine als auch große Moleküle nahezu aller Substanzklassen untersucht werden. Da es beim normalen ESI-Experiment häufig nur zu wenigen Fragmentierungen der Moleküle kommt, wird bevorzugt die Molekülmasse detektiert.

Eine Datenbanksuche, wie sie in der EI(MS) durchgeführt werden kann, ist nicht möglich, da keine entsprechenden kommerziellen Datenbanken existieren. Bei der Erstellung eigener Bibliotheken ist die starke Abhängigkeit der ESI-Spektren von verschiedenen Aufnahmeparametern zu beachten.

Nähere Strukturinformationen erfordern MSⁿ-Experimente und/oder Hochauflösungsmessungen zur Determinierung der Summenformel.

3.1.1.2.2 Atmospheric-Pressure-Chemical-Ionisation (APCI)

Wie die ESI findet die Ionisierung in der APCI ebenfalls unter Atmosphärendruck statt (Bild 3-5) und kann sowohl im positiven, als auch im negativen Modus betrieben werden. Hier wird das Sprühgas, das sich zwischen der Kapillare und dem Heizblock befindet, auf bis zu 500 °C erhitzt. Der Eluent und die Proben-Moleküle verdampfen während des Versprühens und die Discharge-Needle (2 bis 5 kV) ionisiert zunächst die Gase N₂, O₂ und H₂O. Die so gebildeten Ionen (N₂⁺, O₂⁺, H₂O⁺ im positiven Modus) übertragen ihre Ladung auf die Lösungsmittelmoleküle.



Bild 3-5: Schema des APCI-Interfaces aus Lit.[47] (S= Solvent; M=Analyt)

Diese Bildung der Ionen ist im Schema 3-6 bis 3-10 am Beispiel des Stickstoffs und Wassermoleküls beschrieben:

$$N_{2} + e^{-} \rightarrow N_{2}^{+\bullet} + 2 e^{-}$$
Schema 3-6

$$N_{2}^{+\bullet} + 2N_{2} \rightarrow N_{4}^{+\bullet} + N_{2}$$
Schema 3-7

$$N_{4}^{+\bullet} + H_{2}O \rightarrow H_{2}O^{+\bullet} + 2N_{2}$$
Schema 3-7a

$$H_{2}O^{+\bullet} + H_{2}O \rightarrow H_{3}O^{+} + OH^{\bullet}$$
Schema 3-8

Bestimmte Ionenspezies wie z.B. gebildete Hydroxonium-Ionen geben schließlich ihre Ladung unter Bildung von Quasi-Molekülionen $[M+H]^+$ an die neutralen Moleküle ab bzw. lagern sich an diese an (Adduktion-Bildung).

$$H_{3}O^{+} + M \rightarrow [M + H]^{+} + H_{2}O$$

$$H_{3}O^{+} + M \rightarrow [M + H_{3}O]^{+}$$
Schema 3-10

Dieses Interface ist, so wie das ESI-Interface, für nahezu alle Substanzklassen und Analysatoren geeignet; setzt die Substanzen allerdings stärkerer Temperaturbelastung aus. Eine Bestimmung von Molekülen mit $M_r > 2000$ ist nicht möglich. Auch bei der APCI kommt es nur zu wenigen Fragmentierungen der Moleküle. Eine elektronische Datenbanksuche wie sie mit EI-Spektren durchgeführt werden kann, ist auch hier nicht möglich (es fehlen entsprechende APCI-Spektrenbibliotheken). Zusätzliche Strukturinformationen lassen sich mit MSⁿ-Experimenten und/oder Hochauflösungsmessungen erhalten.

3.1.1.2.3 Particle Beam (PB)

Hier gibt es verschiedene Interface-Typen. Wir wollen uns hier auf das Thermabeam-Interface konzentrieren, an dem die Messungen von mir durchgeführt wurden. Das Thermabeam-Interface (Bild 3-6a) arbeitet unter leicht reduziertem Atmosphärendruck. Ähnlich wie beim APCI strömt zwischen der Kapillare (Fused Silica Capillary) und dem beheizbaren Metallmantel (Nebulizer) ein Sprühgas (Bild 3-6b). Der Eluent wird mit Hilfe des Sprühgases (Helium) in die beheizbare Expansion Region gesprüht, wo die Evaporation stattfindet. Die neutralen Lösungsmitteltropfen werden unter Einfluß der Temperatur verdampft. In den nächsten beiden Stufen (Two-stage Momentum separation) wird unter Verminderung des Druckes das gasförmige Laufmittel und das Helium entzogen. Die vom Lösungsmittel befreiten Substanzpartikel gelangen in die Ionenquelle. Hier werden die Substanzpartikel verdampft und anschließend durch EI (70 eV) ionisiert (Bild 3-6c).

Das PB-Interface liegt bezüglich seines Anwendungsbereiches etwa im Bereich von EI und APCI und ist für Moleküle mit $M_r < 1000$ geeignet (Bild 3-7). Nach der Elektronenstoß-Ionisierung der Moleküle erfolgt die Fragmentierung der Molekülionen und man erhält den klassischen EI-Spektren vergleichbare Spektren, die somit über Spektrenvergleiche in einschlägigen kommerziellen Bibliotheken (Wiley, NIST etc.) identifizierbar sind. Ionisierung mittels Chemischer Ionisierung (CI) und Fast Atom Bombardment (FAB) sind mit diesem Interface ebenfalls durchführbar. Als Analysatoren finden Quadrupole und Sektorfelder Anwendung.



Bild 3-6: Schema des PB-Interfaces (Thermabeam (**a**)) des Nebulizers (**b**) und der Ionenquelle (**c**) aus Lit.[46, 49]

3.1.1.2.4 Direct Liquid Introduction/MS (DLI/MS)

Dies ist eine vereinfachte Form der LC/MS-Kopplung. Mit Hilfe einer Spritzenpumpe wird die zuvor isolierte Probenkomponente gelöst und langsam in das Interface gespritzt. Eine HPLC-Kopplung ist hier ebenso möglich. Bei Einzelstandards, die keiner Chromatographie bedürfen, kann daher eine Spritzenpumpe verwendet werden. Hier kann jedes Interface mit den jeweiligen Beschränkungen verwendet werden.

Welche Bereiche für das jeweilige Interface in Abhängigkeit vom chromatographischen System, der Polarität, dem Molekulargewicht und der Flüchtigkeit der Substanzen Verwendung finden, zeigt Bild 3-7.



Bild 3-7: Interface in Bezug auf das chromatographische System und die Substanzeigenschaften aus Lit.[50]

3.1.2 Analysator und Detektor

Alle Analysatoren bestimmen das Masse-zu-Ladungsverhältnis (m/z) der im Interface generierten Ionen. Hierzu werden die Ionen im Vakuum in den gasförmigen Aggregatzustand überführt und über den Analysator zum Detektor weitergeleitet. Die für meine Untersuchungen benutzten Analysatoren waren der Quadrupol, das Sektorfeld und die Ionenfalle (Trap). Tabelle 3-1 zeigt einen Vergleich der Eigenschaften und experimentellen Möglichkeiten der verwendeten Massenspektrometer. Die Detektion der Ionen erfolgt mit einem Sekundärelektronen-Vervielfacher (SEV oder Electron Multiplier).

Tabelle 3-1: Vergleich der Eigenschaften und experimentellen	n Möglichkeiten
unterschiedlicher Massenspektrometer nach Lit.[20, 51]

	Analysator		
	Single Quadrupol	Ion trap	Sektorfeld
Empfindlichkeit	hoch	sehr hoch	hoch
Massenauflösung	niedrig	niedrig	hoch
Massenbereich	\leq 4000	≤2000	\leq 20.000
MS/MS-Fähigkeit	-	MS^n	MS/MS
Massenfeinbestimmung	nein	nein	ja
Interface	ESI, APCI, PB, TS	ESI, APCI,	ESI, APCI, PB, TS

3.2 HPLC/(PB)MS-Untersuchungen

Im Folgenden wird nur auf die Parametervariationen des Thermabeams als Bestandteil des Integrity-Systems (siehe Kapitel 6.7.1) der Firma Waters eingegangen. Die Variationsmöglichkeiten der anderen MS-Techniken finden sich in Lit.[20, 46].

Bisher existieren nur wenige Studien über massenspektrometrische Untersuchungen von Naturstoffen mittels der Particle Beam(PB)-Technik. Dies liegt an zwei starken Limitierungen, denen die PB-Methode unterworfen ist. Zum einen können nur Verbindungen mit einem Molekulargewicht unter 1000 Dalton analysiert werden, d.h. der Massenbereich ist sehr eingeschränkt; zum anderen sind polare Verbindungen entweder nur schwierig oder gar nicht zu vermessen. Sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe sind deshalb nur bedingt mittels HPLC/(PB)MS zu untersuchen.

Wie bereits erwähnt, ist die PB-Technik von großer Bedeutung, wenn es darum geht, möglichst schnell Strukturinformationen von einzelnen Komponenten gewonnener Pflanzen- oder Pilzextrakte zu erhalten, speziell, wenn einigen ihrer Komponenten im HPLC/HTS-Screening Bioaktivität zugeordnet werden konnte. Der Grund liegt darin, daß die PB-Spektren den "normalen" EI-Spektren gleichen, d.h. eine relativ starke Fragmentierung aufweisen. Aus dieser lassen sich einerseits strukturelle Informationen gewinnen, zum anderen sind diese Spektren auch mit denen entsprechender EI/MS-Datenbanken vergleichbar, d.h. sie können im Rahmen entsprechender Suchroutinen zuverlässig identifiziert werden.

Wegen der - gerade in Bezug auf das HTS von Naturstoffextrakten - großen Bedeutung der PB-Technik war es ein zentraler Aspekt meiner Arbeit, an Hand ausgewählter Beispiele die Eignung verschiedener Naturstoffgruppen bzw. Grundstrukturen für eine HPLC/(PB)MS-Analyse zu untersuchen. In diesem Zusammenhang war es außerdem wichtig, den Einfluß verschiedener Parameter des Interfaces (Nebulizer, Expansion Region) sowie der Ionenquelle auf das Meßergebnis bzw. den Spektrenhabitus zu studieren (vgl. dazu auch Lit.[52]).

3.2.1 Einfluß der mobilen Phase

Der Wassergehalt hat einen großen Einfluß auf die Intensität des Totalionenstromsignals. Laufmittelkombinationen mit hohem organischen Anteil (Acetonitril, Methanol) liefern höhere Intensitäten im Vergleich zu Laufmitteln mit niedrigeren organischen Anteil. Ebenso kann durch den Zusatz von flüchtigen Salzen eine Erhöhung der Signalintensität erzielt werden. Bei der Verwendung von reinem Wasser im Vergleich zu Acetonitril oder Methanol kann, je nach Substanz ein Verlust an Signalintensität von bis zu 75% verzeichnet werden (Bild 3-8). Dies ist für die Messung aktiver Extraktkomponenten von geringer Konzentration von Bedeutung.



Bild 3-8: Signalintensitäten (Furosemid, Spectinomycin, Methylenblau) in Abhängigkeit vom organischen Laufmittelanteil aus Lit.[46]

3.2.2 Flußrate, Temperatur des Nebulizers und der Expansion Region

Die Temperatur des Nebulizers in Abhängigkeit von der Flußrate hat Einfluß auf die gebildeten Tröpfchen und damit auf die Intensität der Signale. Ist die Nebulizer Temperatur zu hoch eingestellt, kann es zur Zerstörung des Moleküls kommen oder leichter flüchtige Substanzen verdampfen und werden im Vakuum abgesaugt. Ist die Temperatur des Nebulizers zu niedrig eingestellt, kann eine homogene Bildung der Tröpfchen nicht erfolgen und es kommt zu instabilen Signalen. Je nach Flußrate und Einstellungen des Nebulizers (s. Kapitel 3.2.3) kann die Nachweis- und die Bestimmungsgrenze von Substanzen erniedrigt werden [46]. Die Temperatur der Expansion Region beeinflußt die Entfernung des Laufmittels und sollte entsprechend dem Wassergehalt des Laufmittels angepaßt werden, da nicht vollständig entferntes Laufmittel den Transport des Analyten zur Ionenquelle und damit eine Detektion verhindert. Standardeinstellungen für Flußrate, Nebulizer und Expansion Region des Integrity-Systems sind in Tabelle 3-2 gezeigt.

ColumnID [mm]	LC Flow Rate [ml/min]	Fused Silica CapillaryID [µm]	Helium Flow Rate [L/min]	Nebulizer Temperature Range [°C]	Expansion Region Temperature [°C]
2.0	0.25 (Optimum)	51	0.3	70 to 90	75
2.0	0.20 to 0.30	51	0.3 to 0.4	70 to 90	80
3.0	0.40 to 0.60	58	0.4 to 0.7	80 to 100	80 to 100
3.9	0.80 to 1.00	75	1.2	100 to 130	110

Tabelle 3-2: Standardeinstellungen des Thermabeam-Systems aus Lit.[49]

Im Rahmen unseres Extrakt-Screenings war es notwendig, zu überprüfen, inwieweit die Temperatur von Nebulizer, Expansion Region und Ionenquelle die Signalintensität des TIC's (Totalionenstrom Chromatogramm) von Naturstoffen beeinflußt.

Dies wurde von uns mit dem Herzglykosid Digoxin (aus Digitalis lanata) als Testsubstanz durchgeführt, da derartige polare Komponenten ohnehin schon problematische Komponenten für Particle-Beam-Messungen darstellen, d.h. es wurden bewußt ungünstige Bedingungen gewählt.

Die Werte der Signalintensitäten sind in Tabelle 3-3 aufgeführt. Die Bilder 3-9 bzw. 3-10 zeigen das stärkste bzw. schwächste TIC-Signal des Digoxins.

Temperatur [°C] von Nebulizer / Expansion Region / Ionenquelle	Signalintensität
65 / 75 / 250	1.754.185
75 / 75 / 250	824.736
75 / 85 / 250	663.723
75 / 95 / 250	590.899
85 / 85 / 250	472.891
85 / 95 / 250	513.040
95 / 75 / 250	323.802
95 / 85 / 250	478.362
95 / 95 / 250	408.072

Tabelle 3-3: Einfluß der Temperatur von Nebulizer/Expansion Region/Ionenquelle auf die Intensitäten TIC-Signals von Digoxin



Bild 3-9: TIC des Digoxins (Nebulizer: 65 °C / Expansion Region: 75 °C / Ionenquelle: 250 °C); Signalintensität: 1.754.185



Bild 3-10: TIC des Digoxins (Nebulizer: 95 °C / Expansion Region: 95 °C / Ionenquelle: 250 °C); Signalintensität: 408.072

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Die höchste Intensität (Bild 3-9) des TIC-Signals von Digitoxin wurde bei niedriger Temperatur des Nebulizers erzielt (Nebulizer: 65 °C) bei gleichzeitig niedriger Temperatur der Expansion Region (75 °C). Bereits eine Erhöhung der Nebulizer-Temperatur um 10 °C (auf 75 °C), bei gleichbleibender Expansion Region-Temperatur (75 °C), führt zu einer drastischen Reduktion des TIC-Signals um 47 %, die sich mit weiterer Erhöhung der Temperatur der Expansion Region (auf 85 °C) bzw. 95 °C) weiter sukzessive fortsetzt (vgl. Tabelle 3-3).

Eine weitere Steigerung der Nebulizer-Temperatur (auf 85 °C bzw. 95 °C) führte zwar zu einer weiteren Verringerung des TIC-Signals, allerdings sind die Sprünge hierbei nicht mehr so stark. Auch kam es im Verlaufe der zusätzlichen Erhöhung der Temperatur der Expansion Region (auf 85 bzw. 95 °C) zu einer Signalsteigerung (vgl. Tabelle 3-3); so registrierten wir die geringste Intensität des TIC-Signals (Bild 3-10) des Digoxins bei einer Temperatur der Expansion Region von nur 75 °C (Nebulizer: 95 °C). Allerdings war diese Tendenz nicht einheitlich; z.T. wurde nach Erhöhung der Expansion Region-Temperatur eine Signalsenkung beobachtet (vgl. Tabelle 3-3).

Diese Daten sind nicht sicher erklärbar und substanzabhängig.

 Vergleicht man die beiden Extremwerte der erhaltenen Signalintensitäten, so läßt sich ein Unterschied von 75 % erkennen (vgl. Bild 3-10). Dies verdeutlicht den starken Einfluß der beiden Parameter Nebulizer-/Expansion Region-Temperatur auf das Ergebnis der Particle Beam-Messung

3.2.3 Temperatur der Ionenquelle

Bei dem Thermabeam-Interface werden die Substanzpartikel durch hohe Temperaturen in der Ionenquelle verdampft. Hohe Temperaturen erbringen eine erhöhte Signalintensität. Dies kann wiederum zur Zerstörung des Moleküls führen und die Detektion verschlechtern. Solch ein Verhalten wird z.B. im GC/MS-Betrieb bei einer Reihe von Monoterpenkohlenwasserstoffen ($C_{10}H_{16}$) beobachtet, die in EI-Quellen unter diesen Bedingungen leicht zum aromatischen p-Cymen ($C_{10}H_{14}$) dehydrieren. Andererseits kann eine zu niedrige Temperatur zur Ablagerung von Substanzpartikeln an der Ionenquellenwandung führen. Hier ist dann mit einer Substanzverschleppung in die nachfolgenden Messungen zu rechnen. Daher wurde die Ionenquellen-Temperatur in den folgenden Versuchen auf 250 °C eingestellt.

3.3 Wiley-Datenbank

In der Wiley-Datenbank⁵ sind rund 230.000 Spektren von über 200.000 unterschiedlichen Substanzen enthalten. Da es sich bei den Datenbankspektren um EI-Spektren (erzeugt mittels GC/MS bzw. Direkteinlaß) handelt, können die PB(EI)-Spektren über einen Suchalgorithmus (hier PBM = Probability Based Matching System Lit.[53]) mit diesen konventionellen EI-Spektren verglichen werden.

Dieser Sachverhalt macht somit die HPLC/(PB)MS-Technik für die Analyse von Naturstoffextrakten unbekannter Zusammensetzung so attraktiv.

Das Fehlen systematischer Untersuchungen zu dieser Thematik machte es erforderlich, zahlreiche Naturstoffstandards (meist kommerziell erhältliche Reinsubstanzen) aus verschiedenen Sekundärstoffklassen in Bezug auf ihr Verhalten (z.T. unter variierenden Bedingungen) bei einer HPLC/(PB)MS-Analyse zu untersuchen.

Zunächst wurde das Vorhandensein der entsprechenden Massenspektren der Naturstoffstandards in der Wiley-Datenbank überprüft (Tabelle 3-4).

Bei glykosidischen Standards wurde das Vorliegen der zugehörigen Aglykone kontrolliert (Tabelle 3-5).

Naturstoffstandard	Wiley-Datenbank
1,8-Dihydroxyanthrachinon	+
4-Hydroxycumarin	+
6-Methylcumarin	+
7-Methylcumarin	+
Esculetindibenzylether	+
Aloe-Emodin	+
+ : vorhanden	- : nicht vorhanden

Tabelle 3-4: In der Wiley-Datenbank enthaltene Massenspektren der verwendeten nicht-glykosidischen Naturstoffstandards

⁵ 6th Edition Version 3.10d

Fortsetzung Tabelle 3-4

Naturstoffstandard	Wiley-Datenbank
Apigenin	+
Chrysin	+
Chrysophanol	+
Cumarin	+
Daphnetin	+
Dihydrocumarin	+
Dihydrofisetin	-
Dihydroquercetin	+
Dihydrorobinetin	-
Emodin	+
Esculetin	+
Fisetin	-
Flavon	+
Genistein	+
Hesperetin	-
Homoeriodictyol	-
Imperatorin	+
Kämpferol	+
Khellin	+
Luteolin	+
Myricetin	-
Naringenin	+
Quercetin	+
Rhein	+
Sinensetin	-
Umbelliferon	+
Visnadin	-
Visnagin	+
Xanthotoxin	+

+ : vorhanden - : nicht

- : nicht vorhanden

Naturstoffstandard Glykoside	Wiley- Datenbank	Aglykon	Wiley- Datenbank
Aloin	+	-	-
Apiin	-	Apigenin	+
Convallatoxin	-	Convallatoxigenin	+
Digitoxin	+	Digitoxigenin	+
Digoxin	+	Digoxigenin	+
Esculin	+	Esculetin	+
Frangulin A	-	Emodin	+
Gitoxin	-	Gitoxigenin	-
g-Strophanthin	-	Ouabagenin	+
Hyperosid	-	Quercetin	+
Isorhoifolin	+	Apigenin	+
Naringin	-	Naringenin	+
Neohesperidin	-	Hesperetin	-
Robinin	-	Kämpferol	+
Rutin	-	Quercetin	+
Sennosid A	-	Sennidin	-

Tabelle 3-5: Verwendete glykosidische Naturstoffstandards und ihre Aglykone in der Wiley Datenbank

+ : vorhanden

- : nicht vorhanden

Für die weiteren PB-Untersuchungen fanden nur solche Verbindungen Berücksichtigung, die sich anhand einer automatischen Datenbankrecherche über die Wiley-Bibliothek identifizieren ließen.

Für die Glykoside Digoxin, Digitoxin, Esculin und Isorhoifolin sind Vergleichsspektren in der Wiley-Datenbank vorhanden. Eine Identifizierung ist also prinzipiell möglich, wenn auch nicht sehr wahrscheinlich, da im Particle Beam häufig nur die Aglykone detektiert werden. Entsprechend könnte hier eine Identifizierung über das Vergleichsspektrum des Aglykons erfolgen. Diese Möglichkeit besteht bei den Glykosiden Aloin, Gitoxin, g-Strophanthin und Neohesperidin nicht, da deren Aglykonspektren nicht in der Datenbank enthalten sind (vgl. Tabelle 3-5). Für die Naturstoffstandards Dihydrorobinetin, Dihydrofisetin, Fisetin, Hesperetin, Homoeriodictyol, Myricetin, Neohesperidin, Sennosid A, Sinensetin und Visnadin sind keine Vergleichsspektren in der Wiley-Datenbank vorhanden; sie können somit nicht über diese identifiziert werden (vgl. Tabelle 3-4). Obwohl die Spektren dieser Substanzen qualitativ gut waren, wurden sie deshalb bei der weiteren Betrachtung nicht berücksichtigt.

3.4 Massenspektrometrische Particle Beam-Untersuchungen ausgewählter Naturstoffstandards

Bei den durchgeführten HPLC/MS-Versuchen wurde für die Chromatographie, wie in den Vorversuchen (Kapitel 2.3.3.1), eine Säule mit RP-Material unter isokratischen Bedingungen verwendet (siehe Kapitel 6.7.1). Im ersten Arbeitsschritt untersuchten wir die in Kapitel 2 aufgeführten Naturstoffstandards (vgl. Kapitel 3.3, Tabelle 3-4 und 3-5) mittels HPLC/(PB)MS, um festzustellen welche dieser Verbindungen sich überhaupt mit dem Particle-Beam-Verfahren analysieren bzw. messtechnisch erfassen läßt. Bei einer Übereinstimmung der generierten MS-Spektren mit den entsprechenden Spektren ("Full Spectra") der Wiley-Bibliothek von \geq 50 % "Match Quality" galt der Naturstoffstandard als identifiziert. Für die Untersuchungen wurden zunächst 5 µl der 0,01 %igen Standard-Lösung injiziert und unter den gewählten Startbedingungen (hier wurden zunächst die vom Gerätehersteller empfohlenen Systemeinstellungen übernommen; vgl. Kapitel 3.2.2, Tabelle 3-2) im Thermabeam vermessen. Von denjenigen Substanzen, von denen kein entsprechendes MS-Spektrum zu erhalten war, wurde unter gleichen Bedingungen das doppelte Volumen (10 µl) injiziert, um festzustellen, ob dieses negative Ergebnis eventuell auf eine zu geringe Substanzmenge zurückzuführen war. Diejenigen Naturstoffstandards, die bei 5 µl bzw. 10 µl Injektionsvolumen und den gewählten Startbedingungen des Thermabeam-Interfaces der Messung zugänglich waren, sind in Tabelle 3-6 beschrieben.

Das Bild 3-11 illustriert am Beispiel des PB-Spektrums des Apigenins, daß Spektren, die bei der Datenbankrecherche (PBM-Suchalgorithmus) nur eine "Match Quality" von etwa 50 - 60 % zeigen, visuell noch eine große Ähnlichkeit mit Spektren hoher "Hit Quality" (hier 96 %) aufweisen können.

