



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Systematische Interpretation der Fragmentationen-
Massenspektren von Bufadienoliden und deren Derivaten

verfasst von

Regina Friedl

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Diplomstudium Pharmazie

Betreut von:

Ao. Univ.Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Aufgabenstellung	1
1.2. Herzwirksame Steroidglykoside mit Schwerpunkt Bufadienolide	2
1.2.1. Vorkommen	2
1.2.2. Chemie	4
1.2.3. Pharmakokinetik	5
1.2.4. Pharmakodynamik	6
1.2.5. Bufadienolide und Cardenolide als Gegenstand der aktuellen Forschung	9
1.3. Massenspektrometrie	14
1.3.1. Elektrosprayionisation	15
1.3.2. Ionenfallen-Massenspektrometer	17
1.3.3. Grundzüge von Bufadienolid-Massenspektren	21
2. Untersuchte Bufadienolide	25
2.1. Einteilung der Bufadienolide nach strukturellen Merkmalen	28
2.2. Vorgangweise der Interpretation der Massenspektren	28
3. Ergebnisse und Interpretationen	32
3.1. Gruppe I: Bufadienolidaglyka mit Hydroxygruppen	32
3.2. Gruppe II: Bufadienolidaglyka mit Hydroxy- und Acetoxygruppen	37
3.3. Gruppe III: Bufadienolidaglyka mit Hydroxy- und Ketogruppen	42
3.4. Gruppe IV: Bufadienolidaglyka mit einer Epoxygruppe und anderen Substituenten	44
3.5. Gruppe V: Bufadienolidaglyka mit Hydroxy- und Formylgruppen	47
3.6. Gruppe VI: Bufadienolidaglyka mit Hydroxy-, Formyl- und Acetoxy- gruppen	51
3.7. Gruppe VII: Bufadienolidaglyka mit Hydroxy-, Keto- und Acetoxy- gruppen	53
3.8. Gruppe VIII: Bufadienolidglykoside	56
4. Diskussion	59
5. Zusammenfassung	63
6. Summary	65
Wissenschaftliche Literatur	66
Internet Referenzen	69
Anhang	70
A. Strukturen	70
B. Spektren	92

1. Einleitung

Bufadienolide zählen zu den Hauptwirkkomponenten des in der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) eingesetzten Chansu (Venenum bufonis). Dabei handelt es sich um das getrocknete, eingedickte Sekret, welches durch das Ausdrücken der Ohrspeicheldrüsen oder Hautdrüsen bestimmter ostasiatischer Krötenarten, wie *Dutaphrynus melanosticus* oder *Bufo gargarizans* CANTOR, gewonnen wird.

Chansu kommt als Bestandteil von Liu-Shen-Wan – einer Rezeptur in der chinesischen Medizin – in einem breit gefächerten Indikationsgebiet zum Einsatz. Aufgrund der positiven kardialen Wirkungen der enthaltenen steroidalen Bufadienolide, steht natürlich eine Anwendung dieser Zubereitungen bei Herzinsuffizienz und ödematösen Beschwerden im Vordergrund. Auch Tonsilitis, Furunkeln und bakterielle Infekte können mit Chansu traditionell therapiert werden. [HCY92]

Die tiefe Verankerung von bufadienolidhaltigen Drogen in der ostasiatischen Heilkunst, als auch äußerst potente und vielfältige pharmakologische Eigenschaften, machen die Bufadienolide zu einer sehr interessanten Stoffgruppe, welche die aktuelle Forschung beschäftigt. Neben den gut untersuchten kardialen Wirkungen stehen derzeit neue Erkenntnisse über antineoplastische, lokalanästhetische als auch immun-suppressive Eigenschaften dieser Wirkstoffe im Fokus der Wissenschaft. [LXX⁺10]

Bisher wurden über 250 Bufadienolide isoliert und die Suche nach neuen aktiven Vertretern aus biogenen Quellen ist bei weitem noch nicht abgeschlossen. Es ist in diesem analytischen Prozess von Relevanz, noch unbekannt, womöglich biologisch aktive, Inhaltsstoffe besonders schnell von bereits bekannten Komponenten differenzieren zu können. Idealerweise sollte diese Aussage bereits vor zeitintensiven Aufreinigungsverfahren getroffen werden können, um eine unnötige und wiederholte Isolierung geläufiger Inhaltsstoffe aus den Rohextrakten zu verhindern. Eines der wichtigsten analytischen Verfahren zur Charakterisierung neuer Komponenten aus komplexen Naturstoffgemischen und Extrakten stellt die Kombination aus Flüssigchromatographie und Massenspektrometrie (LC/MS, engl.: liquid chromatography/mass spectrometry) dar. Die Massenspektrometrie stellt dabei relevante strukturelle Informationen zu einer Verbindung bereit. [LXX⁺10]

1.1. Aufgabenstellung

Die Wissenschaft konzentrierte sich bisher maßgeblich auf die Isolierung, Aufreinigung, Strukturaufklärung, quantitative Analyse und Qualitätskontrolle der Bufadienolide, wobei die strukturelle Charakterisierung mittels Massenspektrometrie derzeit noch wenig ausgereift ist. [LXX⁺10]

Im Zuge der vorliegenden Diplomarbeit sollen anhand der Analyse und Interpretation einer umfangreichen Sammlung an Bufadienolid-Massenspektren Fragmentierungsregeln abgeleitet werden, welche es erlauben, Rückschlüsse auf strukturelle Merkmale von unbekanntem Bufadienoliden zu ziehen. Die Reinsubstanzen, welche

für diese Arbeit herangezogen werden, stammen aus der Naturstoff-Bibliothek des Departments für Pharmakognosie (Univ. Prof. Mag. Dr. Dr. h. c. Brigitte Kopp) der Universität Wien. Die Strukturaufklärung dieser Verbindungen erfolgte bereits im Vorhinein mittels NMR-Spektroskopie. Ebenso wurde unter Verwendung eines ESI-Ionenfallen-Massenspektrometers die massenspektrometrische Aufnahme der Bufadienolide von Dr. Martin Zehl durchgeführt. Auf Basis der vorliegenden Strukturinformation, sollen die Massenspektren nun auf Fragmentationen, Markerpeaks oder Abspaltungsmuster untersucht werden, welche das Vorhandensein bestimmter Substituenten oder Funktionalitäten am Bufadienolid-Grundkörper charakterisieren. Eine Grundvoraussetzung dafür ist die Feststellung, ob strukturell ähnliche Bufadienolide auch hinsichtlich ihres Fragmentierungsverhaltens Parallelen aufweisen. Dies stellt einen wesentlichen Bestandteil dieser Diplomarbeit dar. Die so erworbenen Erkenntnisse können in Zukunft die Analytik von Bufadienoliden erleichtern, da bereits auf Grundlage des Massenspektrums und mit Hilfe des zu entwerfenden Regelwerkes schon wichtige Informationen zur Struktur einer unbekanntem Verbindung bereitgestellt werden kann.

1.2. Herzwirksame Steroidglykoside mit Schwerpunkt Bufadienolide

Dieses Kapitel erläutert die wesentlichen Charakteristika und Eigenschaften dieser Substanzklasse. Neben den chemischen und pharmakologischen Merkmalen werden weitere Informationen zur therapeutischen Anwendung von Steroidglykosiden, sowie der aktuelle Stand der Forschung näher beleuchtet.

1.2.1. Vorkommen

Wichtige tierische Quellen für Bufadienolide sind die Krötengattung *Bufo* (Echte Kröten) und einige andere Vertreter der Familie Bufonidae, die Gattung *Photinus* aus der Familie der Lampyridae (Leuchtkäfer) und eine zur Familie der Colubridae (Nattern) zählende Schlangengattung mit der Bezeichnung *Rhabdophis* [KRK13]. Die Gattung *Rhabdophis* ist jedoch nicht in der Lage Bufadienolide selbst zu synthetisieren, sondern bezieht diese Toxine aus Kröten, welche als Beutetiere fungieren. Wie bereits in der Einleitung erwähnt, werden die Hautsekrete bestimmter asiatischer Krötenarten für die Herstellung von Formulierungen und Zubereitungen (Chansu, Liu-Shen-Wan) in der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) verwendet. Die Abbildung 1.1 zeigt einen Vertreter der Gattung *Bufo*.

Krötengifte werden meistens zur Abschreckung von Fressfeinden aus den Hautdrüsen sezerniert. In diesem Zusammenhang können sie beim Verzehr der Kröte als Beutetier zu Nausea, Emesis, unspezifischen Augenentzündungen und Reizungen des Gastrointestinaltraktes führen [GHG07]. Neben den Bufadienoliden ist das Hautsekret der Gattung *Bufo* auch reich an biogenen Aminen, Alkaloiden, Steroiden und Peptidkomponenten. Bufalin, Bufogenin, Bufotalin, Cinobufagin, Marinobufagin als auch Resibufagin zählen zu den relevantesten Bufadienolid-Vertretern des Krötengiftes und verleihen dem Hautsekret einen milchigen, opaleszierenden Glanz [GHG07]. Bufadienolide können zudem im Blut von Vertretern der Gattung *Bufo* nachgewiesen werden, wobei sie in diesem Fall in glykosidisch gebundener Form (Bufadienolidglykoside)

Abb. 1.1.: *Bufo alvarius*

vorliegen und für die normale Herztätigkeit vonnöten sind. Im Hautsekret hingegen dominieren neben der freien Form auch Ester mit Suberylarginin, wie das Bufotoxin, der Suberylarginylester des Bufotalins [1]. Die im Krötenhautsekret vorliegenden Proteinkomponenten zeichnen sich durch antimikrobielle Aktivität aus, besitzen teilweise auch Enzymcharakter und schützen das Individuum vor oberflächlichen Hautläsionen und daraus resultierenden Infektionen [GHG07]. Ein zur Gruppe der Indolylalkylamine zählender Inhaltsstoff mit psychedelischen und halluzinogenen Wirkkomponenten ist das sogenannte Bufotenin (5-Hydroxy-N,N-dimethyltryptamin), welches in Abbildung 1.2(a) dargestellt ist.

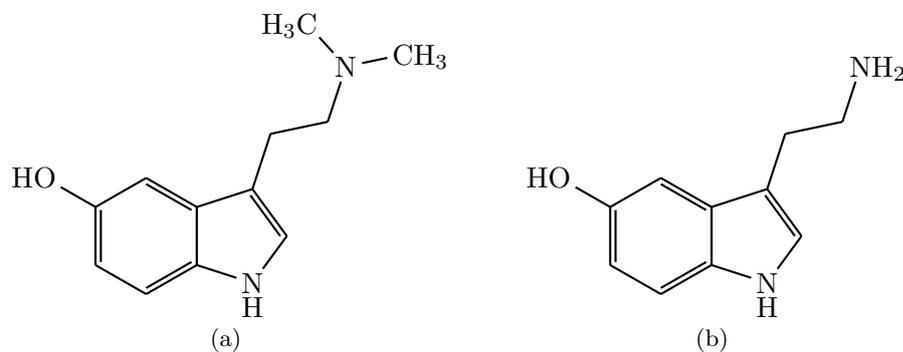


Abb. 1.2.: Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen Bufotenin (a) und Serotonin (b)

Aufgrund seiner hohen strukturellen Ähnlichkeit mit dem endogenen Neurotransmitter Serotonin (5-Hydroxytryptamin, Abb. 1.2(b)) wirkt Bufotenin an potentiell halluzinogenen Serotoninrezeptoren (5-HT_{2A}, 5-HT_{2C}) als Agonist. Auch heute noch werden Zubereitungen aus dem giftigen Hautsekret von *Bufo marinus* (große Meereskröte) von südamerikanischen Indianerstämmen im Rahmen spiritueller Riten verwendet, um Rauschzustände herbeizuführen. [Ges97, S.136-137][McB00]

Zu den wichtigsten Pflanzenfamilien, bei denen Bufadienolide nachgewiesen werden konnten, zählen jene der Crassulaceae und Hyacinthaceae, aber auch Iridaceae, Ranunculaceae, Melianthaceae und Santalaceae [KRK13]. Besonders die Echte Meerzwiebel (*Drimys maritima* (L.) STEARN, Asparagaceae) als auch die Schneerose (*Hel-leborus niger*, Ranunculaceae) stellen relevante bufadienolidhaltige Heilpflanzen dar.

1.2.2. Chemie

Bufadienolide werden der Klasse der *herzwirksamen Steroidglykoside* zugeordnet. Die Aglyka dieser Stoffklasse weisen einen 10,13-Dimethylsteran-Grundkörper auf. Je nach Substituent am C-17 kann man eine weitere Unterteilung in *Cardenolide* und *Bufadienolide* vornehmen. [TLM12, S.228-230]

Cardenolide zeichnen sich durch einen β -ständigen, 5-gliedrigen, einfach ungesättigten γ -Lactonring (Butenolidring) aus, wohingegen Bufadienolide an dieser Position einen β -ständigen, 6-gliedrigen, zweifach ungesättigten δ -Lactonring (Pentadienolidring) besitzen [TLM12, S.228-230]. Die entsprechenden Grundkörper sind in Abbildung 1.3 (S. 5) dargestellt.

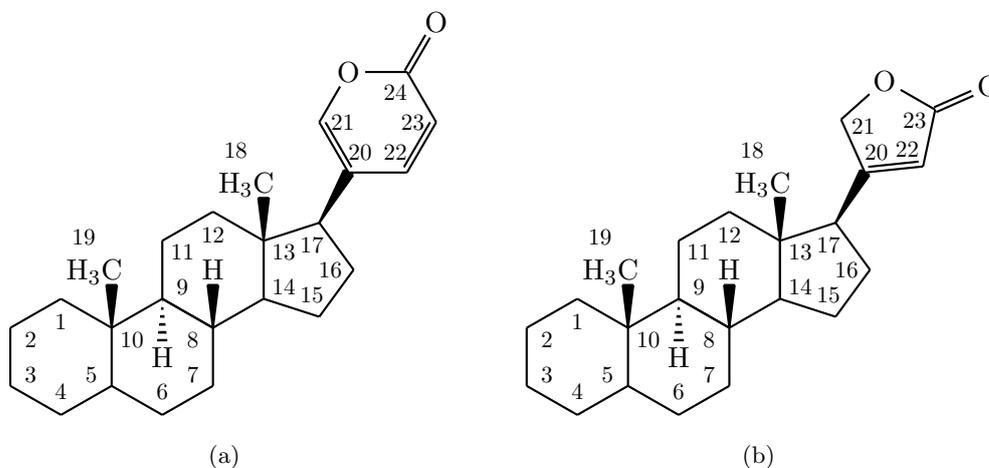


Abb. 1.3.: Struktur des Bufadienolidgrundkörpers (a) und des Cardenolidgrundkörpers (b)

Generell sind die vier Ringe des Steran-Grundgerüsts meist *cis-trans-cis* verknüpft, nicht so häufig kommt auch eine *trans-trans-cis* Stellung vor. Typisch für die herzwirksamen Steroidglykoside sind Zuckerreste in Position 3β . [TLM12, S.228-230]

Der Ausdruck *Bufadienolid* leitet sich vom biogenen Ursprung dieser Substanzgruppe ab. *Bufo* (Echte Kröten) ist jene Krötengattung, welche Bufadienolide in hohem Ausmaß produziert. Das Interfix *-adien* steht für die beiden Doppelbindungen im 2-Pyranonring und das Suffix *-olid* bezeichnet den Lactonring. [KRK13]

Das *Substitutionsmuster* der Aglyka kann stark variieren, genauso wie der Sättigungsgrad des Sterangrundkörpers. Besonders charakteristisch sind β -ständige Hydroxygruppen am C-3 und am C-14. Hydroxylierungen treten seltener auch am C-1, -5, -11, -12 und C-16 auf. In bestimmten Fällen sind auch Epoxy- oder Oxogruppen zu finden. Weiters besteht die Möglichkeit, dass in Position 16 eine Acetoxy-Gruppe oder ein Formylrest substituiert ist. Die Methylgruppe am C-10 kann auch zu einem Aldehyd aufoxidiert sein. [Alb13, S.8]

Die *Zuckerkomponenten* befinden sich meist am C-3 des Sterangrundkörpers. Besonders beeindruckend ist in diesem Zusammenhang die Vielfalt an Monosaccharidkomponenten, welche bei den herzwirksamen Steroidglykosiden vorkommt (über 40 Monosaccharide). Äußerst weit verbreitet sind Zucker wie D-Glucose, L-Arabinose und D-Xylose, aber auch 6-Desoxyhexosen (L-Rhamnose, L-Thevetose, D-Digitalose)

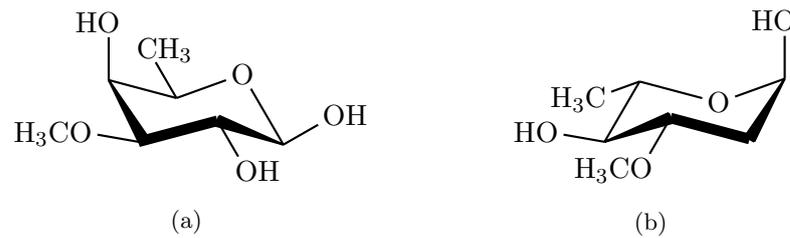


Abb. 1.4.: D-Digitalose (a) und L-Oleandrose (b)

und 2,6-Didesoxyhexosen (L-Oleandrose, D-Digitoxose) [TLM12, S.229]. Die beiden Zucker D-Digitalose und L-Oleandrose sind in Abbildung 1.4 gezeigt.

Die Oligosaccharidketten kommen durch eine 1→4-Verknüpfung zustande, wobei höchstens fünf Einfachzucker diese Zuckerketten aufbauen. In diesem Zusammenhang ist auch die sogenannte Klynesche Regel zu erwähnen, welche besagt, dass D-Monosaccharide meist β -glykosidisch gebunden sind und L-Monosaccharide α -glykosidisch. Wenn die Oligosaccharidkette neben Glucose noch andere Zuckerbausteine enthält, so ist es typisch, dass Glucose nicht direkt an das Aglykon gebunden ist, sondern das Schlussglied der Zuckerkette bildet. Jene Steroidglykoside mit terminalem Glucoserest nennt man auch Primärglykoside, da diese möglicherweise der Speicherung dienen. [TLM12, S.229-230]

Die herzwirksamen Steroidglykoside können biogenetisch als Abkömmlinge des Cholesterols bezeichnet werden. Dieses kann im pflanzlichen Organismus zum C-21-Progesteron abgebaut werden. Wichtiges Zwischenprodukt im Biosyntheseweg der Bufadienolide stellt diesbezüglich das 5β -Pregn-5-en-3,14,21-triol-20-on dar. Der für die Bufadienolide charakteristische δ -Lactonring entsteht durch Reaktion von Methylmalonyl-Coenzym A mit C-Atom 20 und der C-21-ständigen Hydroxygruppe des zuvor genannten Pregnanderivates. [TLM12, S.231][HS10, S.913]

1.2.3. Pharmakokinetik

Die Pharmakokinetik von herzwirksamen Steroidglykosiden – und auch im Speziellen von Bufadienoliden – wird grundsätzlich durch die Anzahl an freien Hydroxygruppen determiniert. [TLM12, S. 232]

Apolare Vertreter sind relativ arm an freien Hydroxygruppen, werden peroral gut resorbiert und weisen eine hohe Affinität zu Plasmaproteinen auf. Die Wirkung setzt nicht sofort ein, dennoch ist die Wirkungsdauer lang und bei ständiger Anwendung besteht Kumulationsgefahr. Sie durchlaufen auch den enterohepatischen Kreislauf und an ihrer Elimination ist die Biotransformation (hauptsächlich in der Leber) stark beteiligt. Zudem überwinden sie die Blut-Hirn-Schranke und führen nicht selten zu zentralnervösen Nebenwirkungen. Bei den Cardenoliden ist diesbezüglich Digitoxin zu nennen, bei den Bufadienoliden gilt beispielsweise Cinobufagin als apolar. [TLM12, S. 232] In Untersuchungen zum pharmakokinetischen Profil bestimmter Bufadienolide, konnte gezeigt werden, dass Bufalin, Cinobufagin und Resibufogenin hauptsächlich über das Cytochrom P450-System (CYP3A4) in den Lebermikrosomen metabolisiert werden. Beim Menschen treten als Hauptmetaboliten folglich hochhydroxylierte Derivate auf [HYL⁺15].

Polare Vertreter zeichnen sich durch eine hohe Anzahl freier Hydroxygruppen in Relation zum Kohlenstoffgrundgerüst aus und werden dementsprechend schlecht resorbiert und meist parenteral appliziert. Als Beispiel hierfür ist das Ouabain zu erwähnen, ein aus den Samen von *Strophanthus gratus* isoliertes, sechsfach hydroxyliertes Cardenolid. Durch die erhöhte Polarität ist die Bindung an Plasmaproteine erniedrigt, der Wirkungseintritt rasch und die Abklingquote erhöht. Die Kumulationsgefahr ist in diesem Fall nicht so latent. Viele dieser Vertreter werden unverändert über die Nieren ausgeschieden. [TLM12, S. 232]

1.2.4. Pharmakodynamik

Hinsichtlich der pharmakodynamischen Wirkungen erweisen sich die herzwirksamen Steroidglykoside als relativ homogene Substanzklasse. In diesem Zusammenhang hervorzuheben sind natürlich die typischen kardialen Wirkungen:

- *positiv inotrop*: Erhöhung der Kontraktilität des Arbeitsmyokards und dadurch Zunahme des Schlagvolumens
- *negativ chronotrop*: Verminderung der Herzfrequenz
- *negativ dromotrop*: Absenkung der Reizleitungsgeschwindigkeit am Herzen

Diese Herzwirkungen kommen überwiegend durch Hemmung der extrazellulären Domäne, der membranständigen, kardialen, Mg^{2+} -abhängigen Na^+/K^+ -ATPase zustande. [TLM12, S. 232-233]

Einige *Struktur-Wirkungs-Beziehungen* konnten bei dieser Stoffgruppe verifiziert werden. Für die Wirkung ist der elektronegative Carbonylsauerstoff des β -ständigen Lactonrings die entscheidende funktionelle Gruppe, da diese für den Aufbau von Wasserstoffbrückenbindungen zum Rezeptor erforderlich ist. Der Steroidgrundkörper mit den cis-verknüpften C und D Ringen, als auch β -ständige OH-Gruppen in Position 3 und 14, erhöhen die sterische Kompatibilität des Moleküls mit der Bindungsstelle an der Na^+/K^+ -ATPase. Auch die gebundenen Monosaccharidreste können die Wirkung modifizieren und schützen das Molekül vor einem schnellen metabolischen Abbau. Bufadienolide weisen im Vergleich zu den Cardenoliden eine zehnfach höhere Wirkstärke auf. [TLM12, S. 232-233]

Die Na^+/K^+ -ATPase stellt den zellulären Angriffspunkt der herzwirksamen Steroidglykoside dar. Es handelt sich hierbei um ein sogenanntes aktives Transportsystem, das unter Verbrauch von ATP Natriumionen in den Extrazellulärraum befördert und im Gegenzug Kaliumionen in die Zelle transportiert. Somit ist diese ATP-betriebene Pumpe unerlässlich für die Aufrechterhaltung des transmembranären Konzentrationsgradienten dieser beiden Ionen. Alle herzwirksamen Steroidglykoside binden mit hoher Selektivität an eine extrazelluläre Bindungsstelle und hemmen dadurch die Na^+/K^+ -ATPase. [SE07, S. 476]

Durch Blockade dieses transmembranären Enzyms in Herzmuskelzellen kommt es zu einem Anstieg der intrazellulären Na^+ -Konzentration, da Natriumionen, welche beim Eintreffen einer Erregungswelle über spannungsabhängige Natriumkanäle in die Zelle eingedrungen sind, nicht mehr aktiv aus der Zelle entfernt werden können. Dadurch kommt es wiederum zu einer verminderten Kapazität des Na^+/Ca^{2+} -Austauschers, wodurch in der Diastole vermehrt Calcium-Ionen im Intrazellulärraum verbleiben.

