

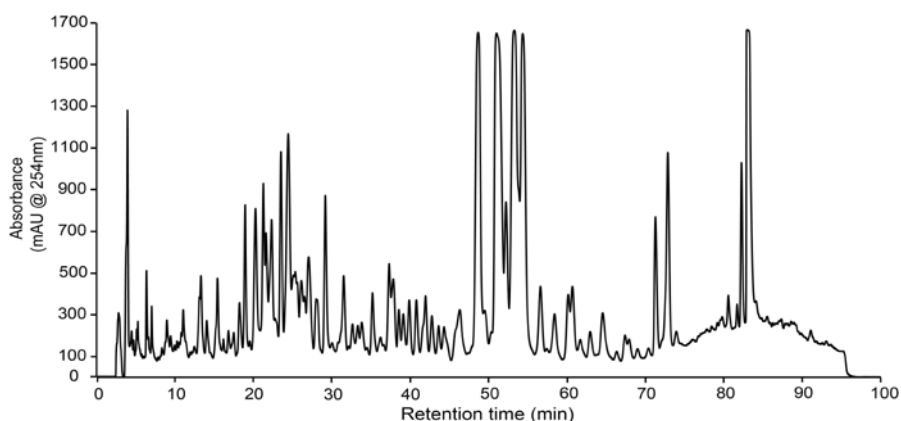
Jagten på bioaktive naturstoffer

Sammenkoblet HPLC-PDA-HRMS-SPE-NMR til hurtig identifikation af bioaktive naturstoffer i komplekse blandinger.

Af professor Dan Stærk, Naturstofkemisk Forskningsgruppe, Institut for Lægemiddeldesign og Farmakologi, Københavns Universitet

Hvis du deltager i Jeopardy og får svaret: "Højtopløselig inhibitions-profilering i kombination med HPLC-PDA-HRMS-SPE-*tt*NMR", så skal du stille spørgsmålet: "Hvad er den ultimative sammenkoblede analytisk-skala teknologi, der hurtigt og effektivt kan pinpointe og strukturoplære nye bioaktive naturstoffer i komplekse ekstrakter?". Det lyder måske som et fjernt fremtidsscenario, men er ikke desto mindre allerede nu en veludviklet teknologi, der tillader fuld strukturoplæring af komplekse bioaktive naturstoffer direkte fra analytisk-skala HPLC-analyse af komplekse råekstrakter.

Naturen er en rig kilde til bioaktive organiske molekyler, hvilket blandt andet ses ved, at naturstoffer og analoger heraf udgør op mod 70 procent af al medicin inden for visse sygdomsområder [1]. Klassiske og velkendte eksempler på bioaktive naturstoffer er morfin fra opiumsvalmuer (*Papaver somniferum*), artemisinin fra en Kinesisk bynke (*Artemisia annua*) og penicillin fra skimmelsvampe (*Penicillium* spp.) - men der registreres stadig mange nye lægemidler baseret på naturstoffer [1]. Planter og svampe er derfor lovende kilder til nye bioaktive stoffer, og i fremtiden forventes eksempelvis marine organismer og fødevarerestprodukter at blive vigtige klimavenlige kilder til bioaktive stoffer (figur 1).



Figur 1. Planter, svampe og marine-organismer er en rig kilde til nye bioaktive naturstoffer, men ekstrakter af disse er så komplekse, at det er en udfordring at identificere de enkelte bioaktive indholdsstoffer.

Ekstrakter af ovennævnte er imidlertid så komplekse, at isolering og strukturoptklaring af de aktive indholdsstoffer svarer til at lede efter en nål i en høstak. Således er det ikke usædvanligt, at et rækstrakt af en medicinplante indeholder mere end 100 forskellige stoffer i meget forskellig mængde og i grupper af nært beslægtede analoger, der er svære at adskille. Samtidig er det vigtigt at undgå at analysere allerede kendte stoffer og/eller stoffer, der ikke er bioaktive. I naturstofkemisk forskningsgruppe ved Københavns Universitet har vi udviklet, hvad der i vores øjne er den ultimative sammenkoblede analytiske teknologi til sådanne undersøgelser: højt-opløselig inhibitions profilering/HPLC-PDA-HRMS-SPE-*tt*NMR. Se faktaboks for forklaring af forkortelser og figur 2 (side 42) for en skematisk illustration.