Es wird auch deutlich, daß die erzielte "Hit Quality" - in gewissen Grenzen eine Funktion der absoluten Ionenintensitäten ist. So resultiert bei einem Spektrum mit einer Intensität des TIC-Peaks von lediglich 8.883 "Counts" nur eine "Match Quality" von 53 % während das entsprechende Top-Spektrum (Bild 3-11) desselben TIC-Peaks (Intensity: 272.372 "Counts") mit einer "Match Quality" von 96 % im PBM-Search identifiziert wird. Dabei erscheinen die visuellen Unterschiede zwischen diesen beiden Spektren marginal.

Als Konsequenz ergibt sich, daß bei der HPLC/MS-Analyse komplexer Naturstoffextrakte bei der MS-Identifizierung anhand kommerzieller oder eigener elektronischer Datenbanken der "Hit-Level" (als Erfassungsgrenze) nicht zu hoch angesetzt werden darf (etwa \geq 50 %), um hier nicht Komponenten nur auf Grund geringer Konzentration auszuschließen.

Tabelle 3-6: Naturstoffstandard	s, die mittels der HPLC/(PB)MS-Technik bei Standard-
bedingungen analy	vsierbar waren.

	Nebulizer: 85 °C	Nebulizer: 85 °C
	Expansion Region: 75 °C	Expansion Region: 75 °C
	Ionenquelle: 200 °C	Ionenquelle: 200 °C
Naturstoffstandard	Injektionsvolumen: 5 µl	Injektionsvolumen: 10 μl
1,8-Dihydroxyanthrachinon	+	-
4-Hydroxycumarin	+	-
Esculetindibenzylether	+ (Aglykon: Esculetin)*	-
Esculin	-	+ (Aglykon: Esculetin*)
Aloe-Emodin	+	-
Apigenin	+	-
Chrysin	+	-
Chrysophanol	+	-
Daphnetin	+	-
Dihydrocumarin	+	-
Dihydroquercetin	+	-
Emodin	+	-
Esculetin	+	-
Flavon	+	-
Frangulin A	+ (Aglykon: Emodin*)	-
Genistein	+	-
Hyperosid	+ (Aglykon: Quercetin*)	-
Imperatorin	+	-
Kämpferol	+	-
Khellin	+	-
Luteolin	+	-
Naringenin	+	-
Quercetin	+	-
Rhein	+	-
Umbelliferon	+	-
Visnagin	+	-
Xanthotoxin	+	-

+ : Mit der Wiley-Datenbank vergleichbares Spektrum

- : keine weiteren Messungen

*: Massenspektrometrische Identifizierung des Spaltprodukts (meist Aglykon)



Bild 3-11: 1) TIC-Signal und 2) entsprechende Massenspektren der HPLC/(PB)MS-Analyse des Apigenins. Die Massenspektren sind an den Punkten a, b, c des TIC-Signals entnommen.
Die Spektren zeigen folgende Intensitäten (TIC-Peak) und "Match Quality" (PBM-Search,

Wiley Bibliothek): a) 8.883 (53 %) b) 272.372 (96 %), c) 8.063 (60 %). Spektrum d repräsentiert das Vergleichsspektrum (EI) des Apigenins aus der Wiley-Datenbank. In einem weiteren Arbeitsschritt wurden nun diejenigen Naturstoffstandards, deren MS-Spektrum weder bei 5 µl noch bei 10 µl Injektionsvolumen über die Wiley-Datenbank identifiziert werden konnten (s.o. "Match Quality" \geq 50 %), weiteren Messungen unterzogen, wobei die Temperatur des Nebulizers, der Expansion Region und der Ionenquelle variiert wurden. Ziel dieser Experimente war es, herauszufinden, unter welchen Bedingungen auswertbare, d.h. anhand der Wiley-Bibliothek sicher identifizierbare Particle-Beam-Spektren zu erhalten waren. Für die Auswertungen wurden nur die TIC-Peaks der Substanzen herangezogen deren Signalintensität \geq 50.000 war, da bei geringerer Intensität eine Interpretation der Massenspektren oft nur bedingt möglich gewesen ist und hierfür weitere Messungen zur Absicherung notwendig gewesen wären.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-6a bis 3-6d zusammengefaßt. Abschließend wurden zum Vergleich von ausgewählten, teilweise dem PB nicht zugänglichen Naturstoffkomponenten, weitere LC/MS-Experimente mit anderen Techniken durchgeführt (siehe Kapitel 3.5).

Tabelle 3-6a bis 3-6d: HPLC/(PB)MS-Messungen ausgewählter Naturstoffkomponenten unter verschiedenen experimentellen Bedingungen (Einzelheiten vgl. Text).

TIC: + : TIC-Peak nachweisbar

+ : erhaltenes Spektrum über Wiley-Datenbank identifizierbar

- : kein TIC-Peak, deshalb auch kein identifizierbares Spektrum über Wiley-Datenbank

*: Identifizierung über die Wiley-Datenbank negativ, aber partiell interpretierbares Spektrum nach Literaturdaten **: TIC-Peak schwach, Identifizierung über die Wiley-Datenbank negativ, Interpretation des Spektrums nur bedingt möglich

3-6a	Startbedingungen	Startbedingungen	
	Nebulizer: 85 °C	Nebulizer: 85 °C	Nebulizer: 65 °C
	Expansion Region: 75 °C	Expansion Region: 75 °C	Expansion Region: 75 °C
	Ionenquelle: 200 °C	Ionenquelle: 200 °C	Ionenquelle: 250 °C
Naturstoffstandard	Injektionsvolumen: 5 µl	Injektionsvolumen: 10 μl	Injektionsvolumen: 5 μl
6-Methylcumarin	-	•	ı
7-Methylcumarin	I	•	I
Apiin	I	* *	**
Convallatoxin	**	* / TIC: +	**
Cumarin	I	•	I
Digitoxin	* / TIC: +	* / TIC: +	* / TIC: +
Digoxin	* / TIC: +	* / TIC: +	* / TIC: +
Isorhoifolin	**	* *	**
Naringin	**	* *	**
Robinin	**	* *	**
Rutin	**	* *	**

Fortsetzung Tabelle 3-6a bis 3-6d: HPLC/(PB)MS-Messungen ausgewählter Naturstoffkomponenten unter verschiedenen experimentellen Bedingungen (Einzelheiten vgl. Text und Tabelle 3-6a).

3-6b	Nebulizer: 75 °C	Nebulizer: 75 °C	Nebulizer: 75 °C
	Expansion Region: 75 °C	Expansion Region: 85 °C	Expansion Region: 95 °C
	Ionenquelle: 250 °C	Ionenquelle: 250 °C	Ionenquelle: 250 °C
Naturstoffstandard	Injektionsvolumen: 5 µl	Injektionsvolumen: 5 µl	Injektionsvolumen: 5 μl
6-Methylcumarin	-	•	ı
7-Methylcumarin	I	I	I
Apiin	I	•	**
Convallatoxin	**	•	I
Cumarin	-	ſ	•
Digitoxin	* / TIC: +	* / TIC: +	* / TIC: +
Digoxin	* / TIC: +	* / TIC: +	* / TIC: +
Isorhoifolin	I	ſ	**
Naringin	I	**	**
Robinin	-	**	**
Rutin	I	I	**

162

Fortsetzung Tabelle 3-6a bis 3-6d: HPLC/(PB)MS-Messungen ausgewählter Naturstoffkomponenten unter verschiedenen experimentellen Bedingungen (Einzelheiten vgl. Text und Tabelle 3-6a).

Expansion Region: 75 °C Injektionsvolumen: 5 μl Ionenquelle: 250 °C Nebulizer: 95 °C * / TIC: + * / TIC: + * * ı ı I. ı. ı н **Expansion Region: 95 °C** Injektionsvolumen: 5 μl + (Aglykon: Naringenin) Ionenquelle: 250 °C Nebulizer: 85 °C * / TIC: + * / TIC: + * * * * * * * * * * ı I. I Expansion Region: 85 °C Injektionsvolumen: 5 µl Ionenquelle: 250 °C Nebulizer: 85 °C * / TIC: + * / TIC: + * * * * * * * * * * ı ı. ı ī Naturstoffstandard 7-Methylcumarin 6-Methylcumarin Convallatoxin Isorhoifolin Digitoxin Cumarin Digoxin Naringin Robinin Apiin Rutin **3-6c**

ı.

Fortsetzung Tabelle 3-6a bis 3-6d: HPLC/(PB)MS-Messungen ausgewählter Naturstoffkomponenten unter verschiedenen experimentellen Bedingungen (Einzelheiten vgl. Text und Tabelle 3-6a).

3-6d	Nebulizer: 95 °C	Nebulizer: 95 °C
	Expansion Region: 85 °C	Expansion Region: 95 °C
	Ionenquelle: 250 °C	Ionenquelle: 250 °C
Naturstoffstandard	Injektionsvolumen: 5 µl	Injektionsvolumen: 5 µl
6-Methylcumarin	-	-
7-Methylcumarin	-	-
Apiin	**	**
Convallatoxin	-	* / TIC: +
Cumarin	-	-
Digitoxin	* / TIC: +	* / TIC: +
Digoxin	* / TIC: +	* / TIC: +
Isorhoifolin	**	**
Naringin	+ (Aglykon: Naringenin)	+ (Aglykon: Naringenin)
Robinin	**	**
Rutin	**	**

3.4.1 Zusammenfassung der Particle Beam-Untersuchungen ausgewählter Naturstoffstandards

Die Ergebnisse der HPLC/(PB)MS-Messungen ausgewählter Naturstoff-Referenzsubstanzen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen (vgl. dazu Tabelle 3-6 und 3-6a bis 3-6d):

- Die nicht-glykosidischen Vertreter zahlreicher Naturstoffgruppen (M_r < 1000 Dalton) lassen sich erfolgreich unter Standardbedingungen (vom Gerätehersteller empfohlene Systemeinstellungen; s. Tabelle 3-2) mittels der PB-Technik analysieren, auch wenn sie verschiedene polare Gruppen enthalten. Bei nicht-glykosidischen Verbindungen war die Übereinstimmung der Particle-Beam-Spektren mit den entsprechenden konventionellen EI-Massenspektren einer kommerziellen Datenbank (Wiley) sehr hoch (Match Quality bis zu 97 %). Dies ist am Beispiel des Naringenins (ein Flavanon aus der Bitterorangenschale) in Bild 3-12 dargestellt. Diese hohe Übereinstimmung konnten wir auch zwischen HPLC/(PB)MS- und entsprechenden GC/(EI)MS-Spektren feststellen. Dies veranschaulicht Bild 3-14 am Beispiel des Anethols.
- Die Substanzen wurden von uns unter Standardbedingungen vermessen, wobei ein Injektionsvolumen von 5 µl einer 0,01 %igen Lösung (d.h. 0,5 µg der Komponente) zum Einsatz kam. Von denjenigen Substanzen, die sich der PB-Messung entzogen, nahm das Naphthodianthron Hypericin (in den Tabellen nicht aufgeführt) insofern eine Sonderstellung ein als von diesem weder ein TIC noch ein UV-Signal detektierbar war, d.h. diese Verbindung ließ sich mit unseren Fließmittelsystem (auch mit unterschiedlichen Gradienten) nicht von der HPLC-Säule eluieren. Alle anderen untersuchten Standardsubstanzen zeigten zumindest ein UV-Signal. Erwartungsgemäß war dies in Abhängigkeit von der Struktur der chromophoren Gruppe unterschiedlich stark ausgeprägt.



Bild 3-12: Vergleich des PB-MS-Spektrums (a) von Naringenin (Intensity 581.790; TIC vgl. Bild 3-13) mit dem entsprechenden EI-Spektrum der Wiley-Datenbank (b).
"Match Quality" im PBM-Search: 93 %



Bild 3-13: PB-TIC des Naringenins (Analysenbedingung siehe Tabelle 3-6; Injektionsvolumen 5 µl)

166



Bild 3-14: Vergleich der GC/(EI)MS- (a) der HPLC/(PB)MS- (b) Spektren des Anethols mit dem Spektrum der Wiley-Datenbank (c)

Von einigen Verbindungen (vgl. Tabelle 3-6 und 3-6a) waren unter den gewählten Bedingungen keine Massenspektren zu erhalten. Von den Lösungen dieser Substanzen wurde deshalb unter gleichen Bedingungen die doppelte Menge (10 μ l = 1 μ g Substanz) injiziert, um festzustellen, inwieweit dieses negative Ergebnis eventuell nur auf eine zu geringe Substanzmenge zurückzuführen war. Diese Vermutung konnte für das Esculin, ein Glykosid des 6,7-Dihydroxycumarin, bestätigt werden, dessen Aglykon bei dieser zweiten Messung ein gut identifizierbares Massenspektrum ergab (Tabelle 3-6). Substanzen, deren TIC-Signalintensität < 50.000 war, wurden auf Grund des schwachen Signals und der daraus resultierenden minderen Spektrenqualität nicht mit die in Auswertung einbezogen. Obwohl Auswertung dieser Spektren z.T. bedingt möglich war, wären hier weitere Untersuchungen zur Absicherung notwendig.

 Es muß als bemerkenswertes Ergebnis hervorgehoben werden, daß z.T. selbst Glykoside aus unterschiedlichen Naturstoffgruppen wie Esculin, Frangulin A und Hyperosid trotz des polaren Zuckeranteils durchaus mittels der Particle-Beam-Technik zu analysieren waren. Allerdings konnten dabei nur die Spektren der entsprechenden Aglykone registriert werden, d.h. offenbar werden die Glykoside im Bereich PB-Interface/Ionenquelle gespalten. Das gleiche Phänomen konnte auch bei anderen Substanzgruppen beobachtet werden, wie etwa dem Esculetindibenzylether. Man darf in diesem Zusammenhang sicher auch eine andere denkbare Möglichkeit nicht ganz ausschließen, nämlich daß eine Spaltung dieser Glykoside erst in der Ionenquelle unter Elektronenbeschuß auftritt (mit dem vollständigen Verbleib der Ladung auf dem Aglykon). Darauf könnte die bei den Herzglykosiden gemachten Beobachtungen hindeuten.

- Bei den Herzglykosiden Convallatoxin, Digitoxin und Digoxin konnten ein TIC-Peak und auswertbare Particle-Beam-Massenspektren erzeugt werden. Anders als bei anderen Glykosiden jedoch gelang mittels der PBM-Suche keine Identifizierung über die Wiley-Bibliothek, obwohl in dieser die EI-Spektren der entsprechenden Aglykone (Convallatoxigenin, Digitoxigenin und Digoxigenin) enthalten sind. Hierfür verantwortlich ist die Tatsache, daß z.B. die Moleküle des Digitoxins unzersetzt die PB-Ionenquelle erreichen und dort unter Elektronenbeschuß eine Fragmentierung initiiert wird, bei der intensive Ionen aus der Zuckerkette gebildet werden, die entsprechend den Habitus des Aglykonspektrums verändern (Einzelheiten vgl. 3.5.2.1).
- Wie bereits in Kapitel 3.2.2 beschrieben, konnte auch bei den hier untersuchten Naturstoffstandards in einigen wenigen Fällen eine deutliche Beeinflussung des Meßergebnisses durch eine Änderung von Nebulizer- und Expansion Region-Temperatur erzielt werden.

So ist beim Convallatoxin ein TIC-Signal und ein entsprechendes PB-Massenspektrum bei einer Nebulizer-Temperatur von 85 °C bzw. 95 °C zu beobachten (Tabelle 3-6c). Die bei diesem Experiment auf 75 °C abgesenkte Temperatur der Expansion Region zeigt, daß diese anders als beim Digoxin kaum Einfluß auf diesen Prozeß hat.

Die Tatsache, daß die anderen Herzglykoside, Digitoxin und Digoxin (bzw. ihre abgespaltenen Aglykone) bereits bei niedriger Temperatur des Nebulizer (85 °C) ein deutliches TIC-Signal sowie auswertbare Massenspektren zeigen, könnte folgendermaßen interpretiert werden: Das Aglykon des Convallatoxins, das Strophanthidin, ist deutlich polarer (vier O-haltige Substituenten) - und damit schwerer flüchtig als die entsprechenden Aglykone (Digitoxigenin und Digoxigenin) der beiden anderen Herzglykoside. Hier mag deshalb eine höhere Nebulizer-Temperatur für die Detektion des Analyten erforderlich sein.

Auf der anderen Seite konnte bei einem Vertreter der Flavonoide nachgewiesen werden, daß bei diesem das Meßergebnis maßgeblich durch die Temperatur der Expansion Region beeinflußt wird, während die Nebulizer-Temperatur nur eine untergeordnete Rolle spielt.

So registrierten wir beim Flavanon Naringin ein TIC-Signal (und ein entsprechendes Massenspektrum) nur, wenn die Temperatur der Expansion Region mindestens 95 °C betrug; gleichzeitig mußte der Nebulizer mindestens 85 °C heiß sein (vgl. Tabelle 3-6a bis 3-6d)

- Im Gegensatz zu den bisher diskutierten Fällen ließ sich jedoch bei einer Reihe von Flavonglykosiden auch durch Variation der Temperatur von Nebulizer und Expansion Region, mit Ausnahme von Robinin, kein oder nur ein schwaches TIC-Signal und damit auch nur ein bedingt interpretierbares Massenspektrum erzeugen. Es handelt sich um die Flavonoide Apiin, Isorhoifolin, Rutin. Offenbar werden diese Flavone nicht gespalten, d.h. es entstehen keine meßtechnisch erfaßbaren Aglykone.
- Die Ergebnisse der HPLC/(PB)MS-Messungen der Cumarine lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

Im Gegensatz zu den Hydroxycumarinen (4-Hydroxycumarin, Daphnetin, Esculin) wurden von den Cumarinen ohne OH-Funktion (Cumarin, 6-Methylcumarin, 7-Methylcumarin) keine TIC-Signale erhalten und damit auch keine Massenspektren.

Man könnte vermuten, daß die höhere Flüchtigkeit dieser Komponenten dafür verantwortlich ist.

Durch den Einfluß der Temperatur von Nebulizer und Expansion Region könnten diese, zusammen mit dem dampfförmigen Laufmittel und dem Spraygas, im Interface entfernt (abgesaugt) worden sein. Gegen diese Hypothese spricht jedoch die Detektion des Dihydrocumarins für das - im Gegensatz zum Cumarin - ein TIC-Signal und ein PB-Massenspektrum erhalten wurde, obwohl sein Siedepunkt ca. 30 °C unter dem des Cumarins liegt.

Insgesamt läßt sich diese Situation noch nicht zufriedenstellend erklären; hier sind weitere Messungen mit strukturell verwandten Verbindungen erforderlich.

3.5 Massenspektrometrische Untersuchungen ausgewählter Naturstoffstandards

Zur weiteren MS-Analyse ausgewählter Naturstoffstandards, die nicht mittels (PB)MS meßbar waren (bzw. deren Spektren nicht über die Wiley-Datenbank identifiziert werden konnten), wurden zusätzliche massenspektrometrische Techniken (siehe Kapitel 3.1.1) eingesetzt.

Ziel war es, herauszufinden, welche strukturellen Informationen sich mit welcher dieser Techniken über die einzelnen Vertreter verschiedener Naturstoffgruppen erhalten lassen. Von diesen alternativen MS-Ionisierungsund z.T. auch Einlaß-Techniken, können nur die mittels Direkteinlaß gewonnenen (EI)MS-Spektren "vollständige" Spektren liefern, d.h. fragmentreiche EI-Spektren, die als "Full Spectra" mit entsprechenden Datenbanken zu vergleichen waren.

Wir setzten Direkteinlaß/(EI)MS, HPLC/(ESI)MS, HPLC/(APCI)MS, und DLI/(ESI)MS/Sektorfeld/Trap für weitere Experimente ein. Dabei wurden zusätzlich Sennosid A und Visnadin ausgewählt. Diese beiden Substanzen sind nicht in der Wiley-Datenbank enthalten. Die verwendeten Naturstoffreferenz-substanzen und die jeweils durchgeführten Alternativmessungen sind in Tabelle 3-8 aufgeführt.

Von den Glykosiden werden im PB(MS) und Direkteinlaß/(EI)MS nur die Aglykone erfaßt. Daher wird bei der Auswertung der EI-Spektren nur auf diese eingegangen. Auf die EI-Direkteinlaß-Experimente der Glykoside wurde verzichtet, da wie im Particle Beam nicht mit einer Detektion des gesamten Moleküls zu rechnen war.

Tabelle 3-8: Die verwendeten Naturstoffreferenzsubstanzen und die durchgefü	hrten
Alternativmessungen	

Naturstoffreferenz- substanzen	HPLC/ (PB)MS	Direkteinlaß/ (EI)MS	DLI/(ESI)MS ⁿ (Sektorfeld/Trap)	HPLC/MS	
				(ESI)	(APCI)
Cumarin	+	+	-	+	+
Digitoxin (Herzglykosid)	+	-	+	+	+
Robinin (Flavonoid)	+	-	+	+	+
Sennosid B (Anthrachinon)	+	-	+	+	+
Visnadin (Pyranocumarin)	+	+	+	+	+

+ : durchgeführt

- : nicht durchgeführt
3.5.1 Massenspektrometrische Untersuchungen des Cumarins



3.5.1.1 HPLC/(PB)MS-Messungen

Das Cumarin war unter den gewählten Bedingungen dem Particle Beam nicht zugänglich (siehe Kapitel 3.4). Dies beruht vermutlich auf seiner geringen Molekülgröße und relativ hohen Flüchtigkeit.

3.5.1.2 Direkteinlaß/(EI)MS-Messungen

Im Direkteinlaß/MS(EI) wurden die charakteristischen Massen m/z 146 (C1), m/z 118 (C2), m/z 90 (C3) und m/z 89 (C4) detektiert (Schema 3-11).

Nach Einführung des Cumarins über den Direkteinlaß und Verdampfung wird durch Elektronenstoßionisation ein klassisches EI-Spektrum erhalten mit dem erwartet starken Molekülion bei m/z 146 (100 %).

Aus Mangel an anderen energetisch günstigen Bindungsspaltungen bestehen die dominierenden Fragmentierungsprozesse in einem zweimaligen Verlust des Neutralteilchens CO unter Bildung der Fragmente m/z 118 (54 %) und m/z 90 (17 %). Die anschließende Eliminierung eines H-Atoms läßt ein geradelektronisches Bruchstück der Massenzahl m/z 89 (14 %) entstehen:

Es sei in diesem Zusammenhang angemerkt, daß es Hinweise dafür gibt, daß das Radikal-Ion m/z 118 (C2) korrekter als offenkettige Struktur zu formulieren ist, denn als Benzofuran-System, dem häufig aus Plausibilitätsgründen der Vorzug gegeben wird [54].



Schema 3-11 aus Lit.[55]



Bild 3-15: Direkteinlaß-EI-Spektrum des Cumarins

3.5.1.3 HPLC/(ESI)MS- und HPLC/(APCI)MS-Messungen

Das (ESI)MS-Spektrum des Cumarins (Bild 3-16) zeigt das Quasimolekülion mit der Masse m/z 147 $[M + H]^+$. Zusätzlich sind die Massen m/z 165 $[M + H_2O + H]^+$ und m/z 169 $[M + Na]^+$ vorhanden. Das Ion m/z 186 (M⁺ + 40) ist nicht sicher zu interpretieren; eine rein numerisch denkbare Spezies $[M + K + H]^+$ ist als einfach geladenes Teilchen kaum erklärbar.

Die Ionen im höheren Massenbereich sind vermutlich auf Verunreinigungen im HPLC-System zurückzuführen.

Das (APCI)MS-Spektrum des Cumarins Bild 3-17) zeigt hingegen nur das Quasimolekülion mit der Masse m/z 147 $[M + H]^+$.

3.5.1.4 DLI/(ESI)MSⁿ-Messungen

Das DLI-MS-Experiment des Cumarins wurde auf Grund der geringen Molekülgröße nicht durchgeführt. Im Fall des Cumarins ist eine Detektion und Stabilisierung der Moleküle in der Trap nicht zu bewerkstelligen.

3.5.1.5 Zusammenfassung der massenspektrometrischen Untersuchungen des Cumarins

Das Cumarin konnte im Rahmen der HPLC/(PB)MS-Messung nicht erfaßt werden und war auch einer DLI/(ESI)MSⁿ-Analyse (Sektorfeld/Trap) nicht zugänglich. Im Direkteinlaß/(EI)MS zeigte das Spektrum die in Lit.[55] beschriebene Fragmentierung des Moleküls. Bei der HPLC/(ESI)MS-Analyse kam es zur Bildung der typischen Addukte mit Wasser und Natrium. Im ESI-Spektrum zeigten sich weitere Ionen, die vermutlich auf Verunreinigungen zurückzuführen sind.

