



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Comprehensive extraction and NMR-based Metabolomics : novel approaches to natural products lead finding in drug discovery

Yuliana, N.D.

Citation

Yuliana, N. D. (2011, June 9). *Comprehensive extraction and NMR-based Metabolomics : novel approaches to natural products lead finding in drug discovery*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/17704>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License: [Leiden University Non-exclusive license](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/17704>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Samenvatting

Obesitas is wereldwijd een ernstig gezondheidsprobleem geworden in zowel de Westerse landen als in ontwikkelingslanden. Het is ook een gezondheidsprobleem dat extreem hoge kosten met zich meebrengt, omdat het relateert aan verschillende ziektebeelden zoals hart- en vaatziekten, diabetes type 2, degeneratieve gewrichtsaandoeningen en kanker, en het is een probleem dat een negatieve impact heeft op de kwaliteit van leven van mensen met deze aandoening.

Momenteel is Orlistat het enige geregistreerde middel dat wereldwijd gebruikt wordt tegen obesitas. Anderzijds is er een overvloed van voedingssupplementen zonder recept op de markt verkrijgbaar die toegepast worden ten behoeve van gewichtsverlies en -controle; hieronder overheersen vooral supplementen met componenten van plantaardige oorsprong. De anti-obesitas werking van medicinale planten wordt ook veelvuldig in wetenschappelijk studies onderzocht, waarbij verschillende mechanismen van anti-obesitas werking bestudeerd zijn en de betrokken actieve componenten geïdentificeerd zijn. De uitgebreide studies worden echter niet gereflecteerd in een significant aantal plantaardige componenten dan wel extracten in klinische studies. Door het ontbreken van dergelijke klinische studies is er nog steeds een tekort aan gegevens over de veiligheid van dergelijke producten bij de mens, en speelt het probleem om een betrouwbare effectieve dosis te definiëren (**Hoofdstuk 1**).

De ontdekking van nieuwe geneesmiddelen uit planten kan via meerdere benaderingen, zoals middels het testen van willekeurig gekozen planten, door middel van het opvolgen van beschreven biologische activiteiten of via een ethnofarmacologische aanpak. De twee laatstgenoemde methoden zijn gehanteerd om medicinale planten en specerijen te onderzoeken op verschillende anti-obesitas effecten, bijvoorbeeld met een werkingsmechanisme middels de zogenaamde adenosine A1 of de CB1 receptor, remming van TNF- α en lipolyse effectiviteit bij 3T3-L1 adipocyten. Meerdere specerijen en planten bleken actief te zijn in een of meer van de genoemde biologische testen. De effectiviteit van de producten werd getest bij verschillende concentraties, mede afhankelijk van de biologische test, maar in alle testen bij concentraties lager dan 100 μ M.

Benincasa hsipida zaad, sesamzaad en rode chilipeper extracten vertoonden hoge bindingsaffiniteit met de adenosine A1 receptor; nootmuskaat, foelie (zaadrok van nootmuskaat, *Myristica fragrans*), zwarte peper, en curcuma toonden affiniteit voor de cannabinoid CB1 receptor; extracten van moerbei boomschors, Temu lawak (rhizomen van *Curcuma xanthorrhiza*) en Temu kunci (rhizomen van *Boesenbergia pandurata*) lieten een hoge bindingsaffiniteit voor beide receptoren zien. Pimentbes en curcuma extracten bewerkstelligden een hoge remming van TNF- α accumulatie, terwijl zwarte komijn (zaden van *Nigella sativa*) de enige specerij is die activiteit vertoont ter bevordering van 3T3-L1 adipocyt differentiatie. Een aantal van de hoofdcomponenten in de genoemde specerijen, zoals capsaïcine, myristicine, papaverine, piperine, kaneelzuur, α -pineen, kamfeen en borneol, werden individueel getest in de relevante biologische toetsen waarbij activiteit van het originele extract was gedetecteerd, maar bij geen werd een effect aangetoond. De activiteiten gevonden bij de extracten zijn mogelijk het resultaat van een synergistisch effect tussen verschillende componenten in de extracten (**Hoofdstuk 2**).