Med denne sammenkoblede teknologi får man via én og samme platform *i*) et biokromatogram, der direkte pinpointer de indholdsstoffer, der er korreleret med bioaktivitet, *ii*) UV og HRMS-data til dereplikering (det vil sige identifikation af allerede kendte stoffer) og *iii*) 1D og 2D NMR-spektre til fuld strukturoptkla-

ring af nye naturstoffer. Analysen kan således ses som en tretrinsskema, hvor hver proces er vigtig for at løfte den næste:

Første trin i processen starter efter endt udvikling af en analytisk-skala HPLC-metode med tilfredsstillende separation af så mange indholdsstoffer som muligt. HPLC-eluatet mikrofraktioneres i korte konstante tidsintervaller i en eller flere 96-brønds plader. Eluatet fordampes og bioaktiviteten mod det valgte enzym- eller cellulære assay bestemmes. Herefter omregnes resultaterne til procent inhibition og indsættes som funktion af retentionstiderne for de enkelte brønde. Dette resulterer i en højt-opløselig inhibitionsprofil, i daglig tale et biokromatogram, som effektivt tillader lokalisering af de HPLC-peaks, hvor materialet er korreleret med bioaktivitet. Mikrofraktioneringen kan gentages og fraktionerne testes for andre bioaktiviteter. I naturstofkemisk forskningsgruppe laver vi rutinemæssigt polyfarmakologiske biokromatogrammer [2-4]. Den fortsatte kemiske analyse kan derefter målrettes de bioaktive stoffer.

I næste trin foretages en dereplikering baseret på de UV- og HRMS-data, som systemet også genererer. Dereplikering er terminologien for den proces, hvor kendte stoffer identificeres, og i et naturstofkemisk drug discovery-projekt er det en vigtig del af processen for ikke at spilde tid på isolering og strukturoptklaring af kendte stoffer, som blot kunne købes hos et kemikaliefirma. Dereplikering kan ske ved at sammenligne λ_{\max} og UV-spektre fra PDA-analysen samt bruttoformler for hovedioner og fragmenter fra HRMS-analysen med interne og/eller eksterne databaser. Nyligt er det også inden for naturstoffer blevet muligt med en mere automatiseret dereplikering via Global Natural Products Molecular networking [5], som baserer sig på maskinlæring og kunstig intelligens til at matche eksperimentelle data fra tandem massespektrometri med tilsvarende data i databaser eller gennem generering af teoretiske data ud fra en foreslået struktur.

Det sidste trin omfatter isolering og strukturoptklaring af de potentielt nye og bioaktive naturstoffer. Klassisk set er dette sket ved hjælp af præparativ-skala



Food Diagnostics A/S

- din partner i fødevarer sikkerhed

Mød os på DiaLabXpo stand D1064

» Kolonitællere

Spar tid i laboratorieret med effektive og præcise tællere fra Interscience.

» PCR-løsning fra Bio-Rad

Real-time PCR-løsning til hurtig analyse af fødevarer for mikrobiologi, allergener, GMO og identifikation af dyrearter.

» Prøveforberedelse

Alt i prøveforberedelse, både til den manuelle og den automatiserede arbejdsgang.

» CDR kvalitetskontrol

Nem og hurtig kvalitetskontrol af fedt, olier, drikkevarer og en lang række fødevarer.

» RIDA Cube Scan


Muliggør enzymatiske analyser af fødevarer uden laboratoriefaciliteter og med en svartid på 10 min.