Im HPLC/(APCI)MS wurde, im Gegensatz zum HPLC/(ESI)MS nur das [M+H]⁺-Ion detektiert. Der Messung in der Ionenfalle war das Cumarin nicht zugänglich.



Bild 3-16: ESI-Massenspektrum des Cumarins (Einzelheiten vgl. Text)



Bild 3-17: APCI-Massenspektrum des Cumarins (Einzelheiten vgl.Text)



3.5.2 Massenspektrometrische Untersuchungen des Digitoxins

3.5.2.1 HPLC/(PB)MS-Messungen

Bei der HPLC/(PB)MS-Analyse dieses Herzglykosids konnte ein TIC-Peak erzeugt werden und entsprechend standen auswertbare MS-Spektren zur Verfügung. In diesen Particle-Beam-Spektren treten nur relevante Ionen innerhalb des Massenbereichs des Aglykons (< m/z 374) auf. Im Gegensatz zu anderen Glykosiden (vgl. Kapitel 3.4) gelingt beim Digitoxin keine Identifizierung anhand seines Aglykonspektrums, obwohl das EI-Spektrum des Digitoxigenins in der Wiley-Datenbank enthalten ist. Das erhaltene PB-Spektrum des Digitoxins ist in Bild 3-19 und 3-20 dargestellt.

Im Unterschied zu den bisher untersuchten Glykosiden liegt beim Digitoxin eine Zuckerkette (aus drei Desoxy-Zuckern) im Molekül vor.

Dies dürfte ein wesentlicher Grund für die deutlichen Unterschiede zwischen dem PB-Spektrum des Digitoxins und dem EI-Spektrum seines Aglykons sein (vgl. Bild 3-19, 3-20 und 3-21).

Der Hauptgrund hierfür ist vermutlich die Tatsache, daß hier eine Kette aus 2-Desoxy-Zuckern vorliegt, die bedingt, daß die dominierende Spaltung hier nicht die glykosidische Bindung zum Aglykon (mit dem Verbleib der Ladung auf dem Aglykon) betrifft, dessen Fragmente dann das Spektrum beherrschen.

In diesem Falle wird das Spektrum vielmehr durch Fragmente dominiert, die aus der Desoxy-Zuckerkette stammen müssen (m/z 243, 131, 113) - und entsprechend im Aglykonspektrum weitgehend fehlen - so daß zu folgern ist, daß zumindest ein Teil des eluierten Digitoxins das Particle-Beam-Interface intakt passiert und als neutraler Teilchenstrom die Ionenquelle erreicht. Unter den dortigen Bedingungen (250 °C, Hochvakuum) wird offenbar eine ausreichende Menge des Glykosids unzersetzt verdampft; initiiert durch die anschließende Elektronenstoßionisation kommt es dann zu einer entsprechenden Fragmentierung der Moleküle.

Der Zerfall erscheint dabei ähnlich zu erfolgen, wie er auch für das reine EI-Massenspektrum des Digitoxins in der Literatur [56] beschrieben worden ist. Hier besteht der Hauptfragmentierungsweg in einer schrittweisen Eliminierung terminaler Zuckereinheiten durch Spaltung der glykosidischen Bindung unter H-Transfer (Bild 3-18)



Bild 3-18: Schematische Darstellung des charakteristischen Fragmentierungsprozesses von Digitoxin unter EI-Bedingungen aus Lit.[56]; S = Zucker, G = Genin (Aglykon).
*: Ionen durch Hochauflösungsdaten abgesichert.

Nach dem Konzept der lokalisierten Ladung könnte man z.B. bei Annahme der Abspaltung eines Elektrons aus dem n-Elektronenpaar des acetalischen Sauerstoffatoms der terminalen Digitoxose den grundlegenden Fragmentierungsschritt folgendermaßen plausibel formulieren:



Als treibende Kraft dieser Reaktion wäre die energetisch vorteilhafte Etablierung einer "allylischen" Doppelbindung (zwischen den C-Atomen 1 u. 2) zum Ringsauerstoff des terminalen Zuckers zu sehen, deren Entstehung durch H-Wanderung von C-2 des terminalen Zuckers an den O-glykosidischen Sauerstoff unter gleichzeitiger Spaltung der glykosidischen Bindung vorstellbar wäre. Diese wäre z.B. homolytisch denkbar (das Glykosid hätte dann Radikalionencharakter).

Von den entsprechenden Schlüsselionen des schrittweisen Eliminierungsprozesses terminaler Zuckereinheiten des Digitoxins, m/z 764 ($M^{+\bullet}$); m/z 634 ($M - S_3$)⁺; m/z 504 ($M - S_3S_2$)⁺; m/z 374 [($M - S_3S_2S_1$)⁺ = Aglykon)] ist im PB-Spektrum nur m/z 634 nachweisbar (Bild 3-19), allerdings - wie auch im normalen EI-Spektrum - nur mit schwacher Intensität. Die entsprechenden Komplementärionen (m/z 130, 260 und 390) mit dem Ladungsverbleib auf dem abgespaltenen Zuckerrest treten dagegen nicht auf. Jedoch sind diese Fragmente mit z.T. über 50 % Intensität im Feldionisationsspektrum zu registrieren [56].

Das PB-Spektrum wird dagegen dominiert durch die Abspaltung eines terminalen Digitoxoserestes und dessen Fragmentierung.

Diese Abspaltung muß nach einem anderen Mechanismus als oben geschildert erfolgen, denn es entsteht eine Ionenspezies der Nominalmasse m/z 131.

Denkbar ist folgender Mechanismus:



Bei Annahme einer Ionisierung am Ringsauerstoff der terminalen Digitoxose würde die homolytische Spaltung der glykosidischen Bindung (α -Spaltung) zur Ausbildung eines ladungsstabilisierenden Oxoniumions führen. Dabei erfolgt keine H-Wanderung, d.h. das glykosidische O-Atom trägt ein freies Radikal und das Fragment m/z 131 ist eine gerad-elektronische Spezies. Vermutlich durch die anschließende Wasserabspaltung (unter Entstehung des Teilchens m/z 113) und die dadurch bedingte gute Stabilisierung des Oxoniumions ist dieser Fragmentierungsprozeß energetisch weit günstiger als die oben beschriebene Spaltung unter H-Transfer.

Entsprechend dominieren diese drei Ionen das PB-Spektrum des Digitoxins (vgl. Bild 3-19) und stellen auch starke Ionen im konventionellen EI-Spektrum dar, während im FI-Spektrum nur m/z 131 intensiv ist [56].

Auch die Spaltung auf der anderen Seite der glykosidischen Bindung (d.h. am C-4 der zweiten Digitoxose) ist vermutlich wegen der Stabilisierung des Radikalelektrons am sekundären C-4-Atom realisiert, wie das Fragment m/z 147 zeigt. Diese Fragmentierung ist allerdings gegenüber der diskutierten Alternative deutlich geringer (Intensität lediglich 10 %).

Die restlichen signifikanten Ionen des PB-Spektrums des Digitoxins sind Fragmente des Aglykons; diese treten allerdings nur mit einer Intensität < 30 % im Spektrum auf, d.h. das PB-Spektrum dieses Herzglykosids wird durch die Zuckerfragmente dominiert (vgl. Bild 3-19).

Die Abspaltung der kompletten Zuckerkette $(-S_1S_2S_3)$ geschieht offenbar ausschließlich unter Verbleib der Ladung auf dem Aglykon, da die entsprechenden komplementären Fragmente der Massenzahlen m/z 391 bzw. 390 (- H) fehlen.

Bei dieser Fragmentierung muß zudem eine H-Migration vom Zucker (vermutlich aus Position 2 von S_1) zum glykosidischen Sauerstoff angenommen werden, da sonst zumindest das Fragment m/z 357 (Aglykon - 17; Abspaltung einer Hydroxylgruppe als Radikal) nicht erklärbar wäre.

Eine anschließende Eliminierung von H₂O, wahrscheinlich unter Beteiligung der OH-Gruppe an C-14 macht die Entstehung des Teilchens m/z 339 plausibel.

Beide genannten Ionen treten auch im EI-Spektrum des Digitoxins auf, allerdings mit wesentlich höherer Intensität (85 - 100 %) [57].



Bild 3-19: PB-Massenspektrum des Digitoxins



Bild 3-20: PB-Massenspektrum des Digitoxins. Darstellung des Massenbereiches m/z 190 - 380

Die Genese des Schlüsselions m/z 203 ist bei EI-Spektren von Digitoxigenin durch Markierungsversuche abgeleitet worden [57]:



Als charakteristischer Startprozeß bei der Fragmentierung des Moleküls ist die Öffnung des Ringes D zwischen C-13 und C-17 anzusehen; ein Verbleib der Ladung am C-13 führt dann nach Spaltung der Bindung C-15 / C-16 schließlich zum Fragment m/z 203.

Die Schlüsselfragmente der Massenzahlen m/z 124 und m/z 259, die nach der alternativen Ladungsverteilung auf C-17 abgeleitet werden können, lassen sich im PB-Spektrum nicht auffinden. Dies gilt auch für weitere Schlüsselbruchstücke der Massenzahlen m/z 111 und m/z 231 (bezügl. ihrer Entstehung vgl. Lit.[57]), die nur in den EI-Literaturspektren auftreten, in unserem PB-Spektrum aber fehlen.

Das Ion m/z 243 dagegen tritt bei uns in höherer Intensität (25 %) auf als in den FI- und EI-Spektren des Digitoxins von Lit.[56], wo es nur 10 bis 20 % ausmacht.

In den EI-Spektren des entsprechenden Aglykons Digitoxigenin fehlt es völlig [58]. Dies ist verständlich, wenn man seine Bildung aus der Zuckerkette postuliert.

Zwar gibt es darüber keine Informationen, doch wäre folgende Entstehung denkbar:





m/z 243

3.5.2.2 Direkteinlaß/(EI)MS-Messungen

Digitoxin wurde als Glykosid nicht im Direkteinlaß/(EI)MS gemessen (s.o.).

3.5.2.3 HPLC/(ESI)MS- und HPLC/(APCI)MS-Messungen

Das HPLC/(ESI)MS-Spektrum des Digitoxins ist unter den gewählten Aufnahmebedingungen überraschend fragmentreich und unterscheidet sich stark vom HPLC/(PB)MS- und konventionellen EI-Spektrum (vgl. Bild 3-19 und Bild 3-21). Es zeigt als Basispeak das intensive Natriumaddukt $[M + Na]^+$ des Molekülions (m/z 787) und daneben auch das deutlich schwächere Quasimolekülion $[M + H]^+$ mit der Massenzahl m/z 765.

Durch die Abspaltung des terminalen Zuckers (S_3) als Neutralteilchen wird ein Fragment der Masse m/z 657 $[(M + Na) - 130]^+$ generiert. Weitere Zuckerabspaltungen, die zu Fragmenten der Nominalmassen m/z 527 bzw. m/z 397 führen würden, sind nicht zu beobachten. Jedoch wäre die Abspaltung eines Disaccharids (S_3S_2) aus dem Quasimolekülion $[M + H]^+$ mit nachfolgender Wasserelimination vorstellbar, die das Auftreten eines Ions der Masse m/z 487 $[(M + H) - S_3S_2 - H_2O]^+$ erklären würde. Auch das durch Abspaltung der gesamten Zuckerkette entstandene Ion des protonierten Aglykons mit der Massenzahl m/z 375 $[(M + H) - (S_3S_2S_1)]^+$ tritt mit signifikanter Intensität auf. Vergleichbar der Situation im PB-Spektrum können dann die Fragmente m/z 357 und m/z 339 durch Eliminierung von einem bzw. zwei Molekülen H₂O aus diesem Aglykon interpretiert werden. Entsprechend dürften auch die Ionen m/z 113 $[(S_3) - H_2O]^+$ bzw. m/z 97 $[(S_3) - 2 H_2O]^+$ entstanden sein (vgl. Diskussion des PB-Spektrums).

Darüber hinaus treten im ESI-Spektrum mehrere starke Ionen wie m/z 249, m/z 337, und m/z 454 auf, die bisher weder im reinen EI- noch PB-Spektrum des Digitoxins beobachtet wurden.

Für deren Entstehung konnten keine sinnvollen Zerfallswege abgeleitet werden; auch die Fragmentierungssoftware MassFrontier[™] lieferte dazu keine befriedigenden Interpretationen.

Es ist deshalb sehr wahrscheinlich, daß diese Ionen von Verunreinigungen aus dem Analysensystem stammen. Diese Vermutung wird auch durch das APCI-Spektrum (Bild 3-22) bestätigt, in dem diese entsprechenden Ionen fehlen.

Dieses HPLC/(APCI)MS-Spektrum des Digitoxins weist weniger Fragmente als das entsprechende ESI-Spektrum auf und einen anderen Basispeak (m/z 339). Sowohl das Natrium-Addukt- als auch das H⁺-Addukt-Ion des Digitoxins fehlen. Das Fragment höchster Masse wird überraschenderweise durch m/z 505 repräsentiert. Es steht zu vermuten, daß dieses Ion durch Abspaltung der beiden Digitoxosen (S_3S_2) als Disaccharid-Kette entsteht und nicht durch sukzessive Eliminierung der einzelnen jeweils terminalen Desoxy-Zucker, wie es unter EI- und FI-Bedingungen [56] erfolgt. Für diese Hypothese spricht auch die Tatsache, daß die Abspaltung dieser Disaccharideinheit offenbar nach einem anderen Mechanismus vollzogen wird als von uns bei der Genese anderer Zuckerionenspezies beschrieben. In diesem Fall wird nämlich ein Teilchen der Masse 259 eliminiert, was zur Entstehung eines Fragments mit der Masse 505 (statt der erwarteten 504) führt und welches nur im Rahmen einer doppelten H-Umlagerung plausibel erklärbar scheint.

Ein entsprechendes Bruchstück m/z 634, entstanden durch Verlust von S₃ aus dem Molekülion ist nicht nachweisbar, da es - wie bereits erwähnt - bei der Abspaltung der terminalen Digitoxose energetisch günstiger ist, die Ladung auf dieser Digitoxose (m/z 113) zu belassen (Oxoniumstruktur mit konjugierter Doppelbindung).

Die Peaks m/z 487, m/z 469 und m/z 451 deuten durch die Massendifferenz von jeweils 18 auf eine Wasserabspaltung aus dem Ion m/z 505 hin. Dabei ist die Abspaltung von zwei Molekülen Wasser eventuell aus der terminalen Digitoxose unter dem Aspekt der Stabilisierung des Kations verständlich. Eine weitere Wasserabspaltung, die die Entstehung des Teilchens m/z 451 erklären würde, ist dann nur aus dem Digitoxigenin, d.h. dem Aglykon, denkbar. Das protonierte Aglykon m/z 375 $[(M + H) - (S_3S_2S_1)]^+$ spaltet hier ebenso wie im PB- und ESI-Spektrum zwei Moleküle Wasser unter Bildung der Fragmente m/z 357 und m/z 339 (Basispeak) ab.

Unter APCI-Bedingungen folgt dann offenbar die Fragmentierung des Lactonringes unter Eliminierung von H₂O und CO bzw. umgekehrt, wodurch die Fragmente m/z 321, 311, und 293 entstehen.

Insgesamt sind damit zum einen die vier Sauerstoff-Funktionen des Digitoxigenins nachgewiesen und zum anderen ist belegt, daß zwei davon Hydroxylsubstituenten des Ringsystems sein müssen.



Bild 3-21: ESI-Massenspektrum des Digitoxins



Bild 3-22: APCI-Massenspektrum des Digitoxins

3.5.2.4 DLI/(ESI)MSⁿ-Messungen

Um detaillierte Informationen über die massenspektrometrische Fragmentierung des Digitoxins zu gewinnen, wurden MSⁿ-Experimente durchgeführt. Dies geschah mittels eines Hybridsystems (Kombination aus doppeltfokussierendem Magnetfeldsystem und einer Ionenfalle). Die Probeneinführung erfolgte über die Direct Liquid Introduction (DLI).

Das DLI/ESI(Sektorfeld)-Massenspektrum besteht praktisch nur aus zwei Ionen, dem Natriumaddukt-Ion (m/z 787) und dem Kaliumaddukt-Ion (m/z 803) des Digitoxinmoleküls (Bild 3-23). Daß dieses Spektrum wesentlich fragmentärmer ist als das entsprechende HPLC/(ESI)-Massenspektrum (Bild 3-21), ist sicher nur zum Teil auf unterschiedliche Aufnahmebedingungen zurückzuführen, da letzteres - wie bereits an früherer Stelle erwähnt (Kapitel 3.5.2.3) - durch Fremdionen verunreinigt ist.

Das im vorgeschalteten Sektorfeldgerät (MS^1) selektierte Addukt-Ion m/z 787,1 [M + Na]⁺ wurde in der nachgeschalteten Ionenfalle durch Stoßaktivierung zum weiteren Zerfall angeregt (CAD bzw. CID) und so das entsprechende MS/MS-Spektrum (MS^2 -Spektrum, Bild 3-24) erzeugt.

Einige charakteristische Ionen lassen sich wie folgt interpretieren:

m/z 769: $[(M + Na) - H_2O]^+$; Wasserabspaltung, vermutlich aus dem Aglykonteil.

m/z 743: [(M + Na) - 44]⁺; denkbar ist eine CO₂-Abspaltung aus dem Genin, ein Prozeβ, der z.B. von Anhydriden und Lactonen bekannt ist.

Da keine Hochauflösungsdaten vorliegen, muß jedoch auch in Betracht gezogen werden, daß z.B. bei cyclischen Ethern und Cycloalkanolen die Abspaltung eines Teilchens der Nominalmasse 44 mit der Summenformel C_2H_4O als Produkt einer Umlagerung auftritt. Es kann deshalb nicht sicher entschieden werden, ob die Eliminierung des Neutralteilchens der Masse 44 beim Digitoxin aus dem Aglykon oder dem Zuckerrest geschieht. m/z 657: [(M + Na) - 130]⁺; Abspaltung der terminalen Digitoxose (S₃), der denkbare Mechanismus wurde bereits an früherer Stelle beschrieben (Kapitel 3.5.2.3).

Die mögliche Entstehung der folgenden Ionen m/z 639 (Abspaltung von H₂O), m/z 613 (von geringer Intensität, vermutlich CO₂-Abspaltung) und m/z 527 (Eliminierung einer weiteren Digitoxose (S₂)) wurde durch ein entsprechendes MS³-Experiment [MS³ (787 \rightarrow 657)] nachgewiesen (Bild 3-25).

- m/z 527: [(M + Na) (S₃S₂);]⁺; Ein zusätzlich durch Wasserabspaltung entstandenes Fragment m/z 509 tritt nicht auf. Die Zuckerabspaltung erfolgt vermutlich in Anlehnung an die Beobachtung im EI-Spektrum [56] konsekutiv, jedoch kann wohl auch die Abspaltung einer Disaccharid-Einheit nicht vollständig ausgeschlossen werden.
- m/z 413: [M + Na]⁺ 390; Formal bieten sich zwei Interpretationen für dieses Ion an: Zum einen wäre ein Addukt-Ion des Aglykons mit Kalium [Aglykon + K]⁺ denkbar. Allerdings sollte man in diesem Fall auch die daraus durch Abspaltung von H₂O und CO₂ hervorgehenden Fragmente erwarten.

Alternativ könnte das Ion der Nominalmasse 413 auch das Natriumaddukt-Ion der abgespaltenen Trisaccharidkette $[S_1S_2S_3 + Na]^+$ repräsentieren. Es sei darauf hingewiesen, daß das Fragment m/z 283 nicht, wie man zunächst vermuten könnte, durch Abspaltung einer terminalen Digitoxose aus diesem Trisaccharid-Addukt-Ion entsteht. Es kann somit auch nicht zur Unterstützung dieser Interpretation herangezogen werden. Dieses Ion wird, wie aus dem zweiten MS^3 -Spektrum (787 \rightarrow 387) erkennbar aus dem Fragment m/z 387 generiert (Bild 3-26).

m/z 639: $[(M + Na) - H_2O - S_3]^+$

m/z 387: Dies bereits erwähnte Bruchstück verkörpert den Basispeak im

MS²-Spektrum (Bild 3-24). Leider konnte für dieses Ion kein sinnvoller Strukturvorschlag abgeleitet werden.

Dies gelang auch nicht anhand eines entsprechenden CID-Spektrums, zumal die auftretenden Massendifferenzen vieldeutig sind (Bild 3-26).



Bild 3-23: DLI/ESI/Sektorfeld-Massenspektrum des Digitoxins



Bild 3-24: MS^2 -Spektrum (\rightarrow 787) des Digitoxins





Bild 3-26: zweites MS³-Spektrum (787 \rightarrow 387) des Digitoxins

3.5.2.5 Zusammenfassung der massenspektrometrischen Untersuchungen des Digitoxins

Während bei anderen untersuchten Glykosiden im Particle Beam ein dem EI-Spektrum vergleichbares Aglykon-Spektrum erhalten wurde, dominieren im PB-Spektrum des Digitoxins - vermutlich bedingt durch das Vorliegen einer Desoxy-Zuckerkette - charakteristische Fragmente, die eben dieser Trisaccharid-Kette entstammen. Ionen vom Zerfall des Aglykons treten nur wenige und mit deutlich geringerer Intensität auf. Viele charakteristische, im normalen EI-Spektrum zu beobachtende, Schlüsselfragmente des Digitoxigenin-Zerfalls fehlen.

Zwar erscheint es bemerkenswert, daß im PB-Spektrum des Digitoxins sowohl Ionen des Zuckerteils als auch des Aglykons enthalten sind, doch da ein Molekül- oder Quasimolekülion weder nachweisbar noch sicher abzuleiten ist, erscheint die Particle Beam-Technik zur Gewinnung von Strukturinformationen derartiger Herzglykoside nur bedingt geeignet.

Das HPLC/(ESI)MS-Spektrum weist demgegenüber ein starkes Natriumaddukt-Ion $[M + Na]^+$ (Basispeak) auf und ein schwächeres Quasimolekülion $[M + H]^+$.

Weiterhin treten charakteristische Schlüsselionen durch Abspaltung von Zuckern teils aus dem H⁺-Addukt- und teils aus dem Natriumaddukt-Ion auf $[(M + Na) - S_3]^+$, $[(M + H) - (S_2S_3) - H_2O]^+$ mit anschließender Eliminierung von Wasser, sowie $[(M + H) - (S_1S_2S_3)]^+$ als protoniertes Aglykon mit nachfolgender H₂O-Abspaltung. Zudem ist, wie im PB-Spektrum, mit $[(S_3) - H_2O]^+$ ein diagnostisch wichtiges Fragment der terminalen Digitoxose erkennbar.

Zusammengefaßt ist das ESI-Spektrum des Digitoxins sehr viel aussagefähiger als das entsprechende PB-Spektrum; es vermittelt Informationen sowohl über das Aglykon als auch den Zuckerrest. Als nachteilig ist allenfalls die von uns häufig beobachtete Kontamination mit Störionen von Systemverunreinigungen zu vermerken. Demgegenüber waren die HPLC/(APCI)MS-Spektren weitgehend frei von Verunreinigungen. Überraschenderweise ließ sich im APCI-Spektrum des Digitoxins, im Gegensatz zu der entsprechenden ESI-Messung kein Molekülpeak detektieren, d.h. sowohl das H⁺-Addukt-Ion als auch das Natriumaddukt-Ion fehlten. Ohne diese gestaltet sich jedoch die Interpretation des Massenspektrums eines unbekannten Herzglykosids schwierig. Es ist allerdings nicht sicher, ob diese Situation generell für derartige APCI-Messungen zutrifft, da nicht die experimentelle Möglichkeit bestand, die APCI-Mess-parameter weiter zu variieren.

Im Unterschied zum ESI-Spektrum läßt sich unter APCI-Bedingungen beim Digitoxin kein durch Abspaltung einer Monosaccharid-Einheit entstandenes Fragment detektieren, wohl aber ein Ion $[(M + H) - (S_2S_3)]^+$, welches wiederum im ESI-Spektrum fehlt.

Die entsprechenden H₂O-ärmeren Ionen $[(M + H) - (S_2S_3) - H_2O]^+$ und

 $[(M + H) - (S_2S_3) - 2 H_2O]^+$ sind demgegenüber in beiden Spektren nachweisbar. Dies trifft auch für das protonierte Aglykon und einen Teil seiner Fragmentierungsprodukte zu, nämlich die durch Eliminierung von einem bzw. zwei Molekülen Wasser entstandenen Ionen der Nominalmassen m/z 357 und m/z 339 (Basispeak).

