

ESL 22 Arznei- und Gewürzpflanzenanalytik im Hochdurchsatz – Technologie, Möglichkeiten und Anwendungen der numares NMR-Plattform

Medicinal and Aromatic Plant Analysis in high-throughput – technology, possibilities and applications of the numares NMR-platform

Roland Geyer, Michael Rettig, Christoph Dotzer, Volker Pfahlert, Fritz Huber

numares PLANTS, Josef-Engert-Str. 9, 93053 Regensburg, Germany
roland.geyer@numares.com



DOI 10.5073/jka.2014.446.022

Zusammenfassung

Um eine effiziente Analytik von Arznei- und Gewürzpflanzen zu gewährleisten und die hohe Variabilität an auftretenden Matrizes und Probenotypen, ebenso wie die unterschiedlichsten analytischen Fragestellungen und Anforderungen bearbeiten zu können, ist eine Vielzahl komplementärer analytischer Methoden erforderlich.

Die numares AG nutzt einen neuen, innovativen Ansatz, basierend auf der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), um Pflanzenzüchter und die verarbeitende Industrie bei der Analyse und Optimierung von Züchtungsprojekten, Prozessabläufen oder in der Qualitätskontrolle zu unterstützen. Nachfolgend werden anhand ausgewählter Beispiele die Technologie und deren Möglichkeiten und Anwendungsgebiete vorgestellt.

Stichwörter: NMR, Hochdurchsatzanalytik, Elitenselektion, Metabolomic Profiling

Abstract

To ensure an efficient analysis of medicinal and aromatic plants and to be able to handle the high variability occurring in matrices and sample types a variety of complementary analytical methods is required.

The numares AG provides a new and innovative approach based on nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy to assist plant breeders and industry in the analysis and optimization of breeding projects, process flows and in quality control. The technology, its potential and applications are presented below based on selected examples.

Keywords: NMR, high-throughput screening, elite selection, metabolomic profiling

Einleitung

Die als wirksam beschriebenen Inhaltsstoffe in Arznei- und Gewürzpflanzen liegen fast immer in komplexen Vielstoffgemischen, neben zahlreichen indifferenten pflanzlichen Komponenten, vor. Üblicherweise sind diese Wertkomponenten nicht gleichmäßig über die Pflanze verteilt und werden durch den genetischen Hintergrund der jeweiligen Art, aber auch durch biotische und abiotische Faktoren beeinflusst. Darüber hinaus wirken sich Erntetechnik, Trocknung und Lagerung ebenfalls auf den Gehalt der jeweiligen Wertkomponenten aus.

Um eine effiziente Analytik zu gewährleisten und die hohe Variabilität an auftretenden Matrizes und Probenotypen, ebenso wie die unterschiedlichsten analytischen Fragestellungen und Anforderungen bearbeiten zu können, ist eine Vielzahl komplementärer analytischer Methoden erforderlich.

Die numares AG nutzt einen neuen, innovativen Ansatz, basierend auf der Kernspinresonanzspektroskopie (NMR), um Pflanzenzüchter und die verarbeitende Industrie bei der Analyse und Optimierung von Züchtungsprojekten, Prozessabläufen oder in der Qualitätskontrolle zu unterstützen. Numares-Systeme sind in der Humandiagnostik mittlerweile im Routineeinsatz und erlauben die Analyse von mehreren hundert Proben pro Tag. Auch für die Analytik von Arznei- und Gewürzpflanzen sind erste Projekte erfolgreich umgesetzt und zeigen das Potenzial der numares-Technologie, die etablierten, meist chromatografischen Methoden, sinnvoll zu ergänzen. Bisher war eine gleichzeitige Selektion auf agronomische Merkmale und auf Inhaltsstoffgehalte und -zusammensetzung meist limitiert durch die hohen Kosten für die Analytik und es konnten

nur wenige Pflanzen pro Serie auf Inhaltsstoffmuster und -gehalte analysiert werden. Mit Hilfe der NMR können größere Kollektive von Pflanzen auch inhaltsstoffanalytisch zu vertretbaren Kosten untersucht werden. Nachfolgend werden anhand ausgewählter Beispiele die Technologie und deren Möglichkeiten und Anwendungsgebiete vorgestellt.