Abbildung 1.5 stellt diesen Mechanismus schematisch dar. Diese Calcium-Ionen werden im sarkoplasmatischen Retikulum gespeichert, sodass bei erneutem Erreichen eines Aktionspotentials eine größere Menge Ca^{2+} in der Herzmuskelzelle verfügbar ist, was wiederum in einer Steigerung der Kontraktilität der Myofilamente resultiert. Vermutlich kommt es bei der Anwesenheit von herzwirksamen Steroidglykosiden auch zu einer Umkehr der Transportrichtung des $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschproteins während des Aktionspotentials, wodurch der systolische Ca^{2+} -Einstrom forciert wird und dadurch ebenso die positiv inotropen Effekte. [SE07, S. 476]

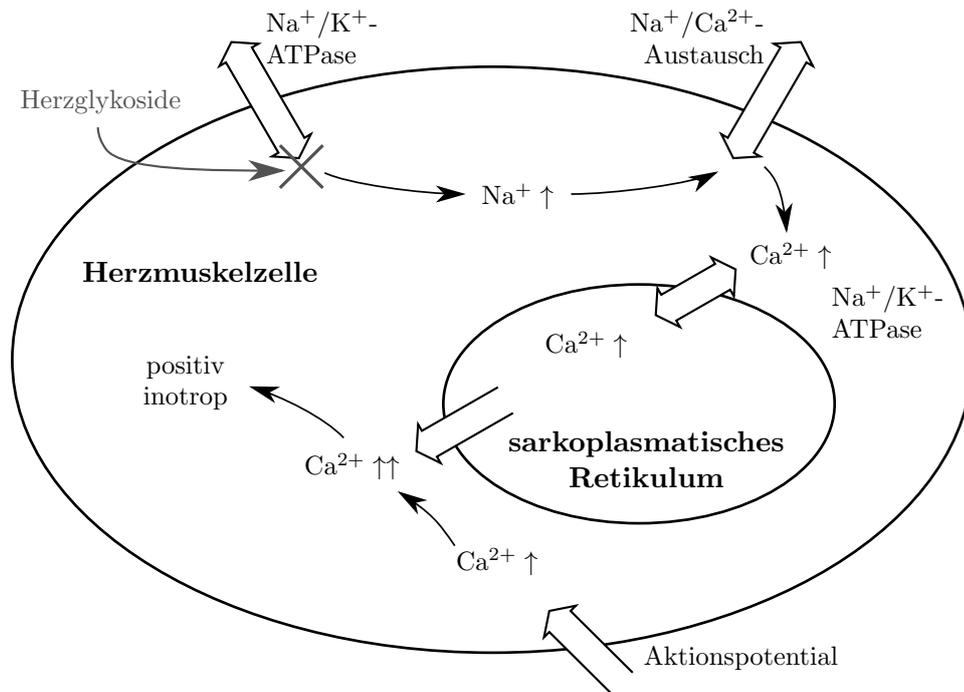


Abb. 1.5.: Wirkmechanismus der Herzglykoside

Neben der positiv inotropen Wirkung, welche am insuffizienten Herzen besonders stark ausgeprägt ist, führen Herzglykoside auch zu einer Erhöhung des Schlagvolumens, wobei damit auch eine verbesserte ventrikuläre Entleerung einher geht und das enddiastolische Füllungsvolumen vermindert ist. Durch eine verstärkte Nierendurchblutung und Steigerung der Diurese wirken diese Substanzen antiödematös. Herzwirksame Steroidglykoside setzen die Herzfrequenz herab (negativ chronotrop), indem der Sympathikustonus vermindert wird und der Sinusknoten gegenüber vagalen Reizen sensibilisiert wird. Außerdem spielen auch hämodynamische Effekte eine Rolle. Die Verlangsamung der Erregungsleitung im Atrioventrikularknoten (negativ dromotrop) kann zur Linderung von supraventrikulären Herzrhythmusstörungen therapeutisch eingesetzt werden. Vor allem in hohen Konzentrationen kommt es jedoch zu einer Herabsetzung der Erregungsschwelle im Sinusknoten als auch im Arbeitsmyokard (positiv bathmotrop), wodurch ektopere Erregungen als auch Nachdepolarisationen induziert werden können. [SE07, S. 476-477]

Die Anwendung von herzwirksamen Steroidglykosiden in der medizinischen Praxis wird durch die geringe therapeutische Breite maßgeblich erschwert. Im toxischen Konzentrationsbereich kommt es durch massive Hemmung der Na^+/K^+ -ATPase zu einer Überbeladung der Zellen mit Na^+ -Ionen, bei gleichzeitigem Verlust an K^+ -Ionen. Daraus resultiert ein Absinken der Reizschwelle und leichteres Ansprechen des

Herzmuskelgewebes auf elektrische Reize [TLM12, S. 233]. Typisch für Herzglykosid-Intoxikationen sind demzufolge kardiale Arrhythmien mit ventrikulären Extrasystolen oder beispielsweise atrioventrikuläre Überleitungsstörungen. Weitere unerwünschte Wirkungen oder Vergiftungssymptome konzentrieren sich hauptsächlich auf das zentrale Nervensystem. Kopfschmerzen, Übelkeit, Erbrechen, Psychosen und Störungen der Farbwahrnehmung sind häufige Nebenwirkungen. Bei längerer Anwendung können auch estrogenartige Wirkungen auftreten, welche bei Männern eine Gynäkomastie einschließlich Leberfunktionsstörungen hervorrufen können. Blutbildveränderungen, wie beispielsweise Thrombozytopenie und Eosinophilie, treten seltener in Erscheinung. [Böh00, S. 64]

Therapeutische Anwendung

Das medizinische Hauptanwendungsgebiet der Herzglykoside stellt die chronische, manifeste Herzinsuffizienz dar. Im Speziellen kommen hauptsächlich Digitalisglykoside bei einer ausgeprägten Linksherzinsuffizienz zum Einsatz, oder aber auch bei tachykardem Vorhofflimmern, um eine Frequenzkontrolle zu erreichen. Bei herzinsuffizienten Patienten mit Sinusrhythmus im NYHA-Stadium III-IV (*New York Heart Association*) gelten Herzglykoside jedoch nur mehr als Reservemedikament, das nur dann verordnet wird, wenn mit der Standardmedikamentation, wie beispielsweise ACE-Hemmer, β -Blocker oder Diuretika, keine Verbesserung der klinischen Symptomatik zu erreichen ist. [Del11, S. 58][LB04, S. 256]

Aufgrund der geringen therapeutischen Breite und des ungünstigen Nebenwirkungsprofils müssen die Plasmakonzentrationen von herzwirksamen Steroidglykosiden besonders streng überwacht werden. Vor allem in älteren wissenschaftlichen Studien konnte belegt werden, dass eine Monotherapie mit herzwirksamen Steroidglykosiden die Prognose von herzinsuffizienten Patienten verschlechtern kann. Deshalb wird in neuen Therapiekonzepten ein niedriger Serumspiegel angestrebt (Serumkonzentration 0,5 - 0,9 ng/mL Digoxin), wodurch eine Senkung der Mortalität einschließlich Verbesserung der Lebensqualität erreicht wird. [TLM12, S. 235]

Bufadienolidglykosidhaltige Drogen und Reinsubstanzen

Die einzige Droge, welche Bufadienolidglykoside als Hauptwirkkomponenten enthält und medizinische Relevanz besitzt, ist die Meerzwiebel. Die Nutzung dieser Pflanze ist volksmedizinisch verwurzelt und sie wurde bereits im alten Ägypten zur Behandlung der Wassersucht in unterschiedlichsten Zubereitungsformen appliziert. Auch im antiken Rom galt das Spargelgewächs als Hausmittel zur Bekämpfung von asthmatischen Beschwerden, Katarrhen, Frauenleiden und gastrointestinalen Störungen. Sie ist im ganzen Mittelmeerraum verbreitet und besitzt oberirdische weiß- bis rotschalige Zwiebeln. In medizinischen Belangen wurde stets die „weiße“ Zwiebel verwendet, wohingegen im Mittelalter die „rote“ Meerzwiebel als Rodentizid zum Einsatz kam. [KKSK01]

Im 20. Jahrhundert konnte das Inhaltsstoffspektrum der Meerzwiebel aufgeklärt werden. Sie enthält etwa 0,2–4 % Bufadienolidglykoside, wobei als Hauptglykoside Scillaren A (Scillarenin-3 β -(4 β -D-glucosyl- α -L-rhamnosid), Scillicyanosid, als auch Scilliphaeosidinglykoside zu nennen sind. Proscillaridin A (Scillarenin-3 α -L-rhamnosid)

entsteht unter dem enzymatischen Einfluss der Scillarenase aus Scillaren A unter Abspaltung eines Glucoserestes. Dieser Vorgang geht bei der Fermentation von geschnittenen Meerzwiebeln vonstatten und wird für die technische Gewinnung von Proscillaridin A genutzt. [HH96, S. 96-98][TLM12, S. 240]

Heute wird das Meerzwiebelpulver (*Scillae pulvis normatus*, Deutsches Arzneibuch) nur noch bei sehr milder Ausprägung der Herzinsuffizienz additiv zur Standardmedikamentation eingesetzt, da die Dosierung und praktische Anwendung von Reinstoffen (Digoxin, Proscillaridin A) einfacher durchzuführen sind. [KKSK01]

Jahrelang manifestierte sich eine Differenzierung in eine „weißwiebelige“ und in eine „rotwiebelige“ Varietät, welche zum Teil auch noch heute in Arzneibuchmonographien zur Anwendung kommt [KKSK01]. Für die Gewinnung der Droge *Scillae bulbosus* (Meerzwiebel, Deutsches Arzneibuch) – es handelt sich hierbei um die in Streifen geschnittenen und getrockneten mittleren Schuppen der nach der Blütezeit gesammelten Zwiebeln – fordert das Deutsche Arzneibuch weißwiebelige Unterarten der Echten Meerzwiebel, *Drimia maritima* (L.) STEARN, Asparagaceae. [TLM12, S. 240]

Erst 1980 ergaben Untersuchungen, dass eine Unterteilung von *Drimia maritima* (L.) STEARN in eine „weiße“ bzw. „rote“ Rasse nicht haltbar ist. Sowohl karyologisch als auch morphologisch konnte gezeigt werden, dass es sich bei *Drimia maritima* (L.) STEARN um ein Aggregat handelt, dem mindestens 6 Kleinarten unterzuordnen sind: *Charybdis maritima*, *C. hesperia*, *C. numidica*, *C. aphylla*, *C. elata* und *C. pancration*. Das spezifische Herzglykosidmuster erlaubt eine Unterscheidung dieser Unterarten, wohingegen die Gesamtwirkstoffkonzentration keine eindeutige Zuordnung zulässt. *Charybdis maritima* (L.) SPETA wird den Anforderungen des Deutschen Arzneibuches am ehesten gerecht, da hier der Gehalt an Scillaren A und Proscillaridin A relativ hoch ist, die Zwiebel eine weiße Farbe aufweist und zusätzlich Scillirosid nahezu nicht vorhanden ist. Scillirosid, das eine rodentizide Eigenschaft besitzt, kommt hauptsächlich in der Kleinart *Charybdis numidica* vor, aber auch in anderen „roten“ Varietäten, welche in Nordafrika, in Süditalien und auf den Ionischen Inseln heimisch sind. [KKSK01][KK98]

1.2.5. Bufadienolide und Cardenolide als Gegenstand der aktuellen Forschung

Neben den bereits soliden Erkenntnissen über die kardiologischen Effekte der herzirksamen Steroidglykoside, sind andere Wirkbereiche dieser Substanzklasse relativ neues wissenschaftliches Terrain. Herzirksame Steroidglykoside besitzen zudem immunmodulatorische Eigenschaften, beeinflussen die NO-Synthese, modifizieren die renale Exkretion und weisen ausgeprägtes antineoplastisches Potential auf [GPKW11]. Der Fokus der Wissenschaft liegt momentan auf weiteren Untersuchungen hinsichtlich der Antitumoraktivität von Herzglykosiden, da der Bedarf an neuartigen Zytostatika weiterhin ungebrochen bleibt, zumal Krebs noch immer zu den häufigsten Todesursachen in wirtschaftlich hoch entwickelten Ländern zählt. Viele Krebsformen, wie etwa Gliome, Melanome, das nicht-kleinzellige Lungenkarzinom oder Pankreaskarzinome entwickeln sehr häufig Multidrug-Resistance-Phänotypen oder Resistenzmechanismen gegenüber proapoptischen Stimuli und sind dadurch einer Bestrahlungstherapie oder konventionellen Chemotherapie weitgehend unzugänglich [BUG⁺13]. In zahlreichen Studien konnte belegt werden, dass bestimmte

herzwirksame Steroidglykoside Apoptose-resistente Krebszelllinien gegenüber proapoptotischen Impulsen sensibilisieren können und somit die medizinische Prognose im Fall einer solchen malignen Erkrankung unter Umständen verbessert werden könnte. [BKM⁺13]

Tabelle 1.1.: Mittels kolorimetrischem MTT-Zellviabilitätstest ermittelte IC₅₀ (mittlere inhibitorische Konzentration) Werte (nM) ausgewählter Bufadienolide nach dreitägiger Inkubationszeit. Humane Krebszelllinien: MCF-7 Brustkrebs, PC-3 Prostatakarzinom, A549 nicht-kleinzelliges Bronchiakarzinom. Maus-Krebszelllinie: CT26.WT Kolonkarzinom. Ouabain und Digoxin dienen als Positivkontrolle. (Auszug aus [BUG⁺13])

Name	Humane Krebszelllinien			Maus- krebzell- linie
	MCF-7	PC-3	A549	CT26.WT
Gamabufotalin Rhamnosid	8	<1	<1	877
Bufotalin	37	34	14	>10000
Hellebrin	44	11	6	>10000
Argentinogenin	36	43	53	>10000
Bovogenin A	278	2431	51	>10000
Scillarenon	341	284	333	>10000
Bufarenogin	9301	7417	3843	>10000
Ouabain	133	43	27	>10000
Digoxin	426	75	50	>10000

Banuls et al. (2013) untersuchten in einer Studie den antiproliferativen Effekt ausgewählter Bufadienolide und Derivate an verschiedenen humanen, als auch Maus-Krebszelllinien anhand eines MTT [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid]-basierten Zellviabilitätstests. Als Referenzverbindungen fungierten die beiden Cardenolide Ouabain und Digoxin. Tabelle 1.1 zeigt dabei die in vitro IC₅₀-Werte einiger untersuchter Substanzen nach dreitägiger Inkubationszeit, also jene mittlere inhibitorische Konzentration bei der eine Hemmung des Wachstums der Krebszellen um 50 % eintritt [BUG⁺13].

Besonders Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnosid weist ausgeprägte in vitro antitumorale Eigenschaften auf, da im Fall der humanen Lungenkrebszelllinie A549 bzw. Prostatakrebszelllinie PC-3 bereits bei geringen Konzentrationen eine halbmaximale Wachstumshemmung erreicht wurde (IC₅₀ unter 1 nM). Bufotalin und Hellebrin besitzen eine um etwa zehnfach geringere in vitro antineoplastische Potenz als Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnosid, trotzdem sind diese Bufadienolide noch immer wirksamer als die Referenzverbindungen Ouabain und Digoxin. [BUG⁺13]

Auch in diesem Zusammenhang wurden Struktur-Wirkungsbeziehungen analysiert und festgestellt, dass die Aglyka der herzwirksamen Steroidglykoside stets geringere zellwachstumshemmende Aktivitäten aufweisen als ihre glykosylierten Analoga. Die einzige Ausnahme stellt Hellebrigenin dar, das nachweislich genauso potent ist

wie Hellebrin. Besondere Bedeutung kommt der 14 β -ständigen Hydroxyfunktion zu, da diese für die Ausbildung einer Wasserstoffbrückenbindung mit einem Asparaginrest innerhalb der Bindungstasche der Na⁺/K⁺-ATPase vonnöten ist. Ist diese alkoholische Funktion durch eine Epoxygruppe ersetzt, so ist der Protonendonoreffekt nicht mehr vorhanden und es kommt zu einer Minderung der biologischen Aktivität. Auch Substituenten an der Position 16 wirken sich nachteilig auf die antiproliferativen Eigenschaften aus. Die Verbindungen, welche an dieser Position eine Acetoxygruppe tragen, wie es häufig bei Cinobufagin-Derivaten der Fall ist, sind den an C-16-hydroxyierten Vertretern in Bezug auf Hemmung des Krebszellwachstums überlegen. Dieser Umstand kann dadurch erklärt werden, dass diese Seite des Steroidgrundkörpers – im Falle der Interaktion mit der Na⁺/K⁺-ATPase – gegen eine lipophile Zone der Bindungstasche ausgerichtet ist und somit ein Acetoxyrest im Vergleich zu einer alkoholischen Funktion energetisch bevorzugt ist. Von großer Bedeutung für die zytostatische Wirkung von Bufadienoliden scheint der charakteristische α -Pyroneering zu sein, da 23 der von Banuls et al. (2013) getesteten 27 aktiven Komponenten über dieses heterozyklische Element verfügen. Ausschließlich Reste, welche diesen Heterozyklus bezüglich sterischer Merkmale und Wechselwirkungsmöglichkeiten bestmöglich imitieren, können an dieser Position verwendet werden. Ungesättigte Ester erfüllen diese Anforderungen noch am besten. [BUG⁺13]

Aufbau der Na⁺/K⁺-ATPase

Die bisherigen Forschungserkenntnisse legen nahe, dass die Na⁺/K⁺-ATPase als wichtigster zellulärer Angriffspunkt für die Entfaltung der antitumoralen Wirkungen der herzwirksamen Steroidglykoside zu nennen ist. Neben seiner Funktion im Elektrolythaushalt (siehe Abschnitt 1.2.4), spielt dieses integrale Membranprotein auch eine wichtige Rolle in der intrazellulären Signaltransduktion, der Regulation des Zellzyklus, der Zelladhäsion und ist an der Expression spezifischer Gene beteiligt. [BUG⁺13]

Die Na⁺/K⁺-ATPase ist aus zwei verschiedenen Untereinheiten aufgebaut: α und β . Diese Untereinheiten bilden in der Membran ein $\alpha 2\beta 2$ Tetramer aus [2]. Zusätzlich besitzt die Na⁺/K⁺-ATPase auch noch eine regulatorische Untereinheit mit der Bezeichnung FXYD. Es handelt sich hierbei um eine kleine Familie transmembranärer Proteine, welche die gewebespezifischen Aktivitäten der Ionenpumpe regulieren und somit den Na⁺ und K⁺ Transport auf die Bedürfnisse bestimmter Zelltypen anpassen [Gee06]. Die β -Untereinheit des Enzyms ist ein Glykoprotein, das für die strukturelle und funktionelle Reifung des Enzyms essentiell ist. Sie bewerkstelligt zudem den Transport und Einbau der α -Untereinheit in die Membran und ist auch für den Verbleib des Enzymkomplexes in der Cytoplasmamembran erforderlich. Die α -Untereinheit agiert hingegen als katalytisches Element der Ionenpumpe und ist für die Bindung von Mg²⁺, Na⁺, K⁺ als auch ATP verantwortlich. Im extrazellulären Bereich dieser Untereinheit findet sich auch eine hochaffine Bindungsstelle für Steroidglykoside [NYPB08]. Die Struktur der Na⁺/K⁺-ATPase ist in Abbildung 1.6 schematisch dargestellt.

Insgesamt konnten bisher vier α -Isoformen identifiziert werden, sowie auch drei β -Varianten und sieben voneinander abweichende FXYD-Proteine [NYPB08]. Die Kenntnisse über das Vorhandensein dieser Isoformen ist insofern von Bedeutung, als bestimmte Krebszellen zur Überexpression spezifischer α -Isoformen neigen. Der $\alpha 1$ -

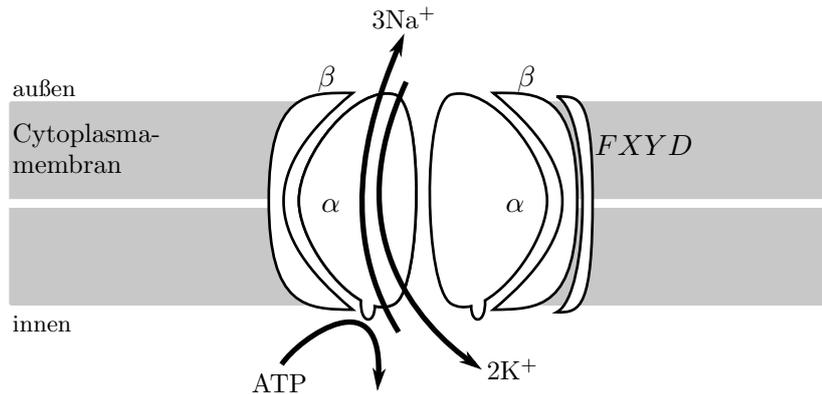


Abb. 1.6.: Schematischer Aufbau der Na^+/K^+ -ATPase [3]

Typ wird beispielsweise in einer signifikant hohen Zahl an Nierenzellkarzinomen überexprimiert, ebenso bei Melanomen, Glioblastomen und nicht-kleinzelligen Lungenkarzinomen. Die $\alpha 3$ -Isoform ist dagegen hauptsächlich in Kolonkarzinomen und Leberzellkarzinomen vorherrschend. Die $\alpha 2$ -Form scheint stärker in die kardiale Kontraktion involviert zu sein [BKM⁺13].

Untersuchungen zeigten, dass herzwirksame Steroidglykoside anhand ihrer Bindungsaffinitäten zu diesen unterschiedlichen α -Untereinheiten charakterisiert werden können. So ist bekannt, dass Digoxin eine etwa drei- bis vierfach höhere Affinität zu humanen $\alpha 2$ - und $\alpha 3$ -Isoformen als zu $\alpha 1$ -Formen entwickelt. Ouabain weist etwa idente Affinitäten zu allen drei Isoformen auf. Bei den Bufadienoliden zeichnet sich vor allem Gamabufotalin-Rhamnosid durch hohe Affinitäten zu allen drei Isoformen aus, die auch jene des Aglykons (Gamabufotalin) weit übertreffen. Es gibt Hinweise darauf, dass die Zuckerkomponente das Selektivitätsmuster für bestimmte Isoformen beeinflusst [BKM⁺13]. Prinzipiell kamen einige Studien zum Schluss, dass Cardenolide die $\alpha 3$ -Isoform mit einer höheren Präferenz binden als die Varianten $\alpha 1$ und $\alpha 2$. Daraus kann gefolgert werden, dass sich besonders Krebszelllinien, welche ein geringes $\alpha 3$ zu $\alpha 1$ Verhältnis besitzen, als relativ resistent gegenüber zytotoxischen Stimuli durch Steroidglykoside erweisen. Vice versa sprechen jene Krebstypen mit hohen Quotienten stark auf eine Intervention mit lipid-löslichen Vertretern, wie Oleandrin, an [NYPB08].

Kenntnisse über das Expressionsmuster dieser Isoformen in verschiedenen Gewebetypen und genaue pathologische Charakterisierung der Krebsform werden unumgänglich sein, um das Ansprechen auf diese neue Klasse von antitumoralen Wirkstoffen vorauszusagen [NYPB08].

Mechanismen des antiproliferativen Effektes von herzwirksamen Steroidglykosiden

Die postulierten Mechanismen, welche die Zellwachstumshemmung ausgewählter kardialer Steroidglykoside bewirken, führen zu sehr komplexen Modulationen der intrazellulären Signaltransduktion. Im Mittelpunkt dieser Untersuchungen steht der sogenannte „Signalosomen“-Komplex, dessen Komponenten die Na^+/K^+ -ATPase, die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), Phospholipase C (PLC) als auch die Tyrosinkinase Src darstellen. Von jedem dieser Bestandteile können Signalwege ausgehen,

welche entweder den programmierten Zelltod (Apoptose) auslösen oder zur zellulären Selbstverdauung (Autophagozytose) führen. Folgende in Abbildung 1.7 dargestellte zelluläre Signalwege können nach einer Intervention mit herzwirksamen Steroidglykosiden aktiviert werden:

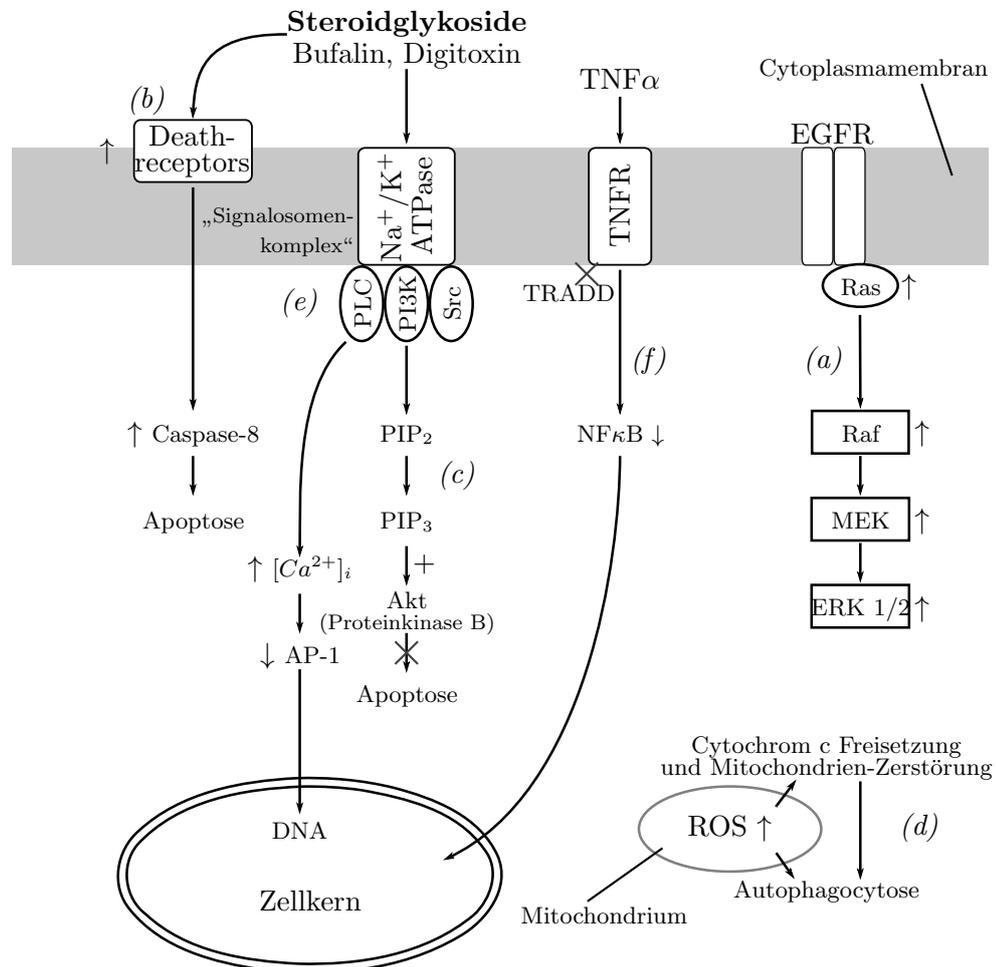


Abb. 1.7.: Zelluläre Mechanismen der antitumoralen Wirkung von herzwirksamen Steroidglykosiden [NYPB08]

- (a) Die Aktivierung der Tyrosinkinase Src kann zu einer Transaktivierung des EGFR (engl.: epidermal growth factor receptor) führen, wodurch wiederum das monomere GTP-bindende Protein Ras stimuliert wird. Es kommt zur Anregung des Raf-MAP-Kinase Weges. Die p42/44 MAP-Kinasen (Mitogenaktivierte Proteinkinasen), auch bezeichnet als ERK1/2 (engl.: extracellular-signal regulated kinase), führen zu einer gesteigerten Expression von p21 (eine Inhibitor Cyklin-abhängige Kinase). Dieser Faktor unterdrückt ein erhöhtes Zellwachstum. [NYPB08]
- (b) Der Einbau von Rezeptoren mit Todesdomänen (Fas, DR4, DR5, CD95) in die Cytoplasmamembran wird gesteigert. Durch Bindung entsprechender Todesliganden (FasL, TRAIL) an diese Rezeptoren kann die Caspase-8-aktivierte Apoptose ausgelöst werden. [NYPB08]
- (c) Durch Eingriff in die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K) gesteuerten Signalwege

werden ebenfalls apoptotische Mechanismen in Tumorzellen ausgelöst. PI3K phosphoryliert Phosphoinositoldiphosphat (PIP₂) zum entsprechend aktiven Triphosphat (PIP₃). Phosphoinositoltriphosphat (PIP₃) ist weiters für die Rekrutierung und Aktivierung der Proteinkinase B (auch Akt genannt) verantwortlich. Dieses Protoonkoprotein wirkt einer Apoptose entgegen, da es einen proapoptotischen Faktor (Bax) aus der Familie der Bcl-2 Proteine hemmt. Herzwirksame Steroidglykoside können den PI3K/Akt-Weg blockieren. [NYPB08] [KBP⁺09, S. 99]

- (d) Durch die kontinuierliche Herabsetzung des mitochondrialen Membranpotentials wird eine verminderte Produktion von anti-apoptotischen Proteinen, wie beispielsweise Bcl-2 und Topoisomerase I und II induziert. Weiters führt die vermehrte Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zu einer nachhaltigen Schädigung der Mitochondrien, der Freisetzung von Cytochrom c und der Einleitung der Autophagozytose. [NYPB08]
- (e) Über Phospholipase C (PLC)- und Inositoltriphosphat (IP₃)-vermittelte Mechanismen kann es zu einem Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration kommen. Daraus resultiert eine verringerte Expression von Transkriptionsfaktoren, welche den Zellzyklus regulieren, wie das AP-1 (engl.: activator protein 1). [NYPB08]
- (f) Auch eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (engl.: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells) über den Todesliganden Tumornekrosefaktor α (TNF α) wird durch Herzglykoside minimiert, da im Falle einer Bindung von TNF α an seinen Rezeptor (TNFR) die Interaktion des Todesdomänen-Proteins TRADD (engl.: tumor necrosis factor receptor 1-associated death domain) mit den intrazellulären Elementen dieses Rezeptors unterbunden wird und damit auch die weitere Signaltransduktion. [NYPB08]

1.3. Massenspektrometrie

Bei der Massenspektrometrie handelt es sich um eine äußerst empfindliche und potente analytische Technik dessen Grundzüge durch H. Kienitz bereits 1968 wie folgt beschrieben wurden:

„Grundprinzip der Massenspektrometrie (MS) ist es, aus anorganischen oder organischen Substanzen in geeigneter Weise Ionen zu erzeugen, diese Ionen nach ihrer Masse und Ladung zu trennen und sie mit einem Registriersystem nach Masse und Häufigkeit qualitativ und quantitativ zu erfassen. Die Ionisation der Substanzen kann thermisch, durch elektrische Felder oder durch Beschuss der Probe mit Elektronen, Ionen oder Photonen erfolgen. Die im allgemein positiven Ionen können einzelne ionisierte Atome oder deren Vielfache, ionisierte Moleküle, deren Bruchstücke oder Assoziate sein. Die Ionentrennung erfolgt durch statische oder dynamische elektrische oder magnetische Felder.“ [Kie68, S. 3]

Die Massenspektrometrie ist äußerst vielseitig und kann zur Strukturaufklärung anorganischer oder organischer Analyten eingesetzt werden. In diesem Zusammenhang ist vor allem das Fragmentierungsprofil der Verbindung ausschlaggebend, welches

durch die spezifischen Massen als auch Häufigkeiten der gebildeten Fragmentionen charakterisiert wird. Diese entstehen entweder bereits bei der Ionisation oder im Anschluss durch gezielte Dissoziation.