Im Gegensatz zu der ESI-Messung aber zeigt das APCI-Spektrum mit $[(M + H) - (S_1S_2S_3) - 3 H_2O]^+$ und $[(M + H) - (S_1S_2S_3) - 3 H_2O - CO]^+$ noch zwei weitere wichtige Fragmente des Aglykonabbaus, die vermutlich als Zerfallsprodukte des Lactonringes zu interpretieren sind.

Diese Ionen sind insofern als diagnostisch wertvoll einzustufen, weil durch diese im APCI stattfindende Fragmentierung des Aglykons nicht nur Informationen über die Gesamtzahl von dessen Sauerstoff-Funktionen erhalten werden sondern auch darüber, wieviel davon Hydroxylsubstituenten (oder eventuell auch andere sauerstoffhaltige Substituenten) des Ringsystems darstellen.

Das DLI/ESI/Sektorfeld Massenspektrum war frei von Störionen. Die MSⁿ-Experimente, die nur in begrenzter Zahl durchgeführt werden konnten, unterstützten die bisherigen Ergebnisse; so konnte auch im MS^2 -und $MS^3(787 \rightarrow 657)$ -Experiment eine Abspaltung der Digitoxose nachgewiesen werden. Auch wurde auf verschiedenen Stufen die Eliminierung von H₂O und vermutlich CO₂ aus dem Aglykon beobachtet. Ein in anderen Spektren nicht nachzuweisendes Ion wurde im $MS^2(787)$ -Spektrum mit der Masse m/z 413 registriert welche als $[(M + K) - (S_1S_2S_3)]^+$ oder wahrscheinlicher als $[(S_1S_2S_3) + Na]^+$ zu interpretieren ist.

Aus dem ebenfalls erstmalig in diesem Spektrum beobachteten intensiven Fragment m/z 387 (Basispeak) konnte leider keine strukturelle Information gewonnen werden, da sich auch sein CID-Spektrum [$MS^3(787 \rightarrow 387)$] nicht eindeutig interpretieren ließ.



3.5.3 Massenspektrometrische Untersuchungen des Robinins

3.5.3.1 HPLC/(PB)MS-Messungen

Wie schon bei anderen Glykosiden beobachtet (siehe Kapitel 3.4) erfolgt auch bei der HPLC/(PB)MS-Messung des Robinins im Bereich Interface/Ionenquelle eine Abspaltung der Zuckerreste, so daß nur das Massenspektrum des Aglykons Kämpferol registriert wird.

Da Flavone keine Stelle der begünstigten Fragmentierung besitzen, weisen sie in der Regel ein sehr starkes Molekülion auf, welches oft den Basispeak repräsentiert, während die Fragmente eine deutlich geringere Intensität (meist unter 70 %) zeigen.

Dies ist auch im EI-Spektrum (Bild 3-29) des Kämpferols der Fall und auch im PB-Spektrum (Bild 3-28) ist der Molekülpeak⁶ m/z 286 stark (Intensität: 90 %).

Daneben lassen sich in diesem Spektrum weitere charakteristische, in konventionellen EI-Spektren von Flavonolen auftretenden, Ionen nachweisen [59]; vgl. auch Bild 3-27:

m/z 285: [M - 1]⁺; Abspaltung von Wasserstoff mittels nicht geklärtem Mechanismus

m/z 258: [M - 28]⁺; Eliminierung von CO aus Ring C unter Bildung eines furanoiden Ringsystems [59]

⁶ Unter Molekülpeak [M] soll im Folgenden der Molekülpeak des Aglykons verstanden werden.

m/z 257: [M - H - CO]⁺

- m/z 152: [C₇H₄O₄]⁺; charakteristisches Retro-Diels-Alder-Zerfallsprodukt, welches unter Spaltung des heterocyclischen Ringes C entsteht und als Schlüsselfragment Informationen über Substituenten am Ring A liefert (hier 2 Hydroxylfunktionen). Oft ist die Abbaureaktion noch von einer H-Wanderung begleitet (m/z 153).
- m/z 121: [C₇H₆O₂]⁺; repräsentiert ein substituiertes Benzoylkation und fungiert ebenfalls als diagnostisch wichtiges Schlüsselion bei dieser Naturstoffklasse, da es über eine Substitution an Ring B Auskunft gibt (hier: eine Hydroxylfunktion). Eine nachfolgende CO-Abspaltung liefert das Fragment m/z 93.



Bild 3-27: Wichtige Fragmente von Flavonolen aus Lit.[55]



Bild 3-28: PB-Massenspektrum des Robinins



Bild 3-29: EI-Massenspektrum (Wiley) des Kämpferols

Abschließend seien zu dem PB-Spektrum des Robinins noch zwei Punkte angemerkt:

- Neben den genannten Ionen sind in diesem Spektrum noch eine Reihe weiterer Fragmente erkennbar, die auch im entsprechenden EI-Spektrum auftreten: z.B. m/z 241, 229, 213, 143, 129 und 105.
- Da aber einerseits die Ionenintensitäten im EI-Spektrum des Robinins relativ schwach sind (alle unter 10 % mit Ausnahme von [M - 1]⁺), das HPLC/(PB)MS-Spektrum jedoch andererseits ein deutliches, durch Verunreinigungen bedingtes Untergrundrauschen (zwischen 3 und 12 %) aufweist, kann in einigen Fällen nicht mit Sicherheit entschieden werden, ob die genannten Ionen im PB-Spektrum wirklich, wie im reinen EI-Spektrum, Fragmente des Flavons sind.

3.5.3.2 Direkteinlaß/(EI)MS-Messungen

Robinin wurde als Glykosid nicht im Direkteinlaß/(EI)MS gemessen (s.o).

3.5.3.3 HPLC/(ESI)MS- und HPLC/(APCI)MS-Messungen

Im ESI-Spektrum des Robinins (Bild 3-30) stellt der Basispeak m/z 763 das Natriumaddukt-Ion des Molekülpeaks dar $[M + Na]^+$.

Auch das Quasimolekülion m/z 741 $[M + H]^+$ ist vorhanden, allerdings nur mit relativ geringer Intensität (Int.: ca. 4 %). Die weitere Fragmentierung nimmt primär von diesem Ion seinen Ausgang.

So ist die Abspaltung eines Teilchens der Nominalmasse 146 zu beobachten, die ein Teilchen der Masse 597 erzeugt und bei glykosidischen Verbindungen in der Regel eine Desoxy-Hexose indiziert [60]. Der gleiche Spaltungsprozeß findet auch vom Natriumaddukt-Ion aus statt, jedoch mit geringerer Häufigkeit. Auf diese Weise entsteht ein Fragment m/z 617. Wir vermuteten zunächst, daß dabei die an der Galaktose gebundene Rhamnose abgespalten wurde (R1: Spaltung 1b), da andernfalls auch die Abspaltung einer weiteren Rhamnose (m/z 595 - 146 = 449) hätte erwartet werden können.

Die Abspaltung von Zuckern aus Zuckerketten von Glykosiden wurde schon beim Digitoxin diskutiert und dürfte hier vergleichbar verlaufen.



Das Fragment m/z 433 als zweitintensivstes Bruchstück (Int. 70%) im Spektrum kann aus m/z 595 durch Galaktose-Abspaltung entstehen $[(M + H) - Rha - Gal]^+$, oder aber aus dem protonierten Molekülion durch Abspaltung einer Disaccharideinheit $[(M + H) - (Rha-Gal)]^+$ (R1: Spaltung 2). Letzteres würde aber voraussetzten, daß die erste Rhamnose aus Position 7 eliminiert wurde. Welcher dieser beiden Fragmentierungswege beschritten wird, läßt sich nicht sicher entscheiden.

Der Verlust der letzten Rhamnose unter Bildung des protonierten Aglykons führt zu einem Ion m/z 287 $[M + H]^+$ von allerdings nur geringer Intensität.

Dies ist ein wesentlicher Unterschied zum APCI-Spektrum (Bild 3-31) des Robinins, wo dieses Teilchen eine Intensität von ca. 98 % erreicht, also wesentlich besser erkennbar ist.

Die zweite deutliche Abweichung bei der APCI-Messung besteht im Fehlen des Natriumaddukt-Ions des Molekülpeaks. Da das $[M + H]^+$ -Quasimolekülion hier, wie auch im ESI-Spektrum, nur sehr klein ist, erscheint eine zuverlässige

Determinierung der Molmasse bei unbekannten Flavonoiden ähnlicher Struktur im APCI weniger sicher, zudem hier auch das zusätzlich absichernde Ion $m/z 617 [(M + Na) - Rha]^+$ fehlt.

Die anderen charakteristischen ESI-Ionen wie m/z 595 $[(M + H) - Rha]^+$ und m/z 433 $[(M + H) - Rha - Gal]^+$ als Basispeak treten dagegen auch im APCI-Spektrum auf, wo m/z 433 sogar (zusammen mit m/z 287 den Basispeak verkörpert.



Bild 3-30: ESI-Massenspektrum des Robinins



Bild 3-31: APCI-Massenspektrum des Robinins

3.5.3.4 DLI/(ESI)MSⁿ-Messungen

Zunächst galt es, mittels MSⁿ-Messungen die bisher erhaltenen Strukturinformationen über das Flavonol Robinin zu bestätigen; darüber hinaus sollte jedoch geprüft werden, inwieweit mit dieser Technik weitere Strukturinkremente abzuleiten waren. Die Probe wurde über ein DLI in das doppeltfokussierende Magnetfeldsystem eingeführt.

Das DLI/(ESI)MS/Sektorfeld-Massenspektrum (Bild 3-32) weist neben dem dominierenden Natriumaddukt-Ion m/z 763 $[M + Na]^+$ nur noch zwei nennenswerte Ionen mit einer Intensität größer 10 % auf:

m/z 617 $[(M + Na) - Rha]^+$ und m/z 411. Damit unterscheidet sich dieses Spektrum deutlich von dem HPLC/ESI-Spektrum (vgl. Bild 3-30) dieser Verbindung, welches - neben dem Moleküladdukt-Ion - maßgeblich durch Ionen der Fragmentierung des $[M + H]^+$ -Teilchens bestimmt wurde. Inwieweit diese Unterschiede durch Variation bestimmter Meßparameter beeinflußbar sind, muß offengelassen werden.

Das Addukt-Ion m/z 763 $[M + Na]^+$ wurde im Sektorfeldgerät selektiert und in der nachgeschalteten Ionenfalle durch Stoßaktivierung zum weiteren Zerfall angeregt; auf diese Weise wurde das entsprechende MS²-Spektrum (Bild 3-33) erzeugt. Dieses wird nur durch ein einziges, durch Abspaltung einer Rhamnose erzeugtes Ion m/z 617 $[(M + Na) - Rha]^+$ repräsentiert.

Das anschließende MS^3 -Spektrum [$MS^3(763 \rightarrow 617)$] besteht aus vier Ionen (Bild 3-34).

Das Fragment m/z 599,5 (bzw. 600) wird generiert durch Abspaltung eines Teilchens der Nominalmasse 17 (Hydroxylgruppe) aus dem Bruchstück m/z 617 $[(M + Na) - Rha - OH]^+$. Diese Hydroxylfunktion muß als Substituent an einem der beiden benzoiden Ringe lokalisiert sein. Dies ergibt sich zwingend daraus, daß das entstandene freie Elektron durch das aromatische System wesentlich besser stabilisiert wird als am Zuckerrest (bei alternativer Eliminierung der OH-Gruppe von Rhamnose oder Galaktose).

Nur dann ist überhaupt wie hier die eigentliche energetisch ungünstige Bildung eines "odd electron"-Teilchens aus einem "even electron"-Ion möglich.

Das Ion m/z 471 erklärt sich durch Abspaltung der zweiten Rhamnose durch CAD von m/z 617 und war im Prinzip zu erwarten $[(M + Na) - 2 Rha]^+$.

Überraschend ist dagegen das Auftreten des Bruchstücks m/z 331 (Basispeak) im MS^3 -Spektrum. Dieses entsteht durch Verlust eines Neutralteilchens der Masse m/z 286 aus dem Ion m/z 617 und muß als Abspaltung des Aglykons Kämpferol interpretiert werden, d.h. m/z 331 ist als [(M + Na) - Rha - Aglykon]⁺ aufzufassen.

Das Auftreten dieser Ionenspezies ist insofern sehr interessant als dadurch bewiesen ist, daß die Eliminierung der ersten Rhamnose aus $[M + Na]^+$ unter Bildung des Bruchstücks m/z 617 aus Position 7 des Kämpferols erfolgt sein muß (R1: Spaltung 1a, siehe Kapitel 3.5.3.3); nur dann kann durch eine einzige weitere Fragmentierung das reine Aglykon abgetrennt werden. Die Ladung verbleibt dabei auf der vorher in Position 3 befindlichen Disaccharidkette aus Galaktose und Rhamnose, die als solche damit eindeutig nachgewiesen worden ist, d.h. das Ion m/z 331 muß formuliert werden als [(Gal + Rha) + Na]⁺. Vorausgesetzt, die im HPLC/ESI-Spektrum (Bild 3-30) von $[M + H]^+$ ausgehende Fragmentierung des Robinins ist mit der hier beobachteten Situation (Ausgangsbasis: $[M + Na]^+$) vergleichbar, muß man die Interpretation des ESI-Spektrums (vgl. Kapitel 3.5.3.3) revidieren.

Dann nämlich muß auch dort die Abspaltung der ersten Rhamnose aus Position 7 (m/z 595) erfolgen und das Fragment m/z 433 entsteht durch Verlust der Disaccharidkette (Gal–Rha) aus Position 3 und nicht durch konsekutive Eliminierung dieser beiden Zucker.

Das MS^4 -Spektrum (763 \rightarrow 617 \rightarrow 471) des Robinins (Bild 3-35) bestätigt die bisherige Interpretation; erwartungsgemäß wird beim CAD des Ions m/z 471 auch der letzte Zucker (Galaktose) abgespalten. Dabei kann die Ladung sowohl auf dem Aglykon m/z 309 [Aglykon + Na]⁺ als auch der Galaktose m/z 185 [Gal + Na]⁺ verbleiben.



Bild 3-32: DLI/ESI/Sektorfeld-Massenspektrum des Robinins



Bild 3-33: MS²-Spektrum (\rightarrow 763) des Robinins



Bild 3-34: MS^3 -Spektrum (763 \rightarrow 617) des Robinins



Bild 3-35: MS⁴-Spektrum (763 \rightarrow 617 \rightarrow 471) des Robinins

206

3.5.3.5 Zusammenfassung der massenspektrometrischen Untersuchungen des Robinins

Wie schon bei der MS-Untersuchung anderer Glykoside beobachtet, erfolgt auch bei der HPLC/(PB)MS-Analyse des Robinins eine Abspaltung der Zuckerreste, so daß nur das Massenspektrum des Aglykons Kämpferol registriert wird.

In diesem lassen sich einige, z.T. auch für die gesamte Substanzgruppe der Flavone charakteristische Ionen erkennen, von denen bestimmte Schlüsselfragmente auch Informationen über Ringsubstituenten vermitteln.

Da das PB-Spektrum des Robinins jedoch durch Ionen meßbedingter Verunreinigungen überlagert war, konnte nicht sicher entschieden werden, wie gut seine Übereinstimmung mit dem eines konventionellen EI-Spektrums des Kämpferols ist und inwieweit anhand eines PB-Spektrums eine entsprechende Identifizierung des Aglykons über elektronische Datenbanken möglich ist.

Im HPLC/ESI-Spektrum kann das Molekülion sicher anhand eines starken $[M + Na]^+$ -Ions identifiziert werden. Ein schwaches $[M + H]^+$ -Signal kann als zusätzliche Absicherung herangezogen werden.

Im APCI-Spektrum war nur letzteres mit geringer Intensität zu detektieren, d.h. eine sichere Determinierung der Molmasse ist hier ungleich schwieriger. Die Abspaltung der drei Zucker war in beiden Spektren an den charakteristischen Massendifferenzen zu erkennen.

Während im ESI-Spektrum die Eliminierung der ersten Rhamnose deutlicher war, trat die der zweiten Rhamnose als letzter Zucker bei der APCI-Messung stärker hervor (m/z 287: Int.: ca. 99 %). Durch kombinierte Auswertung beider Spektren ist auch das Molekulargewicht des Aglykons sicher bestimmbar.

Das DLI/ESI/Sektorfeld-Massenspektrum wies weniger Fragmente auf als das entsprechende HPLC/(ESI)MS-Spektrum; sicher war nur der Basispeak $[M + Na]^+$ und das Fragment m/z 617 $[(M + Na) - Rha]^+$ zuzuordnen.

Durch die entsprechenden MS/MS-Spektren (bis MS⁴) konnte die Reihenfolge der Zuckerabspaltungen und damit das Vorliegen einer Disaccharid-Kette, die Masse des Aglykons sowie die Existenz mindestens einer Hydroxylgruppe als Substituent an Ring A oder B des Robinins nachgewiesen werden. Dabei traten neben Ionen bekannter Genese (aus ESI- und APCI-Messungen) auch die diagnostisch wichtigen Spezies $[(M + Na) - Rha]^+$, $[Aglykon + Na]^+$ [(Gal + Rha) + Na] und $[Gal + Na]^+$ auf.

3.5.4 Massenspektrometrische Untersuchungen des Sennosids B





Als Vertreter einer weiteren Naturstoffgruppe, der Anthrachinone, wurde das Sennosid B massenspektrometrisch untersucht.

Sennosid B ($C_{42}H_{38}O_{20}$; M_r 862,7; Stereochemie in Pos. 10/10: R/S) ist ein Isodianthron, bei dem beide Molekülhälften Rheinanthronstruktur besitzen.

Es tritt z.B. in den laxierend wirkenden Drogen Sennae folium (Cassia angustifolia und Cassia senna) und Rhei radix (Rheum palmatum und Rheum officinale) auf.

3.5.4.1 HPLC/(PB)MS-Messungen

Bei der HPLC/PB-Analyse des Sennosids konnte ein TIC-Signal erzeugt und ein entsprechendes Massenspektrum erhalten werden.

Dieses PB-Spektrum (Bild 3-36) läßt nur Ionen des monomeren Anthronaglykons mit seinem "Molekülion" m/z 270 als Basispeak erkennen (vgl. EI-Spektrum Bild 3-37).

Es steht deshalb zu vermuten, daß hier ähnlich wie wir es schon bei den PB-Messungen anderer Glykoside in Betracht gezogen haben, primär die Zuckerreste im Bereich Interface/Ionenquelle abgespalten werden. Dies scheint auch für die Dianthronspaltung zuzutreffen. Die Alternative wäre ein durch
Elektronenstoß induzierter Prozeß; die gleichzeitige Abspaltung von zwei Zuckerresten und der C-10/C-10'-Bindung dürfte jedoch unter massenspektrometrischen Gesichtspunkten unmöglich sein.



Spektrum 3-36: PB-Massenspektrum des Sennosids B



Bild 3-37: EI-Datenbankspektrum des Rheinanthrons

Es sei an dieser Stelle nochmals daran erinnert, daß es im Zuge unserer Screening-Analysen mit der HPLC/HTS-Kopplung wünschenswert war, schnell parallel Strukturinformationen von determinierten "Hit-Komponenten" zu erhalten.

Dabei sollte im Rahmen meiner Arbeit insbesondere die Leistungsfähigkeit verschiedener MS-Kopplungstechniken untersucht werden.

Von besonderem Interesse war in diesem Zusammenhang die automatische Identifizierungsmöglichkeit von HPLC/PB-Spektren mittels elektronischer EI-Datenbanken (z.B. Wiley).

Die Strukturinformationen, die man beim PB-Spektrum des Sennosids B hätte erwarten können wäre die des monomeren Rheinanthrons gewesen. Leider lieferte die Wiley-Bibliothek keinen entsprechenden Identifizierungsvorschlag, obwohl im PB-Spektrum eine Reihe charakteristischer Ionen des entsprechenden EI-Spektrums auftraten (siehe Bild 3-36 und 3-37). Vermutlich beruht dies auf der Tatsache, daß PB-Spektren im Massenbereich unterhalb etwa m/z 150 häufig zahlreiche Störionen von Verschmutzungen (z.B. aus dem Laufmittel) aufweisen.

Einige charakteristische Ionen des PB-Spektrums (die auch im EI-Spektrum enthalten sind) seien kurz angesprochen:

- m/z 242: [M 28]⁺ ist als CO-Eliminierung zu interpretieren und ein bekannter Abbauprozeß bei Hydroxy-Naphthochinonen und -Anthrachinonen.
- m/z 241: [M 29]⁺; beim Zerfall unsubstituierter Phenole und Naphthole wird als Abspaltung ein CHO-Radikal unter Entstehung eines relativ stabilen Cyclopentadienylkations gebildet [61]. Man darf durchaus spekulieren, daß beim Rheinanthron ein ähnlicher Fragmentierungsprozeß abläuft, zumal eine andere Erklärung dieser Massendifferenz schwierig erscheint (ein gesättigtes Kohlenwasserstoff-Fragment C₂H₅ scheidet hier mit Sicherheit aus).

- m/z 225: [M 45]⁺ entsteht vermutlich aus dem Anthron-Molekülion durch Verlust eines Bruchstücks der Masse m/z 45. Bei Ethylestern, Lactonen, vielen Säuren u.a. repräsentiert ein solches Teilchen C₂H₅O; bei aromatischen, in ortho-Stellung unsubstituierten Carbonsäuren sind dagegen die Abspaltung eines OH-Radikals (Bildung eines stabilen Benzoylions) mit konsekutiver CO-Eliminierung die dominierenden Prozesse, die zur Bildung eines Fragments [M - 45]⁺ führen [61]. Das Fehlen von [M - 17]⁺ deutet hier jedoch auf eine andere Entstehung des Ions m/z 225 hin; eventuell verliert das Molekül zunächst CO (m/z 242) und spaltet dann eine Hydroxylgruppe ab.
- m/z 214: [M 56]⁺; in Naphtho- und Anthrachinonen ist die Eliminierung von zwei Mol CO ein wesentlicher Abbauprozeß. In Hydroxyanthrachinonen wird sogar der Verlust von drei Molekülen CO beobachtet, weil das Fragment M 56 in der für Phenole typischen Weise unter Abspaltung von CO oder CHO-Radikal weiter zerfällt [61].
 Bei den um eine Carbonylfunktion ärmeren Anthronen wie dem hier

vorliegenden Rheinanthron, wäre nach einem entsprechenden Mechanismus die schrittweise Eliminierung von zwei Molekülen CO zu erwarten (M - 56 = m/z 214). Dieses Fragment trat allerdings nur im PB-Spektrum nicht aber im EI-Bibliotheksspektrum (Bild 3-37) auf.

m/z 197: [M - 45 - 28]⁺; Erwartungsgemäß eliminiert das Fragment m/z 225
 [M - CHO₂]⁺ ein Molekül CO unter Bildung dieses Ions der Nominalmasse 197.

Neben diesen bisher diskutierten Fragmenten sind auch die im Bibliotheksspektrum auftretenden Ionen m/z 168, 151, 115 und 112 im PB-Spektrum des Rheinanthrons nachweisbar, treten aber wegen der schon erwähnten Störionen von Verunreinigungen z.T. nicht klar hervor.

3.5.4.2 Direkteinlaß/(EI)MS-Messungen

Sennosid B wurde als Glykosid nicht im Direkteinlaß/(EI)MS gemessen (s.o.).

3.5.4.3 HPLC/(ESI)MS- und HPLC/(APCI)MS-Messungen

Das ESI-Spektrum des Sennosids B (Bild 3-38) weist zahlreiche Ionen auf, d.h. das Molekül wird bei der Elektrospray-Ionisation relativ stark fragmentiert. Ohne zusätzliche massenspektrometrische Informationen (Hochauflösung, MSⁿ-Experimente) lassen sich von diesen Ionen jedoch nur wenige sicher zuordnen und diagnostisch verwerten:

m/z 885 repräsentiert das Natriumaddukt-Ion des Molekülpeaks $[M + Na]^+$.

m/z 270 kann als das monomere Anthron-Aglykon (Rheinanthron) interpretiert werden.

Durch Erhöhung der Fragmentorspannung von 40 eV auf 150 eV wird das Aussehen des HPLC/(ESI)-Spektrums des Sennosids B massiv verändert und zwar sowohl in qualitativer (andere Ionen) als auch in quantitativer (veränderte Ionenintensitäten) Hinsicht (Bild 3-39).