Grundlagen der numares-Methode

Mit Hilfe der numares-Plattform können in nur einer Messung alle organischen Inhaltsstoffe in einer Probe simultan, in identischer Matrix und über einen großen dynamischen Konzentrationsbereich von 6 Größenordnungen erfasst werden. Frischpflanzenmaterial kann ebenso verarbeitet werden wie Droge oder Extrakt. Das entsprechende Probenmaterial (Trockenmasse ~50-200 mg) wird nur extrahiert (bzw. gelöst) und abzentrifugiert bzw. gefiltert. Das Filtrat wird dann direkt zur NMR-Probe verarbeitet. Einschränkungen bzgl. Lösungsmittel bestehen kaum, teure deuterierte Lösungsmittel sind nur in Zusätzen enthalten und werden nicht in großen Mengen benötigt, da mittels entsprechender Messtechnik mit nicht-deuterten Lösungsmitteln gearbeitet werden kann. Die Messung der 1D ¹H-Spektren erfolgt, je nach Komplexität der Matrix, bei 400 oder 600 MHz und dauert nur wenige Minuten. Das resultierende Spektrum beinhaltet die Signale aller in der Probe vorhandenen organischen Substanzen, d. h. es bildet die qualitative und quantitative Information aller Substanzen der Probe, die über der Nachweisgrenze liegen, ab. Mittels numares-Software werden im Folgenden Signalüberlagerungen verrechnet und so die Signale einzelner Substanzen zugänglich. Nach einmaliger Signalzuordnung mittels Referenzspektren/oder der numares-Datenbank, kann eine voll automatisierte Quantifizierung erfolgen.

Neben der quantitativen Erfassung einzelner Wertkomponenten im Multiparameteransatz, werden mit Hilfe dieser Analyse-Technik auch qualitative Fingerprints der detektierten Pflanzeninhaltsstoffe aufgezeichnet. Diese tiefere Charakterisierung von Pflanzenextrakten dient beispielsweise der Klassifizierung einer bestimmten Droge bzw. eines Pflanzenextraktes (z. B. im Vergleich zu einer Referenz-Probe). Auf diese Weise kann z. B. sehr schnell erkannt werden, ob die analysierte Probe unerlaubte Zusätze enthält oder ein von der Spezifikation abweichendes Inhaltsstoff-Profil aufweist. Die Summe an Informationen kann weiterhin genutzt werden, um Stoffwechselprofile zu erstellen und mit eigenen automatisierten Auswerteverfahren relevante Zusammenhänge zu extrahieren. In diesem Rahmen sind neben zielgerichteten Analysen, auch Metabolom-Analysen möglich und erlauben die Beantwortung komplexer Fragestellungen (agronomische Merkmale, Herkunft, heterotische Gruppen, kontrollierte Replikation, u. v. m.).

Anwendungsbeispiele

Obwohl die NMR seit vielen Jahren in zahlreichen wissenschaftlichen Disziplinen eingesetzt wird, finden deren Anwendung auf komplexere biologische Fragestellungen, sowie der Einsatz in der analytischen Routine, erst langsam den Weg in die tägliche und breite Anwendung. Insbesondere in der Lebensmittelanalytik (DAIS und HATZAKIS, 2013; GODELMANN et al., 2013; LACHENMEIER et al., 2009; LACHENMEIER, 2012; MINOJA und NAPOLI, 2014; SPRAUL et al., 2008) und der Diagnostik (eigenes Portfolio) wird aber in den letzten Jahren verstärkt die Vielfältigkeit der NMR genutzt.

Auch im Bereich der Pflanzenanalytik unterstützt numares bereits verschiedene Projekte und Kundenlabore und liefert wertvolle Daten zur Qualität von pflanzlichen Rohstoffen oder Selektionskriterien im Züchtungsprozess.

