

# 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<sup>®</sup>/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<sup>®</sup>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<sup>®</sup>-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<sup>®</sup>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<sup>®</sup>Auto, für die Cumarin-Mischung eine Anpassung an die Parameter der EVOscreen<sup>®</sup>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<sup>®</sup>-Software erstellte nach dem virtuellen Sorbentienwechsel 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<sup>®</sup>NACONA ist ChromSword<sup>®</sup>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 unbekanntes Extraktes auf eine maximale Peakanzahl.  
Hierzu wurden dem *Lenzites betulina*-Extrakt 3 bekannte Naturstoffstandards zugesetzt. ChromSword<sup>®</sup>Auto konnte 10 Gradientenvorschläge generieren.

Dies zeigt, daß die ChromSword<sup>®</sup>-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)MS<sup>n</sup> 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 Coumarine) 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 massenspektrometrischen Analyse verschiedener Naturstoffgruppen, da sie - meist anhand mehrerer z.T. starker Ionen wie  $[M + H]^+$ ,  $[M + H_2O]^+$ ,  $[M + Na]^+$ , selten auch  $[2 \times M + Na]^+$ , 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.

Pyranocoumarine 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. Coumarin) keine sichere Molekulargewichts-Determinierung zuließen (Quasimolekülionen 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.

4. Die abschließenden DLI/(ESI)MS<sup>n</sup>-Messungen einzelner Vertreter unterschiedlicher Naturstoffgruppen wurden durchgeführt, um auszuloten, in welchem Maße weitergehende Strukturinformationen mit dieser aufwendigen Analysetechnik 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 MS<sup>n</sup>-Experimente lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- Die (ESI)MS<sup>n</sup>-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<sup>6</sup>) 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]<sup>+</sup> im MS<sup>3</sup>-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 unbekanntes Verbindung ist eine Pyranocumarin-Grundstruktur aber auch mittels dieser Technik nicht ableitbar. Allerdings lassen sich aus den MS<sup>n</sup>-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)MS<sup>n</sup>-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 ( $MS^2$ ) fast ausschließlich in der Dimerenspaltung besteht und beim  $MS^3$ -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 Zeit- und 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.