Auffällig ist zunächst die starke Intensitätserhöhung des Natriumaddukt-Ions $[M + Na]^+$ auf bis etwa 98 %, sowie die starke Reduktion bzw. das völlige Fehlen der vorher dominanten Fragmente m/z 318 (Basispeak), m/z 354 (70 %) und m/z 461 (30 %).

Eine diagnostisch wichtige Zusatzinformation vermittelt das nur in diesem Spektrum mit erhöhter Fragmentorspannung auftretende Ion m/z 454 $[1/2 \text{ M} + \text{Na}]^+$ (Basispeak), welches als monomeres Anthronglykosid durch Spaltung der C-10/C-10'-Bindung des Natriumadduktes des Sennosids (S1: Spaltung 1) generiert wird. Nach Eliminierung von Glucose und Na⁺ entsteht dann mit m/z 270 das ionisierte monomere Anthron-Aglykon [(1/2 M + Na) - Glu - Na]⁺,

das in beiden Spektren mit ähnlicher Intensität auftritt. Bei stärkerer Fragmentorspannung scheint dieses weiter zu fragmentieren.

Die Interpretation des Bruchstücks m/z 224 erscheint jedoch in diesem Zusammenhang problematisch. Rein numerisch läßt sich zwar eine Entstehung aus m/z 270 durch Abspaltung von H₂O und CO ableiten, doch setzt ein derartiger Zerfall bei aromatischen Carbonsäuren einen H-liefernden ortho-Substituenten voraus (o-Effekt), der hier fehlt. Dennoch besteht die Möglichkeit, daß ein H-Transfer aus dem benachbarten Ringsystem erfolgt. Hierfür spricht die Masse m/z 196, die aus m/z 224 durch CO-Abspaltung hervorgegangen sein dürfte.



Wie schon bei dem Flavonolglykosid Robinin beobachtet, ist auch beim Anthrachinon Sennosid B festzustellen, daß das Molekulargewicht zuverlässiger aus dem ESI- als aus dem APCI-Spektrum zu entnehmen ist.

Letzteres wird dominiert durch das Bruchstück m/z 270 (Basispeak), welches das monomere Anthron, d.h. Rheinanthron, darstellt (Bild 3-40). Die diagnostisch wichtigen Ionen m/z 454 und m/z 537 stellen das protonierte monomere Glykosid (Rheinanthronglykosid) bzw. das Aglykon (Sennidin) des Sennosids B (- H) dar.



Bild 3-38: ESI-Massenspektrum des Sennosids B (Fragmentorspannung 40 eV)



Bild 3-39: ESI-Massenspektrum des Sennosids B (Fragmentorspannung 150 eV)



Bild 3-40: APCI-Massenspektrum des Sennosids

3.5.4.4 DLI/(ESI)MSⁿ-Messungen des Sennosids B

Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, welche weitergehenden Strukturinformationen sich mittels verschiedener MSⁿ-Experimente von derartigen dimeren Anthronen erhalten lassen. Bedingt durch die vielen elektronegativen Substituenten, insbesondere die Carboxyl-Gruppen, können vom Sennosid ESI-Spektren sowohl im positiven als auch im negativen Modus (siehe Kapitel 3.1.1.2.1, Schema 3-2 und 3-3) aufgenommen werden. Hierbei wurde im Negativ-Modus, im Vergleich zum Positiv-Modus, eine um das 25-fache erhöhte Signal gemessen.

3.5.4.4.1 DLI/(ESI)MSⁿ-Messungen im Positv-Modus

Nach Probeneinführung über das DLI und Electrospray-Ionisierung des Sennosids B (Bild 3-41) wurde das gebildete Natriumaddukt-Ion des Molekülpeaks $[M + Na]^+$ im Magnetfeld selektiert (m/z 885) und in der nachgeschalteten Ionenfalle stoßaktiviert.

Das entsprechende MS^2 -Spektrum (Bild 3-42) wird fast ausschließlich durch das Ion m/z 454 gekennzeichnet, das durch Spaltung der C-10/C-10'-Bindung (S1: Spaltung 1, Kapitel 3.5.4.3) entsteht. Dieses Fragment verkörpert somit das Natriumaddukt-Ion des "halben" Sennosid-Moleküls [1/2 M + Na]⁺, d.h. des Rheinglykosids; es trat bereits im HPLC/ESI-Spektrum (bei erhöhter Fragmentorspannung) als Basispeak auf (Bild 3-39).

Das MS³-Spektrum (885 \rightarrow 454) weist als Basispeak das Ion m/z 185 auf, das als Natriumaddukt der abgespaltenen Glucose zu interpretieren ist (Bild 3-43). Genau genommen wird eine Desoxy-Glucose eliminiert: [(Glu - H₂O) + Na]⁺.

Generell deutet die Massendifferenz von m/z 162 bei Glykosiden auf den Verlust einer Desoxy-Hexose hin. Der ionisierte Zuckerrest (bzw. Desoxy-Zucker) m/z 163 [Glu - OH]⁺ ist ebenfalls im Spektrum erkennbar.

Die Abspaltung der Glucose (bzw. Desoxy-Hexose) ist in anderer Form auch aus dem HPLC/ESI-Massenspektrum (mit erhöhter Fragmentorspannung, Bild 3-39) anhand der Massendifferenz von 184 (m/z 454 - 270) ableitbar. In diesem Fall bleibt die Ladung jedoch auf dem komplementären Teilchen, d.h. dem Aglykon mit m/z 270.

In geringerem Maße geschieht dies vermutlich auch bei der MS^3 -Fragmentierung, nur daß hier statt dessen das Natriumaddukt-Ion des monomeren Anthrons [(1/2 M + Na) - Glu]⁺ auftritt (m/z 292). Zusammenfassend ist festzuhalten, daß diese MS/MS-Analyse bereits gewonnene Strukturinformationen bestätigt aber keine weiteren neuen Erkenntnisse vermittelt hat.

Als wesentlicher Grund dafür ist sicher die Tatsache anzusehen, daß die Primärfragmentierung (MS^2) fast ausschließlich in der Dimerenspaltung besteht und beim MS^3 -Experiment das dominierende Hauptfragment, das Natriumaddukt-Ion der Desoxy-Glucose darstellt.



Bild 3-41: DLI/ESI/Sektorfeld-Massenspektrum des Sennosids B



Bild 3-42: (Positiv-ESI) MS^2 -Spektrum (\rightarrow 885) des Sennosids B



Bild 3-43: (Positiv-ESI) MS^3 -Spektrum (885 \rightarrow 454) des Sennosids B

3.5.4.4.2 DLI/(ESI)MSⁿ-Messungen im Negativ-Modus

Das negative ESI-Massenspektrum zeigt ein starkes Quasimolekülion bei m/z 861, das durch Abspaltung eines Protons aus dem Molekülion [M - H] entstanden ist (Bild 3-44).

Das MS²-Spektrum (Stoßaktivierung von m/z 861, Bild 3-44) wird durch das Ion m/z 699 dominiert, das durch Verlust eines Teilchens der Masse m/z 162, d.h. die Eliminierung einer Desoxy-Hexose (Glucoserest; S2: Spaltung 1) erzeugt wird [(M - H) - Glu].

Stoßaktivierung von m/z 699 liefert das MS^3 -Spektrum (861 \rightarrow 699) mit dem Fragment m/z 537 als Basispeak (Bild 3-45). Die Massendifferenz von 162 deutet auf die Abspaltung eines weiteren Desoxy-Zuckers, d.h. des zweiten Glucoserestes hin (S2: Spaltung 2)



Da in den folgenden MS/MS-Experimenten keine weiteren Zuckerabspaltungen beobachtet wurden, muß dieses Ion [(M - H) - 2 Glu]⁻ der Nominalmasse 537 (bzw. 538) das Aglykon dieses Dianthronglykosids repräsentieren. Aus den HPLC/ESI-Spektren (Bild 3-38 und 3-39) ist zwar die Masse dieses Aglykons nicht direkt entnehmbar, bei bekannter Substanz - wie in dem vorliegenden Fall - jedoch ableitbar.

Ähnliches gilt für das DLI/(ESI)MS-Spektrum im Positiv-Modus (Bild 3-41) und davon abgeleitete MS/MS-Messungen.

Handelt es sich jedoch um eine Komponente unbekannter Struktur, kann die Determinierung der Masse des Aglykons Schwierigkeiten bereiten, insbesondere, wenn die Dimerenspaltung nicht als dominierender Prozeß auftritt (vgl. Bild 3-38). Sie geschieht dann zuverlässiger durch (Negativ-ESI)-Spektren anhand entsprechender MS/MS-Experimente.

Auch die Abspaltung zweier Zuckerreste aus dem Molekülion konnten wir in dieser direkten konsekutiven Form in den ESI-Spektren im Positiv-Modus nicht registrieren. Dies kann man allerdings auch in diesem durch MS/MS-Experimente erschließen, indem man im CID-Spektrum des monomeren Molekülions das Natriumaddukt-Ion der (Desoxy)Glucose nachweist. Da hier mit dem Sennosid B ein Homodianthron vorliegt, gilt für die andere Molekülhälfte exakt die gleiche Situation, d.h. jeder Molekülteil muß einen Hexose-Rest tragen. Eine Heterodianthron-Struktur ließe sich bereits im MS²-Spektrum an den dominierenden Molekülionen (Natriumaddukten) der beiden (verschiedenen) monomeren Bausteine erkennen, die dann in den entsprechenden MS³-Spektren Auskunft über eventuelle Zuckersubstituenten - falls vorhanden - geben würden.

Das MS³-Spektrum (861 \rightarrow 699, Negativ-Modus) zeigt neben dem diskutierten Basispeak (m/z 537) mit m/z 655 noch ein zweites wichtiges Fragment, das eine Massendifferenz von 44 zum Mutterion aufweist. Dies kann auf eine C2H4O-Abspaltung (McLafferty-Produkt bei Aldehyden; aus Cyclobutanol-Derivaten) oder eine CO₂-Eliminierung (z.B. bei Carbonsäuren, Estern und Anhydriden) hindeuten; bei stickstoffhaltigen Verbindungen ist auch die Eliminierung von C₂H₅N denkbar. Bei Anthranoiden liegt der Verdacht auf eine Decarboxylierung aus einer Carboxylgruppe als Substituent nahe. Ein derartiger Hinweis war bei den Messungen im positiven ESI-Modus nicht zu erhalten, auch nicht durch MSⁿ-Experimente.

Hier könnte man allenfalls bei Annahme einer Anthronstruktur, aus der Masse des monomeren Aglykons auf die Gesamtmasse aller Substituenten schließen und dann über deren wahrscheinliche Struktur spekulieren.

Das MS^4 -Spektrum (861 \rightarrow 699 \rightarrow 537, Negativ-Modus) entsteht durch Stoßaktivierung von m/z 537 und zeigt als Hauptfragmentierung ebenfalls die Abspaltung eines Neutralteilchens der Masse 44 (m/z 493), die auf eine Carboxylgruppe als Substituent hindeutet (Bild 3-47). Da die Abspaltung der beiden CO₂-Moleküle nicht konsekutiv erfolgt, darf man in diesem Zusammenhang nicht auf die Existenz von zwei Carboxylgruppen schließen.

Gleiches gilt im MS³- und MS⁴-Spektrum bezüglich der jeweiligen H₂O-Eliminierung (Massendifferenz von 18); auch hier kann zunächst nur die Existenz eines weiteren sauerstoffhaltigen Substituenten - in diesem Fall einer Hydroxylgruppe - angenommen werden. Dieser Sauerstoff kann nicht aus der Carboxylgruppe stammen, da eine begleitende CO-Eliminierung nicht beobachtet wird.

Zwei weitere diagnostisch wichtige Fragmente des MS^4 -Spektrums, m/z 268 (m/z 537 - 269) und m/z 224 (m/z 537 - 269 - 44) sind im MS^5 -Experiment aussagekräftiger zu interpretieren.

Das MS^5 -Spektrum (861 \rightarrow 699 \rightarrow 537 \rightarrow 493; Negativ-Modus) wird durch Stoßaktivierung des Ions m/z 493 [(M - H) - (2 Glu) - CO₂] erhalten (Bild 3-48). Als Basispeak wird das Bruchstück m/z 449 registriert, das durch Abspaltung eines Neutralteilchens der Masse 44 (als CO₂ zu interpretieren, s.o.) erzeugt wird. Damit ist eindeutig nachgewiesen, daß das vorliegende Anthranoid zwei Carboxylgruppen besitzt. Als diagnostisch sehr wertvoll sind die beiden Bruchstücke m/z 268 und m/z 224 anzusehen. Unter Berücksichtigung der Informationen aus dem HPLC/ESI-Spektrum (Positiv-Modus) muß das Fragment m/z 268 (dort entsprechend 270) das monomere Anthronaglykon [(1/2 M - H) - Glu] repräsentieren. Wenn bei dessen Entstehung (durch Spaltung der C-10/C-10'-Bindung) als weiteres monomeres Anthronaglykon auch ein Teilchen der Masse m/z 224 (der Massenunterschied von 44 deutet auf eine decarboxylierte Form hin) entsteht, müssen die beiden bisher nachgewiesenen Carboxylgruppen auf verschiedenen Molekülhälften lokalisiert sein.

Diese Interpretation ist allerdings nur zwingend, wenn man eine - nicht sehr wahrscheinliche - Entstehung von m/z 224 sekundär durch Weiterzerfall des Bruchstückes m/z 449 ausschließt. Da die Masse eines unsubstituierten monomeren Anthrons m/z 192 betragen würde, ist entsprechend auch die Existenz von jeweils zwei Hydroxylgruppen auf jeder Molekülhälfte nachgewiesen.

Das CID-Spektrum (MS^6 , Bild 3-49) von m/z 449, dem decarboxylierten (dimeren) Aglykon [(M - H) - (2 Glu) – (2 CO₂)] zeigt erwartungsgemäß das Monomeren-Bruchstück (durch Spaltung der 10/10'-Bindung entstanden) der Masse m/z 224.

Dominiert wird das Spektrum allerdings durch Fragmente, die wie m/z 431 durch Abspaltung von H_2O (Eliminierung einer Hydroxylgruppe) entstehen oder dem Abbau des Anthron-Ringsystems entstammen. So wird z.B. das Fragment m/z 421 durch einen bei Anthrachinonen und Anthronen zu beobachtenden charakteristischen Verlust von CO gebildet.

Die Genese einiger anderer Ionen wie m/z 399 und m/z 374 läßt sich dagegen nicht erklären; dies trifft auch für das durch Abspaltung eines Teilchens der Masse 43 entstandene Fragment m/z 406 zu, dessen Entstehung eine komplizierte Umlagerung unter Einbeziehung der Carboxylgruppe von Ring C bzw. C' erfordert. Das eliminierte Neutralteilchen der Masse 43 muß zwangsläufig die Summenformel C_2H_3O haben.



Bild 3-44: DLI/ESI/Sektorfeld-Massenspektrum des Sennosids B



Bild 3-45: (Negativ-ESI)MS²-Spektrum (\rightarrow 861) des Sennosids B



Bild 3-46: (Negativ-ESI)MS³-Spektrum (861 \rightarrow 699) des Sennosids B



Bild 3-47: (Negativ-ESI)MS⁴-Spektrum (861 \rightarrow 699 \rightarrow 537) des Sennosids B



Bild 3-48: (Negativ-ESI)MS⁵-Spektrum (861 \rightarrow 699 \rightarrow 537 \rightarrow 493) des Sennosids B



Bild 3-49: (Negativ-ESI)MS⁶-Massenspektrum (861 \rightarrow 699 \rightarrow 537 \rightarrow 493 \rightarrow 449) des Sennosids B

3.5.4.5 Zusammenfassung der massenspektrometrischen Untersuchungen des Sennosids B

Bei der HPLC/(PB)MS-Messung des Sennosids B wurde nur das monomere (entglykosidierte) Anthron (mit dem entsprechenden "partiellen" Molekülion m/z 270 als Basispeak) massenspektrometrisch erfaßt, d.h. es gab keine Information über das Molekulargewicht des Gesamtmoleküls.

Obwohl das EI-Spektrum dieses Rheinanthrons in der Wiley-Spektrenbibliothek enthalten ist und seine charakteristischen Hauptfragmente auch im PB-Spektrum auftraten, gelang trotzdem keine positive Identifizierung über diese elektronische Datenbank, weil - speziell im Massenbereich < m/z 150 - das PB-Spektrum durch zahlreiche Störionen überlagert ist. Trotzdem vermittelt dieses PB-Spektrum bei "manueller" Auswertung einige Strukturinformationen wie z.B. den Hinweis auf ein relativ stabiles polyzyklisches System mit mehreren Sauerstoff-Funktionen (mehrfache CO-Abspaltung). Die Abschätzung der Doppelbindungsäquivalente (≥ 8) belegt einen hohen Grad an Ungesättigtheit und läßt ein aromatisches System vermuten.

Das HPLC/(ESI)MS-Spektrum dieses Sennosids wird stark von der gewählten Fragmentorspannung beeinflußt, wobei sich das Spektrum mit der höheren Spannung als aussagekräftiger erwies.

Dominierende und diagnostisch sehr wertvolle Ionen waren hier:

m/z 885 (Natriumaddukt-Ion des Molekülpeaks), m/z 454 (Natriumaddukt-Ion des monomeren Anthronglykosids) und m/z 270 (monomeres Anthronaglykon). Wenn die Dianthronstruktur eines Moleküls bekannt ist, lassen sich aus der im ESI-Spektrum zu beobachtenden dominierenden C-10/C-10'-Bindungsspaltung (und nachfolgender Eliminierung der Zucker) essentielle Strukturinformationen gewinnen, einerseits bezüglich einer Homo- oder Heterodianthron-Struktur des Moleküls und andererseits über die Anzahl der gebundenen Zucker. Auch Zahl und Größe möglicher weiterer Ringsubstituenten lassen sich abschätzen.

Das APCI-Spektrum des Sennosids B ist insofern wesentlich weniger aussagefähig, da es weder eine Information über das Molekulargewicht des Gesamtmoleküls noch eine sichere Aussage bezüglich einer Dimerenstruktur zuläßt, d.h. auffallende Ionen vom Typ $[M + Na]^+$ bzw. $[M + H]^+$ oder m/z 454 (Natriumaddukt des monomeren Anthronglykosids) fehlen.

Erst in Kombination mit den ESI-Daten liefert es interpretierbare ergänzende und bestätigende Informationen mit dem Auftreten der Ionen m/z 270 (monomeres Anthron-Aglykon = Rheinanthron), m/z 433 (monomeres Anthronglykosid) und m/z 537 (Aglykon = Sennidin).

Die DLI/(ESI)MSⁿ-Experimente (im Positiv- und Negativ-Modus) bestätigten einerseits die Ergebnisse der bisherigen MS-Analysen, lieferten darüber hinaus aber noch weitergehende Strukturinformationen, die ausschließlich aus den Spektren im Negativ-Modus gewonnen wurden.

So gelingt eine sichere Determinierung der Masse des Aglykons (Sennidin) sowie der Nachweis zweier Carboxyl- und Hydroxylgruppen, die sich wegen der Homodianthronstruktur gleichmäßig auf die beiden Molekülhälften verteilen müssen.

3.5.5 Massenspektrometrische Untersuchungen des Visnadins



Abschließend soll mit Visnadin noch das massenspektrometrische Verhalten eines Vertreters aus der Naturstoffgruppe der Pyranocumarine untersucht werden. Visnadin $[C_{12}H_{24}O_7; (9R,10R)-(+)-Form]$ ist ein Wirkstoff aus Ammi visnaga-Früchten (Apiaceae) und weist u.a. eine coronargefäßdilatierende Wirkung auf.

3.5.5.1 HPLC/(PB)MS-Messungen

Visnadin ergab unter den gewählten Bedingungen ein deutliches TIC-Signal und lieferte ein gutes Massenspektrum (Bild 3-50).

Dies ließ sich nicht anhand von EI-Spektren elektronischer Datenbanken (Wiley, NIST) identifizieren, da ein derartiges Spektrum dort nicht enthalten war.

Die sehr gute Übereinstimmung unseres PB-Spektrums mit einem über Direkteinlaß des Visnadins erhaltenen EI-Spektrum (Bild 3-51) deutet jedoch darauf hin, daß eine entsprechende automatische Identifizierung über elektronische EI-Datenbanken problemlos möglich wäre.



Bild 3-50: PB-Massenspektrum des Visnadins



Bild: 3-51: Direkteinlass-EI-Spektrum des Visnadins

Die Konvergenz zwischen PB-und EI-Spektrum dieses Pyranocumarins belegt auch bei dieser Substanzklasse das hohe Leistungspotential der PB-Technik (speziell in Kombination mit der HPLC) in der Naturstoffanalytik.

Über die EI-Fragmentierung von Diacyloxydihydrocumarinen und Dihydropyranocumarinen wird bei [62] berichtet.

In Anlehnung daran läßt sich die Bildung der wichtigsten Fragmente im PB-Spektrum des Visnadins folgendermaßen interpretieren (s. Schema 3-13):

m/z 286 (Fragment V1): Entsteht durch Abspaltung des 2-Methylbuttersäurerestes (aus Position 3') unter H-Wanderung.

> Da in Position 4' ein γ -H zur Verfügung steht, darf man als Mechanismus eine McLafferty-Umlagerung unter Säureabspaltung mit Verbleib der Ladung auf dem Cumaringerüst vermuten; der Acetoxy-Substituent in Position 4' scheint die Reaktion sterisch nicht zu behindern.

m/z 271 (Fragment V2): Dieses Ion entsteht aus dem Ion m/z 286 durch Verlust eines Methylradikals aus Position 2'.

Treibende Kraft für diesen - energetisch eigentlich nicht besonders günstigen - Prozeß ist die Ausbildung eines stabilen Benzopyryliumions.

m/z 244 (Fragment V3): Der Essigsäurerest der 4'-Hydroxylgruppe des Dihydropyran-Rings soll nach Literaturangabe [62] beim Vorliegen einer zweiten Acyloxy-Gruppe in Position 3' bevorzugt als Carboxylradikal abgespalten werden (der in Position 3' dagegen als Säure)
Eine derartige Fragmentierung (M - 43) konnten wir bei Visnadin nicht beobachten. Hier erfolgt die Eliminierung der Estergruppe in Position 4' offenbar erst nach der Abspaltung des 3'-Substituenten, d.h. sie geht von Fragment V1 aus.

Auch wird in diesem Fall nicht eine Acyloxy-Gruppe eliminiert sondern die eingezogene Doppelbindung zwischen den Positionen 3' und 4' begünstigt vermutlich die Spaltung der (exocyclischen) allylischen Bindung unter H-Wanderung und Keteneliminierung, so daß das Ion m/z 244 (V3) entsteht.

Eine entsprechende Abspaltung findet vermutlich auch aus dem demetylierten Fragment V2 (m/z 271) statt, was zur Bildung des Basispeaks m/z 229 führt.

Dessen Entstehung erfolgt mit Sicherheit auch (bzw. vornehmlich) aus dem Fragment V3 (m/z 244) durch den Verlust eines Methylradikals in dem Bestreben, ein stabiles Benzopyryliumion auszubilden.

- m/z 201 (Fragment V6): Dieses Ion weist eine Massendifferenz von 28 zu dem Basispeak (m/z 228) auf. Die Abspaltung eines derartigen Teilchens deutet bei Cumarinen in der Regel auf einen CO-Verlust hin.
 Dabei wird zunächst die Carbonylfunktion des Lactonringes unter Ausbildung eines furanoiden Systems eliminiert, wie es etwa beim Dihydropyranocumarin Lomatin beschrieben ist [63].
- m/z 213 (Fragment V5): Beim Abbau der gleichen Verbindung tritt ein Teilchen der in Schema 3-13 wiedergegebenen Struktur auf; es ist sehr wahrscheinlich, daß dieses bei der Fragmentierung des Visnadins auftretende Bruchstück gleicher Masse damit übereinstimmt. Allerdings ist seine Entstehung in diesem Fall nicht ganz klar.
- m/z 175 (Fragment V7): nach Abspaltung der Acetoxygruppe in Position 4' könnte man sich die Entstehung dieses Ions analog zur Fragmentierung des Lomatinacetats (Schema 3-14) vorstellen.



Schema 3-14: Fragmentierung von Lomatinacetat nach Lit.[63]

3.5.5.2 Direkteinlaß/(EI)MS-Messungen

Das über Direkteinlaß gewonnene EI-Spektrum des Visnadins weist eine hohe Übereinstimmung mit den PB-Messungen auf (Bild 3-50 u. 3-51). Auch dieses Beispiel aus der Sekundärstoffgruppe der Pyranocumarine bestätigt die hervorragende Vergleichbarkeit dieser beiden Techniken, auf die bereits bei der massenspektrometrischen Diskussion von Vertretern anderer Naturstoffklassen hingewiesen wurde.