Orthosiphon stamineus Benth (kattensnor) is een veelgebruikt medicinaal kruid in Indonesië. Het wordt toegepast om verschillende aandoeningen, zoals verhoogde bloeddruk, diabetes en nierstenen, te behandelen. Het wordt ook gebruikt als ingrediënt in diuretica en op kruiden gebaseerde afslankproducten. Vele metabolieten zijn geïdentificeerd in deze plant, waaronder diterpenen, triterpenen en flavonoiden. Deze plant is geselecteerd om nieuwe liganden voor de adenosine A1 receptor te vinden middels conventionele fractionering gecombineerd met selectie op basis van biologische activiteit. Deze aanpak resulteerde in de isolatie van 7 methoxy-flavonoiden met K_i waarden op micromolaire niveau. De zogenaamde Hill-coëfficiënten waren niet significant verschillend van 1 (uiterste waarden 0.9 en 1.4), wat betekent dat de metabolieten een antagonistische werking hebben op de receptor. Deze resultaten leveren derhalve bewijs voor het mogelijke effect van het traditioneel gebruik van *O. stamineus* als afslankkruid en tegen nierstenen (**Hoofdstuk 3**).

Snelle ontwikkelingen voor het ontdekken van nieuwe geneesmiddelen, zoals combinatoriële chemie en structuur-activiteit relaties, maken weinig gebruik van natuurlijke producten, en vooral planten, als een bron voor nieuwe kandidaat

geneesmiddelen. Ondanks de grote diversiteit aan moleculaire structuren en biologische activiteiten, zijn het de complexe mengsels van de metabolieten en hun dynamiek, die het gebruik van planten als belangrijke bron voor de ontwikkeling van geneesmiddelen gelimiteerd hebben. Meerdere nieuwe strategieën zijn geïntroduceerd om deze problemen op te lossen, zoals het opzetten van collecties van natuurlijke producten, het verbeteren van zuiveringsmethoden, het optimaliseren van dereplicatie en identificatie stappen, en het toepassen van structuur gebaseerde virtuele bindingsstudies met bekende receptoren en natuurstoffen. Desalniettemin is er in de afgelopen jaren met geen enkele van de genoemde methodes veel vooruitgang geboekt met het vinden van nieuwe leads voor het ontwikkelen van geneesmiddelen. Wat betreft natuurstoffen wordt snelle dereplicatie van bekende bio-actieve metabolieten, vals positieve metabolieten en identificatie van nieuwe actieve componenten als meest belangrijk beschouwd bij de ontwikkeling van geneesmiddelen uit planten. Als oplossing hiervoor wordt in meerdere publicaties een meer holistische benadering beschreven, waarmee een breed scala aan metabolieten in een extract ineens geanalyseerd kunnen worden, de zogenaamde metabolomics aanpak. Deze nieuwe aanpak benut de toepassing van verschillende analytische methoden gevolgd door multivariate data analyse. Het doel hierbij is om het proces van fractionering in combinatie met biologische toetsen voor selectie te verkorten, met name als het gaat om de identificatie en de dereplicatie stappen (**Hoofdstuk 4**).

Dunne laag chromatografie in combinatie met orthogonale-partiële kleinste kwadraat analyse (OPKK) is toegepast voor het bepalen van de correlatie tussen de chemische samenstelling van *O. stamineus* extracten en fracties verkregen na vloeistof-vloeistof partitionering met de overeenkomende resultaten van adenosine A1 receptor bindings activiteit. De mate van correlatie is hierbij gebaseerd op de vergelijking van kleurintensiteit van een vlek in de “loading plot”; op deze wijze werden de vlekken 1-5 en 7 als actief geïdentificeerd. De retentie van de 7-methoxy flavonoiden, die eerder geïdentificeerd waren als actieve stoffen op de receptor, kwamen overeen met de vlekken 2, 3, 4 en 5. Verder werden pilloine en eupatorine geïdentificeerd in vlek 2 en vlek 3 bevatte tevens 3'-hydrxy-4',5,6,7-tetramethoxyflavone en sinensetine. In vlek 4 werden tetramethylscutellareine en eupatoretine geïdentificeerd, terwijl 5,6-dihydroxy-7,4'-dimethoxyflavone in vlek 5 gevonden werd. De identificatie van de stoffen werd

verder bevestigd met ^1H NMR analyse van de extracten in combinatie met de OPKK analyse (**Hoofdstuk 5**).