Auch eine Identifizierung und Quantifizierung von Substanzen im Spurenbereich kann durch den Einsatz der Massenspektrometrie erzielt werden. Dies findet hauptsächlich im Bereich der Umwelt-, Lebensmittel- und medizinischen Laboranalytik, als auch in der Forschung, breite Anwendung.

Massenspektrometer unterliegen meist einem ähnlichen apparativen Aufbau. Sie bestehen grundsätzlich aus einem Probeneinlasssystem, einer Ionenquelle, einem Massenanalysator und schließlich einem Detektor. Wichtig ist der Aufbau eines stabilen Hochvakuums [Gro13, S. 7]. In der Ionenquelle erfolgt die Ionisierung und gegebenenfalls auch eine Überführung in die Gasphase des Probenmaterials, wobei die so erzeugten Ionen in Richtung Massenanalysator beschleunigt werden. Der Massenanalysator übernimmt die Auftrennung dieser Ionen gemäß ihres Masse/Ladungsverhältnisses (m/z). Die Registrierung der geladenen Analyten erfolgt letztendlich durch den Detektor [4]. Die Abbildung 1.8 zeigt diesen grundsätzlichen Aufbau.

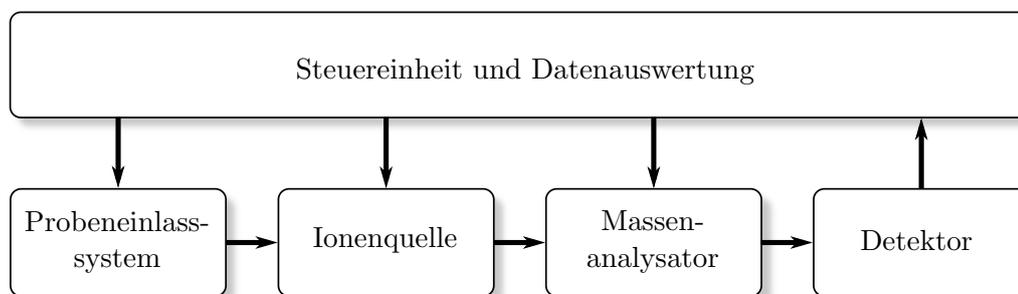


Abb. 1.8.: Schematischer Aufbau eines Massenspektrometers

Häufig wird die Massenspektrometrie auch mit chromatographischen Verfahren gekoppelt, was primär in der Bioanalytik den Nachweis und die Quantifizierung von Analyten aus komplexen Stoffgemischen ermöglicht. Äußerst vorteilhaft ist, dass mit den neuen Technologien bereits Nachweisgrenzen im Femtogramm-Bereich erreicht werden [Gey15, S. 315]. Trotzdem ist anzumerken, dass die Massenspektrometrie zu den destruktiven analytischen Verfahren zählt, das heißt, dass das Probenmaterial nach der Untersuchung unwiderruflich zerstört ist und nicht, wie beispielsweise in der Kernresonanzspektroskopie oder Infrarotspektroskopie, wiederverwendbar ist [Gro13, S. 9].

Natürlich steht heute eine große Auswahl an unterschiedlichen Ionisationstechniken und Massenanalysatoren zur Verfügung, wobei im Folgenden nur auf die Elektrosprayionisation und die Ionenfalle als Analysator eingegangen wird, da diese beiden Verfahren bei der Aufnahme der Bufadienolid-Massenspektren zum Einsatz kamen.

1.3.1. Elektrosprayionisation

Grundsätzlich handelt es sich bei der Elektrosprayionisation (engl.: electrospray ionization, Abk. ESI) um eine äußerst empfindliche, robuste und technisch unkomplizierte Ionisationsmethode. Sie geht auf Dole et al. aus dem Jahre 1968 zurück und basiert auf der direkten und selektiven Ionisation des Analyten, der in einem

Lösungsmittelüberschuss vorliegt [DMH⁺68]. Sie zählt zusammen mit der APCI (engl.: atmospheric pressure chemical ionization) zu den Zerstäubungsmethoden und ist vor allem in der Bioanalytik wichtiger Bestandteil der apparativen Ausstattung eines Massenspektrometers, da sie mit Methoden der Flüssigchromatographie sehr gut kombinierbar ist. Durch diese Kopplung können massenspektrometrische Informationen direkt im Anschluss an den chromatographischen Trennvorgang eingeholt werden. [HMZ11, S. 295]

Für die Gewinnung von Ionen mittels Zerstäubungstechniken werden meist Gemische aus Wasser, Methanol oder Acetonitril herangezogen, wobei Essigsäure, Trifluoressigsäure oder Ameisensäure als Additive fungieren können. Das Prinzip der Ionen-erzeugung beginnt mit dem Einleiten der Substanzlösung in eine filigrane Kapillare (aus Stahl oder Quarzglas). Durch das Anlegen einer Hochspannung (1-5 kV) zwischen dem Kapillarenende und dem Sprayschild, werden die erzeugten Ionen über eine Transferkapillare dem Analysatorteil des Massenspektrometers zugeführt. [HMZ11, S. 295-296]

Die Flüssigkeit, die aus der Kapillare austritt, formt sich zu einem sogenannten Taylor Konus, wobei sowohl die Oberflächenspannung als auch das elektrische Feld dieses Phänomen verursachen. Dabei gruppieren sich, im Positivionenmodus, Kationen eher an der Oberfläche des Flüssigkeitskegels, da diese durch die negative Gegenelektrode angezogen werden. Anionen hingegen verbleiben im Inneren des Konus und reichern sich an der anionischen Nadelspitze an, wo es zur Entladung oder Oxidation kommt [Kro10]. An der Spitze des Taylor-Konus wird die sogenannte Rayleigh-Grenze erreicht. An diesem kritischen Punkt nimmt die elektrostatische Abstoßung der Ladungen an der Oberfläche derart zu, dass die sie die Oberflächenspannung der Lösung egalisiert. Durch diesen destabilisierenden Effekt kommt es zur Abschnürung von Tröpfchen mit einer positiven Überschussladung [HMZ11, S. 296]. Um eine verstärkte Verdampfung der Lösungsmittelmoleküle zu erreichen, wird häufig ein inertes Trägergas wie Stickstoff eingeleitet, das zusätzlich eine kontinuierliche Zerstäubung der Lösung gewährleisten soll [Vat07]. Der konstante Verdampfungsprozess verursacht eine Verkleinerung der Tröpfchengröße, bei gleichzeitiger Erhöhung der Ladungsdichte. Die Zahl der sich gegenseitig abstoßenden Ionen nimmt an der Tropfenoberfläche massiv zu, bis die daraus hervorgehende elektrostatische Abstoßung die Tropfen explosionsartig in immer kleinere Tröpfchen teilt (Coulomb-Explosionen). Die Verflüchtigung des Lösungsmittels und die Coulomb-Explosionen verlaufen in einer Art Kettenreaktion, bis nahezu kein Lösungsmittel mehr vorhanden ist, und somit die Desorption von Ionen aus den kleinsten Partikeln eintritt [HMZ11, S. 296]. Dieser Zerstäubungsprozess wird in Abbildung 1.9 dargestellt.

Die Elektrosprayionisation zählt zu den sogenannten weichen Ionisationsmethoden, bei der so gut wie keine Fragmentierungen auftreten, sondern durch Protonierung oder Abzug von Protonen die Bildung von „Quasi-Molekülionen“ induziert wird. Diese können zur Ermittlung des Molekulargewichts herangezogen werden. Besonders Substanzen mit basischen Funktionalitäten zeichnen sich durch eine gute Protonierbarkeit aus und durch Anlagerung eines oder mehrerer Protonen können dementsprechend einfach oder mehrfach positiv geladene protonierte Moleküle ($[M+H]^+$ bzw. $[M+nH]^{n+}$) registriert werden. Eine Besonderheit der ESI stellt die Generierung von Addukt-Ionen dar, bei der es zur Addition von Kationen (Na^+ , K^+ , NH_4^+), welche häufig vom verwendeten Eluenten oder Puffer stammen, an das Analyt-

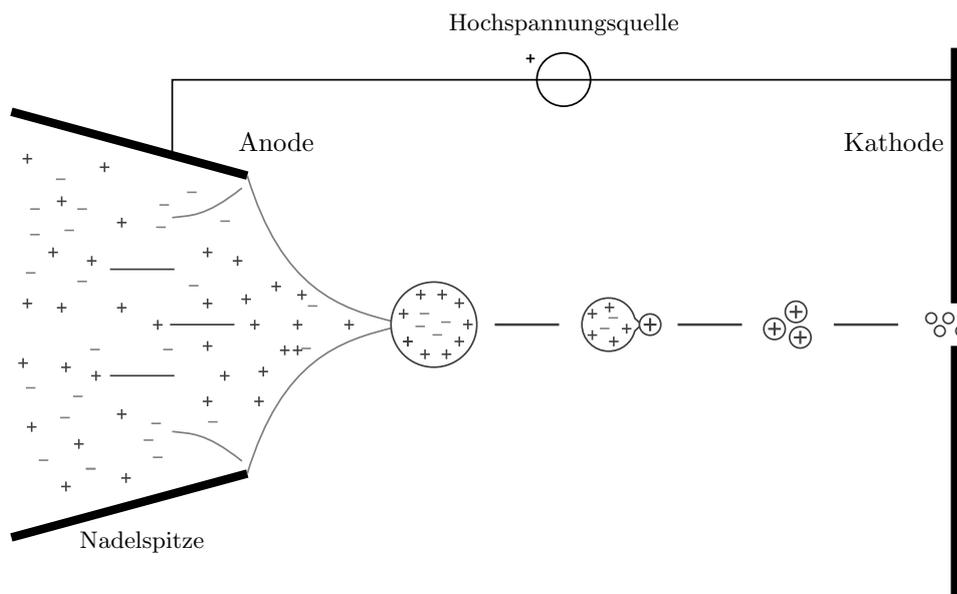


Abb. 1.9.: Schematische Darstellung des Zerstäubungsprozesses und der Ionenbildung bei der Elektrosprayionisation (vgl. [HMZ11, S. 296])

Molekül kommt. Verbindungen mit saurem Charakter werden hingegen leichter deprotoniert und es resultieren negativ geladene Ionen vom Typ $[M-H]^-$. Es besteht die Möglichkeit durch Verwendung eines bestimmten Ionenmodus (positiv oder negativ) auf einen bestimmten Ionentyp zu fokussieren. Durch Variation der Polarität der Ionenoptik können entweder positiv oder negativ geladenen Ionen gesondert aus der Ionenquelle in den Analysatorteil transferiert werden. [HMZ11, S. 296][Riz15]

Generell gibt es mehrere Thesen, welche das Entstehen von Ionen in der Gasphase beschreiben. Hohen Bekanntheitsgrad erlangte das Charge Residue Model (Abk. CRM, „Modell des geladenen Rückstandes“), bei dem man davon ausgeht, dass durch das ständige Verdampfen von Lösungsmittel wiederholt das Rayleigh-Limit erreicht wird und Coulomb-Explosionen stattfinden, bis letztendlich Mikro-Tröpfchen gebildet werden, welche nur mehr ein einziges Analytmolekül enthalten. Werden die verbliebenen Lösungsmittelmoleküle durch Verdampfen entfernt, wird ein gasförmiges Analyt freigesetzt [MKRD70]. Von Iribarne und Thomson stammt eine Theorie, die auf der Annahme basiert, dass aus größeren mit Ionen beladenen Tropfen eine direkte Emission dieser Ladungsträger in die Gasphase erfolgt. Voraussetzung für diesen Vorgang, der als „Ionen Verdampfungsmodell“ (engl.: ion evaporation model) beschrieben wird, ist eine ausreichend hohe elektrische Feldstärke, welche die Solvationsenergie der Ionen übersteigt, sodass diese direkt vom gelösten in den gasförmigen Zustand übergehen [Vat07][IT76].

1.3.2. Ionenfallen-Massenspektrometer

Die Ionenfalle (engl.: ion trap) bezeichnet einen spezifischen Typ eines Massenanalysators, dessen Funktionsprinzip darauf basiert, Ionen mittels eines elektromagnetischen Quadrupolfeldes auf definierten Bahnen zu akkumulieren, selektiv zu analysieren und zu manipulieren. Eine Verwendung dieses Massenanalysators erlaubt die

Bildung mehrerer Generationen von Fragmentionen auf beschränktem Raum. In einer Abfolge von Experimenten können Ionen gezielt angeregt und anschließend massenspezifisch analysiert werden, ohne weitere apparative Elemente einzusetzen. Es können unterschiedliche Typen von Ionenfallen unterschieden werden, wie etwa die Quadrupol-Ionenfalle, Lineare Ionenfalle oder Orbitrap. Im Folgenden wird jedoch nur die Quadrupol-Ionenfalle näher beschrieben. [5]

Die Quadrupol-Ionenfalle, nach ihrem ursprünglichen Entwickler und Nobelpreisträger Wolfgang Paul auch häufig als Paul-Falle bezeichnet, fußt auf den technischen Prinzipien eines Quadrupol-Massenfilters. Zentrale Bauelemente stellen dabei drei rotationssymmetrische Elektroden dar, welche für die Erzeugung des elektrischen Quadrupolfeldes verantwortlich sind. Durch die Erdung der beiden Endkappenelektroden und Anlegen einer Hochfrequenzspannung an die mittlere Ringelektrode wird eine Überlagerung von Wechsel- und Gleichspannung im Elektrodenraum induziert. Sobald die Ionen in den Analysator eintreten, werden sie aufgrund des dort herrschenden zeitlich variablen Feldes auf zyklischen, dreidimensionalen Bahnen gemäß ihres m/z -Verhältnisses stabilisiert. [5]

Durch Erhöhung des Wechselspannungsanteils an den Endkappenelektroden wird eine Destabilisierung dieser akkumulierten Ionen erreicht. Somit können ganze Ionenpopulationen, welche temporär in der Ionenfalle gefangen gehalten werden, durch kontinuierliche Änderung des elektromagnetischen Feldes nach steigenden m/z -Werten aus dem Analysator transferiert und dem Detektor zur Registrierung zugeführt werden (ESI- MS^1 -Spektrum). Weiters erlaubt die Quadrupol-Ionenfalle die Isolierung von Ionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis. Diese Ionen (häufig protonierte oder deprotonierte Moleküle) können durch Kollision mit neutralen Gasmolekülen (z.B. Helium) weiter fragmentiert werden. Die so entstehenden Tochterionen werden wiederum gemäß ihrer m/z -Verhältnisse analysiert (ESI- MS^2 -Spektrum). Dieser Zyklus kann natürlich auch weiter mit spezifischen Tochterionen durchlaufen werden (ESI- MS^n -Spektren) und somit der Informationsgehalt der Analyse weiter erhöht werden. [HMZ05, S. 303][5]

Im Folgenden wird der Aufbau und die Funktionsweise eines ESI-Ionenfallenmassenspektrometers erläutert, wobei in Abbildung 1.10 der Aufbau eines solchen Gerätes veranschaulicht wird.

Wie bereits in Abschnitt 1.3.1 beschrieben, werden die mittels ESI erzeugten Ionen zunächst fokussiert, ehe sie über eine Kapillare den Massenanalysator erreichen. Der Analysatorteil besteht neben der eigentlichen Quadrupol-Ionenfalle auch aus einem Ionentransfersystem (Ionenoptik mit Skimmer, Ionenlinsen und Oktopolen), welche über dynamische oder elektrostatische Mechanismen die Bündelung der Ionen zu einem dichten Strahl herbeiführen. Vakuumpumpen sorgen dabei für das effiziente Entfernen von Lösungsmittelrückständen vor allem im Bereich der Kapillaröffnung. Die durch die vorgeschaltete Ionenoptik fokussierten Ionen bewegen sich infolge des vorhandenen elektrischen Feldgradienten in Richtung Ionenfalle. Diese ist mit einem Puffergas (meist Helium) bei sehr geringem Druck ($10^{(-4)}-10^{(-5)}$ mbar) gefüllt, um die kinetische Energie der eintreffenden Ionen zu minimieren, sodass eine wirksame Anreicherung der Ionen im Quadrupolfeld ermöglicht wird.

Während eines Messzyklus, der einige Millisekunden andauern kann, wird eine Ionenpopulation im Elektrodenraum angesammelt und dort vorrätig gehalten. Dieser Ionenvorrat kann anschließend massenaufgetrennt gescannt werden. Der Zutritt weiterer Ionen wird dabei durch die elektronische Steuerung gezielt verhindert, um

die Störanfälligkeit der Massenanalyse zu reduzieren, aber auch um Abstoßungseffekte zwischen den Ionen zu reduzieren, welche bei hohen Ladungskonzentrationen überhand nehmen können. [Vat07]

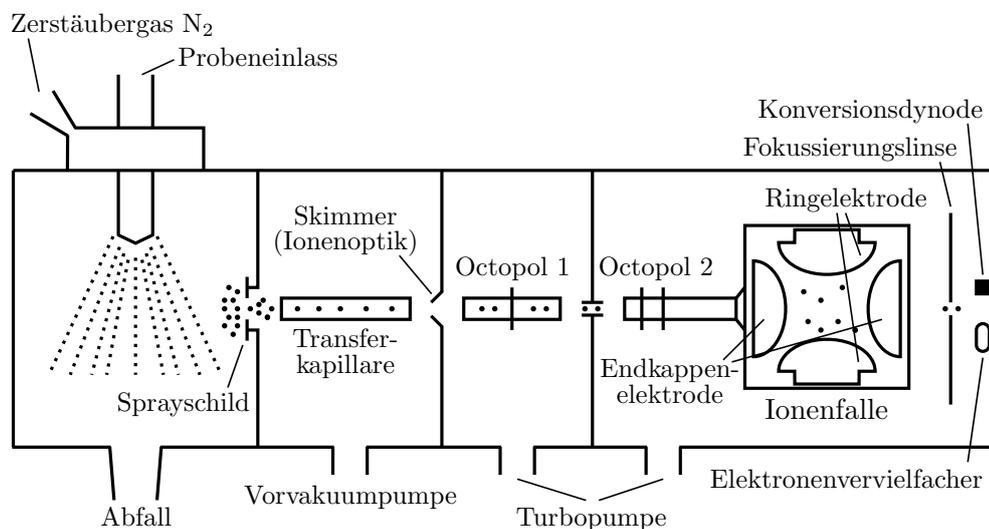


Abb. 1.10.: Skizze eines ESI-Ionenfallenmassenspektrometers [Vat07]

Als Detektoren kommen häufig Sekundärelektronenvervielfacher (SEV) zum Einsatz, welche sich durch hohe Empfindlichkeit und äußerst kurze Ansprechzeiten im Nanosekundenbereich auszeichnen. Die durch Resonanzanregung aus der Ionenfalle herausgeschleuderten Ionen treffen dabei vorerst auf eine Konversionsdynode, deren Polarität den Ionen entgegengerichtet ist. Für jedes Ion, das auf diese erste Dynode aufprallt, werden Elektronen emittiert, welche mit hoher kinetischer Energie auf eine nachgeschaltete Dynode aufschlagen und dort die Freisetzung weiterer Elektronen induzieren. Dieser kaskadenartige Prozess führt über mehrere Beschleunigungsdynoden zu einer signifikanten Erhöhung der Elektronenzahl, welche ein verstärktes elektrisches Signal ergibt. [6]

Tandem- und Mehrstufen-Massenspektrometrie (MS/MS und MSⁿ)

Um das Fragmentierungsverhalten von Substanzen zu studieren oder aber auch um eine Erhöhung der Selektivität und Sensitivität bei quantitativen Bestimmungen zu erreichen, empfiehlt es sich, spezifische Ionen und deren Fragmentionen durch Kopplung mehrerer massenspektrometrischer Experimente zu erfassen. Die Methode ist dadurch gekennzeichnet, dass zunächst die interessierenden Analytionen mit einem bestimmten m/z -Verhältnis, von jenen Ionen, welche in einen anderen m/z -Bereich fallen, abgetrennt werden. Die isolierten Ionen – häufig als Vorläuferionen (engl.: precursor ions) bezeichnet – werden in einem darauffolgenden Experiment angeregt und eine Fragmentierung herbeigeführt.

Die Anregung der Vorläuferionen kann durch den Einsatz unterschiedlicher Techniken erfolgen. In der organischen Chemie ist CID (engl.: collision induced dissociation) die populärste Variante. Bei dieser stoßinduzierten Fragmentierung werden die isolierten Vorläuferionen zunächst durch das Anlegen von Spannungen kinetisch angeregt und anschließend eine Kollision mit inerten Gasteilchen, wie Stickstoff, Helium oder Argon, ausgelöst. Bei diesem Zusammenstoß kommt es zu einer Umwandlung

eines Teiles der kinetischen Energie in innere Energie, wodurch die fragilsten kovalenten Bindungen, sogenannte Sollbruchstellen innerhalb des Moleküls, brechen. In Abbildung 1.11 wird das Prinzip der Mehrstufen-Massenspektrometrie verdeutlicht. [HMZ11, S. 308 ff.], [Sch07]

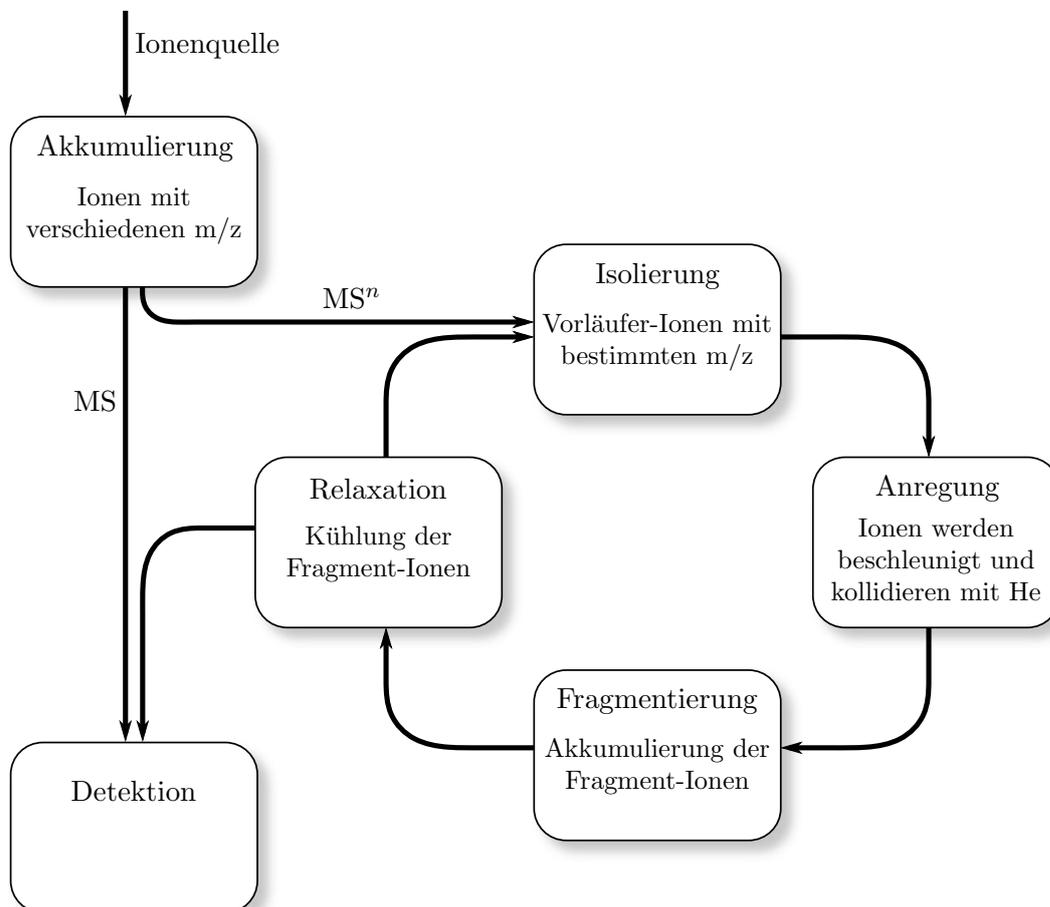


Abb. 1.11.: Prinzip der Mehrstufen-Massenspektrometrie (vgl. [HMZ11, S. 319])

Anschließend kann eine Massenanalyse aller über diese kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) generierten Produktionen erfolgen (MS²-Spektrum) oder der Zyklus durch weitere Selektion eines bestimmten Zerfallsproduktes und erneute Anregung und Fragmentierung fortgesetzt werden (MS^{n>2}).

Die Durchführung von Tandem-MS-Experimenten kann nach zwei unterschiedlichen technischen Gesichtspunkten erfolgen. Bei der räumlichen Tandem-Massenspektrometrie (engl.: tandem-in-space), wie sie beispielsweise bei Triplequadrupolen oder Quadrupol-TOF (engl.: time-of-flight) Geräten vorkommt, werden drei apparative Elemente hintereinander angeordnet. Der erste Massenanalysator ist für die Isolierung des gewünschten Vorläuferions zuständig, danach werden diese separierten Ionen in einer Stoßzelle fragmentiert, sodass die dabei erzeugten Fragmentionen im zweiten Analysator massenspezifisch getrennt werden können. Der Detektor registriert diese Ionen und transformiert sie in ein elektrisches Signal, das schlussendlich computerunterstützt in Form eines Massenspektrums dargestellt wird. Bei diesen Instrumenten erfolgt also sowohl die Isolierung, als auch die Anregung und Auftrennung der Ionen in räumlich getrennten Bereichen. [Sch07][HMZ11, S. 308 ff.]

Ionenfallen funktionieren hingegen nach dem Prinzip der zeitlichen Tandem-Massenspektrometrie (engl.: tandem-in-time). Dabei finden die soeben beschriebenen Prozesse in einem einzigen Analysator jedoch zeitlich versetzt statt. Dies stellt einen wichtigen Vorteil von Ionenfallen-Massenspektrometern dar. Nämlich die Möglichkeit, auf sehr beschränktem Raum und mittels eines kompakten Geräteaufbaus Vorläuferionen wiederholt neu zu definieren und daraufhin zu fragmentieren. Im Falle von ausreichend hohen Ionenpopulationen können diese Analysezyklen solange durchlaufen werden, bis beispielsweise die zehnte Generation an Fragmentionen produziert wurde. Diese Mehrfach-Massenspektrometrie (MS^n) liefert wichtige Informationen zum Fragmentierungsverhalten von Substanzen und ist für die Strukturaufklärung relevant, insbesondere dann, wenn ein einziger Fragmentierungsschritt nur wenig aufschlussreiche Fragmente ergibt. [Sch07]

1.3.3. Grundzüge von Bufadienolid-Massenspektren

Bei einem Massenspektrum handelt es sich allgemein um die grafische, zweidimensionale Darstellung der durch den Detektor registrierten Ionen hinsichtlich ihrer Intensität (Ordinate) – entspricht der Häufigkeit des Auftretens des entsprechenden Ions – und hinsichtlich ihrer m/z -Verhältnisse (Abszisse).