Das EI-Massenspektrum des Visnadins zeigt im Massenbereich m/z > 100 alle signifikanten Ionen des PB-Spektrums, allerdings treten z.T. Intensitätsabweichungen auf. So erscheinen z.B. die Ionen mit einer Nominalmasse < 250 im EI-Spektrum deutlich stärker ausgeprägt. Zusätzlich zeigen sich in diesem Spektrum im Massenbereich von m/z 40 bis m/z 100 weitere relevante Ionen (m/z 43, m/z 57 und m/z 85).

Diese sind im Particle Beam nicht sichtbar, da in diesem Bereich mit Störungen durch Systemverunreinigungen zu rechnen ist und daher dieser Massenbereich in der Regel nicht aufgezeichnet wird. Hierbei handelt es sich um die Fragmente der 2-Methylbuttersäure und der Essigsäure, d.h. der Ringsubstituenten.

3.5.5.3 HPLC/MS(ESI) und HPLC/MS(APCI)-Messungen

Das HPLC/(ESI)MS-Spektrum (Bild 3-52) des Visnadins zeigt eine Reihe charakteristischer Ionen, die sich formal (anhand der Massendifferenzen) plausibel erklären lassen:

m/z 799: Natriumaddukt-Ion des Visnadin-Dimeren $[2 \times M + Na]^+$.

Diese Dimerenbildung scheint bei Naturstoffen nicht häufig zu sein; wir haben sie nur bei diesem Beispiel beobachtet.

m/z 411: Natriumaddukt-Ion des einfachen Moleküls $[M + Na]^+$

m/z 406: H₂O-Addukt des Molekülions m/z 388 $[M + H_2O]^+$

- m/z 329: (Fragment V9); Basispeak, entstanden durch Abspaltung der Acetoxygruppe (aus Position 4') aus dem Molekülion $[M - C_2H_3O]^+$
- m/z 245: (Fragment V10); wird vermutlich aus dem Fragment V9 (m/z 329) durch
 Eliminierung des zweiten S\u00e4urerestes (2-Methylbutters\u00e4ure) aus Pos. 3'
 in Form des Acylrestes nach vorangehender H-Wanderung gebildet.

Das APCI-Spektrum (Bild 3-53) des Visnadins ähnelt sehr dem ESI-Spektrum; es zeigt den gleichen Basispeak (m/z 329) und weist daneben noch die schon diskutierten Ionen m/z 406 und m/z 245 auf. Das Natriumaddukt-Ionen des dimeren Moleküls fehlt jedoch.



Bild 3-52: ESI- Massenspektrum des Visnadins



Bild 3-53: APCI-Massenspektrum des Visnadins

3.5.5.4 DLI/(ESI)MSⁿ-Messungen

Das DLI/(ESI)MS-Spektrum (Sektorfeld/Trap-System) des Visnadins zeigt - mit Ausnahme von m/z 406 - alle charakteristischen Ionen des HPLC/(ESI)-Massenspektrums (Bild 3-53), allerdings treten diese in anderen Intensitätsverhältnissen auf (vgl. Kapitel 3.5.5.3 und Bild 3-54): m/z 799: $[2 \times M + Na]^+$ m/z 411: $[M + Na]^+$ m/z 329: $[(M + Na) - (Na-Acetat)]^+$ m/z 245: $[(M + Na) - (Na-Acetat) - C_5H_8O]^+$.

Darüber hinaus sind hier jedoch noch weitere diagnostisch hilfreiche Ionen zu erkennen, die u.a.auch das Molekulargewicht weiter absichern und die sich formal (auf Basis der Massendifferenzen) folgendermaßen interpretieren lassen: m/z 429: $[M + Na + H_2O]^+$

 $m/z \ 351: \left[(M + Na) - C_2H_4O_2 \right]^+$ $m/z \ 227: \left[M - C_2H_3O_2 - C_5H_8O - H_2O \right]^+$ $m/z \ 199: \left[M - C_2H_3O_2 - C_5H_8O - H_2O - CO \right]^+.$

Das MS²-Spektrum (Stoßaktivierung von m/z 411) läßt einige dieser Ionen erkennen (Bild 3-55):

- m/z 351 (V8): als Basispeak nach Abspaltung des Acetoxyrestes in Form von Essigsäure aus Position 4' aus dem Natriumaddukt-Ion des Molekülpeaks [(M + Na) - Essigsäure]⁺- vermutlich unter Ausbildung einer Doppelbindung zwischen C-3' und C-4'.
- m/z 329 (V9): Eliminierung von Na⁺ und des Acetoxyrestes, vermutlich als Na-Acetat $[(M + Na) - Acetoxy - Na]^+$.
- m/z 245 (V10): zusätzlicher Verlust des 2-Methylbutyrylrestes und Wasserstoff aus m/z 329
- m/z 227: durch Wasserabspaltung aus m/z 245

Bei Stoßaktivierung des Molekülions (Natriumaddukt-Ion) des Visnadins wird demnach bevorzugt der Substituent in Position 4' abgespalten und zwar in Form von Essigsäure nach H-Abstraktion aus Position 3' (V8). Der Substituent in Position 3' (2-Methylbuttersäurerest) dagegen wird auf andere Weise über eine H-Umlagerung eliminiert, wobei eine Hydroxylgruppe in Position 3' verbleibt. Dies geschieht anscheinend aus dem Ion m/z 329 (V9) wie das entsprechende CID-Spektrum (MS³, Bild 3-56) zeigt, wo das Fragment m/z 245 (V10) als Basispeak auftritt. Dieses kann offenbar noch H₂O verlieren (m/z 227), vermutlich unter Beteiligung der Hydroxylgruppe in Position 3'.

Diese Reaktion beobachtet man auch im CID-Spektrum von m/z 245 $[MS^4(411 \rightarrow 329 \rightarrow 245];$ allerdings dominieren hier zwei andere Abbauprozesse:

Zum einen wird eine Decarbonylierung beobachtet, durch die ein Ion der Masse m/z 217 entsteht. Bei dieser Fragmentierung könnte entweder die Ketogruppe des Lactonringes unter Ausbildung eines furanoiden Systems (vgl. Schema 3-13, V6) eliminiert werden oder - nach H-Migration - die Sauerstoff-Funktion in Position 3' als CO abgespalten werden.

Das zweite dominierende Fragment mit der Masse m/z 175 muß durch Fragmentierung des Dihydrofuranringes entstehen; seine Struktur dürfte der von V7 in Schema 3-14 entsprechen.





Bild 3-54: DLI/ESI/Sektorfeld-Massenspektrum des Visnadins



Bild 3-56: MS³-Spektrum (411 \rightarrow 329) des Visnadins



Bild 3-57: MS^4 -Spektrum (411 \rightarrow 329 \rightarrow 245) des Visnadins

3.5.5.5 Zusammenfassung der massenspektrometrischen Messungen des Visnadins

Das Pyranocumarin Visnadin ergab sowohl unter Elektronenstoßionisierung (Direkteinlaß) als auch im HPLC/(PB)MS fragmentreiche Spektren mit charakteristischen Ionen, die ein hohes Maß an Übereinstimmung aufwiesen.

Eine Identifizierung des PB-Spektrums über elektronische Datenbanken wäre deshalb ohne weiteres möglich, allerdings enthielten weder die Wiley- noch die NIST-Bibliothek das entsprechende EI-Referenzspektrum.

Das PB-Spektrum des Visnadins ist maßgeblich durch Ionen geprägt, die durch Eliminierung von Ringsubsubstituenten (als 2-Methylbuttersäure, Keten (aus dem Acetoxyrest) und Methylradikal) entstehen.

Ohne Vergleichsspektren erscheint demnach die Ableitung von Strukturelementen bei einem zu analysierenden unbekannten Pyranocumarin alleine aus dem PB-Spektrum aus mehreren Gründen schwierig zu sein:

Zum einen sind keine spezifischen Ionen im Spektrum des Visnadins vorhanden, die generell ein Erkennen dieses Grundgerüstes erlauben. Außerdem sind die beobachteten Massendifferenzen ohne Kenntnis des Grundgerüstes wenig aussagefähig und zudem vieldeutig; allenfalls eine - unspezifische - Abspaltung von einem CH₃-Radikal darf mit hoher Wahrscheinlichkeit postuliert werden.

Zusätzlich wird die Interpretation durch die Tatsache erschwert, daß im PB-Spektrum des Visnadins die Intensität der Ionen im höheren Massenbereich deutlich geringer ausgeprägt ist als im konventionellen EI-Spektrum, was die sichere Determinierung des Molekülpeaks problematisch macht (vgl. Bild 3-50 und Bild 3-51).

Das HPLC/(ESI)MS-Spektrum ist in diesem Zusammenhang sehr hilfreich, da es durch die Ionen $[2 \times M + Na]^+$, $[M + Na]^+$ und $[M + H_2O]^+$ eine zuverlässige Bestimmung des Molekulargewichtes gestattet und somit eine gesicherte Interpretationsbasis schafft. Auch die Abspaltungen von zwei Teilchen der Nominalmasse 59 und 84 lassen sich hier und im APCI-Spektrum erkennen und bei Kenntnis der Grundstruktur zuordnen (Acetoxy- und 2-Methylbutyroxy-Rest).

Es gilt jedoch auch hier, daß die Interpretation dieser Massen vieldeutig ist und erst aussagekräftig wird bei der Kenntnis der Pyranocumarin-Grundstruktur, die jedoch aus diesen Spektren noch weniger ableitbar ist als aus einem PB-Spektrum. Anhand der DLI/(ESI)MSⁿ-Experimente läßt sich die Fragmentbildung beim Visnadin gut erklären; beim Vorliegen einer unbekannten Grundstruktur könnte die relativ späte Eliminierung von CO erst nach Abspaltung der beiden bereits erwähnten Teilchen der Masse 60 (bzw. 59) und 84 als Hinweis auf ein zyklisches System mit Carbonyl- oder Carboxylfunktion im Ring gedeutet werden. Diese Information und die Tatsache, daß außer H₂O keine anderen interpretierbaren Abspaltungen zu beobachten sind, würde auf ein polyzyklisches System hinweisen. Die abgespaltenen Bruchstücke müßten dann als Substituenten gedeutet werden.

Damit wird deutlich, daß die MSⁿ-Experimente gerade bei unbekannten Strukturen dieses Typs sehr viel weitergehende Informationen vermitteln können, auch wenn die Pyranocumarin-Grundstruktur als solche direkt nicht ableitbar war.

3.6 Ergebnis der massenspektrometrischen Untersuchungen von ausgewählten Naturstoffstandards

Die Ergebnisse dieses massenspektrometrischen Untersuchungskomplexes sollen hier nicht gesondert zusammengefaßt werden; es sei diesbezüglich einerseits auf die ausführliche Zusammenfassung der einzelnen Kapitel verwiesen und zum anderen auf die anschließende Gesamtzusammenfassung dieser Arbeit.

4. Zusammenfassung

Bei der Suche nach neuen pharmazeutischen Wirkstoffen spielen die Naturstoffe mit ihrer strukturellen Vielfalt eine wichtige Rolle. Durch das High-Throughput-Screening (HTS) können sehr schnell bioaktive Substanzen gefunden werden. Auf diesem Sektor gelang der Fa. EVOTEC OAI mit dem EVOscreen[®]/NACONA-System eine revolutionäre Entwicklung, mit der es möglich ist, die Bioaktivität einzelner Komponenten in einer komplexen Mischung direkt aus dem HPLC-Lauf heraus zu testen. Mit diesem Konzept ist eine wesentlich gezieltere und effizientere Suche nach bioaktiven Naturstoffen möglich, da - anders als bisher - eine aufwendige Isolierung erst **nach** positivem Aktivitätsbefund vorgenommen wird. Auf Basis dieser innovativen Technologie wurde von der Fa. Evotec OAI als Projektkoordinator das **BMBF Leitprojekt "Validierte Lead/Target Systeme - eine horizontal integrierte Verbundstruktur zur automatisierten Pharma-Wirkstofffindung ("Drug Discovery Machine")" als Kooperation zwischen Industrie und verschiedenen Hochschulgruppen initiiert. In dem in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Teilprojekt:**

"**Pharmakologisch wirksame Inhaltsstoffe einheimischer Pflanzen**" wurden ca. 800 Pflanzen und Pilze mit Extraktionsmitteln verschiedener Polarität ausgezogen, die Extrakte aufgetrennt und als solche oder in Form bestimmter Fraktionen an das HTS übergeben, um darin neue, bioaktive Komponenten zu detektieren.

Im Rahmen dieser HPLC/HTS-Analysen bzw. deren Vorbereitung kristallisierten sich sehr schnell zwei grundlegende Probleme heraus:

- 1. Zum einen erforderte die Vielzahl der sehr heterogenen und in ihrer Zusammensetzung sehr unterschiedlichen Naturstoffextrakte jeweils eine an diese Verhältnisse angepaßte schnelle Optimierung der HPLC-Trennparameter und
- 2. zum anderen müssen nach der Determinierung einer bioaktiven Hitkomponente mittels HPLC/HTS möglichst umgehend strukturelle Informationen über diese Verbindung generiert werden, um effizient weiterarbeiten zu können. Es ist in diesem Zusammenhang einleuchtend, daß es keinen Sinn macht, einerseits Bioaktivitätsbestimmungen von mehreren 100 Peaks pro Tag durchführen zu können, auf der anderen Seite aber viele Tage auf Strukturinformationen von nur einer einzigen Hitkomponente warten zu müssen.

Hauptthema meiner vorliegenden Arbeit war deshalb, Lösungswege für diese beiden Problempunkte beim Einsatz der HPLC/HTS-Kopplung zu erarbeiten.

Zu Punkt 1.:

Das Ziel einer jeweiligen schnellen Optimierung der HPLC-Trennbedingungen bei häufig wechselnden Proben sehr unterschiedlicher Zusammensetzung schien uns nur erreichbar unter Einsatz einer komplexen, leistungsfähigen, automatischen Trennoptimierungssoftware wie der neu entwickelten ChromSword[®]Auto, deren Möglichkeiten und Grenzen bei der Naturstoffanalyse es im Rahmen dieser Arbeit auszuloten galt.

Im einzelnen wurden dazu folgende Untersuchungen durchgeführt:

• Vollautomatische Trennoptimierung einer Cumarin-Mischung:

Von der ChromSword[®]-Software wurden Vorschläge für vier Methoden im Gradienten und zwei Methoden im isokratischen Betrieb, mit den dazugehörigen Chromatogrammen in 62,3 Stunden erzeugt.

Die Laufzeiten in den Vorschlägen waren sehr hoch, aber die eigentliche Trennung war nach ca. der Hälfte bzw. 2/3 der Zeit abgeschlossen. Auch wenn die angestrebten Parameter, wie Retentionsfaktor und Auflösung nicht immer erzielt wurden, kann die von ChromSword[®]Auto durchgeführte vollautomatische Trennoptimierung als gute Grundlage für weitere Optimierungsschritte dienen.

• Virtuelle Trennoptimierung einer Cumarin-Mischung mit empirischen Daten: Unter Berücksichtigung der experimentellen Daten aus der vollautomatischen Trennoptimierung konnte ChromSword[®]Auto, für die Cumarin-Mischung eine Anpassung an die Parameter der EVOscreen[®]NACONA berechnen. Nach virtueller und experimenteller Trennoptimierung wurde - trotz bestimmter Einschränkungen - eine gute Übereinstimmung der Chromatogramme in Bezug auf Peakreihenfolge und Peakintensität erzielt. Somit kann bei der Änderung oder Übertragung von Methoden, nach virtueller Trennoptimierung mit empirischen Daten, bereits **zuvor** eine Beurteilung der Chromatographie erfolgen.

• Virtueller Sorbentienwechsel am Beispiel einer Cumarin-Mischung:

Die ChromSword[®]-Software erstellte nach dem virtuellen Sorbetienwechsel eine Simulation mit den geforderten Parametern für den Gradientenbetrieb. Auch in diesem Fall waren - trotz einiger Einschränkungen - die Chromatogramme aber in Bezug auf Peakreihenfolge und Peakintensitäten miteinander vergleichbar. Durch die Verwendung der Sorbentiendatenbank kann bei der Methodenentwicklung auf einen zeitaufwendigen Austausch oder den teuren Neuerwerb einer Säule verzichtet werden.

Für eine vollautomatische On-Line-Trennoptimierung im HTS mit der EVOscreen[®]NACONA ist ChromSword[®]Auto auf Grund der vorgeschlagenen langen Analysenzeiten nicht nutzbar. Jedoch kann sie bei der Anpassung von Methoden hinzugezogen werden, um schnell auf neue Bedingungen (z.B. Säurezusatz, Wechsel von Laufmittel und Säulenmaterial) reagieren zu können. Der Einsatz dieser Software ermöglicht, wie am Beispiel des im Diabetes-Typ-II-Assay bioaktiven Pilzextraktes von Lenzites betulina gezeigt, die Präoptimierung und die vollautomatische Trennoptimierung eines unbekannten Extraktes auf eine maximale Peakanzahl.

Hierzu wurden dem Lenzites betulina-Extrakt 3 bekannte Naturstoffstandards zugesetzt. ChromSword[®]Auto konnte 10 Gradientenvorschläge generieren.

Dies zeigt, daß die ChromSword[®]-Software in der Lage ist die Trennoptimierung von Naturstoffstandards, mit "Verunreinigungen" in Form eines Extrakts durchzuführen und somit für die Methodenentwicklung von komplex zusammen gesetzten Extrakten genutzt werden kann.

Zu Punkt 2.:

Die im Rahmen der HPLC/HTS-Kopplung anfallenden sehr großen Datenmengen sind nur effizient weiter zu verarbeiten, wenn parallel möglichst schnell Strukturinformationen über detektierte "Hit-Komponenten" zur Verfügung stehen.

Es sollte deshalb untersucht werden, inwieweit und welche derartigen Daten mit verschiedenen massenspektrometrischen Methoden - die mit der HPLC koppelbar sind - von Vertretern einzelner Naturstoffklassen zu erhalten sind. Dabei ist z.T. auch der Einfluß der Aufnahmeparameter auf den Spektrenhabitus studiert worden. Insgesamt wurden ca. 70 Referenzverbindungen aus sechs verschiedenen Naturstoffgruppen (Cumarine, Phenylpropane, Flavonoide, Anthrachinone, Bitterstoffe, Herzglykoside) mit unterschiedlichen massenspektrometrischen Techniken (Particle Beam, ESI, APCI und z.T. auch (ESI)MSⁿ und konventioneller EI) analysiert. Die Leistungsfähigkeit dieser Methoden wurde am Beispiel von fünf ausgewählten Repräsentanten (Cumarin, Digitoxin, Robinin, Sennosid B, Visnadin) im Detail diskutiert.

Die Ergebnisse dieser massenspektrometrischen Untersuchungen ausgewählter Naturstoffe lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- 1) Die HPLC/(Particle Beam)MS-Technik hat sich als sehr wertvolle und leistungsfähige Methode für die Analyse von Naturstoffextrakten erwiesen (vgl. dazu auch die Zusammenfassung in 3.4.1):
 - Nicht-glykosidische Vertreter und Aglykone zahlreicher Naturstoffgruppen (mit einem Molekulargewicht < 1000 Dalton) lassen sich sehr gut mittels der PB-Technik analysieren, selbst wenn sie verschiedene polare Gruppen besitzen. Sie liefern fragmentreiche Spektren, die eine hohe Übereinstimmung mit den entsprechenden EI-Massenspektren großer elektronischer Datenbanken aufweisen und folglich darüber identifizierbar sind. Auch bei fehlenden Referenzspektren sind aus derartigen (fragmentreichen) PB-Spektren in vielen Fällen anhand von konventionellen EI-Spektren bekannten Fragmentierungsregeln Strukturinformationen ableitbar.
 - Überraschenderweise ergaben unsere Untersuchungen, daß z.T. selbst eine Reihe sehr unterschiedlicher Glykoside wie Esculin, Frangulin A und Hyperosid trotz des polaren Zuckeranteils durchaus mittels der PB-Technik zu analysieren waren. Allerdings konnten nur die Spektren der entsprechenden Aglykone registriert werden.
 - Bei Herzglykosiden enthielten die Spektren dagegen auch intensive Ionen, die aus der Fragmentierung der Zuckerkette stammten, so daß keine Identifizierung anhand des Aglykon-(EI)-Spektrums möglich war.
 - Im Falle der Flavonoide zeigte sich, daß Substanzen dieser Naturstoffgruppe im HPLC/(PB)MS mit unterschiedlichen Empfindlichkeiten registriert wurden.

- Auch einige nicht-glykosidische Verbindungen (bestimmte Cumarine) waren mittels HPLC/(PB)MS nicht zu untersuchen; z.T. kann dies vermutlich ihrer relativ hohen Flüchtigkeit zugeschrieben werden.
- Bei den PB-Messungen konnte in einer Reihe von Fällen eine deutliche Beeinflussung des Meßergebnisses durch Variationen der Temperatur von Nebulizer und Expansion Region erzielt werden, wobei keine generell gültige Tendenz zu erkennen war. Die optimalen Temperaturverhältnisse müssen für jede Substanzgruppe (z.T. sogar Komponente) individuell ermittelt werden.
- 2) Konventionelle EI-MS Messungen über den Direkteinlaß setzen zuvor isolierte Substanzen voraus, d.h. sie spielen im Zusammenhang mit dem HPLC/On-Line-Screening keine Rolle. Diese Spektren wurden von uns nur in Einzelfällen zum Vergleich mit den entsprechenden HPLC/PB-Spektren aufgenommen und bestätigten einmal mehr die sehr gute Übereinstimmung zwischen diesen beiden Spektrentypen; eine Beobachtung, die insofern verständlich ist, da ja auch beim Particle Beam die Ionisierung letztlich mittels Elektronenstoß erfolgt.
- 3) Insbesondere bei fehlenden Referenzspektren ist der Einsatz der ESI- und APCI-Technik (in Kopplung mit der HPLC) unumgänglich. Fast alle von uns untersuchten Verbindungen waren mit diesen - sehr universell einsetzbaren -Techniken analysierbar, die oft komplementäre Informationen vermittelten. Die Elektrospray-Ionisierung erwies sich als sehr wertvolle Methode bei der massenspektromerischen Analyse verschiedener Naturstoffgruppen, da sie - meist anhand mehrerer z.T. starker Ionen wie [M + H]⁺, [M + H₂O]⁺, [M + Na]⁺, selten auch [2 x M + Na]⁺, eine zuverlässige Determinierung des Molekülions gestattet. In einer Reihe von Fällen gelang dadurch auch eine wesentlich fundiertere und weitergehendere Interpretation der PB-Spektren. Daneben traten insbesondere in den ESI-Spektren von Glykosiden z.T. charakteristische Ionen auf, die wichtige Strukturinformationen vermittelten: So zeigt z.B. das Spektrum des Digitoxins aber auch das des Flavonols Robinin Fragmente, die durch Abspaltung von einem, zwei und drei Zuckerresten entstanden sind.

Bei Dianthronen wie dem Sennosid B dagegen besteht die Hauptfragmentierung in der Dimerenspaltung (Bruch der C-10/C-10'-Bindung) unter Entstehung des monomeren Anthronglykosids (Natriumaddukt-Ion); als zweite diagnostisch wertvolle Spezies entsteht hieraus durch Glucose-Eliminierung das monomere Aglykon. Daraus lassen sich essentielle Strukturinformationen gewinnen, einerseits bezüglich einer Homo- oder Heterodianthron-Struktur des Moleküls und andererseits über die Anzahl der gebundenen Zucker. Auch Zahl und Größe möglicher weiterer Ringsubstituenten lassen sich abschätzen.

Pyranocumarine vom Typ des Visnadins verlieren offenbar im ESI-Spektrum bevorzugt die Substituenten des Dihydropyranringes; zumindest eines dieser Fragmente ist sehr intensiv.

Über die HPLC/(APCI)MS-Spektren der untersuchten Substanzen läßt sich generell sagen, daß sie oft "sauberer" (weniger Störionen von Verunreinigungen u.a.) und fragmentärmer waren als die ESI-Spektren und mit wenigen Ausnahmen (z.B. Cumarin) keine sichere Molekulargewichts-Determinierung zuließen (Quasi-molekülionen fehlen oder sind sehr schwach). Trotzdem erwiesen sich diese APCI-

Spektren oft als sehr hilfreich; einerseits, weil sie in vielen Fällen eine zusätzliche Bestätigung - zumindest partieller - ESI-Resultate lieferten, zum anderen aber insbesondere, weil sie diese durch komplementäre Informationen erweitern.