Beispiel – Arnika

Der Gehalt und das relative Verhältnis der Sesquiterpenlaktone-Gruppen (Helenalide und Dihydro-Helenalide) als Hauptwirkstoffe von *Arnica montana* variiert je nach Herkunft, aber auch zwischen den einzelnen Pflanzenteilen und während der Entwicklung der Pflanze. Mit Hilfe des numares-Systems können beispielsweise Unterschiede in der Wirkstoffverteilung und des relativen Verhältnisses der Helenalin- und Dihydrohelenalin-Verbindungen zueinander umfassend bestimmt werden. Die Möglichkeit, mit dieser Technologie im Hochdurchsatz einfach und

simultan Inhaltsstoffe zu erfassen, ermöglicht die Charakterisierung der unterschiedlichen zu erntenden Pflanzenteile, eine Genotypen-Bestimmung und die Bestimmung des optimalen Erntezeitpunktes.

Diese Informationen werden sowohl in der Züchtung als Selektionskriterien als auch zur Charakterisierung der Drogen herangezogen. Schnellere und umfangreichere Charakterisierungen von Pflanzen und Extrakten sind so möglich.

In der Routine werden die Untersuchungen an frisch geernteter und eingefrorener Ware durchgeführt. Die Identifizierung der Helenalin/Dihydrohelenalin-Signale in den NMR-Spektren (methanolisch-wässriger Extrakt) erfolgte gegen Referenzspektren der Sesquiterpenlaktone (Abb. 1). Diese Referenzierung ist nur einmalig nötig. Um die gewünschten Gruppenparameter zu bestimmen wurden Signale aus dem gemeinsamen Grundgerüst der Moleküle selektiert und werden vollautomatisch integriert. Zur Quantifizierung werden im weiteren Verlauf nahezu beliebige, kostengünstige Substanzen als interner Standard verwendet.

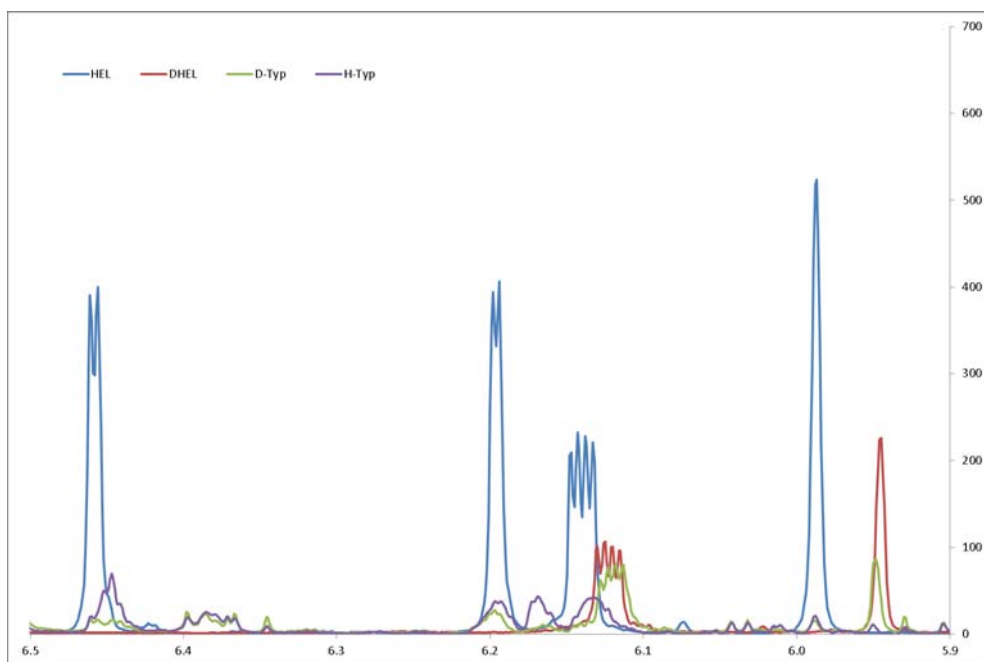


Abb. 1 *Arnica montana* – Spektraler Ausschnitt von Dihydrohelenalin- (rot) und Helenalinmethacrylat (blau) Referenzspektren, sowie zweier Arnika-Frischpflanzenextrakte (D-Typ/H-Typ). Gesamtsesquiterpenlaktongehalt sowie D- und H-Summe können quantifiziert werden.