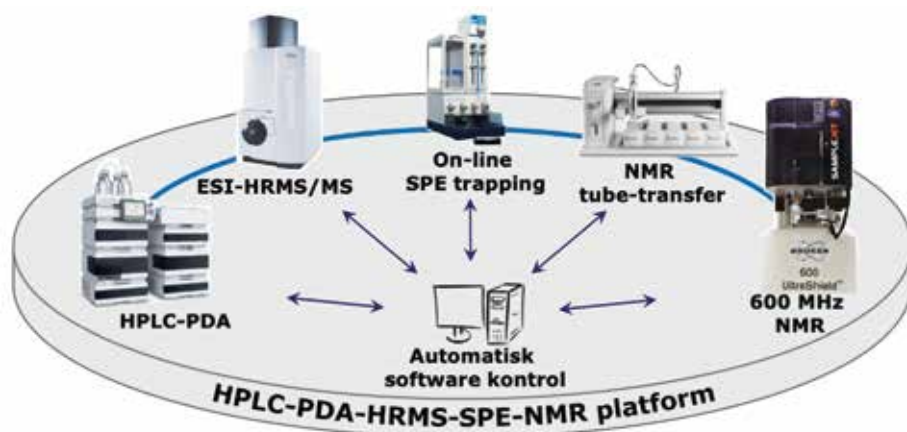
DiaLabXpo

Life Science • Udstilling • Konferencer
Docken KBH • 22.-23. september 2021

Food Diagnostics A/S | Søndre Kajgade 7-9, 8500 Grenaa | info@fooddiagnostics.dk | Tlf.: +45 87591666

 Følg os på LinkedIn - Food Diagnostics A/S

HPLC eller kolonne kromatografi, og har krævet separat metodeudvikling og store mængder ekstrakt og solvent. Men med udvikling af et automatiseret online SPE-system og NMR cryoprober med øget følsomhed, kan dette nu ske direkte fra analytisk-skala HPLC uden yderligere metodeudvikling. Således bruges UV- og/eller HRMS-baserede kromatogrammer fra HPLC-PDA-HRMS-delen af apparaturet til automatisk "opsamling" af de udvalgte analytter på små SPE-kolonner i to racks med 96 SPE-kolonner i hver. Analytterne adsorberes (trappes)



Figur 2. Skematisk oversigt over den sammenkoblede HPLC-PDA-HRMS-SPE-NMR-platform. Den direkte sammenkobling er skitseret med den blå linje.

Den opklarende faktaboks

De termer og forkortelser, der er brugt i denne artikel om HPLC-PDA-HRMS-SPE-NMR fremgår nedenfor:

- **Bioaktivitet:** Termen for stoffer, der har en biologisk eller farmakologisk aktivitet, oftest undersøgt i enzym- eller celle-baserede assays.
- **Biokromatogram:** Det farmakologiske modstykke til HPLC kromatogrammet, dvs. et kromatogram, som viser indholdsstoffernes farmakologiske aktivitet.
- **HPLC:** High-performance liquid chromatography eller på dansk højtydende væskechromatografi.
- **PDA:** Photodiode array detection eller på dansk ofte blot diode array detektion (DAD).
- **HRMS:** High-resolution mass spectrometry eller på dansk højopløselig massespektrometri.
- **SPE:** Solid-phase extraction eller på dansk fastfase ekstraktion. Er oftest brugt til prøveoprensning før kemiske analyser, men bruges i vores eksperimentelle setup efter analytisk-skala HPLC-analyse.
- **tt:** tube transfer. Den proces, hvor analytter på SPE-kolonner elueres til 1,7 mm NMR-rør.
- **NMR:** Nuclear magnetic resonance eller kernemagnetisk resonans spektroskopi. NMR er den absolut vigtigste spektroskopiske teknik til strukturoptælling af komplekse organiske forbindelser.
- **1D:** Et-dimensionelt, refererer til et NMR-spektrum, hvor der på x-aksen typisk vil være frekvens (kemisk skift) og hvor der på y-aksen vil være intensitet.
- **2D:** To-dimensionelt, refererer til NMR-spektroskopi, hvor der er to frekvensakser og data plottes i rummet.