So findet man nur in den APCI-Spektren des Digitoxins ein Fragment, das durch Abspaltung von zwei Zuckerketten aus dem Molekülion entstanden ist sowie Ionen, die über einen weitergehenden Zerfall des Aglykons (speziell des Lactonringes) Auskunft geben.

Im APCI-Spektrum des Flavonols Robinin ist der Verlust des dritten Zuckerrestes wesentlich sicherer zu erkennen als im ESI-Spektrum, da die entsprechende Ionenspezies hier den Basispeak verkörpert. Im APCI-Spektrum des Dianthronglykosids Sennosid B treten schließlich mit den Fragmenten des monomeren Anthronglykosids und dem dimeren Aglykon Sennidin zwei diagnostisch wertvolle Fragmente auf, die in der ESI-Aufnahme fehlen.

 Die abschließenden DLI/(ESI)MSⁿ-Messungen einzelner Vertreter unterschiedlicher Naturstoffgruppen wurden durchgeführt, um auszuloten, in welchem Maße weitergehende Strukturinformationen mit dieser aufwendigen Analysentechnik zu erhalten sind.

Natürlich sind diese Messungen auch in Kopplung mit der HPLC durchführbar; da wir jedoch einzelne Naturstoffstandards vermessen haben, war die Einführung über die "Direct Liquid Introduction" sinnvoller. Die Ergebnisse der MSⁿ-Experimente lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

• Die (ESI)MSⁿ-Daten erwiesen sich prinzipiell als ein sehr wertvolles Werkzeug bei der massenspektrometrischen Strukturaufklärung. Sie dienten uns einerseits zur Bestätigung oder sichereren Interpretation massenspektrometrischer Informationen anderer Quellen (PB, ESI, APCI), da auf diese Weise die Genese einzelner Fragmente zuverlässiger ableitbar war und damit auch ihre Deutung.

Auf der anderen Seite konnten durch die konsekutiven CID-Experimente (bis MS^6) in manchen Fällen auch detailliertere strukturelle Zusammenhänge erkannt und z.T. weitere (neue) Partialstrukturen abgeleitet werden.

Dies war z.B. der Fall beim Flavonol Robinin, wo durch Auftreten eines starken Ions vom Typ $[(Gal + Glu) + Na]^+$ im MS³-Spektrum der sichere Beweis einer Disaccharidkette erbracht werden konnte, so daß damit auch die im normalen ESI-Spektrum beobachtete Abspaltung der einzelnen Zucker korrekt zu interpretieren war.

- Eine andere Situation lag bei dem zur Sekundärstoffgruppe der Pyranocumarine zählenden Visnadin vor. Zwar kann man auch hier die Hauptfragmente (PB-, ESI-, APCI-Daten) anhand der MS/MS-Daten gut erklären; beim Vorliegen einer unbekannten Verbindung ist eine Pyranocumarin-Grundstruktur aber auch mittels dieser Technik nicht ableitbar. Allerdings lassen sich aus den MSⁿ-Daten Hinweise auf ein zyklisches System mit Carbonyl- oder Carboxylfunktionen entnehmen und dann die auch in anderen Spektren beobachteten Abspaltungen eines Acetoxy- und 2-Methyl-butyroxy-Restes als Ringsubstituenten deuten.
- Beim Dianthron Sennosid B dagegen bestätigte die positive (ESI)MSⁿ-Analyse lediglich die bereits mit anderen MS-Techniken gewonnenen Erkenntnisse, lieferte aber keine neuen Strukturinformationen. Als wesentlicher Grund hierfür
ist sicher die Tatsache anzusehen, daß die Primärfragmentierung (MS²) fast ausschließlich in der Dimerenspaltung besteht und beim MS³-Experiment das dominierende Hauptfragment das Natriumaddukt-Ion der Desoxy-Glucose darstellt.

Es stellte sich aber heraus, daß es bei Verbindungen dieses Typs mit so vielen elektronegativen Substituenten wesentlich vorteilhafter ist, ESI-Messungen im Negativ-Modus zu betreiben, d.h. die entsprechenden negativen Ionen zu registrieren und mit diesen die MS^n -Experimente durchzuführen.

Auf diese Weise konnten sehr detaillierte Strukturinformationen erhalten werden: So gelang - neben einer Bestätigung und sichereren Interpretation der ESI- und APCI-Daten - nur auf diese Weise eine zuverlässige Determinierung des dimeren Aglykonions sowie der Nachweis zweier Carboxyl- und Hydroxylfunktionen bei entsprechender Homodianthronstruktur.

Zusammenfassend haben unsere massenspektrometrischen Untersuchungen ergeben, daß es notwendig ist, alle gängigen HPLC/MS-Verfahren einzusetzen um im Rahmen von HTS-Untersuchungen von Naturstoffextrakten möglichst schnell soviel Strukturinformationen wie möglich über detektierte bioaktive Komponenten zu erhalten.

Die MS/MS-Technik erwies sich in diesem Zusammenhang zwar als sehr wertvolles Werkzeug bei der massenspektrometrischen Strukturaufklärung; als limitierender Faktor dieser aufwendigen Untersuchungstechnik ist jedoch der deutlich höhere Zeitund u.U. auch Personalaufwand anzusehen, der eine Anwendung in der Routineanalytik ausschließt.

Letzteres gilt sicher auch für die uns leider nicht zugängliche aber inzwischen etablierte HPLC/NMR-Kopplung, die detailliertere weitere Strukturinformationen anderer Art zur Verfügung stellen kann und auf die zukünftig auf diesem Arbeitsgebiet sicher nicht verzichtet werden kann.

5. Summary

When searching for new drugs, compounds from natural sources displaying a high degree of structural diversity play an important role. By applying High-Throughput-Screening (HTS) technology, a more rapid discovery of biological active components is possible.

In this field EVOTEC OAI enterprise succeeded in developing a revolutionary screening technology with the EVOscreen[®]/NACONA-System being connected to an HPLC. It allows to detect bioactivity of single compounds directly from an HPLC run. This concept gives rise to a much more selective and efficient search for biological active metabolites since - in contrast to existing approaches - time-consuming isolation processes are only started when activity has been discovered **previously**.

Based on this innovative technology EVOTEC OAI initiated the "BMBF Leitprojekt Validierte Lead/Target Systeme - eine horizontal integrierte Verbundstruktur zur automatisierten Pharma-Wirkstofffindung ("Drug Discovery Machine")", a cooperation between industry and research groups of several universities.

In the project part described in this thesis which was titled "**Pharmakologisch wirksame Inhaltsstoffe einheimischer Pflanzen**" about 800 plants and fungi were extracted with solvents of different polarities. Then these extracts were separated and subjected to HTS analysis in total or as fractions, in order to detect new bioactive constituents. In the course of HPLC/HTS analysis two fundamental problems arose:

- 1. the great number of different extracts, complex and heterogeneous in nature requires a rapid adaption and optimization of the HPLC separation parameters
- 2. after determination of a bioactive metabolite during HPLC/HTS analysis it is necessary to get structural information about this hit compound as quick as possible. The reason is that it makes no sense to have a screening machine on the one hand being able to perform bioactivity measurements of several 100 HPLC peaks a day and on the other hand waiting several days for any structural information of one single hit compound.

Therefore, the main subject of this thesis was to find solutions for these two problems of HPLC/HTS analysis.

Ad 1.:

The aim to rapidly optimize and adapt HPLC separation conditions when dealing with numerous samples of varying composition seemed difficult to achieve. In our opinion it requires the application of a method developing software like the new designed ChromSword[®]Auto being capable of automatically optimizing HPLC separation. Thus, efficiency and limits of this software should be explored in this work. In detail the following investigations were carried out:

• fully automated method development for separating a coumarin mixture: The ChromSword[®]-Software calculated four gradient and two isocratic methods with the chromatograms included within 62.3 hours. It is true that the run time of these suggestions was rather high but actually the separation process had already been finished after half and two thirds of the time, respectively.

Although the desired parameter values of retention factor and resolution could not be achieved in every case this automatic method development of ChromSword[®]Auto has turned out to be a good basis for further optimization processes.

virtual method development for separating a coumarin mixture under consideration of empirical data:
Under consideration of the experimental data from the fully automated method development ChromSword[®]Auto was able to calculate the virtual separation of the coumarin mixture using the EVOscreen[®]NACONA parameters. After a virtual and experimental optimization of compound separation the chromatograms were in good congruence with respect to order and intensity of the peaks despite some limitations.

Thus, when changing and transferring methods one should execute a virtual method development on basis of empiric data since then it is possible to prejudge the chromatographic results **before** any experiments have been started.

• virtual change of sorbent demonstrated by using a coumarin mixture: After a virtual change of the sorbent had been initiated, ChromSword[®]Auto generated a simulation using the postulated parameters for gradient elution. Again we found that the chromatograms were well corresponding concerning

order and intensity of the peaks in spite of some restrictions. Method development with using a sorbent database means to avoid a timeconsuming replacement of the column and an expensive buy perhaps proves to be not necessary.

• Since the calculated chromatograms of ChromSword[®]Auto generally exhibit rather long run times this software cannot be applied for on-line-method development on the EVOscreen[®]NACONA system.

However, it can help if methods must be adapted in order to rapidly react on new conditions (e.g. addition of acid to the mobile phase, change of solvent and stationary phase). This software also enables pre-optimization and fully automated method development of an extract of unknown composition aiming to separate a maximum number of peaks. This was demonstrated for an extract of the fungi Lenzites betulina showing bioactivity in a diabetes-type-II-assay. After having added three known reference compounds to this extract, ChromSword[®]Auto offered ten different gradient methods.

This proves that the capability of this software to optimize the separation of reference compounds among an extract as "impurity" can be applied successfully for automatic method development of a complex mixture of unknowns.

Ad 2:

The great number of data can only be processed and evaluated efficiently, if structural information from the "hit-compounds" detected are available as quick as possible.

Therefore, we investigated members of various compound classes to find out what kind of information could be obtained from different mass spectrometric methods coupled with HPLC.

In this connection also the influence which some instrument parameters exercised on the spectral appearance was studied.

In total, about 70 reference substances deriving from six natural compound classes (coumarins, phenylpropanoids, flavonoids, anthraquinones, bitter substances, cardiac glycosides) were investigated by several mass spectrometric techniques (Particle Beam, ESI, APCI and to some extent also (ESI)MSⁿ and common EI). The capability of these methods was discussed exemplarily in detail for five selected natural constituents (coumarin, digitoxin, robinin, sennoside B, visnadin).

The result of these mass spectrometric investigations can be summarized as follows:

- 1) HPLC/(Particle Beam)MS has proven to be a valuable and powerful technique for analyzing plant extracts (see also 3.4.1):
 - Non-glycosidic members and aglycones of many natural compound groups (molecular weight < 1000 Dalton) could be analyzed successfully, even if they bear several polar groups. They show spectra rich in fragments which were in very good accordance with the corresponding EI spectra of great electronic mass spectral databases so that substances could be identified in this way.

If EI spectra are not available, structural information can be deduced from the fragmentation pattern of these PB spectra by applying common fragmentation rules known from EI spectra.

- To our surprise, our studies revealed that even some glycosides as esculin, frangulin A and hyperosid being quite different in structure could be measured by particle beam. However, only the spectra of the corresponding aglycones were obtained.
- In contrast, the spectra of cardiac glycosides additionally exhibited strong ions, deriving from the fragmentation of the sugar-chain. Therefore, no identification was possible by comparing them with the corresponding EI mass spectra of the pure aglycones.
- In case of flavonoids we found that members of this compound class were analyzed with different sensitivity by HPLC/(PB)MS.
- Some non-glycosidic substances (e.g. some coumarins) could not be measured by HPLC/(PB)MS too, presumably because of their volatility.
- In some cases we observed a strong influence on the sensitivity of particle beam signals by changing the temperature of nebulizer and expansion region. However, no regulary trend was recognized, i.e. optimal temperatures have to be determined individually for each compound group and even compound, respectively.

2) Common EI-MS measurements (introduction through direct inlet) are usually performed with pure isolated components, i.e. this technique plays no role in the field of HPLC/On-Line-Screening.

That is why we only exceptionally recorded spectra of this type in order to compare them with HPLC/PB spectra.

In general, both spectra were in very good accordance, probably due to the fact that in both cases ionization was done by electron impact.

3) Particularly, if reference spectra for identification are not available, other ionization techniques like ESI and APCI (in connection with HPLC) must be employed. Nearly all of our samples could be analyzed with these mass spectrometric techniques which often provided complementary structural information and covered a broad range of compound types.

Electrospray ionization proved to be a valuable tool for analyzing natural constituents since it generates the ions $[M + H]^+$, $[M + H_2O]^+$, $[M + Na]^+$, and sometimes $[2 \times M + Na]^+$, partly with high abundances. This allowed a reliable determination of the molecular peak so that sometimes also a more well-founded and extensive interpretation of the particle beam spectra was possible.

Apart from that, particularly in the ESI spectra of some glycosides specific ions appeared conveying essential structural information: e.g. the spectra of digitoxin and robinin displayed fragments formed by the loss of one, two and three sugar moieties.

In contrast, the main fragmentation of sennoside B was the fission of the C-10/C-10'-bond forming the two monomeric anthrone glycosides (as Na-adduct ions). Subsequent ejection of glucose yielded the monomeric aglycone. From these ions essential structural information could be gathered both concerning a homo- or heterodianthrone structure and the number of bonded sugars. Moreover, the occurrence of any further substituents could be estimated.

Pyranocoumarins of the visnadin-type obviously favour the loss of substituents from the dihydropyran ring; at least one of these ions is of high abundance.

In general we found HPLC/(APCI) spectra to be more "clean" (exhibiting less ions from contaminants) and to contain a lower number of fragments compared with ESI.

Apart from that a reliable determination of the molecular weight often was not possible (except e.g. for coumarin) since quasi-molecular ions were absent or too weak.

Nevertheless these APCI spectra often turned out to be helpful, on the one hand confirming results gained from ESI measurements and on the other hand complementing these data by delivering additional structural information.

E.g., in the case of digitoxin only the APCI spectrum shows a fragment originating from the molecular ion by loss of two sugar moieties and ions indicating a further decomposition of the aglycone (in particular of the lactone ring).

From the APCI spectrum of the flavonol robinin the loss of the third sugar can be recognized much easier than from the ESI spectrum because under APCI conditions the specific ion represents the base peak.

Finally, in the APCI spectrum of the dianthrone glycoside sennoside B the characteristic fragments representing the monomeric anthrone glycoside and the dimeric aglycone sennidin arise which are of diagnostic value and are deficient in the ESI record.

4) The DLI/(ESI)MSⁿ experiments have been performed of selected representatives of different natural compound classes to find out, to what degree further structural increments could be established by applying such sophisticated technique. Naturally, these measurements could also have been done in coupling with HPLC, but since we have only analyzed single reference components, introduction via DLI ("Direct Liquid Introduction") seemed to be more appropriate.

The results of these MSⁿ experiments can be summarized as follows:

- In principle the (ESI)MSⁿ technique was found to be a very valuable tool for mass spectrometric structure elucidation of natural compounds. On the one hand, it confirmed ms information gained from other spectra (PB, ESI, APCI) and allowed a more reliable interpretation since frequently the origin of fragments could be traced back. On the other hand, consecutive CID experiments (up to MS⁶) in general imparted more detailed structural information; in some cases further parts of the molecule structure could be deduced.
- For instance, this was true for the flavonol robinin the MS³ spectrum of which showed a strong fragment [(Gal + Glu) + Na]⁺ conclusively indicating the existence of a disaccharide chain.

Just this knowledge led to a correct interpretation concerning the elimination of single sugar moieties in the common ESI spectrum.

- A different situation is encountered for visnadin belonging to a group of secondary metabolites called pyranocoumarins. The main fragments (data from PB, ESI, APCI) could also be well explained by MS/MS experiments but it is not possible to deduce the pyranocoumarin skeleton in case of an unknown component. However, for visnadin data from MSⁿ measurements indicated a cyclic system with a carbonyl or carboxylic function. In this connection the separation of an acetoxy- and 2-methyl-butyroxy residue observed in the above mentioned spectra can be interpreted as loss of ring substituents.
- The (ESI)MSⁿ analysis (ESI in positive mode) of the dianthrone sennoside B only confirmed the information already obtained by other ms techniques before and furnished no new results. The two reasons for this behaviour are first that the dominating primary fragmentation process (in MS²) consisted in a fission of the central C-10/C-10' bond and second that the prominent main fragment in the MS³ spectrum was formed by the Na-adduct ion of desoxy glucose.

Since the sennoside B molecule bears a lot of electronegative groups it proved to be promising to alternatively execute ESI measurements in negative mode, i.e. to record the negative ions and subject them to MS/MS experiments.

Apart from the confirmation and more reliable interpretation of the ESI and APCI data we both received a sure proof of two carboxyl and hydroxyl functions attached to a homodianthrone structure.

To sum up, our investigations showed that working in the field of HPLC/HTS analysis it is necessary to apply all common and available HPLC/MS-techniques (e.g. PB, ESI, APCI) to rapidly obtain as much structural information as possible about the detected bioactive compounds.

It is true that in this connection MS/MS proved to be a powerful tool for mass spectrometric structure elucidation too, but the limitation of this high sophisticated technique lies in a higher expenditure of time and staff making it unsuitable for routine analysis.

This holds also true for HPLC/NMR coupling an interesting new technique being well established today which provides essential data about the molecular structure quite different from those of ms. Unfortunately, we had no access to this fascinating analytical method which will play an important role in this field of research in future.

6. Material und Methoden

6.1 Geräte und Software (Kapitel 2)

Computer:	Compaq Deskpro PII 266;
Betriebssystem:	Windows NT SP 5

Analysensoftware

- HPLC-Systemsoftware: HSM Manager 4.0 (Merck-Hitachi)
- ChromSword[®]Auto:Version 2.0 für Windows 95/98 und NT VWR International (zuvor) Merck KGaA
- ChromSword[®]Report Viewer: Version 1.0 Merck KGaA

Steuereinheit:	LaChrom D-7000 (Merck Hitachi)
Pumpe:	LaChrom L-7100 (Merck Hitachi)
Autosampler:	LaChrom L-7200 (Merck Hitachi)
Dioden-Array-Detektor:	LaChrom L-7455 (Merck Hitachi)

<u>Säulen</u>

	Namo	Länge - Ø	Material	Partikelgröße
	Iname	[mm]		[µm]
Vorsäule 1	Superspher	10-2	RP18e	4
Vorsäule 2	LiChrospher100	10-2	RP18e	5
Säule 1	Superspher	250-2	RP18e	4
Säule 2:	LiChrospher100	125-2	RP18e	5

Zur Entfernung der Luft wurden die Mischungen 5 min im Ultraschallbad behandelt.

6.2 Bestimmung der Totzeit [64]

Injektionsvolumen :	10 μl KNO ₃ -Lösung 0,001 %.		
DAD-Detektionswellenlänge:	220 nm		
Laufmittel A:	Wasser		
Säule:	Säule 1	+ Vorsäule 1	
	Flußrate 1: 0,25 ml/min \Rightarrow Totzeit 1: 1,63min		
Säule:	Säule 2 + Vorsäule 2		
	Flußrate 2: 0,4 ml/min \Rightarrow Totzeit 2: 0,61		
Elutionstyp:	Isokratisch		
	Zeit [min]	Laufmittel A [%]	
	0	100	
	5,0	100	

6.3 Gradientenverzögerungszeit (Dwell-Time) [64]

	Zeit	Laufmittel A	Laufmittel B	
Elutionstyp:	Gradient			
Flußrate:	0,4 ml/min \Rightarrow Dwell-Time 2: 1,70 min			
Flußrate:	$0,25 \text{ ml/min} \Rightarrow \text{Dwell-Time 1: } 2,72 \text{ min}$			
Laufmittel B	Wasser / Aceton (99,5 / 0,5)			
Laufmittel A	Wasser			
DAD-Detektionswellenlänge:	254 nm			
Injektionsvolumen :	0 µl (Signal des Autosamplers für Meßbeginn)			;inn)

Zeit	Laufmittel A	Laufmittel B
[min]	[%]	[%]
0	100	0
4,9	100	0
5,0	0	100
20,0	0	100
21,0	100	0
25,0	100	0

Die Bestimmung der Gradientenverzögerungszeit erfolgt wie in Bild 6-1 dargestellt.



Bild 6-1: Bestimmung der Gradientenverzögerungszeit aus Lit.[64]

6.4 Vorversuche zur Substanzauswahl (Kapitel 2.3.3.1)

<u>Stammlösungen</u>

- 0,15 %: Es wurden ca. 1 mg des jeweiligen Standards auf der Analysenwaage eingewogen und im entsprechenden Volumen Acetonitril (MeCN) oder Methanol (MeOH) gelöst.
- Andere Konzentrationen: Die Substanzen, die nicht in der gewünschten Konzentration löslich sind, wurden sukzessive mit MeOH versetzt, bis sie sich lösten und anschließend wurde die Konzentration errechnet.

Standard-Lösungen

0,01 %: Je 100 µl Stammlösung werden mit einer Eppendorfpipette in ein HPLC-Vial (1,5 ml) gegeben und mit Lösungsmittel auf 1,5 ml aufgefüllt und gemischt.

HPLC-Einstellungen

	Zoit Loufmittel A Loufmittel P
Elutionstyp:	isokratisch:
Säule:	Säule 1+ Vorsäule 1
Flußrate:	0,25 ml/min
Laufmittel B:	MeCN/Wasser (95/5) + 0,1 % Ameisensäure
Laufmittel A:	Wasser/MeCN (95/5) + 0,1 % Ameisensäure
DAD-Detektionswellenlänge:	220 nm - 500 nm

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	50	50
40	50	50

6.5 ChromSword[®]Auto Trennoptimierung der Cumarine (Kapitel 2.3.4)

6.5.1 Herstellung der Lösungen

Standard-Lösungen 0,01%

Siehe Kapitel 6.4

Standard-Mischung 0,01% je Standard

100 μ l je Stammlösung werden mit einer 100 μ l Eppendorfpipette in ein HPLC-Vial (1,5 ml) gegeben und mit Lösungsmittel auf 1,5 ml aufgefüllt und gemischt.

6.5.2 Parameter für die vollautomatische Trennoptimierung einer Cumarin-Mischung (Kapitel 2.3.4.1)

Injektionsvolumen :	10 µl
DAD-Detektionswellenlänge:	270 nm
Laufmittel A	Wasser/MeCN (95/5) + 0,1 % Ameisensäure
Laufmittel B	MeCN/Wasser (95/5) + 0,1 % Ameisensäure
Säule:	Säule 1 + Vorsäule 1
Flußrate:	0,25 ml/min
Elutionstyp:	Gradient, isokratisch

Die von ChromSword[®]Auto ermittelten Gradientenvorschläge (GV1 bis GV4) und isokratisch Vorschläge (IV1 und IV2) für die Cumarin-Mischung (Vollautomatische Methodenentwicklung).

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	95	5
7,8	87	13
17,2	85	15
18,7	75	25
40,3	75	25
40,4	20	80
72,4	20	80
77,1	20	80

Gradientenvorschlag 1

Gradientenvorschlag 2

Zeit	Laufmittel A	Laufmittel B
[min]	[%]	[%]
0	100	0
26,0	100	0
26,1	78	22
40,3	66	34
40,4	27	73
72,3	27	73
77,1	27	73

Gradientenvorschlag 3

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	100	0
7,5	93	7
7,6	60	40
25,5	48	52
66,3	48	52
71,1	48	52

259

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	100	0
12,3	41	59
43,1	41	59

Isokratischer Vorschlag 1

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	51	49
46,9	51	49

Isokratischer Vorschlag 2

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	44	56
39,2	44	56

6.5.3 Virtuelle Trennoptimierung der experimentellen Daten (Kapitel 2.3.5)

Der von ChromSword[®]Auto für die Cumarin-Mischung ermittelte Gradientenvorschlag, nach virtueller Trennoptimierung (Retentionsprognose) der experimentellen Daten (Virtuelle Methodenentwicklung).

Zeit	Laufmittel A	Laufmittel B
[min]	[%]	[%]
0	98	2
3,5	98	2
4,5	57	43
10,8	57	43
10,9	31	69
20	31	69

Gradientenvorschlag der Retentionsprognose

6.5.4 Simulation mit ChromSword[®]Auto nach virtuellem Sorbentienwechsel (Kapitel 2.3.6)

Der von ChromSword[®]Auto für die Cumarin-Mischung ermittelte Gradientenvorschlag, nach virtuellem Sorbentienwechsel (Virtuelle Methodenentwicklung).