Fig. 1 *Arnica montana* – Dihydrohelenaline (red) and Helenalinmethacrylate (blue) reference spectra, and spectra of two arnica fresh plant extracts (D-Typ/H-Typ). Total sesquiterpenlactone content as well as D- and H-sum can be quantified.

Die relativen und absoluten Werte können für über 100 Proben pro Tag ermittelt und dem Züchter bzw. Verarbeiter zur Verfügung gestellt werden. Abb. 2 zeigt exemplarisch das relative Verhältnis von Dihydrohelenaliden zu Helenaliden in 50 Pflanzen, sowie den relativen Gesamtgehalt an Sesquiterpenlaktonen.

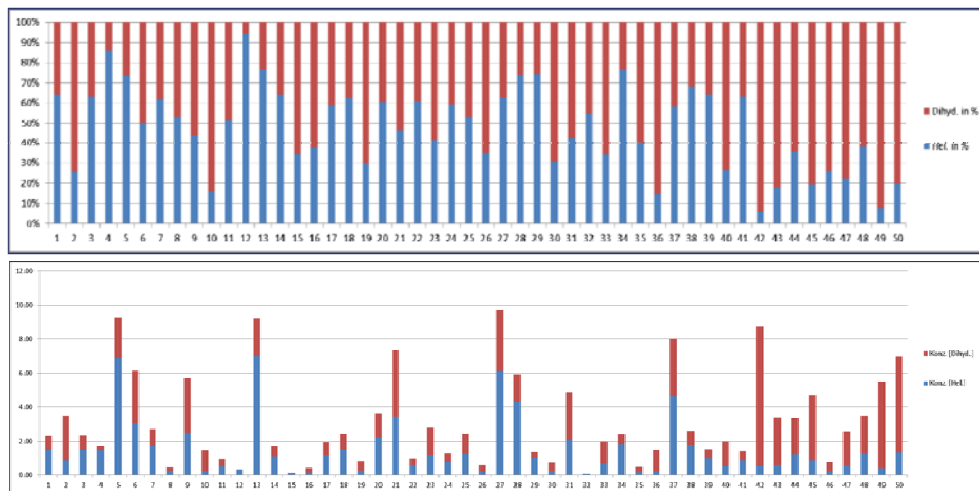


Abb. 2 *Arnica montana* – Verhältnis von Inhaltsstoffen (z. B. Dihydrohelenalin/Helenalin) (oben), sowie Gesamtgehalt (Summe Sesquiterpenlaktone)(unten) auf Einzelpflanzenbasis.

Fig. 2 *Arnica montana* – ratio of ingredients (eg dihydrohelenaline/helenaline) (top) and total content (sum sesquiterpenolactones) (below) for single plants.

Neben Information auf Einzelpflanzenbasis kann beispielsweise auch die Verteilung der Inhaltsstoffe in der Pflanze bestimmt werden. Tabelle 1 zeigt die relativen Sesquiterpenlaktongehalte in unterschiedlichen Pflanzenorganen zur Zeit der Blüte – gemittelt über 3 Arnika-Klone (des spanischen Chemotyps). Es ist ein weitgehend konstantes Verhältnis der unterschiedlichen Sesquiterpenlaktonformen mit einem hohen Gehalt der Dihydrohelenalinform in allen Proben über alle Organe zu erkennen. Lediglich im mittleren und unteren Stängelbereich sind die Konzentrationen so niedrig, dass sich hier im prozentualen Verhältnis leichte Abweichungen ergeben. Des Weiteren ist zu erkennen, dass die Gehalte in folgender Reihenfolge der Organe abnehmen: Blüte voll aufgeblüht > Blüte Frischdroge (2 Röhrenblütenkränze aufgeblüht) > Knospe = Blatt > Stängel unter der Blüte > Stängel Mitte > Stängel Basis.