Die Spektren können dabei in Form von Histogrammen (Strichspektren) dargestellt werden. Die ursprünglichen analogen Signale (Gauß-Kurven) werden dabei zu einzelnen Peaks reduziert. Diese Datenvereinfachung dient einer klaren und unkomplizierten Illustration der Messergebnisse, sofern die Auflösung der Peaks zufriedenstellend ist. [Gro13, S. 10 ff.]

Jener Peak in einem Massenspektrum, der die höchste Intensität aufweist, wird generell als Basispeak (engl.: base-peak) definiert. Um eine Vergleichbarkeit von massenspektrometrischen Daten sicherzustellen, erfolgt oft eine Normierung der Intensität des Basispeaks auf hundert Prozent. Die Intensitäten der anderen Peaks werden dazu in Relation gesetzt und als relative Intensitäten angegeben. [Gro13, S. 10 ff.]

Bei der Verwendung von harten Ionisationsmethoden, wie beispielsweise der Elektronenstoß-Ionisation (EI), kommt es zur Bildung von positiv geladenen, radikalischen Moleküllionen (M^+), welche durch das Herausschlagen von Elektronen erzeugt werden. Diese radikalischen Moleküllionen sind äußerst labil und zerfallen meistens spontan, sodass im Massenspektrum entweder ein sehr schwaches oder kein M^+ -Signal auftritt. Bei diesen Methoden überwiegen also die Fragmentierungsprozesse und häufig kann das Molekulargewicht des Analyten aus dem Spektrum nicht mehr ermittelt werden. [Riz15]

Weiche Ionisationsmethoden, wie die Chemische Ionisation oder ESI, bringen protonierte ($[M+H]^+$), deprotonierte ($[M-H]^-$) Moleküle oder sogenannte Adduktionen (z.B. $[M+Na]^+$) hervor. Adduktionen entstehen durch die Anlagerung eines Kations oder Anions an das intakte Analytmolekül. Bei sehr geringen Anregungsenergien in der Ionenquelle bleiben diese gebildeten Ionen meist stabil und ein sofortiger Zerfall bleibt üblicherweise aus. Es besteht trotzdem die Möglichkeit, dass die generierten Ionen eine hohe Labilität aufweisen und dementsprechend im Zuge der Ionisation fragmentieren. Dies ist hauptsächlich von der Charakteristik des Probenmoleküls abhängig. Bei weichen Ionisationsmethoden kann im Regelfall jedoch davon ausgegangen werden, dass jener Peak mit dem höchsten m/z -Verhältnis vom intakten,

ionisierten Molekül stammt. Unter Berücksichtigung von Protonierungen, Deprotonierungen bzw. Addition von Kationen oder Anionen an dieses intakte Analytmolekül können somit Rückschlüsse auf das Molekulargewicht der Substanz gezogen werden, da im Rahmen der Ionisation die Fragmentierungsrate gering ist. [Riz15]

Für die Erstellung der Bufadienolid-Massenspektren, welche in diese Diplomarbeit einfließen, wurde als Ionisationstechnik die Elektrosprayionisation (ESI) herangezogen. Ein vorgeschaltetes chromatografisches Trennverfahren, wie die Hochleistungsflüssigchromatographie, ist nicht erforderlich, da die zu analysierenden Verbindungen aus der Naturstoffbibliothek des Departments für Pharmakognosie stammen und bereits als Reinsubstanzen vorliegen. ESI ist in diesem Fall die Methode der Wahl, da diese in der Lage ist auch thermisch labile und polare Verbindungen zu ionisieren, die Empfindlichkeit sehr hoch ist und bei einer großen Bandbreite an Analyten eine gute Ionisierbarkeit erreicht wird. Dabei wird der positive Ionenmodus ausgewählt, weil alle intakten Bufadienolide, sowie fast alle Derivate und Abbauprodukte, Carbonylgruppen aufweisen und sich somit protonieren lassen, wohingegen eine Deprotonierung bei den meisten Verbindungen nicht möglich ist. Die Elektronenstoß-Ionisation (EI) ist in diesem Zusammenhang nicht zu favorisieren, weil es sich um eine Gasphasenionenquelle handelt und die verwendeten Substanzen unzersetzt verdampfbar sein müssen. Außerdem kommt es bei harten Ionisationsmethoden im Zuge dieser Ionisation auch zu Fragmentierungsvorgängen, welche durch die Bildung reaktiver radikalischer Molekülonen vorangetrieben werden und autonom ablaufen, also nicht gezielt steuerbar sind.

Um möglichst viele Informationen über das Fragmentierungsverhalten der analysierten Bufadienolide zu erhalten, wird als Analysator eine Quadrupol-Ionenfalle eingesetzt und zur gezielten Fragmentierung ausgewählter Ionen die kollisionsinduzierte Dissoziation (CID) herangezogen. Durch die Verwendung von Mehrstufen-Massenspektrometrie können spezifische Abspaltungsmuster genau untersucht und eben auch Zerfallsprodukte von isolierten Fragmentionen studiert werden. Diese Erkenntnisse sind wichtig, um mögliche Beziehungen zwischen der vorliegenden chemischen Struktur und den massenspektrometrischen Daten herauszufinden.

Bufadienolide erzeugen sehr komplexe CID-Massenspektren, wobei meist das MS² Spektrum, das aus der selektiven Fragmentierung des protonierten Moleküls hervorgeht, einige charakteristische Grundzüge aufweist. Diese Spektren können grundsätzlich in zwei Zonen unterteilt werden:

Im unteren m/z -Bereich (ca. 50-250) treten vor allem Fragmentionen auf, welche aus dem kontinuierlichen Zerfall des Steroidgrundkörpers resultieren. In zahlreichen Untersuchungen (vgl. Liu et al., 2010 [LXX⁺10]) wurde postuliert, dass dieses Zerbersten des Kohlenstoffgerüsts durch Retro-Diels-Alder-Reaktionen und induktive Spaltungen zustande kommt. Dies würde auch die seriellen Abspaltungen von CH₂, CH₄ und C₂H₄ Gruppen erklären. Dieser äußerst signalreiche untere m/z -Bereich ist generell ein guter Hinweis für das Vorliegen steroidalere Verbindungen, jedoch erschwert die Komplexität ein Voraussagen weiterer Strukturmerkmale. Bei höheren m/z -Verhältnissen (250-600) können hauptsächlich Fragmentionen nachgewiesen werden, welche aus der Abspaltung von funktionellen Gruppen oder Substituenten hervorgehen. So sind aufeinanderfolgende Wasserverluste für mehrfach hydroxylierte Verbindungen typisch. Auch ein Neutralverlust von 96 Da, der aus der Abspaltung des δ -Lactonrings resultiert, kann bei nahezu allen Bufadienolid-Massenspektren beobachtet werden. [LXX⁺10]

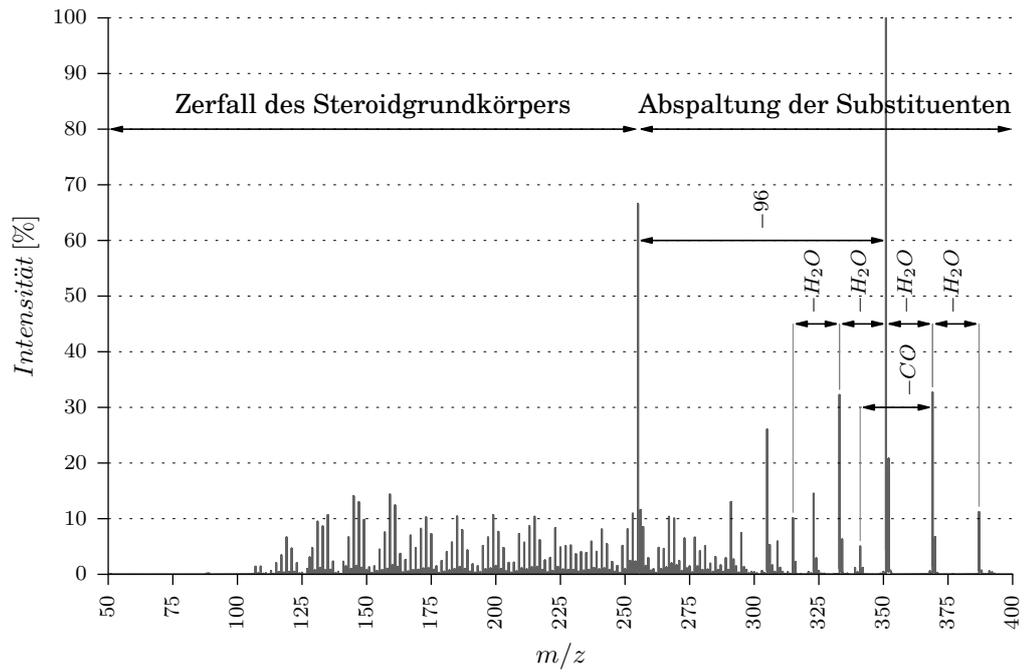


Abb. 1.12.: MS² Spektrum des [M+H]⁺-Ions von Bufalin

Ein typisches CID-MS² Spektrum eines Bufadienolides (Bufalin, 10Q) ist in Abbildung 1.12 dargestellt. Ye et al. (2010) erstellten auch einen hypothetischen Fragmentierungspfad dieser Verbindung, der in Abbildung 1.13 dargelegt wird [YG05].

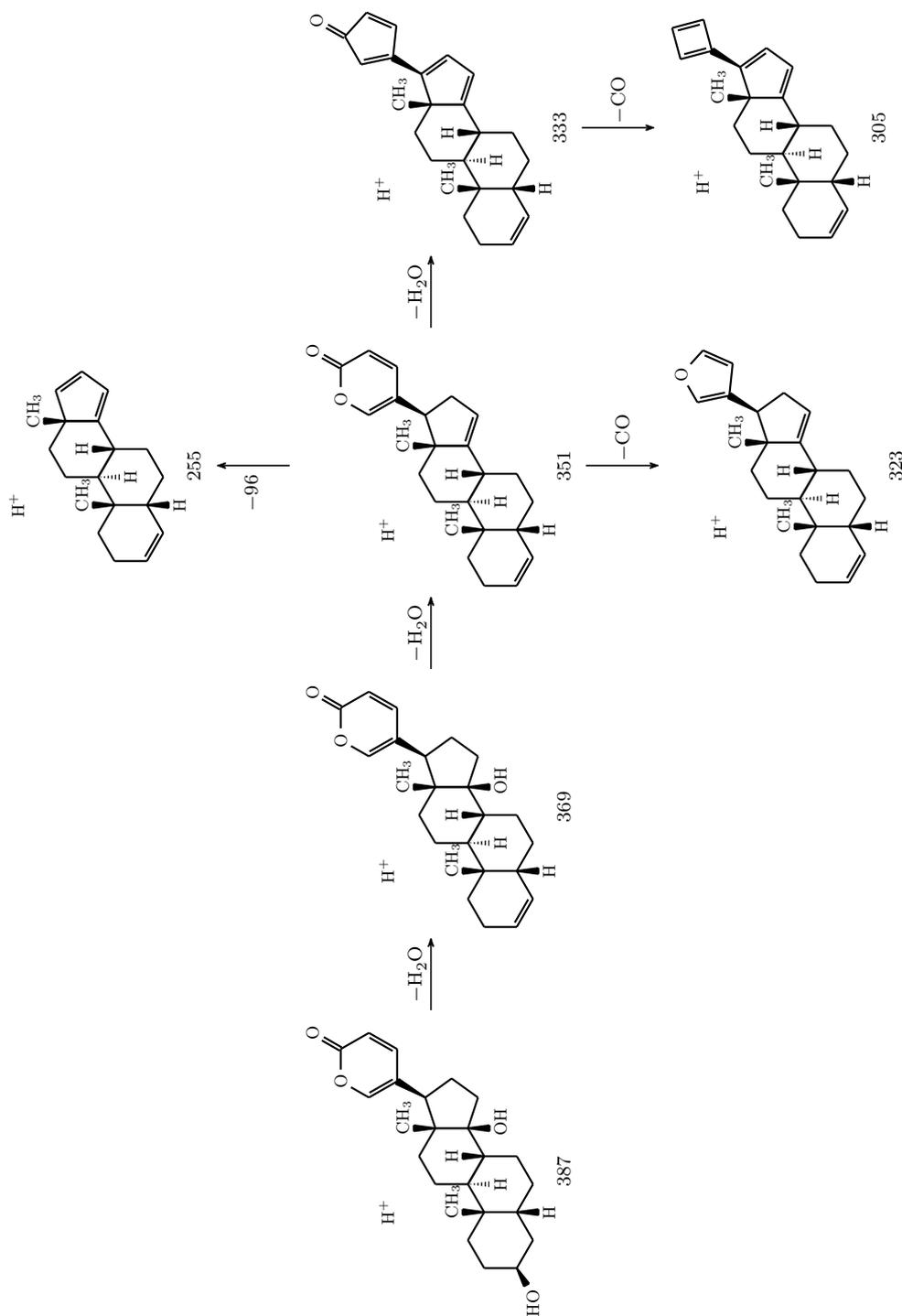


Abb. 1.13.: Angenommener Fragmentierungspfad des Bufadienolides Bufalin [YG05]

2. Untersuchte Bufadienolide

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden die Massenspektren von insgesamt 61 Verbindungen analysiert und interpretiert. 37 dieser Substanzen können als *echte* Bufadienolidaglyka bezeichnet werden, da hier ein 10,13-Dimethylsteran-Grundkörper vorliegt, der an Position 17 einen intakten zweifach ungesättigten δ -Lactonring aufweist. Zusätzlich wird die Substanzauswahl auch noch durch zwei Bufadienolidglykoside ergänzt.

Der Rest der Verbindungen entfällt auf diverse Bufadienolid-Derivate und Abbauprodukte. Diese entstanden im Zuge von chemischen Umsetzungen zum Zwecke der Strukturaufklärung. Sie besitzen ebenfalls einen 10,13-Dimethylsteran-Grundkörper, der jedoch an Position 17 nicht mit dem typischen δ -Lactonring substituiert ist, sondern mit anderen variablen Resten. Viele dieser Substanzen tragen beispielsweise 17 β -Carbonsäuremethylester (z.B. 15S) oder andere aus dem Abbau des Lactonrings entstandene Substituenten.

Die Strukturformeln aller verwendeten Bufadienolide und Derivate, als auch die analysierten Massenspektren können dem Anhang (S. 70 ff.) entnommen werden. Um eine einfache Deklaration dieser Verbindungen zu gewährleisten, ist diesen ein Index zugeteilt, der auch in den folgenden Kapiteln verwendet wird.

Bei den zu analysierenden Substanzen handelt es sich um Reinsubstanzen, welche von Frau Univ. Prof. Mag. Dr. Dr. h. c. Brigitte Kopp vom Department für Pharmakognosie der Universität Wien bereitgestellt wurden.

Tabelle 2.1 (S. 26) zeigt eine Auflistung der Bufadienolidaglyka und -glykoside, welche einen intakten Bufadienolidgrundkörper aufweisen und über keine Epoxygruppe an Position 14 und 15 verfügen. Die Bufadienolidgrundstruktur kann der Abbildung 2.1 entnommen werden.

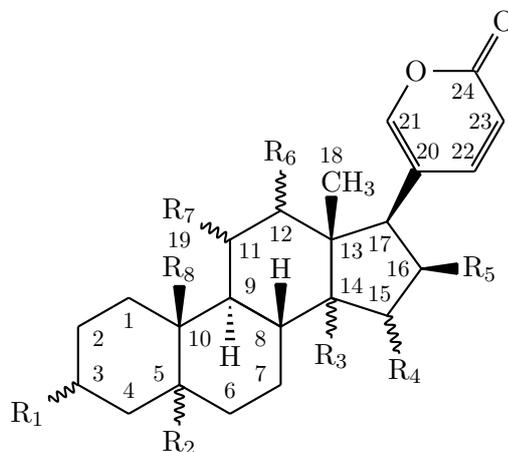


Abb. 2.1.: Grundstruktur der intakten Bufadienolidaglyka/-glykoside ohne Epoxygruppe

Tabelle 2.1.: Untersuchte intakte Bufadienolidaglyka und -glykoside ohne Epoxygruppe

Index	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈	DB
10D	β OH	α H	β OH	H	H	H	H	CH ₃	–
10I	β OAc	β H	α OH	=O	H	H	H	CH ₃	–
10J	β OAc	β OH	β OH	α OH	H	H	H	CH ₃	–
10O	β OAc	β H	β OH	H	H	H	H	CH ₃	–
10Q	β OH	β H	β OH	H	H	H	H	CH ₃	–
10S	α OH	β H	β OH	H	H	H	H	CH ₃	–
10U	=O	β H	β OH	H	H	H	H	CH ₃	–
15c	β OAc	β H	β OH	H	H	β OAc	=O	CH ₃	–
15d	β OH	β H	β OH	H	H	β OH	α OH	CH ₃	–
15i	β OAc	β H	β OH	H	H	α OH	α OAc	CH ₃	–
16D	β OH	β H	β OH	H	H	β OH	=O	CH ₃	–
16G	β OAc	β H	β OH	H	H	α OAc	=O	CH ₃	–
21E	β OAc	β H	β OH	H	β OAc	H	H	CH ₃	–
22D	β OH	β H	–	H	H	H	H	CH ₃	14,16
2C	β OH	α H	β OH	H	H	H	H	CHO	–
2c	=O	–	β OH	H	H	H	H	CH ₃	4
2G	β OAc	α H	β OH	H	H	H	H	CHO	–
2M	β OH	β H	β OH	H	H	H	α OH	CH ₃	–
2P	β (1)	β H	β OH	H	H	H	α OH	CH ₃	–
32A	β H	β OH	β OH	H	β OAc	H	H	CH ₃	–
54v	β OAc	β H	α H	β OAc	H	H	H	CH ₃	–
5D	β OAc	β H	β OH	H	H	=O	α OAc	CH ₃	–
5F	β OH	β H	β OH	H	H	=O	α OH	CH ₃	–
60K	β OH	β OH	β OH	H	H	H	H	CH ₃	–
6B	β OH	β H	β OH	H	H	=O	OH	CH ₃	9(11)
7E	=O	β H	β OH	H	β OAc	H	H	CH ₃	–
Hel1	=O	–	β OH	H	H	H	H	CH ₃	1,4
Hel2	β OAc	β OH	β OH	H	H	H	H	CHO	–
Hel3	β (2)	β OH	β OH	H	H	H	H	CHO	–
Hel4	β OH	β OH	β OH	H	H	H	H	CHO	–

(1) α -L-Rhamnose(2) 4-O- β -D-Glucopyranosyl- α -L-Rhamnopyranosyloxy

DB: Doppelbindung

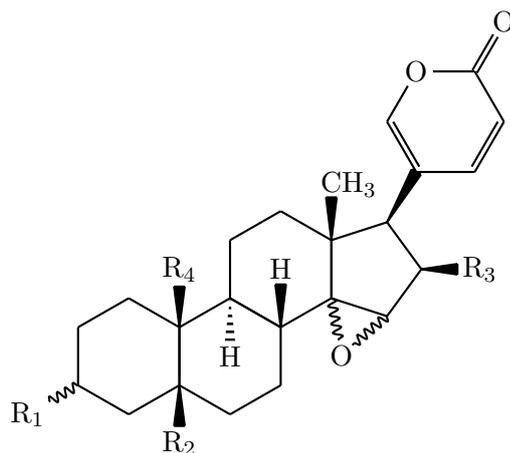


Abb. 2.2.: Grundstruktur der Bufadienolidaglyka mit Epoxygruppe

Tabelle 2.2.: Untersuchte Bufadienolidaglyka mit Epoxygruppe

Index	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Epoxy
12A	β OCHO	H	H	CH ₃	14 α ,15 α
12B	β OH	H	H	CH ₃	14 α ,15 α
27F	α (1)	H	OAc	CH ₃	14 β ,15 β
35B	β OAc	H	OH	CH ₃	14 β ,15 β
52I	β N ₃	H	H	CH ₃	14 β ,15 β
7B	β OAc	H	H	CHO	14 β ,15 β
48J	β OH	OH	H	CH ₃	14 β ,15 β
19A	β OH	OH	H	CHO	14 β ,15 β

(1) Acetylamino

Anhand der Tabelle wird ersichtlich, dass in dieser Bufadienolidauswahl einige Stereoisomere vorkommen, wie beispielsweise 10Q, 10S und 10D. Jedoch auch Konstitutionsisomere, wie beispielsweise 10J und 32A oder 5F und 16D. Anhand dieser Verbindungen kann vor allem untersucht werden, ob die Stellung der Substituenten das Fragmentierungsverhalten beeinflusst.

In Tabelle 2.2 sind jene Verbindungen zusammengefasst, die ebenfalls einen intakten Bufadienolidgrundkörper besitzen und zusätzlich eine 14,15-ständige Epoxygruppe tragen. Der zugehörige Grundkörper ist in Abbildung 2.2 dargestellt. Die Verbindungen 52I und 27F werden aufgrund der 3 β -ständigen Azido- bzw. Acetylamino-Gruppe eigentlich nicht für Vergleiche mit anderen Strukturen verwendet, da diese Substituenten Einzelfälle im gesamten Datensatz sind.

Im Folgenden soll die Aufbereitung dieser Struktursammlung für die darauffolgende Analyse der Massenspektren und Ableitung von Fragmentierungsregeln erklärt werden, als auch die Vorgehensweise bei der Interpretation der Massenspektren dargelegt werden.

2.1. Einteilung der Bufadienolide nach strukturellen Merkmalen

Der erste Schritt des analytischen Prozesses im Rahmen dieser Diplomarbeit war die Einteilung der zu analysierenden Verbindungen hinsichtlich struktureller Gemeinsamkeiten. Diese Klassifikation ist notwendig, um herauszufinden inwiefern bestimmte strukturelle Merkmale, also Funktionalitäten, das Fragmentierungsverhalten der Substanzen beeinflussen.

Außerdem ist eine derartige Gruppeneinteilung vonnöten, um systematisch Massenspektren miteinander vergleichen zu können und somit typische Gemeinsamkeiten innerhalb einer Gruppe zu definieren, oder eben wichtige Unterscheidungsmerkmale zwischen verschiedenen Gruppen zu verifizieren.

Trotz der Interpretation aller vorhandenen Substanzen wurden für die Erarbeitung von Fragmentierungsregeln ausschließlich intakte Bufadienolide herangezogen und keine Derivate oder Abbauprodukte. Dieser Umstand kann dadurch erklärt werden, dass diese chemischen Derivatisierungsprodukte in der Natur eigentlich nicht vorkommen und somit aus bioanalytischer Sicht keine große Relevanz besitzen. Außerdem ist in diesem Zusammenhang der Datenumfang nicht ausreichend groß, um vernünftige Aussagen über massenspektrometrische Charakteristika zu treffen.

Die intakten Bufadienolide werden hingegen nach dem in Abbildung 2.3 (S. 29) dargestellten Schema strukturiert. Wie man diesem Schema entnehmen kann, basiert diese Einteilung prinzipiell auf dem Vorhandensein identischer Substituenten, da der Kohlenstoffgrundkörper unverändert bleibt und man von der Annahme ausgehen muss, dass jene Bufadienolide, welche ein ähnliches Substitutionsmuster aufweisen, auch hinsichtlich des massenspektrometrischen Zerfalls Parallelen besitzen. Eine Strukturierung nach Stellung der Substituenten wird nicht vorgenommen.

2.2. Vorgangsweise der Interpretation der Massenspektren

Die CID-Massenspektren werden unter Verwendung der Software Compass Data Analysis 4.0 (Bruker Daltonics, [7]) analysiert, wobei für die Interpretation der Bufadienolid-Massenspektren, die in der Literatur beschriebenen Fragmentierungsvorgänge verwendet werden (vgl. dazu [LXX⁺10] und [YG05]).

Compass Data Analysis 4.0 ist ein auf die Verarbeitung von massenspektrometrischen Daten spezialisiertes Programm. Für die Deklaration von Fragmentionen und Suche nach wichtigen Massenverlusten kann dabei die Funktion *Annotate* verwendet werden. Diese Funktion erlaubt dem Anwender, eine schnelle Selektion von Peaks und gleichzeitige Berechnung der Massendifferenz zwischen diesen Signalen. Wenn gewünscht, schlägt die Software auch gängige Neutralverluste vor, was die Analyse auch maßgeblich erleichtert.