Injektionsvolumen:	10 µl
DAD-Detektionswellenlänge:	270 nm
Laufmittel A	Wasser/MeCN (95/5) + 0,1 % Ameisensäure
Laufmittel B	MeCN/Wasser (95/5) + 0,1 % Ameisensäure
Säule:	Säule 2 + Vorsäule 2
Flußrate:	0,40 ml/min
Elutionstyp:	Gradient: siehe Kapitel 6.5.3

6.6 Vollautomatische Trennoptimierung eines bioaktiven Pilzextraktes durch ChromSword[®]Auto (Kapitel 2.3.7)

6.6.1 Pilzmaterial

Als Untersuchungsobjekt für die HPLC/HTS-Analysen dienten Extrakte des Birken-Blättlings Lenzites betulina (L.) Fr.

Dieser wurde in den Jahren 2000 bis 2002 an liegenden Birkenstämmen im Sachsenwald (bei Friedrichsruh) in einer Gesamtmenge von 4,5 kg geerntet.

6.6.2 Pilzextraktion

Lenzites betulina wurde von Hand gereinigt und grob zerkleinert. In einem 300 ml Jodzahlkoben werden 50 g des zerkleinerten Pilzmaterials mit 100 bis 150 ml Ethylacetat versetzt und zwei Stunden bei Raumtemperatur auf der Schüttelmaschine (50 Umdrehungen/min) extrahiert.

Nach Filtration wird der Extrakt über NaSO₄ (wasserfrei) für eine Stunde getrocknet, dann wurde er im Rotationsverdampfer auf ca. 10 ml eingeengt. In einer Braunglasflasche wurde der Extrakt bei +8 °C gelagert.

6.6.3 NACONA-Standardmethode

Der genutzte Standardgradient für die EVOscreen®NACONA.

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	100	0
15	0	100
20	0	100
21	100	0
33	100	0

NACONA-Standardgradient

Injektionsvolumen:	10 µl
DAD-Detektionswellenlänge:	variabel
Laufmittel A:	Wasser/MeCN (95/5) + 0,1 % Ameisensäure
Laufmittel B:	MeCN/Wasser (95/5) + 0,1 % Ameisensäure
Säule:	Bischoff Lichrospher100 / 125-2 / RP18e, 5 μm
Vorsäule:	Lichrospher100 / 10-2 / RP18e, 5 µm
Flußrate:	0,40 ml/min
Zeitintervall der Fraktionierung:	2 - 20 min

Lösungsmittelentfernung:	120 min
Inkubationszeit nach Enzymzugabe:	60 min bei 25 °C
Reaktionsstop:	10 mM EDTA-Lösung
Readout:	2D-FIDA Anisotropy bei 633 nm

6.6.4 Parameter für die HPLC-Trennoptimierung eines Extraktes von Lenzites betulina mit ChromSword[®]Auto (Kapitel 2.3.7.3)

<u>Stammlösungen</u>

Siehe oben. Anstelle des Acetonitrils wurde Ethylacetat verwendet.

Standard-Lösungen

Siehe oben. Anstelle Acetonitrils wurde Ethylacetat verwendet.

Naturstoff-Standard-Lösung

Jeweils 100 μ l der Stammlösung werden mit einer Eppendorfpipette in ein HPLC-Vial (1,5 ml) gegeben und mit dem Extrakt auf ein Gesamtvolumen von 1,5 ml aufgefüllt.

Injektionsvolumen :	5 μl
DAD-Detektionswellenlänge:	260 nm
Laufmittel A	Wasser/MeCN (95/5) + 0,1 % Ameisensäure
Laufmittel B	MeCN/Wasser (95/5) + 0,1 % Ameisensäure
Säule:	Säule 1 + Vorsäule 1
Flußrate:	0,25 ml/min
Elutionstyp:	Gradient

Die von ChromSword[®]Auto ermittelten Gradientenvorschläge (LbeGV1 bis LbeGV10) für den Etyhlacetatextrakt von Lenzites betulina (Vollautomatische Methodenentwicklung).

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	87	13
5,8	87	13
5,9	39	61
9,1	36	64
21,4	36	64
21,5	0	100
45,7	0	100

Gradientenvorschlag LbeGV1

Gradientenvorschlag LbeGV2

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	90	10
8,5	19	81
49,1	19	81

Gradientenvorschlag LbeGV3

Zeit	Laufmittel A	Laufmittel B
[min]	[%]	[%]
0	43	57
20,6	43	57
20,7	25	75
74,4	25	75

Gradientenvorschlag LbeGV4

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	99	1
20,6	21	98
20,7	44,1	98

Zeit	Laufmittel A	Laufmittel B	
[min]	[%]	[%]	
0	84	16	
0,6	83	17	
5,8	27	73	
67,2	27	73	

Gradientenvorschlag LbeGV5

Gradientenvorschlag LbeGV6

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	99	1
8,9	10	90
35,1	10	90

Gradientenvorschlag LbeGV7

Zeit	Laufmittel A	Laufmittel B		
[min]	[%]	[%]		
0	41	59		
15,1	34	66		
15,2	0	100		
36,2	0	100		

Gradientenvorschlag LbeGV8

Zeit	Laufmittel A	Laufmittel B	
[min]	[%]	[%]	
0	90	10	
49	2	98	
78,1	2	98	

Gradientenvorschlag LbeGV9

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	51	49
2	39	61
46,6	23	77
76,1	23	77

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B [%]
0	41	59
16,8	36	64
16,9	0	100
38,7	0	100

Gradientenvorschlag LbeGV10

6.7 HPLC/MS-Untersuchungen (Kapitel 3.2)

Standard-Lösungen 0,01% Siehe Kapitel 6.4

6.7.1 HPLC/(PB)MS-System

HPLC/MS-Systemsoftware:	Waters [®] Millennium [®] 32
Datenbank:	Wiley MS-Datenbank 6th Edition
	Version 3.10d
HPLC-Modul:	Waters [®] 2690
Photodioden-Array-Detektor:	Waters [®] PDA 996
Massenspektrometer:	Waters [®] Thermabeam
Elektronenstoßionisierung:	70 eV
Ionenquellen-Temperatur:	200 °C und 250 °C
Massenbereich:	Scan-Modus m/z 60 bis m/z 900
Interface	
Nebulizer-Temperatur:	65 °C - 95 °C
Expansion Region-Temperatur	: 75 °C - 95 °C
Injektionsvolumen:	5 μl und 10 μl
Detektionswellenlänge:	210 nm - 400 nm

Laufmittel A:	Wasser + 0,5 % Ameisensäure
Laufmittel B:	MeCN
Säule:	x-TerraMS 150 x 2,1 mm / C18; 3,5 µm
Flußrate:	0,25 ml/min
Elutionstyp:	Isokratisch

Zeit [min]	Laufmittel A [%]	Laufmittel B	
0	50	50	
15,0	50	50	

6.7.2 HPLC/(ESI)MS- und HPLC/(APCI)MS-Messungen

HPLC-Systemsoftware:	LC/MSD Chemstation-Software

HPLC/MS-System:	1100er-	Serie (Fa. Agiler	nt)		
Fragmentorspannung:	40 eV, 1	150 eV			
Massenbereich:	Scan-M	odus von m/z 80	bis m/z 900		
Nebulizer Gas-Temperatur:	350 °C	350 °C (ESI, APCI)			
Vaporizer-Temperatur:	450°C (450°C (APCI)			
Injektionsvolumen:	10 µl				
Detektionswellenlänge:	200 nm	- 500 nm			
Laufmittel A	Wasser/	Wasser/MeCN (95/5) + 0,1 % Ameisensäure			
Laufmittel B	MeCN/	MeCN/Wasser (95/5) + 0,1 % Ameisensäure			
Säule:	Säule 2	Säule 2 + Vorsäule 2 (siehe Kapitel 6.1)			
Säulenofen:	35 °C	35 °C			
Flußrate:	0,4 ml/r	nin			
Elutionstyp:	Isokratisch				
	Zeit	Laufmittel A	Laufmittel B		
	[min]	[%]	[%]		
	0	50	50		
	15,0	50	50	l.	

266

6.7.3 DLI/(ESI)MSⁿ-Messungen

Standard-Lösungen 0,01 %	(siehe oben) mit Methanol/Wasser (50/50) auf
70 ng/µl verdünnt.	
Massenspektrometer:	Finnigan MAT 95 XL TRAP; ESI
ESI-Spannung:	3,5 kV
Heated Capillary-Temperatur:	250 °C (ESI)
Sheath-Gas zur Spraysta	bilisierung: N ₂ (Vordruck 4 bar)
Beschleunigungsspannung:	5 kV
Massenbereich:	m/z 40 bis m/z 900
	m/z 100 bis m/z 1600
Scanrate:	3 Scans/Dekade
Spritzenpumpe:	20 µl/min

6.7.4 (EI)MS-Messungen (Direkteinlaß)

Substanzeingabe in einen Glastiegel über eine beheizte Schubstange.

Massenspektrometer:Varian MAT 311AIonenquellen-Temperatur:200 °CElektronenbeschleunigung:70 eV



7. Formeln und UV-Spektren
































8. Literaturverzeichnis

- 1. Balick, M. and P.A. Cox, *Drogen, Kräuter und Kulturen. Pflanzen und die Geschichte des Menschen.* 1997: Spektrum Akad. Vlg.
- 2. Rimpler, H., Biogene Arzneistoffe. 1999: DAV.
- 3. Teuscher, E., *Biogene Arzneimittel*. 1997: WVG.
- 4. Wagner, H., Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe. 1999: WVG.
- 5. Colegate, S.M. and R.J. Molyneux, *Bioactive Natural Products Detection*, *Isolation and Structural Determination*. 1993.
- 6. VerbandForschenderArzneimittelhersteller, *Forschung für das Leben*. F&E Konkret 1. 2003.
- God, R., *Pharmazeutische Biotechnologie: Ein Kompendium f
 ür Forschung und Praxis*, ed. O. Kayser and R.H. M
 üller. 2000: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart. 201-214.
- Henkel, T., et al., Statistische Untersuchungen zur Strukturkomplementarität von Naturstoffen und synthetischen Substanzen. Angew. Chem. Vol. 111. 1999. 688-691.
- 9. Koch, C., et al., *Der Naturstoff-Pool: neuer Ansatz für die Wirkstoffsuche*. Nachr. Chem. Tech. Lab. Vol. 45. 1997. 16-18.
- 10. Wölcke, J., *Screening of Fractionated Natural Extracts at Evotec OAI*. 2002, Besuch bei EVOTEC OAI.
- 11. Turner, R., S. Sterrer, and K.-H. Wiesmüller, *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*©. 2002, Wiley-VCH Verlag GmbH.
- 12. Wiegräbe, W., *Fluorescence correlation microscopy: Probing molecular interactions inside living cells*. American Laboratory September 2000, http://www.zeiss.de/C12567BE00472A5C/EmbedTitelIntern/molecular_interactions_ConfoCor/\$File/molecular_interactions.pdf.
- 13. Schultze, W., Suche nach pharmakologisch wirksamen Inhaltstoffen in einheimischen Pflanzen. XXXIII / 1998: unihh Forschung.
- 14. Oshinowo, L., et al., *Poster: Validierte Lead Target Systeme* Statusmeeting Leitprojekt BMBF 303: Diagnose und Therapie der molekularen Medizin - Validierte Lead/Target Systeme. Bonn Oktober 2001.
- 15. Sievers, A., et al., *Simple thin-layer chromatographic test for antioxidative compounds using the DPPH assay*. CAMAG Bibliography Service. Vol. 88. 2002: CAMAG Swizerland.
- 16. Koch, A. and R. Richter, *Analyse der Inhaltsstoffe der Teufelskralle und Bestimmung der Bioaktivität mittels HPTLC*. 2002: Poster: Tagung der Gesellschaft für Arzneimittelforschung an der Universität Erlangen.
- 17. Hamburger, M., *Tracking Bioactivity in Plant Extracts New Concepts* and Aproaches. 2000.

- 18. Ettre, L.S., *75 years of chromatography: a historical dialogue*. Journal of Chromatography Library. Vol. 17. 1979: Elsevier Amsterdam. 483-502.
- 19. Sadek, P.C., *Troubleshooting HPLC Systems: A Bench Manual*. 1999: Wiley, New York.
- 20. Willoughby, R., E. Sheehan, and S. Mitrovich, A Global view of LC/MS: How to solve your most challenging analytical problems. 1 ed. 1998: Global View Publishing.
- 21. Unger, K.K. and E. Weber, *Handbuch der HPLC Teil 1*. 2 ed. 1995: GIT Verlag.
- 22. O'Neil, M.J., *The Merck index : an encyclopedia of chemicals, drugs, and biologicals.* 13 ed. 2001: Merck.
- 23. *Handbook of Size Exclusion Chromatography*. Chromatographic Science Series, ed. C.-S. Wu. Vol. 69. 1995.
- 24. Mori, S. and H.G. Barth, Size exclusion chromatographie. 1999: Springer.
- 25. Rücker, G., M. Neugebauer, and G.G. Willems, *Instrumentelle pharmazeutische Analytik*. 2001: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.
- 26. Mendoza, C.E., *Thin-layer chromatography and enzyme inhibitation techniques*. J. Chromatography, 1973. **78**: p. 29-40.
- 27. Rhee, K., et al., Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. J. Chromatography A, 2001. **915**: p. 217-223.
- 28. Sievers, A., Screening einheimischer Pflanzen und Pilze mittels dünnschichtchromatografischer Bioassays und Hochdurchsatz-Screening auf pharmakologisch wirksame Inhaltstoffe unter besonderer Berücksichtigung des Wurzelschwammes Heterobasidium annosum (Fr.) Bref. 2004, Hamburg.
- 29. Weins, C. and H. Jork, *Toxicological evaluation of harmful substances by in situ enzymatic and biological detection in high-performance thin-layer chromatography*. J. Chromatography A, 1996. **750**: p. 403-407.
- Europäisches Arzneibuch: amtliche deutsche Ausgabe-Allgemeiner Teil.
 4.Ausgabe. 2002.
- 31. Snyder, L., T. Jupille, and I. Molnar, *Optimizing Multilinear Gradients in HPLC*. LCGC Europe. September 2002.
- 32. MerckKGaA and S.V. Galushko, *ChromSword® Instruction Manual for Program Version 2.0 Auto*, ed. 1. 2001: VWR International ehem.Merck KGaA.
- 33. Galushko, S.V., *Calculation of retention and selectitivity in reversedphase liquid chromatography*. J. Chromatography, 1991. **552**: p. 91-102.
- 34. Galushko, S.V., *The Calculation of Retention and Selectitivity in Reversed-Phase Liquid Chromatography II: Methanol-Water Eluents.* Chromatographia, 1993. **36**: p. 39-41.

- 35. Galushko, S.V., A.A. Kamenchuk, and G.L. Pit, *Calculation of retention in reversed-phase liquid chromatography IV. ChromDream Software for the selection of initial conditions and simulating chromatographic behavior.* J. Chromatography A, 1994. **660**: p. 47-59.
- 36. Beinert, W.-D., et al., Automated HPLC Method Development: A Step Forward with Innovative Software Technology, in LCGC Europe On-line Supplement: Statistics & Data Analysis. 2001.
- 37. MerckKGaA and S.V. Galushko, *ChromSword*® *Auto* 2.0. 2001, VWR International ehem.Merck KGaA.
- 38. Ying, J., et al., *Icones of Medicinal Fungi from China*. 1987: Science Press.
- 39. Hobbs, C., Medicinal Mushrooms. 1995: Botanica Press.
- 40. Kreisel, H., *Die phytopathogenen Grosspilze Deutschlands*. Reprint 1979: J. Cramer.
- 41. Fujimoto, H., et al., *Isolation and characterization of immunosuppressive components of three mushrooms, Pisolithus tinctorius, Microporus flabelliformis and Lenzites betulina.* Chemical & Pharmaceutical Bulletin, 1994. **42**(3): p. 694-7.
- 42. Lee, I.-K., et al., *Betulinans A and B, Two Benzoquinone Compounds from Lenzites betulina*. Journal of Natural Products, 1996. **59**(11): p. 1090-1092.
- 43. Smith, J.E., N.J. Rowan, and R. Sullivan, *Medicinal Mushrooms: Their therapeutic properties and current medical usage with special emphasis on cancer treatments*. 2002, http://sci.cancerresearchuk.org/labs/med_mush/final_pdfs/chapt3_a.pdf.
- 44. Baczek, T., et al., *Computer-Assisted Optimization of a Gradient HPLC Method for theSeparation of Flavonoids*. 2001, <u>http://www.lcgceurope.com/lcgceurope/data/articlestandard/lcgceurope/5</u> <u>12001/5427/article.pdf</u>.
- 45. Budzikiewicz, H., *Massenspektrometrie: Eine Einführung*. 4. ed. 1998: Wiley-VCH.
- 46. Niessen, W.M.A., *Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*. 2 ed. Chromatographic Science Series. Vol. 79. 1999: Marcel Dekker Inc.
- 47. WatersCorporation(Europe), *Mass spectrometry in the HPLC laboratry*. LC/MS Booklet 1.0. 5/99.
- 48. Lemière, F., *Interfaces for LC-MS*. 2001, <u>http://www.lcgceurope.com/lcgceurope/data/articlestandard/lcgceurope/0</u> <u>52002/8134/article.pdf</u>.
- 49. WatersCorporation, *Waters ThermaBeam Mass Detector Installation and Maintenance Guide*. 2002, Milford: Waters Corporation.
- 50. WatersCorporation, HPLC Forum: Vision 2000. 1999.
- 51. Vogel, M. and P.-G. Kibat, *Kopplung von HPLC mit Massenspektrometrie*. PZ Prisma, 1998. 1: p. 57-67.
- 52. Tiller, P.R., J. Chromatography, 1993. 647: p. 101.

- 53. McLafferty, F.W. and F. Turecek, *Interpretation von Massenspektren*. 1995: Spektrum Akademischer Verlag.
- 54. Porter, Q.N. and J. Baldas, *Mass Spectrometry of heterocyclic Compounds*. General heterocyclic chemisry series, ed. A. Weissberger and E.C. Taylor. 1971.
- 55. Waller, G.R. and O.C. Dermer, eds. *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*. 1980, Wiley.
- 56. Brown, P., et al., *Field Ionization Mass Spectrometry-III: Cardenolides*. Organic Mass Spectrometry, 1971. **5**: p. 573-597.
- 57. Flaskamp, E. and H. Budzikiewcz, *Ring-D Fragmentation of Cardenolides*. Biomedical Mass Spectrometry. Vol. 4. 1977. 354-357.
- 58. Waller, G.R., *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*. 1972: Wiley.
- 59. Mabry, T.J. and K. Markham, *Mass spectrometry of flavonoids*, in *The Flavonoids*, J.B. Harborne, T.J. Marbry, and H. Marbry, Editors. 1975. p. 78-127.
- 60. Cunniff, J., et al. *Structural Determination of Flavonoids: The Power of MS*^{*n*}. 1999: Thermoquest.
- 61. Spiteller, G., *Massenspektrometrische Strukturanalyse organischer Verbindungen*. 1966: Verlag Chemie.
- 62. Muray, R.D.H., J. Mendez, and A. Brown, *The Natural Coumarins*. 1982: Wiley.
- 63. Shipchandler, M. and T.O. Soine, *Coumarins VIII: Mass Spectra of Lomatin and some of its Derivatives*. Journal of Pharmaceutical Sciences, 1968. **57**(12): p. 2062-2068.
- 64. MerckKGaA and S.V. Galushko, *ChromSword® Schritt-für-Schritt-Einführung in die manuelle Arbeitsweise von ChromSword®*. 2001: VWR International ehem.Merck KGaA.

9. Anhang: Gefahrstoffe

Substanz	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
Aceton	F, Xi	11-36-66-67	9-16-26
Acetonitril	T, F	11-23/24/25	16-27-45
Ameisensäure	С	35	2-23-26-45
1,8-Dihydroxyanthrachinon	Т	45	53-45
4-Hydroxycumarin	Xn	22	22-45
6-Methylcumarin	Т	23/24/25	1-13-45
7-Methylcumarin	Т	23/24/25	1-13-45
Aloe-Emodin	Xn	22	22-45
Aloin	Xn	22	22-45
Apigenin	Xi	36/37/38	26-36
Apiin			
Apiol			
Chrysin	Xi	36/37/38	26-36
Chrysophanol	Xi	36/37/38	26-37/39
Convallatoxin	Т	23/25-33	1-45
Cumarin	Xn	22	22-45
Daphnetin	Т	25	1-13-45
Digitoxin	Т	23/25-33	1-45
Digoxin	Т	23/25-33-36	1-45
Dihydrocumarin	Xn	22	22-45
Dihydrofisetin			
Dihydroquercetin	Xn	22	22-45
Dihydrorobinetin	Xn	22	22-45
Emodin	Xn	22	22-45
Esculin	Xn	22	22-45
Esculetin	Xn	22	22-45
Esculetindibenzylether	Xn	22	22-45
Ethylacetat	F, Xi	11-26-66-67	16-26-33
Fisetin	Xn	22	22-45

Tabelle 9-1: Verwendete Gefahrstoffe mit Gefahrensymbolen und R- und S-Sätzen

Substanz	Gefahrensymbole	R-Sätze	S-Sätze
Flavon	Xi	36/37/38	22-24/25
Frangulin A	Xn	22	22-45
Genistein	Xn	22	22-45
Gitoxin	Т	23/25-33-36	1-45
g-Strophantin	Т	23/25-33-36	1-45
Hesperedin	Xi	36/37/38	22-25-45
Homoeriodictyol			
Hyperosid	Xn	22	22-45
Imperatorin			
Isorhoifolin			
Kämpferol	Xn	22	22-45
Kaliumnitrat	0	8	16-46
Khellin	Т	23/24/25- 36/37/38	26-36/37/39-45
Luteolin	Xn	22	22-45
Methanol	T, F	11-23/24/25- 39/23/24/25	7-16-36/37-45
Myricetin			
Naringenin	Xn	22	22-45
Naringin	Xn	22	22-45
Neohesperidin	Xn	22	22-24/25
Quercetin	Т	25	1-22-45
Rhein	Xi	36/37/38	26
Robinin			
Rutin	Xi	36/37/38	22-24/25
Sennosid A	Xn	22	22-45
Sinensetin			
Umbelliferon	Xn	22	22-45
Visnadin			
Visnagin	Xn	22	
Xanthotoxin	Xn	22	22-45

Fortsetzung Tabelle 9-1: Verwendete Gefahrstoffe mit Gefahrensymbolen und R- und S-Sätzen

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, durchgeführt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Hamburg, im Juli 2004

Lawrence Oshinowo

<u>Lebenslauf</u>

Persönliche Daten

Name Geburtsdatum: Geburtsort Staatsangehörigkeit Familienstand	Lawrence Oshinowo 05.06.1969 Hamburg deutsch ledig
Schulausbildung	
1975 - 1979 1979 - 1989	Grundschule Sachsenweg in Hamburg Gymnasium Ohmoor in Hamburg Abschluß: Abitur
Zivildienst	
6/89 - 1/91	Alten- und Schwerstbehindertenbetreuung
Berufsausbildung	
8/1991 - 7/1993	Staatliche Gewerbeschule Chemie, Pharmazie und Agrarwirtschaft in Bergedorf
8/1993 - 1/1994	PTA-Praktikum in der Blumen-Apotheke, Hamburg
3/1994	Abschluß: Pharmazeutisch-technischer Assistent
Studium	
4/1994 - 4/1998	Studium der Pharmazie an der Universität in Hamburg
5/1998 - 10/1998	Pharmaziepraktikum bei der Beiersdorf-Lilly GmbH & Co.KG in Hamburg
11/1998 - 4/1999	Pharmaziepraktikum in der Hammer Park-Apotheke, Hamburg
7/1999	Abschluß: Approbation als Apotheker
Promotion	
9/1999 - 2004	Wissenschaftlicher Mitarbeiter im BMBF-Projekt 303 am Institut für Pharmazie der Universität Hamburg Abt.: Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie
Berufstätigkeit	
11/2002 - 2004	Teilzeitbeschäftigung in der Blumen-Apotheke, danebe

Teilzeitbeschäftigung in der Blumen-Apotheke, daneben u.a. vertretungsweise Leitung der Atlantik-Apotheke und der Apotheke am Holstentor, Hamburg