Tab. 1 Relative Sesquiterpenlaktongehalte in unterschiedlichen Pflanzenorganen zur Zeit der Blüte – gemittelt über 3 Arnika-Klone.

Tab. 1 Relative Sesquiterpenlactone content in different plant organs at flowering – averaged over 3 arnica clones.

Pflanzenorgan	Rel. Konzentration Dihydrohelenalide (Ø)	% Dihydrohelenalide (Ø)
Knospe	573 ± 59	97 ± 3
Blüte Frischdroge	686 ± 21	94 ± 1
Blüte voll aufgeblüht	1141 ± 118	96 ± 1
Blatt	576 ± 23	97 ± 1
Stängel unter Blüte	274 ± 52	95 ± 2
Stängel Mitte	99 ± 11	93 ± 3
Stängel unten	20 ± 5	74 ± 9

Beispiel – Oregano

Eine weitere Anwendung auf dem Weg in die Routine ist die Bestimmung des Thymol-, Thymochinon- und Carvacrol-Gehalts in Oreganoproben. Getrocknete und gerebelte Proben (~200 mg) wurden mittels Chloroform extrahiert und die Zielsubstanzen gegen einen internen Standard quantifiziert. Die Identifizierung und Zuordnung der relevanten Signale erfolgte gegen Referenzspektren. Trotz der strukturellen Ähnlichkeit der Substanzen bieten die Extraktsspektren genug Informationen, um die drei Zielsubstanzen zu unterscheiden und einzeln zu erfassen (Abb. 3). Die Methode wurde gegen HPLC-Referenzdaten geprüft ($R^2 < 0,9$). Der lineare Arbeitsbereich erstreckt sich über 5 Größenordnungen, bei einer Nachweisgrenze unter 0,01 % (w/w).

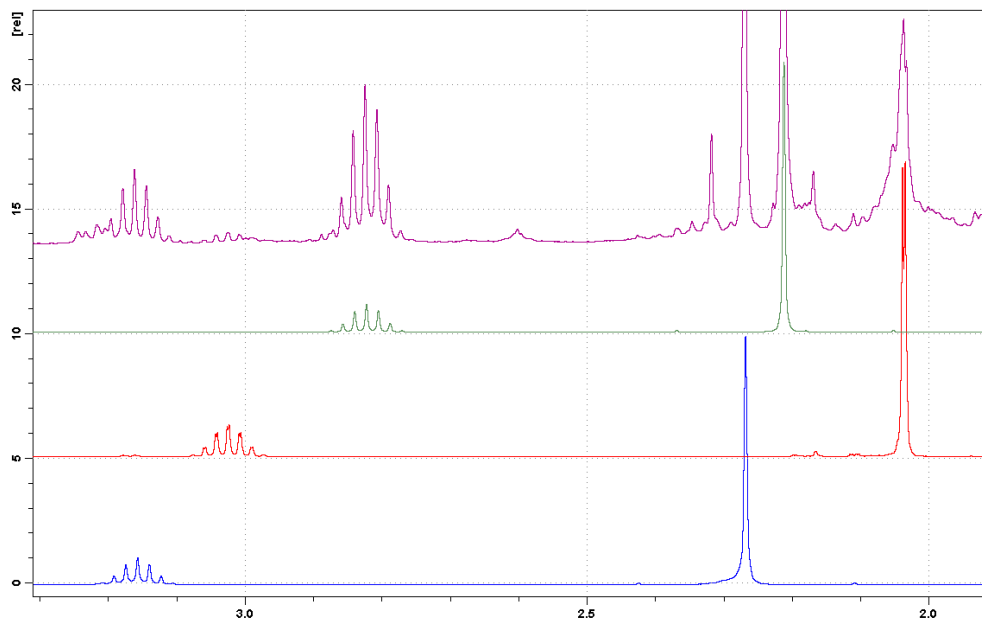


Abb. 3 *Origanum vulgare* – Pflanzenextrakt (lila) gegen Carvacrol- (grün), Thymochinon- (rot) und Thymol-Referenz (blau).