Besonders hilfreich ist auch die Möglichkeit, Massenlisten zu erstellen. Dabei handelt es sich um eine Auflistung jener m/z -Werte, bei der die entsprechenden Peaks auftreten und der dazugehörigen relativen Intensitäten. Diese Daten können wiederum zur weiteren Verarbeitung in andere Programme exportiert werden. In Abbildung 2.4 wird das Benutzerinterface der Software Compass Data Analysis 4.0 dargestellt

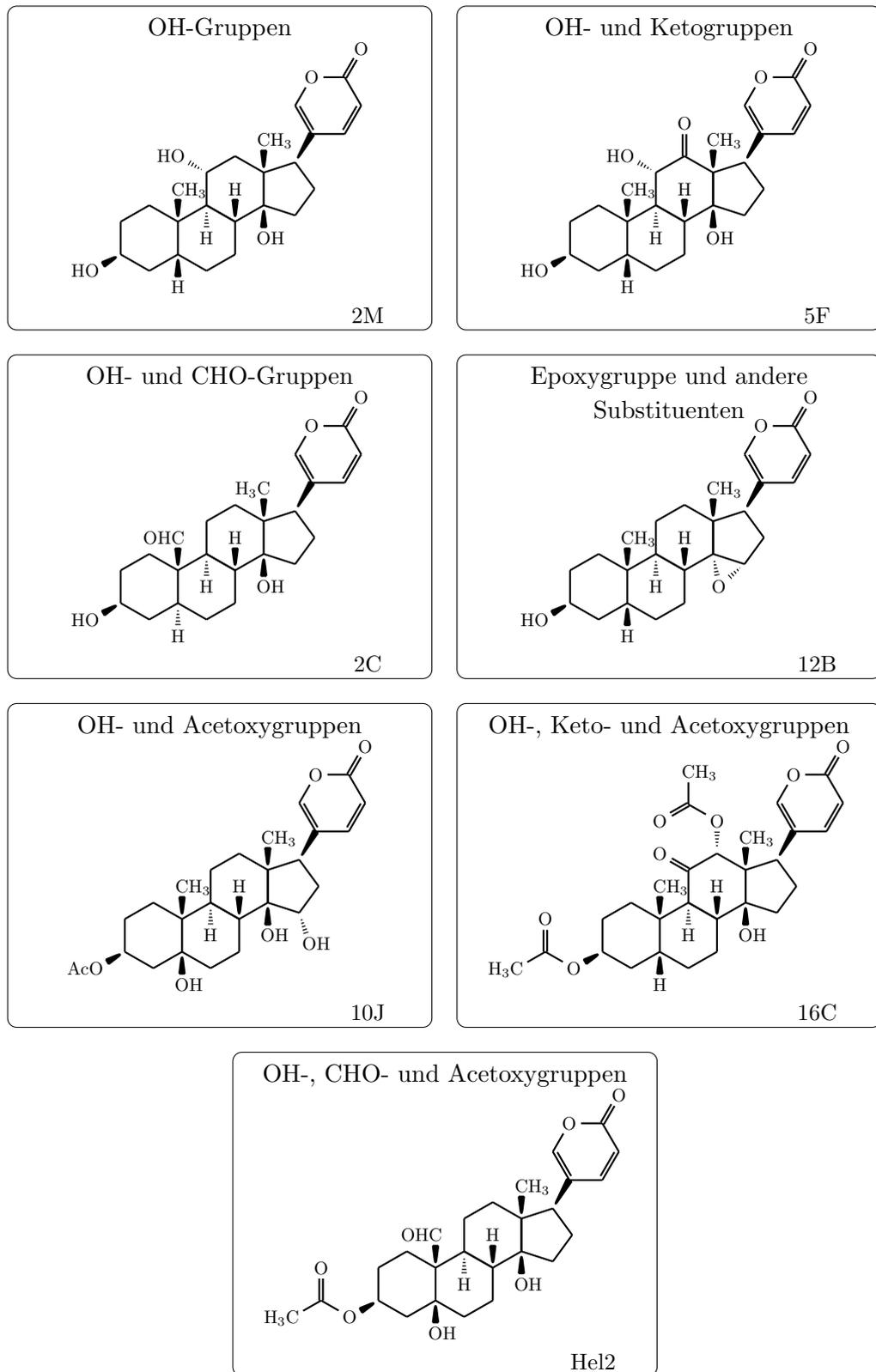


Abb. 2.3.: Einteilung der Bufadienolide nach strukturellen Merkmalen

2. Untersuchte Bufadienolide

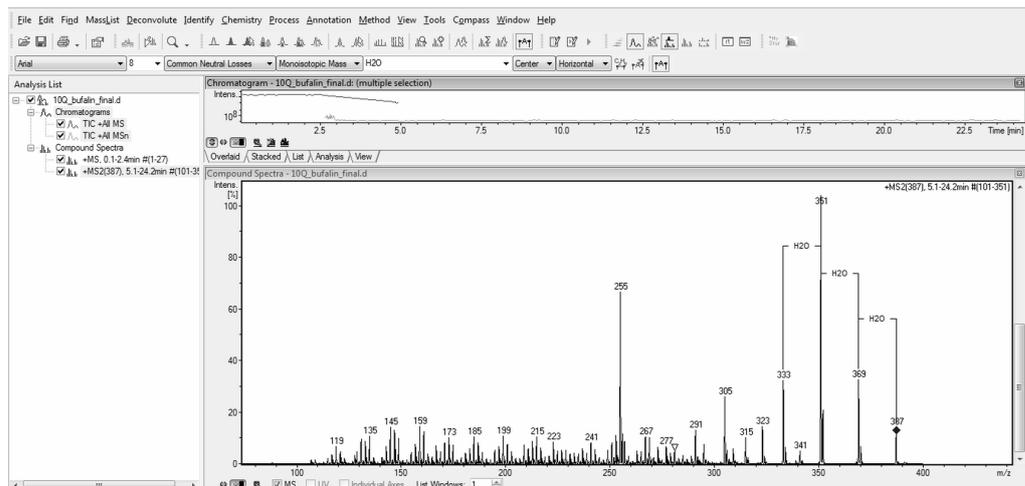


Abb. 2.4.: Benutzerinterface von Compass Data Analysis 4.0. Markierung von drei aufeinanderfolgenden Wasserabspaltungen im MS^2 Spektrum der Verbindung Bufalin (10Q) mittels der Funktion *Annotate*

und zusätzlich die Bearbeitung des MS^2 Spektrums der Substanz Bufalin (10Q) mit der *Annotate*-Funktion gezeigt.

Parallel zu dieser Interpretation der Massenspektren mittels Compass Data Analysis 4.0 wurde die Strukturformel des jeweiligen Bufadienolides mit der Software ACD/ChemSketch [8] gezeichnet. Dieses Programm ermöglicht eine effiziente Darstellung chemischer Strukturformeln, wobei auch das Molekulargewicht und die Summenformel der jeweiligen Struktur automatisch berechnet werden. Dies kann genutzt werden, um Fragmentierungspfade zu erstellen und Abspaltungen von Strukturelementen mit den Ergebnissen der Spektreninterpretation zu vergleichen. Die praktische Durchführung kann aus der Abbildung 2.5 entnommen werden. Dabei ist jeweils die verbleibende Struktur des Bufadienolides Bufalin (10Q) zu erkennen, nachdem die am Sterangrundkörper substituierten Hydroxygruppen, als auch ein Sauerstoffa-

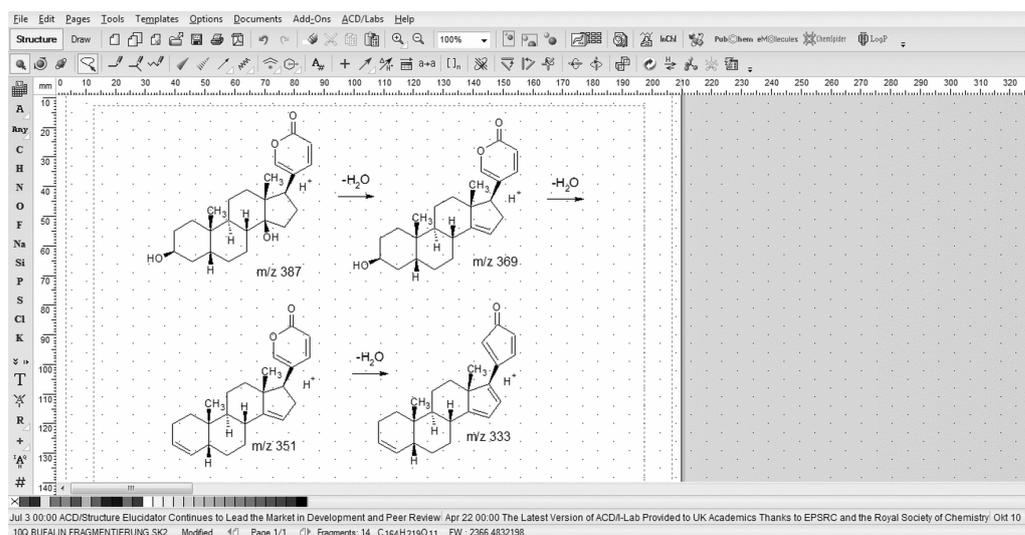


Abb. 2.5.: Darstellung einer seriellen Wasserabspaltung bei der Verbindung Bufalin (10Q) mit dem Programm ACD/ChemSketch [8]

tom des δ -Lactonringes, in Form von Wasser abgespalten wurden. Die hier gezeigten Strukturformeln sind nur eine exemplarische Darstellung. Wegen der Reihenfolge der Abspaltungen, der Lage der Doppelbindungen oder Umlagerungen sind grundsätzlich mehrere Strukturen möglich.

3. Ergebnisse und Interpretationen

Wie bereits in Kapitel 1.1 dargelegt, ist ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit, durch die Analyse von CID-Massenspektren einer bestimmten Auswahl an Bufadienoliden Fragmentierungsregeln zu erstellen. Diese Regeln sollen allgemein für diese Substanzklasse gelten und können für die Identifizierung bzw. Strukturaufklärung unbekannter Bufadienolide herangezogen werden. Mit anderen Worten wurden die Massenspektren hinsichtlich bestimmter Merkmale, also Fragmentationen oder Abspaltungsmuster untersucht, welche als Indikator für entsprechende Funktionalitäten dienen. In diesem Kapitel werden diese Merkmale nach den in Kapitel 2 definierten Gruppen abgehandelt. Die nachfolgenden Interpretationen und Ergebnisse werden durch die im Anhang A (S. 70 ff.) angeführten Strukturformeln und die in Anhang B (S. 92 ff.) gesammelten und annotierten Massenspektren der Substanzen ergänzt.

3.1. Gruppe I: Bufadienolidaglyka mit Hydroxygruppen

Verbindungen: 10Q, 10S, 10D, 2M, 15d, 22D, 60K

In dieser Gruppe werden Bufadienolide zusammengefasst, welche ausschließlich Hydroxygruppen als Substituenten am Bufadienolidgrundkörper aufweisen. Die Interpretation der jeweiligen Massenspektren ergibt ein homogenes Bild und es stellt sich heraus, dass Verbindungen, welche dieser Gruppe zugeordnet wurden, durchaus hinsichtlich ihres Fragmentierungsverhaltens miteinander korrelieren.

Die MS² Spektren dieser Substanzen zeichnen sich durch folgende Charakteristika aus:

1. Der m/z-Wert des protonierten Moleküls ($[M+H]^+$) setzt sich zusammen aus: 354 (Molekulargewicht des unsubstituierten Bufadienolidgrundkörpers) + m · 16 (pro Hydroxygruppe) + 1 (für die Anlagerung des Protons) - n · 2 (für jede Doppelbindung im Steroidgrundkörper)
2. Generell typisch innerhalb dieser Gruppe ist das Auftreten serieller Wasserabspaltungen. Dabei können sowohl die am Steroidgrundkörper substituierten Hydroxygruppen, als auch die beiden Sauerstoffatome des δ -Lactonringes in Form von Wasser eliminiert werden. Die durch diese Wasserabspaltungen entstehenden Fragmentationen treten mit einer großen Häufigkeit auf, was auch die relativen Intensitäten der Peaks widerspiegelt.
3. Die Abspaltung des δ -Lactonringes in Form eines Neutralteilchens ergibt einen typischen Massenverlust von 96 Da.
4. Weiters besteht die Möglichkeit, dass die beiden Sauerstoffatome der Lacton-Teilstruktur als CO-Moleküle eliminiert werden und somit zu charakteristischen Verlusten von 28 Da führen.

5. Ein wichtiges Unterscheidungskriterium für diese Gruppe ist das Vorhandensein eines sogenannten Markerpeaks im m/z -Bereich um 255. Bei dem zugehörigen Fragmentation handelt es sich um den vollständig dehydratisierten und dimethylierten Cyklopentanoperhydrophenanthren-Körper. Der Sättigungsgrad dieses Ringsystems variiert je nach Substituentenzahl, da durch den Verlust der Hydroxygruppen und des δ -Lactonringes Doppelbindungen im Kohlenstoffgerüst entstehen. Im Fall von Gamabufotalin (2M, siehe Abbildung 3.2 und Anhang S. 96) ist dieses Fragmentation, das den Markerpeak verursacht, in Abbildung 3.1 dargestellt.
6. Der Basispeak innerhalb dieser Gruppe ist nicht einheitlich. Meist stammt dieser jedoch von einem Fragmentation, bei dem ausschließlich eine oder mehrere Wasserabspaltungen auftreten.

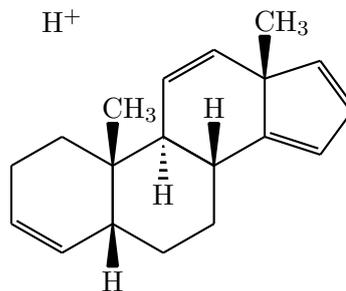


Abb. 3.1.: Fragmentation $[M-3H_2O-96+H]^+$ der Verbindung Gamabufotalin (2M)

Anhand des MS^2 Spektrums (Abbildung 3.2) der Verbindung Gamabufotalin (2M) können einige dieser Merkmale praktisch erläutert werden.

Die Fragmentierungspfade (Abbildungen 3.3, 3.4, 3.5, S. 34 ff.) der Verbindungen 15d, 2M und 10Q (siehe Anhang S. 97), die sich jeweils durch eine Hydroxygruppe

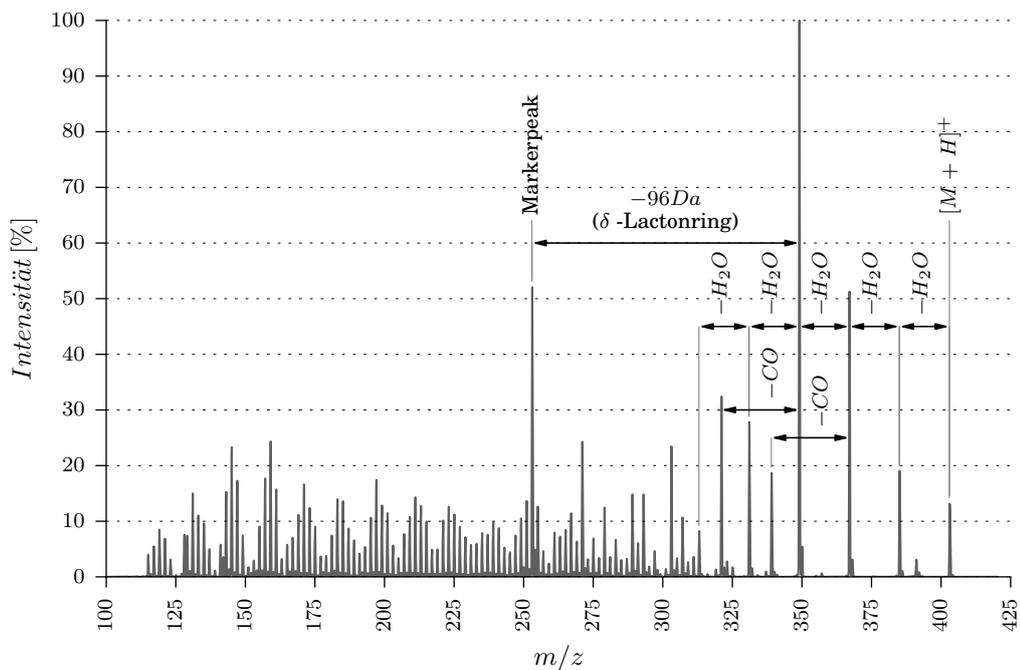


Abb. 3.2.: MS^2 Spektrum der Verbindung Gamabufotalin (2M)

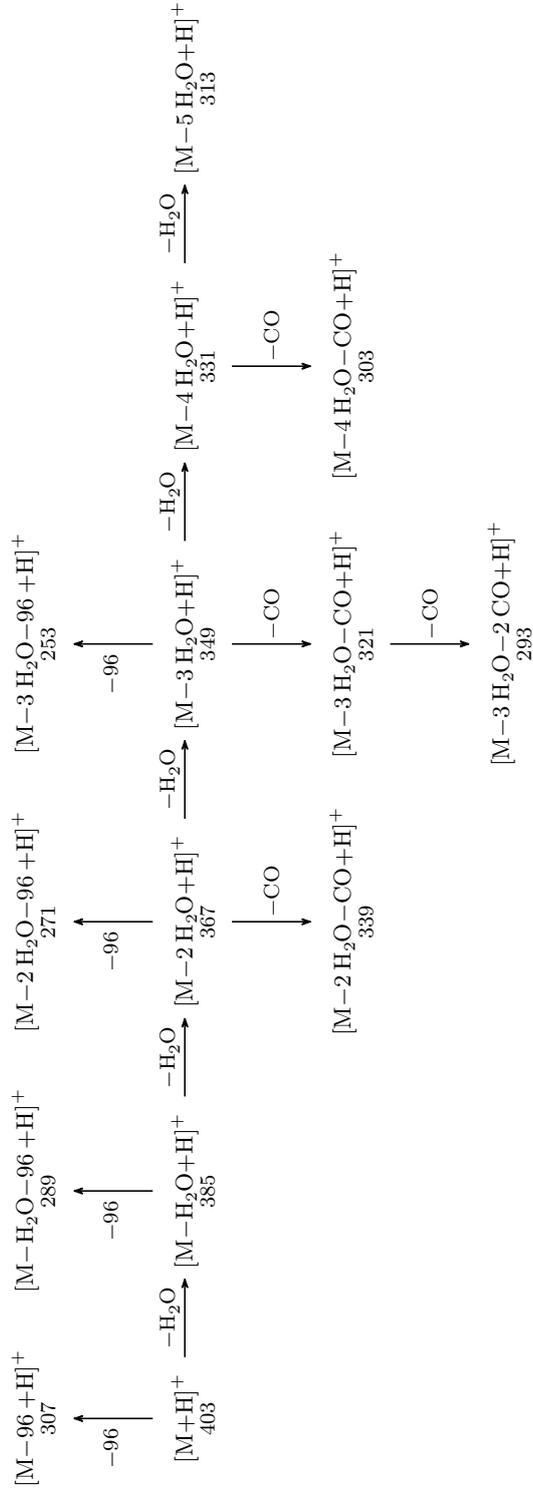


Abb. 3.4.: Fragmentierungspfad des $[M+H]^+$ -Ions von Gamabufotalin (2M)

voneinander unterscheiden und dadurch eine Art homologe Reihe bilden, verdeutlichen, dass das Abspaltungsmuster innerhalb dieser Gruppe starke Gemeinsamkeiten aufweist. Das heißt, unter der Berücksichtigung des unterschiedlichen Substitutionsgrades und der dadurch größeren Zahl an möglichen Wasserabspaltungen, kommt es bei diesen Verbindungen zur Bildung analoger Fragmentationen.

Diesbezüglich charakteristisch ist, dass einem Wasserverlust meist eine CO-Abspaltung folgt oder ein Neutralverlust von 96 Da. Die Eliminierung von zwei CO-Gruppen, welche vermutlich vom Lactonring stammen, erfolgt bei diesen Verbindungen in Zusammenhang mit einer vollständigen Dehydroxylierung (z.B.: $[M-3H_2O-2CO+H]^+$ bei 2M).

Bei der Interpretation der Massenspektren dieser Gruppe konnten auch einige stereochemische Informationen bereitgestellt werden. Diesbezüglich ist vor allem die Konfiguration an Position 5 von Bedeutung, da diese den Verknüpfungstyp (cis oder trans) des A und B Ringes im Steroidgrundkörper determiniert. Somit können beispielsweise die beiden epimeren Verbindungen 10Q (5β) und 10D (5α) anhand der relativen Intensitäten der MS² Spektren (siehe Anhang S. 93 bzw. S. 95) unterschieden werden. Vor allem der Peak bei einem m/z-Wert von 255 ist bei 10D deutlich abgesenkt im Vergleich zu 10Q. Die beiden epimeren Verbindungen 10Q und 10S, die sich nur in der Konfiguration an Position 3 unterscheiden, liefern hingegen nahezu idente MS² Spektren (siehe Anhang S. 93 bzw. S. 94), welche praktisch nicht unterscheidbar sind.

Auch bei den Konstitutionsisomeren Telocinobufagin (60K, siehe Anhang S. 99) und Gamabufotalin (2M) treten in den MS² Spektren signifikante Unterschiede in den relativen Intensitäten auf. Diese beiden Konstitutionsisomere könnten folglich, unter Verwendung entsprechender Referenzspektren, die unter identen Bedingungen und mit demselben Instrumententyp aufgenommen wurden, sicher voneinander differenziert werden. Dennoch können anhand der Abweichungen in den relativen Intensitäten keine allgemeinen Regeln abgeleitet werden.

Die Analyse der Verbindung Bufotalin (22D, siehe Anhang S. 98) liefert Erkenntnisse über die Auswirkungen von Doppelbindungen auf das Fragmentierungsverhalten. Die Anwesenheit dieser zwei Doppelbindungen im D-Ring des Bufadienolidgrundkörpers scheint die Fragmentierung des Steroid-Grundgerüsts zu forcieren und die Bildung von Fragmentationen im unteren m/z-Bereich zu verstärken. Das Fragmentation mit der höchsten Intensität ist in diesem Fall $[M-H_2O-2CO-C_4H_6+H]^+$ (m/z 239).

3.2. Gruppe II: Bufadienolidaglyka mit Hydroxy- und Acetoxygruppen

Verbindungen: 10O, 10J, 32A, 21E, 15i, 54v

Verbindungen, welche dieser Gruppe zugeordnet wurden, tragen ausschließlich Acetoxygruppen und Hydroxygruppen, wobei 21E und 15i sogar zweifach acetoxyliert sind (siehe Anhang S. 75). Bei der Verbindung 54v (siehe Anhang S. 90) liegen ausschließlich zwei Acetoxygruppen an Position 3 und 15 vor.

Grundsätzlich kann bei dieser Gruppe festgehalten werden, dass vor allem die substituierte Acetoxygruppe zu Massenverlusten und Fragmentationen führt, die für die Abgrenzung dieser Gruppe wesentlich sind. Abbildung 3.7 zeigt den potentiellen Fragmentierungspfad der Verbindung 10J, aus dem wichtige Spaltprodukte dieser Gruppe entnommen werden können.

Für die MS² Spektren dieser Gruppe ergibt sich ein typischer, initialer Verlust dieser Acetoxygruppe, entweder durch Abspaltung eines Essigsäuremoleküls (spezifischer Massenverlust von 60 Da) oder durch sequenzielle Abspaltung einer CH₂CO-Gruppe (42 Da) und eines H₂O. Wenn mehrere Acetoxygruppen vorliegen, können diese Abspaltungen und Verluste entsprechend mehrfach beobachtet werden.

Vergleicht man die MS² Spektren der Verbindungen 2M und 10J (siehe Anhang S. 96 und S. 105), die sich durch eine Acetoxygruppe und durch die Position der Substituenten voneinander unterscheiden, so ist ersichtlich, dass die Spektren unterhalb eines m/z-Wertes von 385 starke Ähnlichkeiten aufweisen. Das heißt, sobald die Acetoxygruppe bei 10J eliminiert wurde, verhält sich diese Verbindung in ihrem Fragmentierungsverhalten ähnlich wie die Verbindung 2M nach Abspaltung einer Hydroxygruppe vom Bufadienolidgrundkörper. Durch dieselbe Substituentenanzahl der beiden Verbindungen korrelieren auch die m/z-Werte der Peaks miteinander, nachdem die Acetoxygruppe nicht mehr vorhanden ist. Die Gegenüberstellung dieser beiden MS² Spektren in Abbildung 3.6, verdeutlicht diese Feststellung. Noch deutlicher wird dies beim Vergleich der Verbindungen 10O mit 10Q (siehe Anhang S. 104 und S. 93), die sich nur durch die Acetylierung der Hydroxygruppe an C-3 unterscheiden.

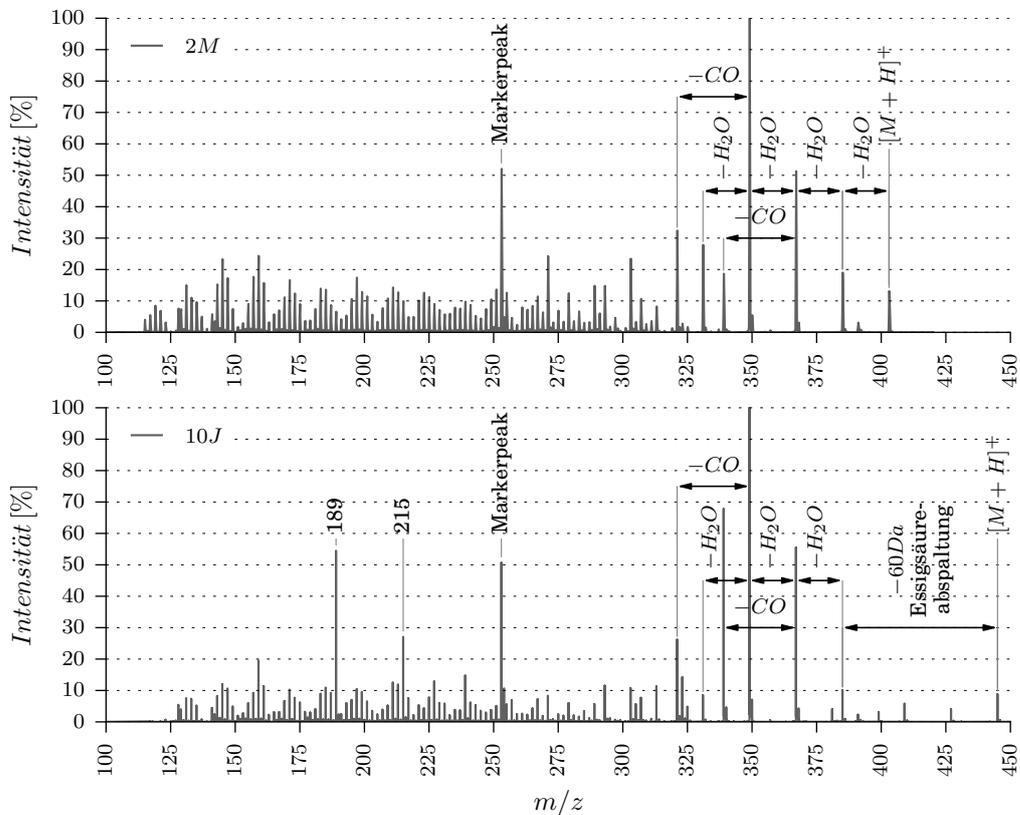
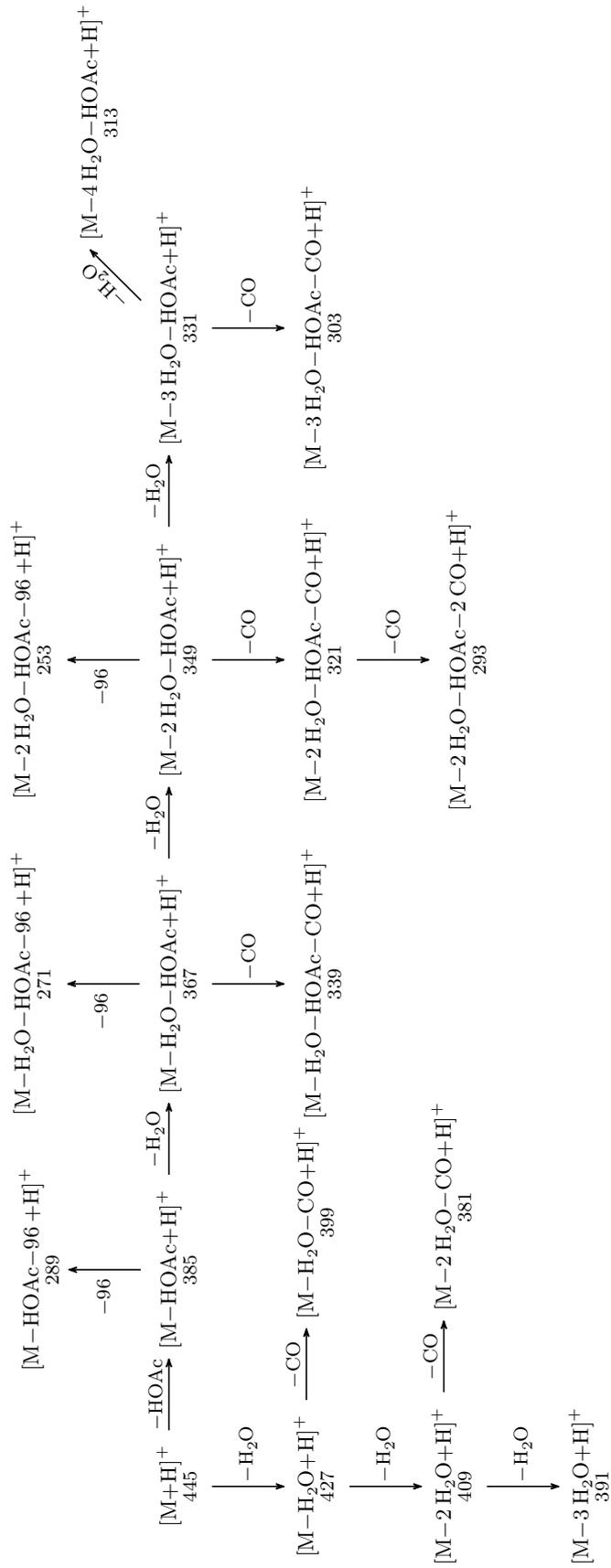


Abb. 3.6.: Gegenüberstellung der MS² Spektren von 2M und 10J

Abb. 3.7.: Fragmentierungspfad des $[M+H]^+$ -Ions der Verbindung (10J)

Zusätzlich fällt auf, dass das MS² Spektrum der Verbindung 10J zwei markante Peaks im unteren m/z-Bereich bei 215 und 189 besitzt. Unter Umständen könnten diese Peaks Hinweise für eine C-15-ständige OH-Gruppe darstellen, da diese Peaks weder bei 100 noch bei 2M auftreten. Dennoch bleibt dies eine Vermutung, da ansonsten keine Verbindung im Datensatz vorhanden ist, welche an dieser Position hydroxyliert ist und somit auch keine Überprüfung möglich ist.