på SPE-kolonnerne, fordi den eluotrope styrke af eluatet sænkes ved at blande det med vand efter PDA-detektoren (post-column dilution). For at øge mængden af adsorberet materiale på SPE-kolonnerne gentages separationerne 10-15 gange, hvor de enkelte analytter adsorberes kumulativt på de samme SPE-kolonner. Efter endt trapping af analytterne fra de gentagne injektioner, tørres SPE-kolonnerne med nitrogen gas for at fjerne de ikke-deutererede solventer (typisk vand og acetonitril), da disse vil give forstyrrende signaler i NMR-spektrene. Analytterne på de tørrede SPE-kolonner overføres herefter til 1,7-mm NMR-rør ved at eluere SPE-kolonnerne baglæns med et deutereret NMR-solvent. Hele processen med trapping, tørring og eluering af analytter sker automatisk med et integreret online SPE-enhed, og både SPE-kolonner, NMR-rør og NMR autosamplern benytter sig af 96-rack formatet.

Bioaktive indholdsstoffer i hvid morbær

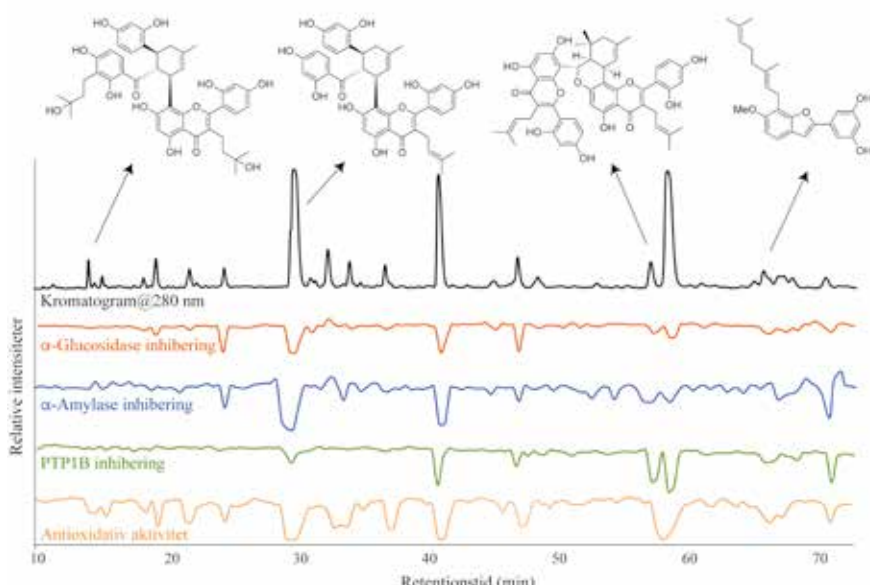
Hvid morbær (*Morus alba*) bruges som et traditionelt antidiabetisk naturlægemiddel i flere kulturer. Et ethylacetat ekstrakt af rodbark af hvid morbær blev derfor testet for hæmmende virkning mod enzymene α -glucosidase, α -amylase og protein tyrosin phosphatase 1B samt for antioxidant aktivitet med henblik på at finde bioaktive indholdsstoffer med mulig antidiabetisk potentiale. HPLC-kromatogrammet samt de fire biokromatogrammer af ethylacetat ekstraktet ses i figur 3. Der ses, at nogle HPLC-peaks er korreleret med peaks i alle fire biokromatogrammer, hvorimod andre HPLC-peaks kun er korreleret med en peak i ét biokromatogram. HPLC-PDA-HRMS-baseret dereplikering viste, at ekstraktet indeholdt en række kendte såvel som nye stoffer biosyntetiseret via en Diels-Alder

reaktion mellem prenylerede chalconer og dehydroprenylphenoler [5]. Disse oplysninger blev brugt til at målrette den efterfølgende HPLC-PDA-HRMS-

Den nørdede faktaboks

Det beskrevne HPLC-PDA-HRMS-SPE-*tt*-NMR-system består af følgende sammenkoblede enheder:

- Et Agilent analytisk-skala HPLC-PDA-system som via en passiv splitter efter HPLC-kolonnen fører cirka 1% af eluatet til HRMS-detektion og 99% til PDA-detektion.
- Et Bruker MicrOTOF-Q II elektrospayt ioniserings quadrupole time-of-flight massespektrometer med høj opløsning for både hovedioner og fragmenter (ved MS/MS-analyser).
- En Knauer post-column pumpe som via et T-stykke fortynder eluatet 1:2.
- En Spark Holland Prospekt II SPE-enhed, som kan opsamle op til 192 analytter på små 10 x 2 mm i.d. SPE-kolonner, som typisk indeholder en poly(styren-divinyl benzen) resin eller C₁₈-materiale.
- En Gilson "tube transfer" autosampler som via en 1-mm nål fylder 1,7-mm NMR-rør i 96-rørs racks. De anvendte rør fyldes med 30 μ L, som svarer til volumen af de anvendte SPE-kolonner.
- Et 600 MHz Bruker NMR-instrument med en 1,7-mm TCI (triple-resonance cold inverse) helium-kølet cryoprobe med en SampleJet autosampler med plads til fem 96-rørs racks. Den inverse konfiguration og det aktive volumen på 30 μ L giver proben en meget høj massefølsomhed.



Figur 3. HPLC-kromatogram af ethylacetat ekstrakt af hvid morbær og tilhørende bio-kromatogrammer. Et udvalg af de ved HPLC-PDA-HRMS-SPE-NMR-analyserede stoffer er indtegnede.

SPE-NMR-analyse mod indholdsstoffer korreleret med bioaktivitet og/eller nye naturstoffer. Dette førte til isolering og strukturopløsning af 18 naturstoffer ved

hjælp af UV, HRMS samt 1D og 2D NMR-eksperimenter direkte fra analytisk-skala HPLC. Et par af de komplekse naturstoffer ses i figur 3.

Fremtidig udvikling

Metodeudvikling, generering af biokromatogrammer og HPLC-PDA-HRMS-SPE-NMR-analyse, inklusive optagelse af 2D NMR-spektre for 10-15 stoffer, vil lægge beslag på et par ugers apparatortid. Det er imidlertid selve strukturopløsningen af de nye komplekse naturstoffer, som er den tidsbegrænsende faktor. Det skyldes, at denne proces, på trods af udvikling af computer-assisteret strukturopløsning, stadig er forholdsvis håndholdt og kræver en erfaren forsker. Ligeledes tillader strukturopløsningen fra HPLC-PDA-HRMS-SPE-NMR-analyser kun tilordning af den relative stereokemi. I fremtiden vil vi derfor arbejde på yderligere direkte eller indirekte kobling med kiroptiske metoder til bestemmelse af den absolutte stereokemi af isolerede stoffer samt bedre integration af maskinlæring til hel eller delvis automatiseret strukturopløsning ud fra 1D og 2D NMR-spektre.

E-mail:
Dan Stærk: ds@sund.ku.dk

INNOVATIVE LØSNINGER TIL LABORATORIET?



BESØG OS PÅ LABDAYS MESSEN PÅ
STAND 46 I ÅRHUS D. 15-16 SEPTEMBER

FOSS

ANALYTICS BEYOND MEASURE



ANALYTISK KEMI - FORTSAT

Referencer

- Newman, D.J.; Cragg, G.M. Natural products as sources of new drugs over the nearly four decades from 01/1981 to 09/2019. *J. Nat. Prod.* **2020**, *83*, 770-803.
- Wubshet, S.G.; Tahtah, Y.; Heskes, A.M.; Kongstad, K.T.; Pateraki, I.; Hamberger, B.; Möller, B.L.; Staerk, D. Identification of PTP1B and α -glucosidase inhibitory serrulatanes from *Eremophila* spp. by combined use of dual high-resolution PTP1B and α -glucosidase inhibition profiling and HPLC-HRMS-SPE-NMR. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79*, 1063-1072.
- Tahtah, Y.; Kongstad, K.T.; Wubshet, S.G.; Nyberg, N.T.; Jønsson, L.H.; Jäger, A.K.; Qinglei, S.; Staerk, D. Triple aldose reductase/ α -glucosidase/radical scavenging high-resolution profiling combined with high-performance liquid chromatography - high-resolution mass spectrometry - solid-phase extraction - nuclear magnetic resonance spectroscopy for identification of antidiabetic constituents in crude extract of *Radix Scutellariae*. *J. Chromatogr. A* **2015**, *1408*, 125-132.
- Zhao, Y.; Kongstad, K. T.; Jäger, A. K.; Nielsen, J.; Staerk, D. Quadruple high-resolution α -glucosidase/ α -amylase/PTP1B/radical scavenging profiling combined with high-performance liquid chromatography - high-resolution mass spectrometry - solid-phase extraction - nuclear magnetic resonance spectroscopy for identification of antidiabetic constituents in crude root bark of *Morus alba* L. *J. Chromatogr. A* **2018**, *1556*, 55-63.
- Wang, M.; Carver, J.J.; Phelan, J.V.; Sanchez, L.M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D.D. et al. Sharing and community curation of mass spectrometry data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nature biotechnol.* **2016**, *34*, 828.