Fig. 3 *Origanum vulgare* – Spectra of plant extract (violet), Carvacrol- (green), Thymochinone- (red) und Thymol-reference (blue).

Weitere Beispiele

Diverse weitere Anwendungen wurden oder werden von numares bearbeitet. Aktuelle Studien an *Glycyrrhiza glabra*, *Echinacea angustifolia*, *Tanacetum parthenium* oder *Baptisia tinctoria* zeigen vielversprechende Resultate. In Abb.4 ist beispielhaft ein methanolisch-wässriger *Echinacea*-Extrakt gegen das Echinacosid-Referenzspektrum aufgetragen. Die relevanten Signale sind eindeutig zuzuordnen und können mittels numares-Software einer Quantifizierung zugänglich gemacht werden.

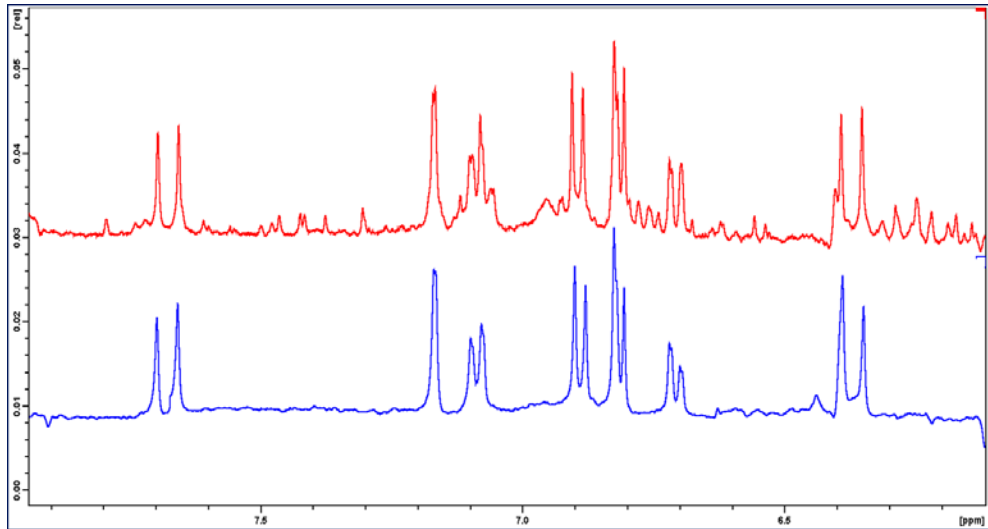


Abb. 4 *Echinacea angustifolia* – Pflanzenextrakt (rot, oben) gegen Echinacosid-Referenz (blau, unten).

Fig. 4 *Echinacea angustifolia* – Spectra of plant extract (red) and Echinacoside-reference (blue).

Die bisherigen eigenen Arbeiten ebenso wie die steigende Zahl an Publikationen (CHAN et al., 2014; KIM et al., 2012; LI et al., 2013; PIERI et al., 2011; PIERI et al., 2012; SIMMLER et al., 2014; TANAKA et al., 2013; VAN DER KOOP et al., 2009; WISHART, 2013), zeigen das große Potenzial der NMR auch für die Arznei- und Gewürzpflanzenanalytik. Das analytische Repertoire, das nötig ist um aktuelle aber auch neue Aufgabenstellungen und höhere Probenzahlen bearbeiten zu können, wird in den nächsten Jahren durch diese Technologie sicherlich um einen weiteren vielfältigen Player ergänzt.