Nach dem für diese Gruppe charakteristischen Verlust der Acetoxygruppe, kommt es – wie in Gruppe I (siehe Abschnitt 3.1) bereits erläutert – zu seriellen Wasser- bzw. CO-Verlusten. Ähnlich wie bei den Vertretern aus Gruppe I kann bei einem m/z-Wert von etwa 255 ein signifikanter Peak beobachtet werden, der dem dimethylierten, mehrfach ungesättigten Cyclopentanoperhydrophenanthren-Körper zugeordnet werden kann. Der Basispeak entspricht meist jenem Fragmentation, das gebildet wird, wenn alle Substituenten außer dem δ -Lactonring eliminiert wurden und somit ein intakter Bufadienolidgrundkörper vorliegt (beispielsweise $[M-H_2O-HOAc+H]^+$ oder $[M-2H_2O-HOAc+H]^+$). Zusätzlich zu erwähnen ist, dass die reinen Wasser-verluste als auch die Neutralverluste von 96 Da nicht so intensiv wie in Gruppe I in Erscheinung treten. Die soeben angeführten Erkenntnisse beziehen sich auf die einfach-acetoxylierten Vertreter 10J, 10K und 32A. Bei Verbindungen, welche zwei Acetoxygruppen tragen, werden die MS² und MS³ Spektren hauptsächlich von Fragmentationen dominiert, die durch den Verlust dieser beiden Substituenten generiert werden. In diesem Fall ist es schwierig festzustellen, welche anderen Substituenten (OH, CHO oder Ketogruppen) zusätzlich vorhanden sind.

Stellung der Acetoxygruppe

Durch die Analyse der Verbindungen 10J und 32A können Informationen darüber gewonnen werden, in welcher Form die Stellung der Acetoxygruppe den massenspektrometrischen Zerfall beeinflusst. 10J und 32A stellen Strukturisomere dar, die in Abbildung 3.8 gezeigt werden.

Der Vergleich der MS² Spektren dieser Verbindungen (Abbildung 3.9) ergibt vor allem Auffälligkeiten hinsichtlich der relativen Intensitäten der vorhandenen Peaks. Die Verbindung 32A, bei der sich die Acetoxygruppe an Position 16 befindet, liefert ein

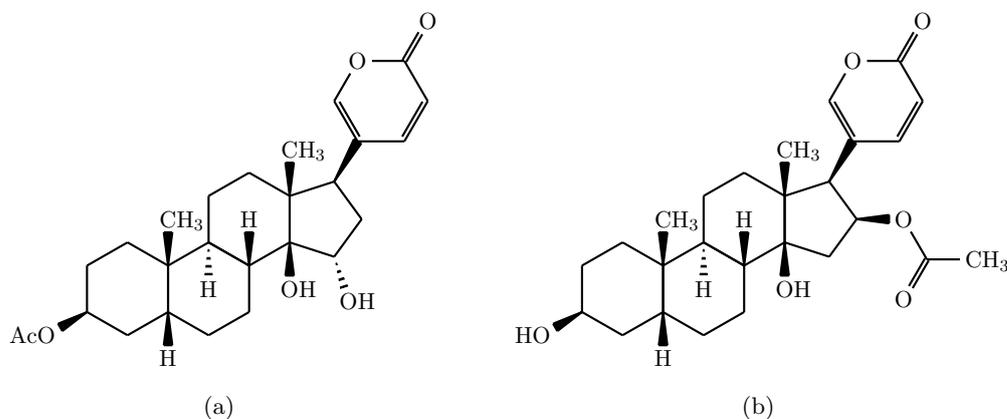


Abb. 3.8.: Strukturisomere 10J (a) und 32A (b)

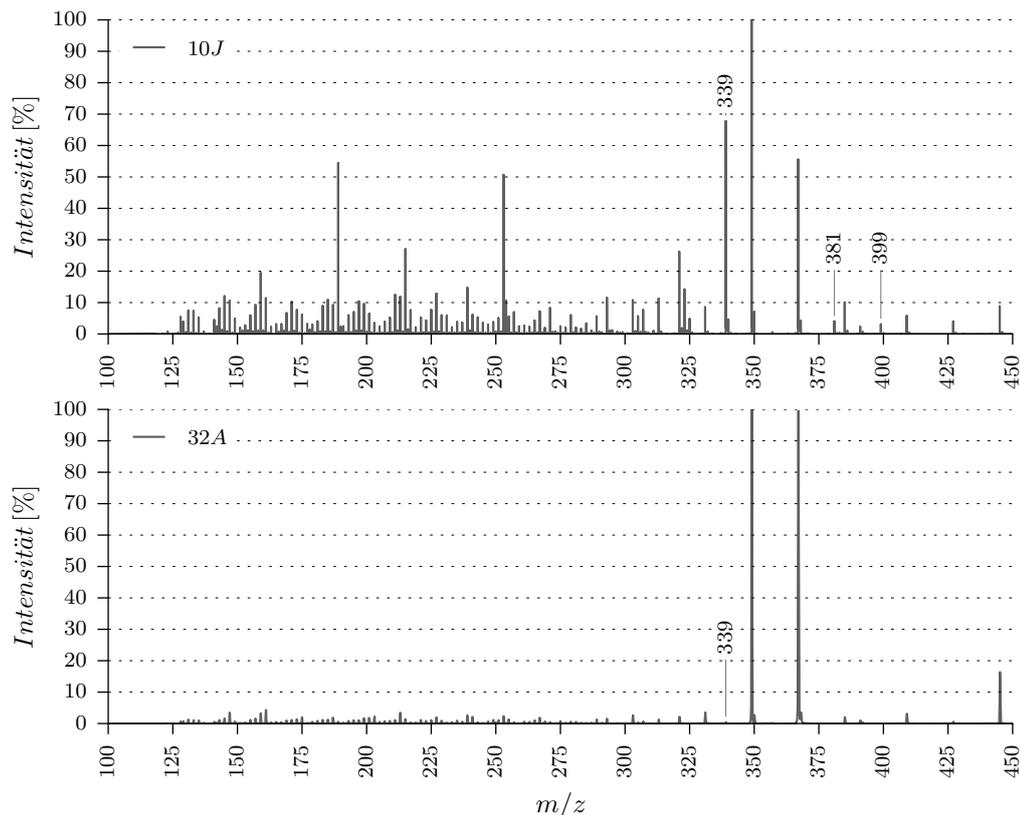


Abb. 3.9.: Intensitätsunterschiede zwischen den MS² Spektren von 10J und 32A

MS² Spektrum mit zwei bevorzugten Ionen bei m/z 367 ($[M-H_2O-HOAc+H]^+$) und m/z 349 ($[M-2H_2O-HOAc+H]^+$), wobei kaum andere Fragmentationen auftreten. Bei 10J treten diese beiden Ionen ebenfalls dominant auf, aber es gibt weitere zahlreiche und relativ stabile Fragmentionentypen. Beispielsweise erreicht das Fragmention $[M-H_2O-HOAc-CO+H]^+$ (m/z 339) diesbezüglich eine relative Intensität von 0,47 %, wohingegen bei 10J 68 % erreicht werden. Neben diesen starken Intensitätsunterschieden sind bestimmte Peaks bei 32A, im Gegensatz zu 10J gar nicht vorhanden (beispielsweise m/z 381, 399). Diese Diskrepanzen zwischen den beiden Verbindungen lassen darauf schließen, dass die Position der Acetoxygruppe merklichen Einfluss auf das Fragmentierungsverhalten besitzt.

Möglicherweise übt eine Acetoxygruppe an Position 16 stabilisierende Effekte aus, da durch die Abspaltung dieses Substituenten eine Doppelbindung von C-16 nach C-17 entstehen könnte, welche mit den Doppelbindungen im Pentadienolidring in Konjugation treten könnte. Dies würde erklären, weshalb ein Neutralverlust von 96 Da, der dem δ -Lactonring entspricht, nicht häufig auftritt oder ausschließlich mit einer geringen relativen Intensität.

Diese Stabilisierungseffekte treten anscheinend nicht auf, wenn die Position 15 hydroxyliert ist (siehe 10J) oder eine 14,15-ständige Epoxygruppe vorhanden ist. Auch die Verbindung 35B (siehe Anhang S. 181), die eine Epoxygruppe trägt und eine 16-ständige Hydroxyfunktion besitzt, weist im MS² Spektrum ebenfalls die zwei dominanten Ionen bei m/z 365 und m/z 347 auf. Im Vergleich zur Verbindung 32A treten hier jedoch weitere Fragmentationen intensiver in Erscheinung.

3.3. Gruppe III: Bufadienolidaglyka mit Hydroxy- und Ketogruppen

Verbindungen: 2c, Hel1, 10U, 5F, 16D, 6B

Innerhalb dieser Gruppe muss differenziert werden zwischen Verbindungen, welche die Ketofunktion an der Position drei am A-Ring tragen und zusätzlich nur an C-14 hydroxyliert sind (2c, Hel1, 10U, siehe Anhang S. 75 ff.) und jenen Substanzen, wo die Ketogruppe an Position elf oder zwölf am C-Ring substituiert ist und insgesamt drei Hydroxygruppen vorliegen (5F, 16D, 6B, siehe Anhang S. 76 ff.).

2c, Hel1, 10U

Bei der Untersuchung der MS² Spektren von Scillarenon (2c, siehe Anhang S. 112) und Bufalon (10U, siehe Anhang S. 114) wird ersichtlich, dass hier viele Übereinstimmungen mit Bufalin (10Q, siehe Anhang S. 93) aus Gruppe I vorliegen. Eine Unterscheidung aufgrund des Fragmentierungsverhaltens ist schwierig, da diese Verbindungen nahezu dieselben Fragmente bilden. Auch die relativen Intensitäten der MS² Spektren sind annähernd gleich. Es liegt also nahe, dass sich die Ketogruppe an Position 3 in etwa so verhält wie eine Hydroxygruppe.

Wichtiges Indiz für das Vorliegen einer Ketofunktion könnte das Fragmention $[M-H_2O-CO+H]^+$ sein und ebenso das Fehlen eines sogenannten Markerpeaks bei einem m/z-Wert von etwa 255, wie er in Gruppe I beschrieben wurde. Dieser Peak ist zwar vorhanden, jedoch bei weitem nicht so intensiv wie beispielsweise bei Vertretern der Gruppe I. Außerdem gibt es Tendenzen dahingehend, dass das Fragmention $[M-H_2O+H]^+$ mit einem steigenden Grad an Doppelbindungen vermehrt gebildet wird und somit dieses auch bei 2C und Hel1 den Basispeak erzeugt.

Das Vorliegen einer Doppelbindung im A-Ring von C-4 nach C-5, im Falle von Scillarenon (2c), scheint den massenspektrometrischen Zerfall nicht sonderlich zu beeinflussen, da das MS² Spektrum jenem von Bufalon (10U) stark ähnelt. Lediglich die Basispeaks weichen voneinander ab, da bei Bufalon (10U) das Fragmention $[M-2H_2O+H]^+$ die größte Häufigkeit besitzt und bei Scillarenon hingegen $[M-H_2O+H]^+$.

Eine weitere Doppelbindung im A-Ring von C-1 nach C-2, wie beispielsweise bei Helleborogenon (Hel1, siehe Anhang S. 76) scheint die relativen Intensitäten zu beeinflussen. Somit treten im MS² Spektrum von Helleborogenon vor allem im unteren m/z-Bereich ab 250 äußerst markante Peaks auf, welche bei Bufalon (10U) und Scillarenon (2c) nicht vorzufinden sind. Womöglich laufen bei einem erniedrigten Sättigungsgrad im A-Ring leichter Retro-Diels-Alder-Reaktionen oder Umlagerungsreaktionen ab, wodurch die Bildung von Fragmenten aus dem Kohlenstoffgrundkörper verstärkt wird. Neben diesen Intensitätsunterschieden findet sich bei Helleborogenon auch ein $[M-CO+H]^+$ -Ion, das weder bei Scillarenon (2c) noch bei Bufalon (10U) zu finden ist. Ansonsten ist das Fragmentierungsverhalten dieser drei Verbindungen (2c, 10U, Hel1) jedoch sehr ähnlich. Durch den Vergleich der MS² Spektren von Scillarenon (2c) und Helleborogenon (Hel1) werden diese Intensitätsunterschiede im unteren m/z-Bereich in Abbildung 3.10 ersichtlich.

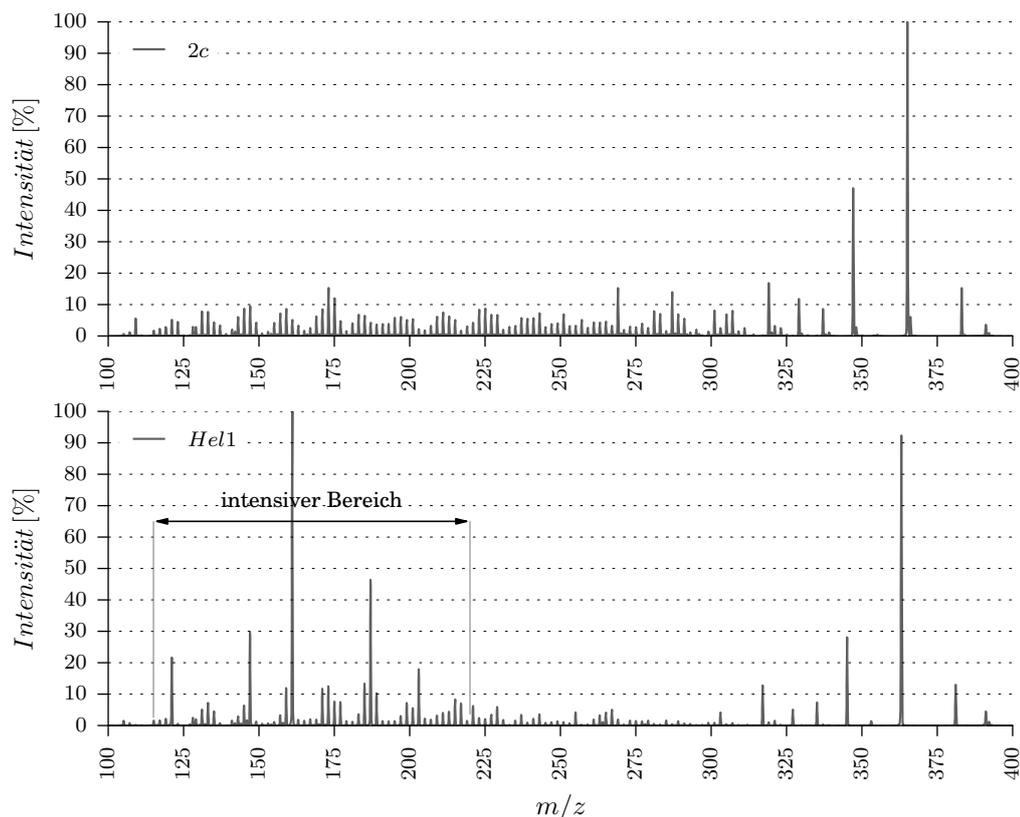


Abb. 3.10.: Intensitätsunterschiede beim Vergleich der MS² Spektren von Scillarenon (2c) und Helleborogenon (Hel1)

5F, 16D, 6B

Aufgrund der Untersuchung der Verbindungen 5F (siehe Anhang S. 115) und 16D (siehe Anhang S. 116) kann festgestellt werden, dass auch in diesem Fall Stellungs-isomere anhand der Massenspektren nicht voneinander unterscheidbar sind. Diese Massenspektren liefern, bis auf geringe Abweichungen in den relativen Intensitäten keine brauchbaren Unterscheidungsmerkmale.

Eine zusätzliche Doppelbindung im C-Ring von C-9 nach C-11, wie bei der Verbindung 6B (siehe Anhang S. 77), verändert das Bild des MS² Spektrums geringfügig. Neben der Verminderung der Molekülmasse durch die Einführung der Doppelbindung können Intensitätsunterschiede bei bestimmten Peaks als wichtige Kriterien genannt werden. So tritt das Fragmentation $[M-H_2O-CO+H]^+$ bei 5F (siehe Anhang S. 115) mit einer relativen Intensität von 27,13 % auf, bei 6B (siehe Anhang S. 117) hingegen nur mit 0,81 %. Womöglich wird durch die enolische Struktur im C-Ring eine Stabilisierung der C-12-ständigen Ketogruppe hervorgerufen. Ansonsten differieren die Fragmentationen, welche durch reine Wasserabspaltungen gebildet werden, hinsichtlich ihrer Häufigkeit. Der Basispeak ist bei 5F und 6B ident ($[M-H_2O+H]^+$), die zweite und dritte Wasserabspaltung ist bei 6B hingegen doppelt so intensiv wie bei 5F. Ähnliche Differenzen liegen beim Peak $[M-2H_2O-CO+H]^+$ vor.

Um den Einfluss der Ketofunktion am C-Ring zu untersuchen und wichtige Kriterien für Verbindungen mit Ketogruppen zu finden, bietet sich eine Gegenüberstellung von Dihydroxybufalin (15d, siehe Anhang S. 97) und Arenobufagin (5F, siehe Anhang

S. 115) an, da sich diese Verbindungen nur durch die Oxidationsstufe an Position 12 unterscheiden und die Stellung der Substituenten ident ist. Folgende Merkmale konnten bei dieser Analyse eruiert werden:

1. Wie bereits erwähnt, gibt es eine Tendenz dahingehend, dass bei Verbindungen mit Keto- und Hydroxysubstituenten der Basispeak vom Fragmention $[M-H_2O+H]^+$ stammt, oder dieses Ion zumindest eine relative Intensität von 90 % erreicht (Hel1). Dies kann bei allen Verbindungen innerhalb Gruppe III beobachtet werden; lediglich Bufalon (10U) erfüllt dieses Kriterium nicht.
2. Der vollständig dehydratisierte 10,13-Dimethylsterangrundkörper, der ein Signal bei einem m/z-Wert von etwa 255 erzeugt, ist bei den Vertretern der Gruppe III zwar vorhanden, jedoch erreicht dieser Peak nicht jene relative Intensität wie bei Verbindungen, die ausschließlich Hydroxygruppen tragen.
3. Ein weiteres Merkmal, das für diese Gruppe III von Bedeutung ist, ist die Bildung des Fragmentions $[M-H_2O-CO+H]^+$. Dieses Zerfallsprodukt kann bei allen Verbindungen, die dieser Gruppe zugeordnet wurden, nachgewiesen werden. In Gruppe I kommt dieses Ion hingegen nur bei jenen Verbindungen vor, die zweifach hydroxyliert sind, jedoch nicht bei Gamabufotalin (2M) und Dihydroxybufalin (15d).
4. Der Fragmentierungspfad von Arenobufagin (Abbildung 3.12, S. 46) verdeutlicht, dass kombinierte Abspaltungen des Lactonringes und der Wassermoleküle (z.B.: $[M-2H_2O-96+H]^+$) in Gruppe III nicht so typisch sind, wie bei ausschließlich OH-substituierten Vertretern. Dies trifft vor allem auf die Verbindungen 5F, 16D und 6B zu. 2c, Hel1 und 10U verhalten sich diesbezüglich eher wie Verbindungen aus Gruppe I.
5. Bei Dihydroxybufalin (15d) erreichen die Ionen der dritten, vierten und fünften Wasserabspaltung höhere relative Intensitäten als bei Arenobufagin (5F), wohingegen die Peaks $[M-2H_2O-2CO+H]^+$ bzw. $[M-3H_2O-2CO+H]^+$ bei Arenobufagin stärker herausstechen. Generell kann bei der Betrachtung der MS² Spektren festgehalten werden, dass bei Dihydroxybufalin, besonders im unteren m/z-Bereich die Wasserverluste als auch die kombinierten Abspaltungen des Lactonringes und der Wassermoleküle dominieren und bei Arenobufagin eher die kombinierten Wasser- und CO-Verluste intensiver auftreten.

Einige dieser soeben dargelegten Merkmale sind in Abbildung 3.11, die das MS² Spektrums von Arenobufagin (5F) zeigt, dargestellt.

3.4. Gruppe IV: Bufadienolidaglyka mit einer Epoxygruppe und anderen Substituenten

Verbindungen: 7B, 12B, 48J, 19A, 35B

Um herauszufinden, ob das Vorliegen einer 14,15-ständigen Epoxygruppe das Verhalten von Verbindungen bei einer massenspektrometrischen Analyse stark verändert, werden zunächst gezielt Vergleiche mit Strukturen durchgeführt, die an den jeweiligen Positionen hydroxyliert sind.

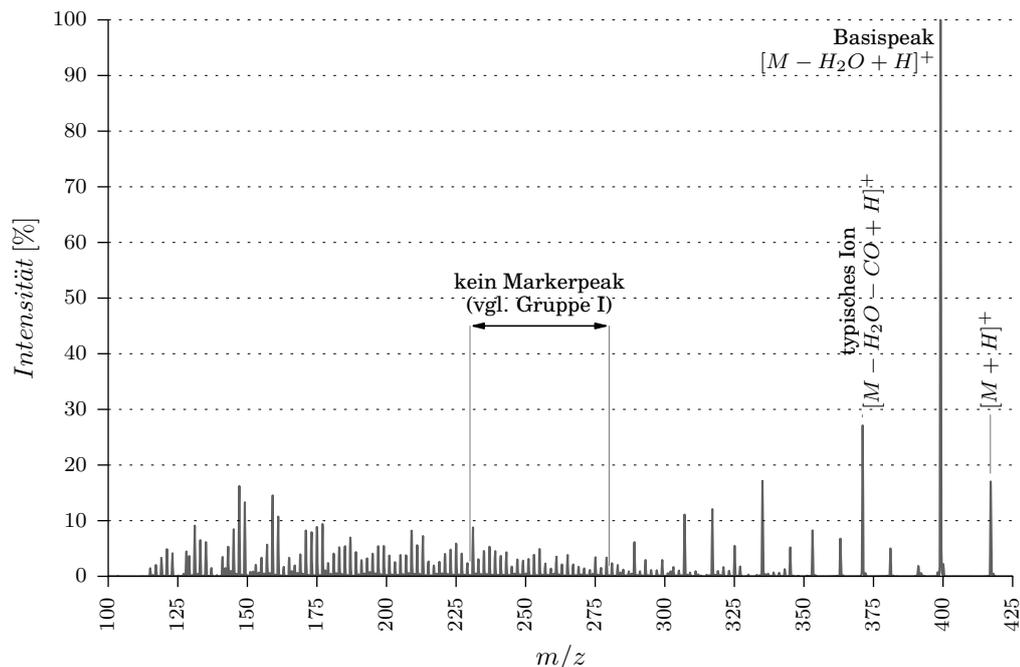


Abb. 3.11.: MS² Spektrum der Verbindung Arenobufagin (5F)

Eine Gegenüberstellung des Bufalinderivates 12B (siehe Anhang S. 118), das am D-Ring diese Epoxygruppe trägt, mit dem hydroxylierten Analogon Bufalin (10Q, siehe Anhang S. 93) zeigt hauptsächlich Differenzen in den relativen Intensitäten der beiden MS² Spektren. Die gebildeten Fragmentationen sind nahezu identisch, außer beispielsweise $[M-H_2O-2CO+H]^+$, das bei 10Q fast nicht ersichtlich ist. Ansonsten differieren die Basispeaks der beiden Verbindungen. Bei 10Q erreicht die zweite Wasserabspaltung die höchste relative Intensität, wohingegen 12B einen unbekanntem Peak bei einem m/z -Wert von 159 als Basispeak aufweist. Für 12B ist generell eine starke Ausprägung der Peaks im unteren m/z -Bereich charakteristisch.

Die zweite und dritte Wasserabspaltung tritt bei 10Q weitaus intensiver in Erscheinung; beispielsweise erzielt das Fragmentation $[M-3H_2O+H]^+$ im Fall von Bufalin (10Q) eine relative Intensität von 32 %, bei der zu vergleichenden Substanz 12B hingegen nur 4 %. Auch die darauffolgenden Peaks variieren diesbezüglich. Somit ist die vierte Wasserabspaltung beim Epoxyderivat fast nicht ersichtlich, wohingegen der zugehörige Peak bei 10Q aus den anderen hervorsticht. Das Fragmentation $[M-2H_2O-CO+H]^+$ tritt beim Bufalin (10Q) doppelt so häufig auf wie bei 12B. Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal ist wiederum der Markerpeak bei einem m/z -Wert von ca. 255, der bei Bufalin stark ausgeprägt ist und vergleichsweise schwach bei 12B auftritt.