Verdensmål nr. 15:

Livet på land



Foto: Eric Macdonnell, www.unspash.com

Det terrestriske økosystem er under hårdt pres. Halvdelen af verdens vilde dyr er forsvundet siden 1970, hvert år forsvinder 13 millioner hektar skov som et resultat af skovhugst og ørkendannelse, svarende til cirka 23 hektar (svarende til cirka 33 fodboldbaner) per minut. Samtidig er 1,6 milliarder mennesker afhængige af skovene for deres levebrød og omkring ¾ af verdens fattige er direkte berørt af nedbrydning af jorden som følge af menneskeskabte aktiviteter. Hovedparten af vores diæt (cirka 80 procent) kommer fra planter, hvor primært ris, majs og hvede tegner sig for cirka 60 procent af energiindtaget. Endvidere hælder cirka 80 procent af befolkningen i landdistrikterne deres hoveder til traditionel plantebaseret medicin for deres basale sundhed. I den sammenhæng er krybskytteri et stort problem.

Det terrestriske økosystem leverer samtidig for eksempel råmaterialer til bygninger, energi og fødevarer. Ligeledes stiller økosystemet en række "services" til rådighed, såsom områder til at sikre biodiversiteten, bidrag til kulstofbinding, opretholdelse af jord- og vandkvaliteten, regulering af vandstrømme og kontrol af

jorderosion, og herigennem bidrage til en reduktion af naturkatastrofer som oversvømmelser og jordskred, og regulering af klimaet samt opretholdelse af produktiviteten på landbrugsarealer.

Det overordnede mål med verdensmål 15 er at "beskytte, genoprette og støtte bæredygtig brug af økosystemer på land, fremme bæredygtigt skovbrug, bekæmpe ørkendannelse, standse udpining af jorden og tabet af biodiversitet"; områder, hvor kemien i mange tilfælde kan spille en, nok indirekte rolle, da opgaverne ikke umiddelbart kan betegnes som primære kemikeropgaver. Indirekte er ikke mindst klimaindsatsen

et område, hvor kemien er vigtig (se beskrivelsen af mål 13), hvor en vedligeholdelse af økosystemerne spiller en vigtig rolle.

På flere områder, som sundhed og trivsel og udpining af jorden, ligger der store opgaver med undervisning og information. Et andet område er krybskytteri, der i vid udstrækning hænger sammen med traditionel medicin. Et område, hvor kemien kan spille sammen med informationskampagner og undervisning.

Lars Carlsen,
lc@awarenesscenter.dk

For detaljer om verdensmål 15, se:
<https://sustainabledevelopment.un.org/sdg15>

Relaterede verdensmål:

- Mål 2: Stop sult
- Mål 3: Sundhed og trivsel
- Mål 4: Kvalitetsundervisning
- Mål 6: Rent vand og sanitet
- Mål 7: Bæredygtig energi
- Mål 8: Anstændige jobs og økonomisk vækst
- Mål 9: Industri innovation og infrastruktur
- Mål 11: Bæredygtige byer og lokalsamfund
- Mål 12: Ansvarligt forbrug og produktion
- Mål 13: Klimaindsats
- Mål 17: Partnerskaber for handling