Literatur

- CHAN, P.H., ZHANG, W.L., CHEUNG, C.Y., TSIM, K.W. und H. LAM, 2014: Quality Control of Danggui Buxue Tang, a Traditional Chinese Medicine Decoction, by-NMR Metabolic Profiling. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014: 567893.
- DAIS, P. und E. HATZAKIS, 2013: Quality assessment and authentication of virgin olive oil by NMR spectroscopy: A critical review. *Anal. Chim. Acta* **765**: 1–27.
- GOELMANN, R., FANG, F., HUMPFER, E., SCHÜTZ, B., BANSBACH, M., SCHÄFER, H. und M. SPRAUL, 2013. Targeted and Nontargeted Wine Analysis by 1H NMR Spectroscopy Combined with Multivariate Statistical Analysis. Differentiation of Important Parameters: Grape Variety, Geographical Origin, Year of Vintage. *J. Agric. Food Chem.* **61** (23): 5610–5619.
- KIM, H.E., CHOI, Y.H., CHOI, K.H., PARK, J.S., KIM, H.S., JEON, J.H. und J.H. LEE, 2012: Metabolic classification of herb plants by NMR-based metabolomics. *Journal of the Korean Magnetic Resonance Society* **16**(2): 91–102.
- LACHENMEIER, D., HUMPFER, E., FANG, F., SCHÜTZ, B., DVORTSAK, P., SPROLL, C. und M. SPRAUL, 2009: NMR Spectroscopy for nontargeted screening and simultaneous quantification of health-relevant compounds in foods: The example of melamine. *J. Agric. Food Chem.* **57**: 7194–7199.
- LACHENMEIER, D., 2012: (CVUA Karlsruhe) Kernspinresonanzspektroskopie (NMR)-Profiling in der Lebensmittelüberwachung. 13. BfR-Forum Verbraucherschutz, 14.06.2012.
- LI, W., RUAN, C.-J., TEIXEIRA DA SILVA, J.A., GUO, H. und C.E. ZHAO, 2013: NMR metabolomics of berry quality in sea buckthorn (*Hippophae* L.). *Mol. Breeding* **31**(1): 57–67.
- MINOJA, A.P. und C. NAPOLI, 2014: NMR screening in the quality control of food and nutraceuticals. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.04.056.
- PIERI, V., BELANCIC, A., MORALES, S. und H. STUPPNER, 2011: Identification and Quantification of Major Steviol Glycosides in *Stevia rebaudiana* Purified Extracts by 1H NMR Spectroscopy. *J. Agric. Food Chem.* **59**(9): 4378–4384.
- PIERI, V., STURM, S., SEGER, C., FRANZ, C. und H. STUPPNER, 2012: 1H NMR-based metabolic profiling and target analysis: a combined approach for the quality control of *Thymus vulgaris*. *Metabolomics* **8**(2): 335–346.
- SIMMLER, C., NAPOLITANO, J.G., McALPINE, J.B., CHEN, S. und G.F. PAULI, 2014: Universal quantitative NMR analysis of complex natural samples. *Curr. Opin. in Biotechnol.* **25**: 51–59.

- SPRAUL, M., HUMPFER, E., SCHÄFER, H., SCHÜTZ, B., MÖRTTER, M. und P. RINKE, 2008: NMR-Based Mixture Analysis on the Example of Fruit Juice Quality Control Using Statistics and Quantification. In: Holzgrabe, U., Wawer, I. und B. Diehl, B. (Eds.): *NMR Spectroscopy in Pharmaceutical Analysis*. Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, S 319–339.
- TANAKA, R., YAMAZAKI, M., HASADA, K. und A. NAGATSU, 2013: Application of quantitative ¹H-NMR method to determination of paeoniflorin in *Paeoniae radix*. *J. Nat. Med.* **67** (3): 657–661.
- VAN DER KOOY, F., MALTESE, F., CHOI, Y.H., KIM, H.K. und R. VERPOORTE, 2009: Quality Control of Herbal Material and Phytopharmaceuticals with MS and NMR Based Metabolic Fingerprinting. *Planta Med.* **75**(7): 763–775.
- WISHART, D.S., 2013: Characterization of biopharmaceuticals by NMR spectroscopy. *Trends Analyt. Chem.* **48**: 96–111.