Auch bei einer Analyse der MS² Spektren der Verbindungen Marinobufagin (48J, siehe Anhang S. 119) und dem entsprechenden hydroxylierten Vertreter aus Gruppe I Telocinobufagin (60K, siehe Anhang S. 99) konnten geringfügige Unterschiede herausgearbeitet werden. Auffällig ist, dass Marinobufagin nicht über derart intensive Peaks im unteren m/z -Bereich verfügt, wie beispielsweise 12B. Dementsprechend kann dieses Merkmal nicht generell als Hinweis für eine Epoxygruppe angesehen werden. Bei diesen Verbindungen gibt es ebenfalls Abweichungen hinsichtlich der relativen Intensitäten der Wasserverluste. Bei Telocinobufagin (60K) stammt der Basispeak vom Fragmentation $[M-3H_2O+H]^+$, bei Marinobufagin (48J) vom Fragmenten-

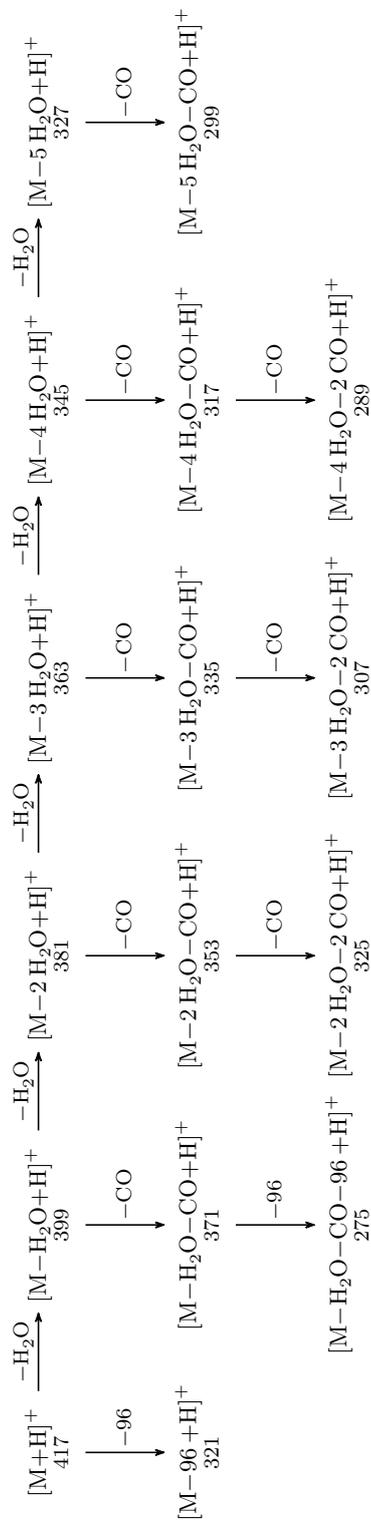


Abb. 3.12.: Fragmentierungspfad des $[M+H]^+$ -Ions der Verbindung Arenobufagin (5F)

tion $[M-2H_2O+H]^+$. Womöglich wird die Epoxygruppe nicht im selben Ausmaß als H_2O -Molekül eliminiert wie beispielsweise eine Hydroxygruppe. Weitere Unterschiede betreffen das Fragmentation $[M-H_2O-CO+H]^+$, das nicht nur typisch für Verbindungen der Gruppe III ist, sondern auch bei Marinobufagin (48J) und 12B vorkommt. Im MS^2 Spektrum von Telocinobufagin (60K) kann dieses Ion zwar auch identifiziert werden, jedoch nur mit einer relativen Intensität von 0,80 %. Auffällig ist, dass Marinobufagin das Zerfallsprodukt $[M-2H_2O-C_2H_2+H]^+$ (m/z 339) bildet, das bei Telocinobufagin nicht vorhanden ist. Bis auf geringfügige Unterschiede in den relativen Intensitäten zeigen die Massenspektren dieser beiden Verbindungen ansonsten ein ähnliches Bild.

Um festzustellen, ob es Parallelen zwischen Bufadienoliden mit Epoxygruppen und solchen mit Ketofunktionen gibt, werden die MS^2 Spektren von Bufalon (10U, siehe Anhang S. 114) und 12B herangezogen. Die Verbindungen weisen dasselbe Fragmentierungsmuster auf und durch das übereinstimmende Molekulargewicht treten die entsprechenden Peaks auch bei gleichen m/z -Werten auf. Diesbezüglich sind die Spektren eigentlich nur durch die verschiedenen relativen Intensitäten unterscheidbar, wobei beim Bufalinderivat 12B eben der sehr signifikante untere m/z -Bereich hervorsticht. Starke Differenzen ergeben sich wieder im Bereich der Wasserverluste, wobei die zweite und dritte Wasserabspaltung beim Bufalon (10U) weitaus intensiver auftreten, als bei 12B. Auch die weiteren Peaks mit m/z -Werten von 331, 321 und 313 erzielen bei der Verbindung Bufalon (10U) signifikant höhere relative Intensitäten.

Die Analyse dieser Spektren zeigt, dass Unterscheidungen vor allem aufgrund der abweichenden Intensitätsverhältnisse möglich sind, jedoch kein eindeutiges Regelwerk erstellbar ist, das es erlaubt, Bufadienolidaglyka mit einer 14,15-ständigen Epoxygruppe zu identifizieren.

3.5. Gruppe V: Bufadienolidaglyka mit Hydroxy- und Formylgruppen

Verbindungen: 2C, Hel4

Die Gruppenzugehörigkeit der beiden Verbindungen Bovogenin A (2C, siehe Anhang S. 122) und Hellebrigenin (Hel4, siehe Anhang S. 123) spiegelt sich in den vorliegenden Fragmentierungsmustern (siehe Abbildungen 3.13 und 3.14) wider. Besonders ab einem m/z -Wert von 365 sind hier Analogien ersichtlich.

Um ein Indiz für das Vorliegen einer Formylgruppe an Position 10 zu finden, müssen wieder Vergleiche mit Vertretern aus Gruppe I und Gruppe III durchgeführt werden, die aufgrund der Substituentenzahl 2C bzw. Hel4 entsprechen.

Bei diesen Untersuchungen werden wiederum einige Charakteristika definiert, welche die Afoxidation des C-19 zur Formylgruppe andeuten können:

1. Generell weist diese Gruppe Merkmale auf, welche teilweise bereits in Gruppe I als auch in Gruppe III beobachtet wurden. Charakteristisch sind sehr dominante serielle Wasserabspaltungen, wobei jene im oberen m/z -Bereich, welche theoretisch von den Hydroxysubstituenten des Grundkörpers stammen könnten, die höchsten relativen Intensitäten erreichen.

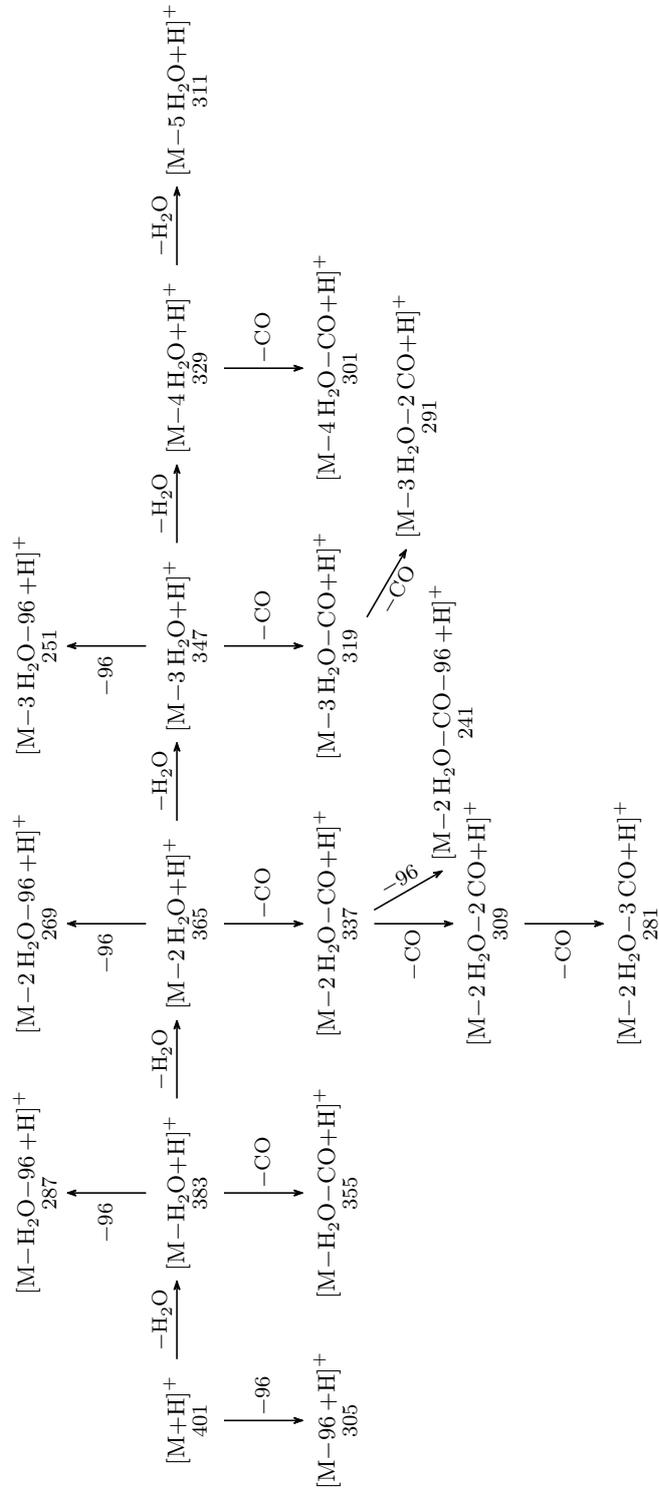


Abb. 3.13.: Fragmentierungsmuster des $[M+H]^+$ -Ions der Verbindung Bovogenin A (2C)

2. Ein wichtiges Kriterium scheint jener Peak bei einem m/z -Wert von 337 bzw. 335 zu sein. Bei Hellebrigenin (Hel4) handelt es sich hierbei um den Basispeak und bei Bovogenin A (2C) erreicht dieser Peak zumindest eine relative Intensität von über 90 %. Es handelt sich bei dem zugehörigen Fragmention im Prinzip um den von Substituenten befreiten Bufadienolidgrundkörper, wobei die Hydroxygruppen in Form von H_2O eliminiert wurden und die C-10-ständige Formylgruppe als CO.
3. Eine weitere Gemeinsamkeit innerhalb dieser Gruppe ist das Fragmention $[M-H_2O-CO+H]^+$, das sowohl bei Bovogenin A (2C) als auch Hellebrigenin (Hel4) detektiert wird. Dieses Ion könnte ein Indiz für eine vorhandene Oxo-Gruppe sein, da es auch bei Keto-substituierten Bufadienoliden auftritt.
4. Hellebrigenin (Hel4) als auch Bovogenin A (2C) ist gemeinsam, dass jener Peak mit dem geringsten m/z -Wert (ca. 240), der sich von den darunterliegenden Signalen noch deutlich abhebt, jenem Fragmention zuzuordnen ist, das entsteht, wenn alle vorhandenen Hydroxygruppen in Form von Wasser eliminiert werden, der Lactonring entfernt wird, und die Formylgruppe als CO abgespalten wird. Es handelt sich also um den mehrfach ungesättigten einfach methylierten Sterankörper ($[M-3H_2O-CO-96+H]^+$ bei Hel4). Dieser Peak fungiert als Markerpeak, da er in Gruppe I und III nicht vorkommt.
5. Ansonsten treten auch in dieser Gruppe serielle Wasser- und CO-Verluste auf, welche meist höhere relative Intensitäten als in Gruppe III erreichen. Auch die kombinierten Abspaltungen des Lactonringes und der Wassermoleküle sind ausgeprägter als bei Bufadienoliden mit Keto- und Hydroxysubstituenten.

Die Gegenüberstellung der MS^2 Spektren von Gamabufotalin (2M) und Bovogenin A (2C) in Abbildung 3.15 zeigt einige dieser Charakteristika auf.

Bei beiden Verbindungen tritt das Fragmention $[M-3H_2O+H]^+$ am häufigsten auf und bildet somit den Basispeak. Die erste und zweite Wasserabspaltung erzielt jedoch bei der Substanz Bovogenin A (2C) mit 31 % und 97 % eine höhere relative Intensität verglichen mit Gamabufotalin (2M), wo 19 % und 51 % gemessen werden. Auch der nachfolgende Peak $[M-2H_2O-CO+H]^+$, der vermutlich ein wichtiges Anzeichen für den Formylrest an Position 10 darstellt, tritt bei Bovogenin A (2C) mit einer relativen Intensität von 95 % sehr markant auf. Bei Gamabufotalin (2M) ist dieser Peak mit 19 % eher unscheinbar. Weitere Intensitätsunterschiede ergeben sich bei den Zerfallsprodukten $[M-3H_2O-CO+H]^+$, $[M-2H_2O-2CO+H]^+$ als auch $[M-3H_2O-2CO+H]^+$, welche bei Bovogenin A (2C) häufiger auftreten. Dies lässt vermuten, dass durch die vorhandene Formylgruppe kombinierte Wasser- und CO-Verluste leichter erfolgen als bei den rein hydroxylierten Substanzen. Ebenfalls zu beachten ist, dass bei Bovogenin A kein Markerpeak bei einem m/z -Wert von etwa 255 vorliegt. Stattdessen ist das Fragmention $[M-2H_2O-CO-96+H]^+$ und der entsprechende Peak bei einem m/z -Wert von 241 ein wichtiges Merkmal zur Unterscheidung der vorliegenden Spektren. Bovogenin A (2C) bildet auch das Ion $[M-H_2O-CO+H]^+$, das bei Gamabufotalin nicht vorkommt.

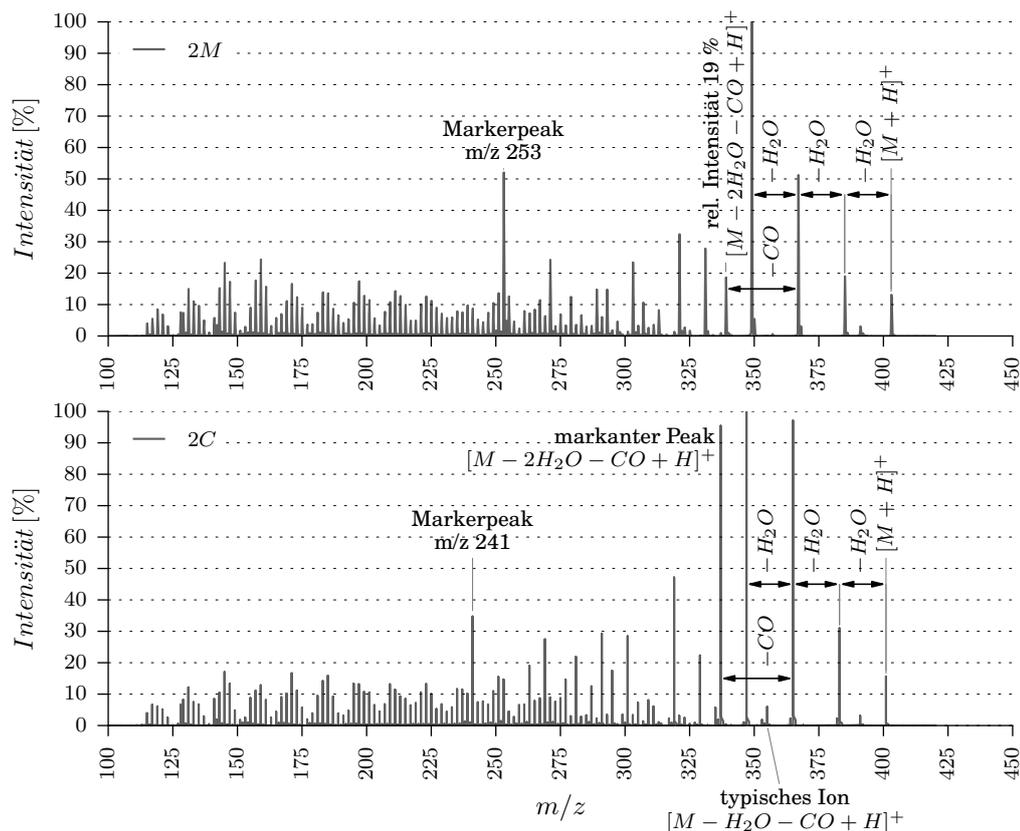


Abb. 3.15.: MS² Spektren der Verbindungen Gamabufotalin (2M) und Bovogenin A (2C)

3.6. Gruppe VI: Bufadienolidaglyka mit Hydroxy-, Formyl- und Acetoxygruppen

Verbindungen: Hel2, 2G

Auch hier kann festgestellt werden, dass sich die Verbindungen Hellebrigeninacetat (Hel2, siehe Anhang S. 124) und 3-Acetoxybovogenin (2G, siehe Anhang S. 125) nach der Elimination der Acetoxygruppe nahezu ident verhalten wie die entsprechenden nichtacetylierten Vertreter aus Gruppe V (2C und Hel4). Diese Übereinstimmungen können auch anhand der Fragmentierungspfade von Bovogeninacetat (siehe Abbildung 3.16) und Bovogenin A (siehe Abbildung 3.13 auf S. 48) nachvollzogen werden. In diesem Fall ist ein derartiger Vergleich auch optimal, da sich diese beiden Verbindungen (2G und 2C) ausschließlich durch die Acetylgruppe unterscheiden und die Substituenten an denselben Positionen auftreten.

Die Interpretation der MS² Spektren von Hellebrigeninacetat (Hel2) und 3-Acetoxybovogenin (2G) zeigt ebenfalls einen typischen Neutralverlust von 60 Da, der durch die Abspaltung der Acetoxygruppe als Essigsäuremolekül hervorgeht. Auffällig ist, dass der zugehörige Peak bei Hellebrigeninacetat (Hel2) mit einer relativen Intensität von 1 % sehr schwach ausgeprägt ist und bei 2G hingegen sogar den Basispeak darstellt. Dies könnte durch die unterschiedliche Zahl der Hydroxygruppen bedingt sein. Im Gegensatz zu Hellebrigeninacetat (Hel2) tritt bei 3-Acetoxybovogenin (2G) auch das Fragmentation $[M - CH_2CO + H]^+$ auf.

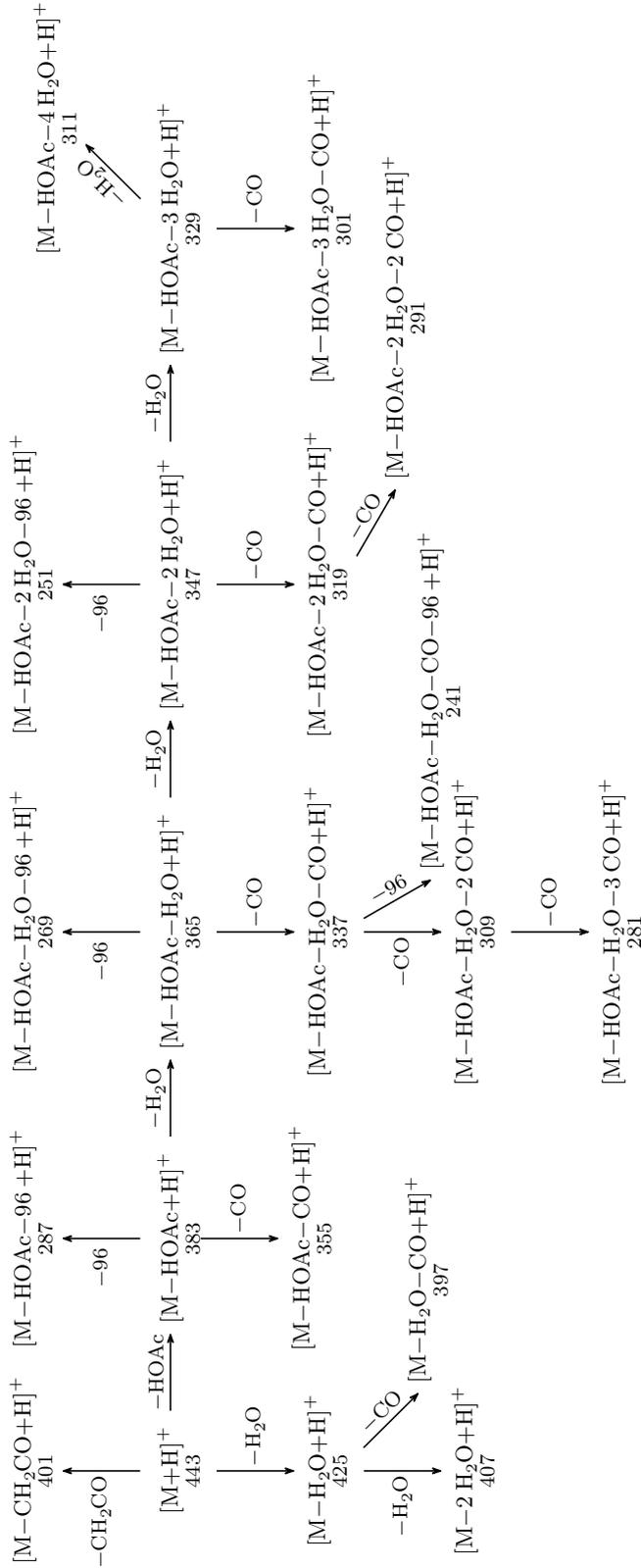


Abb. 3.16.: Fragmentierungsprofil des $[M+H]^+$ -Ions der Verbindung Bovogeminacetat (2G)

Ein wichtiges Kriterium für die Unterscheidung von Bufadienolidaglyka mit Hydroxy- und Acetoxy substituenten (Gruppe II) ist vermutlich der sogenannte Markerpeak bei einem m/z -Wert von etwa 240, der bereits in Gruppe V beschrieben wurde und auch bei den einfach acetylierten 19-Oxo-Bufadienolid-Derivaten klar sichtbar ist.

3.7. Gruppe VII: Bufadienolidaglyka mit Hydroxy-, Keto- und Acetoxygruppen

Verbindungen: 7E, 10I, 5D, 16G, 15c

Dieser Gruppe wurden Verbindungen zugeteilt, welche außer Hydroxygruppen auch noch Keto- und Acetoxygruppen tragen. Diesbezüglich ist das Ziel, durch die Analyse der Massenspektren vor allem Merkmale zu finden, welche das Vorliegen der Ketogruppe andeuten, da die Acetoxygruppe ohnehin relativ eindeutige Fragmente liefert. Dazu werden die Verbindungen Bufotalon (7E, siehe Anhang S. 126 als auch Bufotalin (32A, siehe Anhang S. 106) herangezogen, da sie große strukturelle Ähnlichkeiten aufweisen und sich nur durch die Oxidationsstufe an Position 3 voneinander unterscheiden.

Bei der Betrachtung der MS^2 Spektren dieser beiden Verbindungen wird ersichtlich, dass relativ zu den zwei markanten Ionen $[M-H_2O-HOAc+H]^+$ und $[M-2H_2O-HOAc+H]^+$ die weiteren Fragmentationen mit stark verringerter Intensität auftreten. Ein Großteil der vorhandenen Signale weist im MS^2 Spektrum eine relative Intensität von unter 5 % auf und entspricht somit nicht der Norm. Wie bereits in Gruppe II (siehe Abschnitt 3.2) erläutert, könnte dies auf die an Position 16 substituierte Acetoxygruppe zurückzuführen sein, da solche Intensitätsverminderungen auch bei 21E (siehe Anhang S. 107) und 27F (siehe Anhang S. 169) auftreten.

Ansonsten ergeben sich bei der Gegenüberstellung der MS^2 Spektren von 7E und 32A noch einige Unterschiede, die jedoch die Differenzierung zwischen Keto- und Hydroxysubstituenten nicht eindeutig zulassen. Bufotalon (7E) und Bufotalin (32A) differieren natürlich aufgrund der unterschiedlichen Oxidationsstufe an Position 3 hinsichtlich ihrer Molekülmassen. Der Basispeak wird bei beiden Verbindungen durch das Fragmentation $[M-H_2O-HOAc+H]^+$ generiert. Bei Bufotalon (7E) kann jedoch das Fragmentation $[M-2H_2O+H]^+$ gar nicht nachgewiesen werden. Ansonsten besteht nur noch ein merklicher Intensitätsunterschied beim Peak $[M-2H_2O-HOAc+H]^+$, der bei Bufotalin (32A) den zweiten markanten Peak darstellt und bei Bufotalon (7E) eine relative Intensität von lediglich 23 % erreicht. Aufgrund dieser Intensitätsunterschiede besteht die Annahme, dass die Hydroxyfunktion an C-3 eher als H_2O -Molekül eliminiert wird, als eine Ketogruppe an dieser Position. Dadurch könnten die unterschiedlichen Häufigkeiten dieser Fragmentationen erklärt werden. Außerdem ist zu erwähnen, dass im MS^3 Spektrum von Bufotalon (7E, siehe Anhang S. 126) das Fragmentation $[M-H_2O-HOAc-CO+H]^+$ (m/z 337) mit einer relativen Intensität von 3 % auftritt und der äquivalente Peak im MS^3 Spektrum von 32A mit 0,22 % fast nicht identifizierbar ist. Dieses Fragmentation könnte ein zusätzlicher Hinweis für das Vorliegen einer Ketofunktion sein.

Stellung der Ketogruppe

Bei einer Gegenüberstellung der MS² Spektren der Verbindungen 10J (siehe Anhang S. 105) und 10I (siehe Anhang S. 128), können ebenso signifikante Unterschiede in den relativen Intensitäten ermittelt werden, die vermutlich auf die Stellung der Substituenten zurückzuführen sind.

Die Verbindungen 10J und 10I weichen durch die Oxidationsstufe an Position 15 voneinander ab, wobei 10J an dieser Stelle hydroxyliert ist und 10I eine Ketogruppe trägt. Die Analyse des MS² Spektrums ergibt in diesem Fall einen einzigen eindeutigen Peak, was in Abbildung 3.17 veranschaulicht ist. Die weiteren Fragmentationen sind in Relation dazu fast nicht vorhanden. Da bei 10I die Acetoxygruppe jedoch nicht an Position 16 substituiert ist und eine derartige Verminderung der Intensitäten auch nicht auftritt, wenn eine zweite Acetoxygruppe am C-11 oder C-12 substituiert ist, besteht die Annahme, dass dies auf die C-15-ständige Ketofunktion zurückzuführen ist. Diese dürfte einen hohen stabilisierenden Effekt ausüben, da außer dem Verlust der Acetoxygruppe nahezu keine anderen Fragmente bei 10I auftreten. Ist die Ketogruppe beispielsweise am A-Ring (vgl. 2c im Anhang S. 112) oder am C-Ring (vgl. 5F im Anhang S. 115) vorhanden, so treten im MS² Spektrum andere Fragmentationen im Vergleich zum Basispeak mit höheren relativen Intensitäten auf.

Die Stellung der Hydroxygruppen scheint das Intensitätsmuster nicht dermaßen zu beeinflussen, zumindest wenn diese am C-3, C-5 oder C-14 substituiert sind. Bei C-15 ständigen Hydroxygruppen, gibt es einen Hinweis, dass diese womöglich zwei

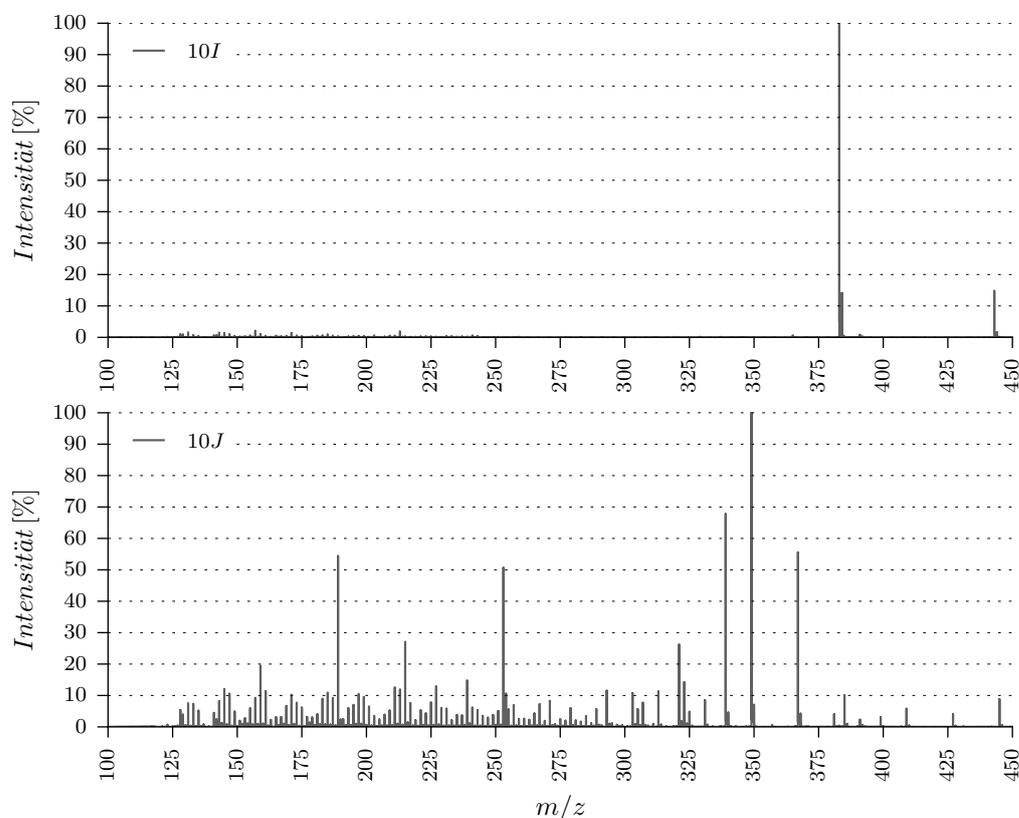


Abb. 3.17.: MS² Spektren der Verbindungen 10I und 10J

signifikante Peaks im unteren m/z -Bereich verursachen (vgl. dazu 10J im Anhang S. 105).