Vervolgens is een nieuwe extractie methode ontwikkeld, die we “comprehensive extraction” hebben genoemd. Bij deze extractie methode wordt plantenmateriaal geëxtraheerd met een gradiënt van oplosmiddelen met toenemende polariteit, waardoor fracties ontstaan met overlappende chemische samenstelling. Hiërarchische cluster analyse (HCA) en partiële kleinste-kwadraat discriminant analyse (PKK-DA) toonden aan dat deze aanpak van “comprehensive extraction” reproduceerbare resultaten levert; verder is de aanpak sneller en efficiënter omdat betere ^1H NMR spectra verkregen worden om het totale chemische profiel van de plantenmateriaal in kaart te brengen (**Hoofdstuk 6**).

“Comprehensive extraction” en NMR metabolomics in combinatie met multivariate data analyse (partiële kleinste-kwadraat –PKK- methode en orthogonale-partiële kleinste-kwadraat –OPKK- analyse) zijn toegepast om metabolieten, die activiteit vertonen in de biologische toetsen, te identificeren in ruwe plantenextracten. Hoewel beide statistische methodes passend zijn voor dergelijke statistische analyses, bleek de OPKK analyse het meest geschikt om de correlatie tussen het chemische profiel van een plantenextract en het bio-activiteits profiel te bestuderen. OPKK analyses zijn eenvoudiger te beoordelen dan PKK analyses, omdat de variabelen die niet gecorreleerd zijn met de respons in de biologische toetsen orthogonaal afwijken van de variabelen die wel correleren. Verder is gevonden dat extractie met oplosmiddelcombinaties met een breder polariteitspectrum (*n*-hexaan-aceton-water) resulteert in een meer gevarieerde chemische samenstelling dan bij oplosmiddelcombinaties met een nauwer polariteitsspectrum (ethyl acetate-methanol (1:1)/methanol-water (1:1)). Voor chemische validatie zijn de ^1H NMR, J-res, COSY, en HMBC NMR data van de zeven flavonoiden, die eerder positief bevonden waren in de adenosine A1 receptor toetsen, vergeleken met de data van één van de actieve fracties uit de “comprehensive extraction” procedure. Alle belangrijke signalen van deze actieve flavonoiden hadden een positieve Y-coëfficiënt waarde en een importantiewaarde hoger dan 0,5; dit betekent dat deze metabolieten een significante bijdrage leveren aan de hoge positieve activiteit van deze fractie (**Hoofdstuk 7**).

Verschillende metabolieten zijn geïsoleerd uit verschillende plantendelen van *Morus alba* L. (vruchten, bladeren, wortelschors en boomschors). Geprenyleerde aromatische verbindingen en alkaloiden zijn de belangrijkste metabolieten. Het methanol extract van deze plant (zie Hoofdstuk 2) had een hoge affiniteit voor de adenosine A1 receptor. De “comprehensive extraction” methode in combinatie met NMR metabolomics en de OPKK analyse zijn toegepast om te bepalen welke metabolieten in het extract significant correleren met de gevonden activiteit. NMR signalen van vetzuren bleken een hoge positieve correlatie te hebben met de activiteit van het extract, en niet de NMR signalen van alkaloiden of geprenyleerde metabolieten. De karakteristieke NMR signalen van twee eerder uit *M. alba* geïsoleerde componenten bleken ook een negatieve Y-coëfficiënt waarde te hebben. Dit komt overeen met de resultaten uit de biologische toetsen waarbij deze twee metabolieten geen binding met de receptor vertoonden (**Hoofdstuk 8**).

Conclusie, dit proefschrift beschrijft een nieuwe strategie om de dereplicatie en identificatie stappen te verbeteren in het proces om nieuwe geneesmiddelen in planten te ontdekken. Het integreren van “comprehensive extraction” gekoppeld aan NMR metabolomics en multivariate data analyse is een nieuwe aanpak met de potentie om snel de bioactieve metabolieten in ruwe extracten te identificeren.