Erstellt man einen Fragmentierungspfad für die Verbindung 10I – unter Einbeziehung jener Fragmentionen, die im MS^3 Spektrum aufscheinen – und vergleicht diesen mit dem Pfad der Verbindung 10J (siehe Abbildung 3.7), so kann festgestellt werden, dass bei 10I die ersten beiden Wasserabspaltungen und auch die nachfolgenden CO-Verluste nicht vorhanden sind. Ansonsten bilden die beiden Strukturen ab einem m/z -Wert von 385 jedoch dieselben Zerfallsprodukte, unabhängig davon ob an Position 15 eine Ketogruppe oder Hydroxyfunktion vorliegt.

Verbindungen mit zwei Acetoxygruppen, Ketogruppe und Hydroxygruppen (5D, 15c, 16G)

Ausschlaggebend für zweifach acetoxylierte Verbindungen ist sicherlich das Molekulargewicht, da dieses durch jede Acetylierung einer OH-Gruppe um 42 Da zunimmt. Dementsprechend treten auch in den Massenspektren spezifische Verluste von 42 Da auf. Das entsprechende Fragmentation $[M-CH_2CO+H]^+$ ist zwar auch teilweise bei einfach acetoxylierten Verbindungen vorhanden, jedoch meist mit einer geringeren Häufigkeit. Ein weiterer signifikanter Verlust beträgt 102 Da und steht für das Zerfallsprodukt $[M-HOAc-CH_2CO+H]^+$, das bei der Verbindung 5D (siehe Abbildung 3.18 und Anhang S. 130) sogar den Basispeak bildet. Der Abgang der beiden Acetoxygruppen wird durch den typischen Massenverlust von 120 Da definiert. Diese Peaks und Fragmente sprechen zumindest eindeutig für das Vorliegen zweier Acetoxygruppen und sollen anhand des MS^2 Spektrums der Verbindung 5D (siehe Abbildung 3.18) veranschaulicht werden.

Typisch für diese Art von Verbindung könnte auch jener Peak bei einem m/z -Wert

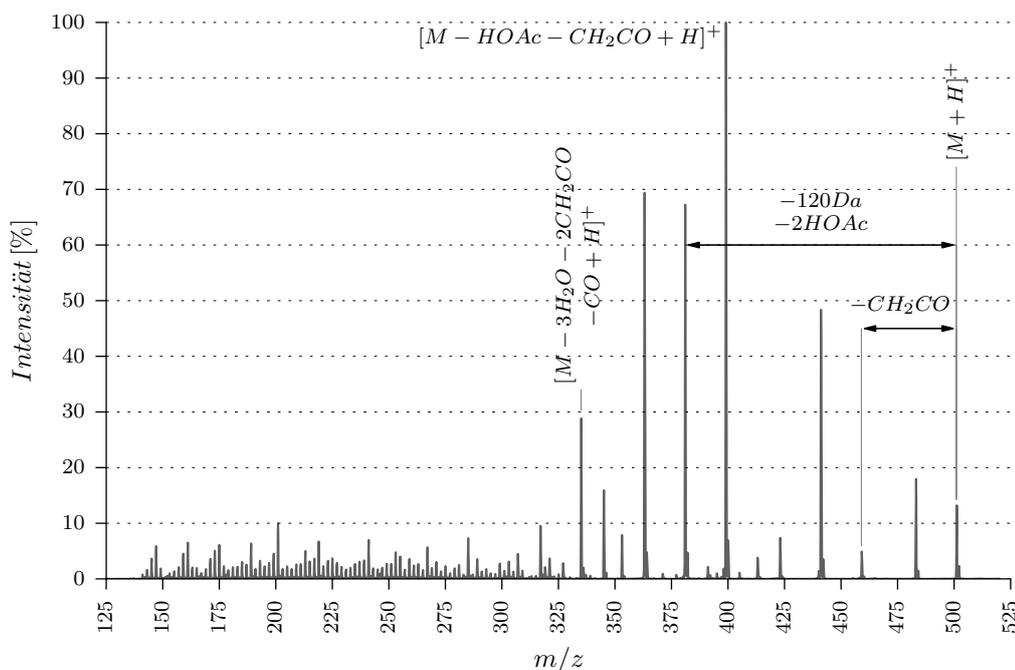


Abb. 3.18.: MS^2 Spektrum der Verbindung 5D

von 335 sein, der vom Fragmention $[M-3H_2O-2CH_2CO-CO+H]^+$ stammt und den letzten signifikanten Peak darstellt, bevor der Bufadienolidgrundkörper im unteren m/z -Bereich fragmentiert.

Bezüglich der Stellung der Acetoxygruppen kann festgehalten werden, dass eine Substitution an Position 3, 11 oder 12 anscheinend nicht zu Stabilisierungseffekten führen. Dennoch hat die Konfiguration der Acetoxygruppe an Position 12 einen starken Einfluss auf die relativen Intensitäten unterschiedlicher Fragmentationen. Dies wird durch den Vergleich der MS^2 Spektren der beiden epimeren Verbindungen 16G (12 α) und 15c (12 β) deutlich (siehe Anhang S. 131 bzw. S. 133). Bei der Verbindung 16G sind beispielsweise die Fragmentationen $[M-CH_2CO+H]^+$ und $[M-HOAc+H]^+$ stark bevorzugt, wobei diese bei der epimeren Verbindung 15c mit einer viel geringeren relativen Intensität auftreten.

Im MS^3 Spektrum der Verbindungen 15c (siehe Anhang S. 133) und 16G (siehe Anhang S. 131) können außerdem drei markante Peaks bei einem m/z -Wert von 241, 189 und 175 ausfindig gemacht werden. Anscheinend erfolgt hier der Zerfall des 10,13-Dimethyl-11-oxo-Sterangrundkörpers.

3.8. Gruppe VIII: Bufadienolidglykoside

Verbindungen: 2P, Hel3

Im gesamten Datensatz sind nur zwei Bufadienolidglykoside vorhanden, nämlich Gamabufotalinrhamnosid (2P, siehe Anhang S. 100) als auch Hellebrin (Hel3, siehe Anhang S. 102).

Die Fragmentierung hängt grundsätzlich vom vorliegenden Ionentyp ab. Im Falle von Gamabufotalinrhamnosid (2P) wird im Zuge der Ionisation ein protoniertes Molekül ($[M+H]^+$) gebildet. Die Ladung befindet sich dabei direkt am Aglykon, vermutlich an der gut protonierbaren Carbonylgruppe der Lacton-Teilstruktur. Im MS^2 Spektrum kann der Verlust der Zuckerkomponente nachvollzogen werden. Hier gibt es zwei unterschiedliche Möglichkeiten, je nachdem, ob die glykosidische Bindung zum Bufadienolidgrundkörper gespalten wird, oder zum Zuckerrest. Wird bei diesem Vorgang die glykosidische Bindung so gespalten, dass Gamabufotalin daraus hervorgeht, so kommt es zu einem Neutralverlust von 146 Da, was einer dehydroxylierten und dehydrierten Rhamnose entspricht. Das entsprechende Fragmention $[M-146+H]^+$ tritt im MS^2 Spektrum von 2P bei einem m/z Wert von 403 auf. Das MS^3 Spektrum des Ions $[M-146+H]^+$ ist ident mit dem MS^2 Spektrum vom protonierten Molekül ($[M+H]^+$) von Gamabufotalin (2M).

Hellebrin (Hel3) setzt sich zusammen aus dem Aglykon Hellebrigenin (Hel4, siehe Anhang S. 79) und einer Zuckerkomponente, welche über eine glykosidische Bindung an Position 3 gebunden ist. Dieses Disaccharid besteht aus D-Glucose und L-Rhamnose.

Bei der Untersuchung des MS^1 Spektrums von Hellebrin, konnte festgestellt werden, dass hier ein anderer Ionentyp vorherrscht, nämlich die Natriumadduktion des intakten Moleküls ($[M+Na]^+$); der zugehörige Peak findet sich bei einem m/z -Wert von 747. Natrium ist ubiquitär vorhanden, kann aber auch zugeführt werden, um die Bildung solcher Adduktionen zu fördern. Vor allem Zuckerstrukturen haben eine hohe Affinität für Natriumionen, da diese durch die alkoholischen Hydroxygruppen

komplexiert werden können. Somit liefert das Natriumadduktion im MS¹ Spektrum von Hellebrin auch den Basispeak. Das protonierte Molekül [M+H]⁺ ist zwar auch vorhanden, erzeugt jedoch nur einen schwachen Peak bei einem m/z-Wert von 725. Dies ist auf die Instabilität dieses Ions zurückzuführen, das bereits in der ESI-Quelle zerfällt und die beiden Fragmentenionen [M-162+H]⁺ und [M-308+H]⁺ bildet.

Das MS² Spektrum des [M+Na]⁺-Ions des Hellebrins zeigt neben dem Signal für das Natriumadduktion des intakten Moleküls (m/z 747), auch intensive Peaks für eine einfache Wasserabspaltung bzw. H₂O-CO-Abspaltung. Der Basispeak ist hingegen bei einem m/z-Wert von 585 angesiedelt und entspricht dem Verlust des Glucoserestes vom intakten Hellebrin. Bei der Spaltung der glykosidischen Bindung bleibt die Rhamnose intakt; die Glucose verliert jedoch ein Molekül Wasser und gewinnt dabei eine Doppelbindung. Der Massenverlust beträgt 162 Da und entspricht einer Anhydroglucose.

Der Peak mit einem m/z Wert von 439 resultiert schließlich aus dem Verlust des Disaccharids, wobei an der Position 3 des Aglykons Hellebrigenin die glykosidische Bindung wiederum so gespalten wird, dass die Hydroxygruppe an dieser Stelle bestehen bleibt. Der m/z Wert 439 entspricht somit dem intakten Aglykon mit einem angelagerten Natriumion.

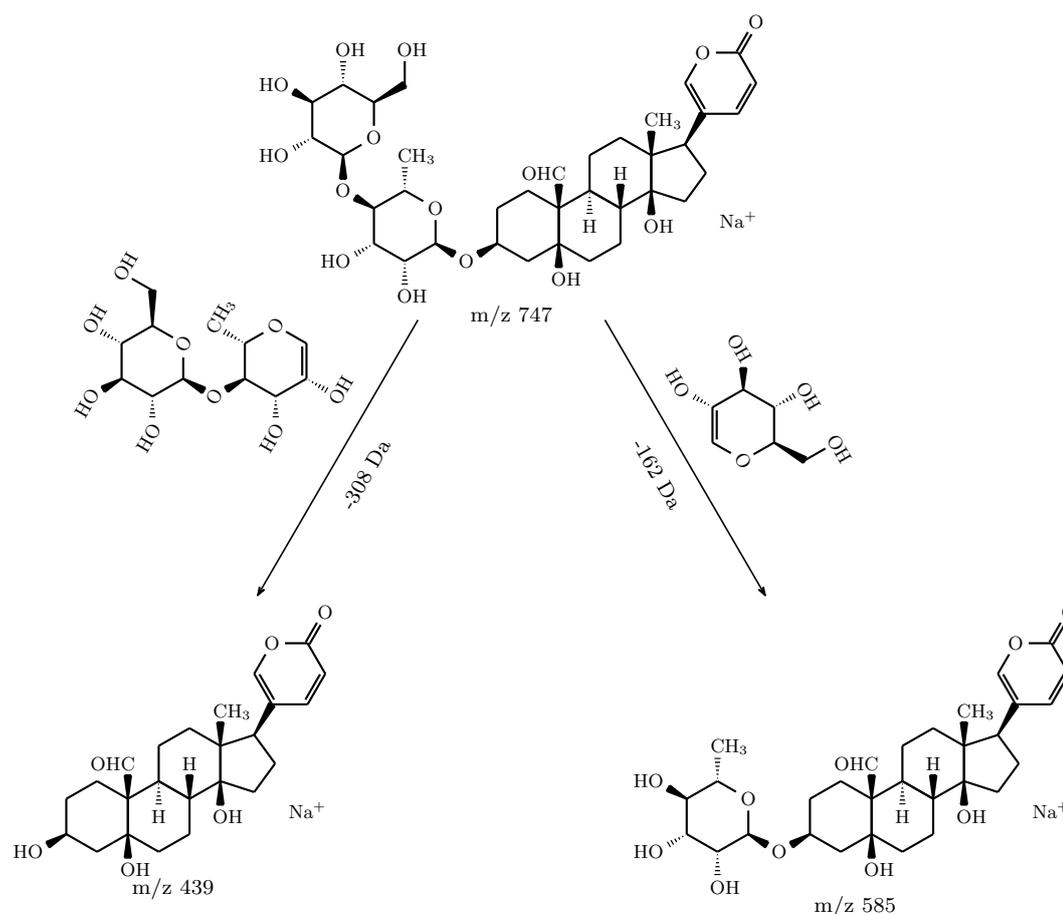


Abb. 3.19.: Fragmentierungsverhalten des des [M+Na]⁺-Ions des Bufadienolidglykosides Hellebrin (Hel3)

Ein weiterer erwähnenswerter Peak tritt bei einem m/z -Wert von 349 auf. Dabei handelt es sich um die Disaccharidkomponente als Natriumadduktion. In diesem Fall wird die glykosidische Bindung auf der Seite des Bufadienolidgrundkörpers gespalten und das einfach ungesättigte 3-Desoxyhellebrigenin als Neutralverlust entfernt. Die gebildeten Fragmente werden in Abbildung 3.19 veranschaulicht.

4. Diskussion

Die im Abschnitt 2.2 getroffene Einteilung der Bufadienolidaglyka nach strukturellen Merkmalen spiegelt sich größtenteils durch die gefundenen Gemeinsamkeiten im Fragmentierungsverhalten bei der in Kapitel 3 durchgeführten Spektreninterpretation wider.

Bei den hydroxylierten Bufadienolidaglyka, welche in Gruppe I zusammengefasst wurden, zeigen die potentiellen Fragmentierungspfade (siehe Abbildungen 3.3, 3.4 und 3.5, S. 34 ff.) eindeutige Parallelen hinsichtlich des Zerfallsverhaltens. Anhand dieser Pfade und typischer Merkmale, wie dem Markerpeak bei einem m/z -Wert von ca. 255, sollte es möglich sein, auch unbekannte Bufadienolidaglyka mit Hydroxysubstituenten in diese Strukturklasse einzuteilen. Unter Berücksichtigung des Molekulargewichtes und der Anzahl der erfolgten Wasserabspaltungen kann auch auf die Anzahl der Substituenten geschlossen werden. Die Stellung der Hydroxygruppen konnte durch die Analyse der Massenspektren nicht charakterisiert werden. Zu diesem Ergebnis führten auch die Untersuchungen von Liu et al. (2010) [LXX⁺10]. Das MS² Spektrum der Verbindung 10J (siehe Anhang S. 105) liefert durch zwei signifikante Peaks bei m/z -Werten von 215 und 189 Hinweise für das Vorliegen einer an Position 15 substituierten OH-Gruppe. Da jedoch keine andere Verbindung im Datensatz vorhanden ist, die diesem Substitutionsmuster entspricht, kann diese Annahme nicht bestätigt werden.

Auch in Gruppe III (Bufadienolidaglyka mit Hydroxy- und Ketogruppen) und Gruppe V (Bufadienolidaglyka mit Hydroxy- und Formylgruppen) können durch die Interpretation der Massenspektren Kriterien abgeleitet werden, welche Rückschlüsse auf die vorliegenden Funktionalitäten erlauben. Für die Unterscheidung der Gruppe III ist dabei hauptsächlich das Ausbleiben des Markerpeaks bei einem m/z -Wert von 255 und die Bildung des typischen Fragmentions $[M-H_2O-CO+H]^+$ ausschlaggebend. Für die Charakterisierung des Basispeaks als $[M-H_2O+H]^+$ kann innerhalb dieser Gruppe jedoch nur ein Trend festgestellt werden, da eine Verbindung (10U) diesem Kriterium nicht entspricht.

Die in Gruppe V (Bufadienolidaglyka mit Hydroxy- und Formylgruppen) zusammengefassten Verbindungen Hellebrigenin (Hel4) und Bovogenin A (2C) weisen ebenfalls gemeinsame massenspektrometrische Merkmale auf, welche für die Identifikation einer Formylgruppe an Position 10 ausschlaggebend sein können. Dabei ist vor allem der Markerpeak mit einem m/z -Wert von etwa 240 essentiell. Dennoch sind die für diese Gruppe definierten Unterscheidungsmerkmale nicht ausreichend repräsentativ, da nur zwei Verbindungen in dieser Gruppe vorhanden sind.

Besonders gut können auch acetoxylierte Bufadienolidaglyka aus den Gruppen II und VI charakterisiert werden. Durch den Massenverlust von 60 Dalton für das Essigsäuremolekül ist dieser Substituent eindeutig bestimmbar und nach der Abspaltung dieser Acetoxygruppe korreliert das vorliegende MS² Spektrum im Prinzip mit jenem des nicht-acetoxylierten Vertreters. Somit besteht auch hier die Möglichkeit

durch Kombination der aufgestellten Regeln für Gruppe I und V mit den Informationen über Molekulargewicht und typische Massenverluste (60 Dalton) unbekannte Verbindungen zumindest grundlegend zu klassifizieren.

Vor allem eine Unterscheidung einer 14,15-ständigen Epoxygruppe von anderen Substituenten, wie Hydroxygruppen oder Ketogruppen, erweist sich als schwierig. Durch einen direkten Vergleich der Massenspektren aus Gruppe IV mit Spektren aus Gruppe I, III oder V können zwar meist Abweichungen in den relativen Intensitäten analysiert werden, aber keine Kriterien erstellt werden, die eine eindeutige Differenzierung dieser Substituenten ermöglichen (vgl. dazu [YG05]).

In der folgenden Tabelle 4.1 werden die wichtigsten Merkmale aus der durchgeführten massenspektrometrischen Analyse zusammengefasst und übersichtlich dargestellt.

Tabelle 4.1.: Übersicht der Ergebnisse

Gruppe	Eigenschaften
Gruppe I OH-Substituenten 10S/10Q/10D/2M/ 15d/22D/60K	<ul style="list-style-type: none"> • [M+H]⁺: 355 +16 für jede OH Gruppe, -2 für jede DB • Markerpeak: m/z ca. 255 (259-2 für jeden OH-Substituenten bzw. DB); rel. Intensität mind. 20 % • Typische Verluste: 18 Da (-H₂O), 28 Da (-CO), 96 Da (-δ-Lacton-Ring), serielle Wasserabspaltungen intensiv • Konstitution: keine allgemeinen Regeln ableitbar, Hinweis auf 15 ständige OH Gruppe (10J, Peak im MS² bei m/z 189)
Gruppe II OH- und Acetoxygruppen 10O/10J/32A/ 21E/15i/54v	<ul style="list-style-type: none"> • [M+H]⁺: 355 +16 für jede OH Gruppe, +58 für jede CH₃COO Gruppe und -2 für jede Doppelbindung • Markerpeak: siehe Gr. I • Typischer Verlust: 60 Da (-HOAc), ansonsten wie Gr. I • Basispeak: Abspaltung aller Substituenten vom Grundkörper (außer Lactonring) • Ab M-60: Spektrum korreliert mit Gruppe I
Gruppe III OH- und Keto- Substituenten 2c/He11/5F/ 6B/16D/10U	<ul style="list-style-type: none"> • [M+H]⁺: 355 +16 für jede OH Gruppe, +14 für Keto und -2 für jede Doppelbindung • Basispeak: meistens [M-H₂O+H]⁺ • Typisches Fragmentation: [M-CO-H₂O+H]⁺; kombinierte Wasser- und CO-Verluste dominant, reine Wasserverluste nicht so intensiv wie in Gr. I bzw. Gr. IV • kein Markerpeak bei m/z ca. 255; letzte mögliche Wasserabspaltung fast nicht ersichtlich • 2 DB im A Ring zusätzlich zu 3-Oxo: markante Peaks im unteren m/z Bereich

Tabelle 4.1: Übersicht der Ergebnisse

Gruppe	Eigenschaften
Gruppe IV Epoxygruppe und andere Substituenten 12B/48J/19A/ 7B/35B	<ul style="list-style-type: none"> • [M+H]⁺: 355 +16 für jede OH Gruppe, +14 für CHO an Pos. 10, +14 für Epoxy, +14 für Keto und -2 für jede Doppelbindung • Typisches Fragmentation: siehe Gruppe I • kein eindeutiges Regelwerk erstellbar • Unterscheidung anhand relativer Intensitäten
Gruppe V OH- und CHO- Substituenten 2C/HeI4	<ul style="list-style-type: none"> • [M+H]⁺: 355 +16 für jede OH Gruppe, +14 für CHO an Pos. 10 und -2 für jede Doppelbindung • Markerpeak: m/z ca. 240 (273-2 für jeden Substituenten und -28 für Aldehydfunktion) • Typisches Fragmentation: [M-CO-H₂O+H]⁺; reine Wasserabspaltungen intensiver als in Gr. III • Basispeak: Abspaltung aller Substituenten vom Grundkörper (außer Lactonring)
Gruppe VI OH-, CHO- und Acetoxygruppen 2G/HeI2	<ul style="list-style-type: none"> • [M+H]⁺: 355 +16 für jede OH Gruppe, +58 für jede CH₃COO Gruppe, +14 für CHO an Pos. 10 und -2 für jede Doppelbindung • Markerpeak: siehe Gr. V • Typischer Verlust: 60 Da (-HOAc) bzw. 42 Da (-CH₂CO) • Ab M-60 Da: Spektrum korreliert mit Gruppe V
Gruppe VII OH-, Keto- und Acetoxygruppen 7E/10I/5D/ 16G/15c	<ul style="list-style-type: none"> • [M+H]⁺: 355 +16 für jede OH Gruppe, +58 für jede CH₃COO Gruppe, +14 für Keto und -2 für jede Doppelbindung • Typischer Verlust: 60 Da (-HOAc) bzw. 42 Da (-CH₂CO, besonders bei 2-fach-acetylierten Verb.) • 5D/16G/15c: dehydratisierter Peak m/z ca. 335 (OH, CO, CH₃COO eliminiert); MS³: Basispeak meistens m/z 363
	<ul style="list-style-type: none"> • Acetoxygruppe an 16: [M-H₂O-HOAC-H]⁺ im MS²-Spektrum dominierend • 15-ständige Keto Gruppe: weitere Fragmentionentypen im Vergleich zum Basispeak schwach ausgeprägt, Keto an 3, 11 oder 12 keine Auswirkung • 15-ständige OH Gruppe: Peak m/z 189 (MS²)

Die auf Basis der Massenspektren durchgeführte Strukturanalyse von Bufadienolid-glyka erlaubt meist keine Unterscheidung von Stereoisomeren, da diese Verbindungen nahezu idente Spektren liefern (siehe z.B. 10Q und 10S). Die Konfiguration scheint jedoch an bestimmten Positionen des 10,13-Dimethylsterangrundkörpers einen großen Einfluss auf die relativen Intensitäten der gebildeten Fragmentionen auszuüben. Dadurch können beispielsweise die epimeren Verbindungen 10Q (5β) und 10D (5α) voneinander unterschieden werden. Auch die epimeren Verbindungen 16G und 15c (siehe Anhang S. 131 bzw. S. 133), die sich durch die Konfiguration der Acetoxygruppe an Position 12 voneinander unterscheiden, weisen im MS^2 Spektrum signifikante Abweichungen in den relativen Intensitäten auf. Bei der Untersuchung von Konstitutionsisomeren treten meist Intensitätsunterschiede auf, auf deren Basis jedoch keine allgemein gültigen Regeln erstellt werden können.

Gelegentlich ist die Gegenüberstellung bestimmter Massenspektren zur Ergebnisfindung nicht optimal, da die betreffenden Verbindungen hinsichtlich der Position der Substituenten nicht miteinander korrelieren. Somit können Einflüsse der Stellung der Substituenten auf das Fragmentierungsverhalten nicht ausreichend bewertet werden.

Die Massenspektren der im Datensatz vorhandenen Bufadienolid-Derivate und Abbauprodukte wurden ebenfalls interpretiert und bezüglich markanter Fragmentionen untersucht, jedoch nicht für die Erstellung von Fragmentierungsregeln verwendet. Die Zahl an strukturell ähnlichen Verbindungen war in diesem Fall nicht gegeben, um eine derartige Analyse durchzuführen.

Resümee und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Diplomarbeit liefern verwertbare Ansätze, um die massenspektrometrische Strukturanalyse von Bufadienoliden zu verbessern und effizienter zu gestalten.

Anhand der erworbenen Erkenntnisse über das Fragmentierungsverhalten dieser Substanzklasse können grundsätzliche Informationen über die Struktur von noch unbekanntem Verbindungen bereitgestellt werden. Dies ist vor allem bei der Untersuchung komplexer Naturstoffgemische hinsichtlich neuer Wirkstoffkomponenten relevant, wo eine schnelle Unterscheidung zwischen bekannten und unbekanntem Inhaltsstoffen erforderlich ist.

Natürlich können die ermittelten Fragmentierungsregeln eine Strukturaufklärung mittels Kernresonanzspektroskopie nicht ersetzen, dennoch können auch hier grundlegende Aussagen über die Anzahl der Substituenten und der funktionellen Gruppen (Hydroxy-, Keto-, Formylgruppen) wichtige Hilfestellungen darstellen.

Eine Möglichkeit zur Optimierung dieser massenspektrometrischen Analyse, ist eine spezifische Auswahl an Bufadienoliden zu erstellen, die sich hinsichtlich der Position und Art der Substituenten für weitere Fragmentierungsanalysen eignen. Optimal wären beispielsweise Verbindungen, die an denselben Positionen substituiert sind und sich nur durch eine Funktionalität voneinander unterscheiden. Somit könnte die Auswirkung dieser funktionellen Gruppe auf das Zerfallsverhalten bestmöglich untersucht werden. Auch die praktische Einsetzbarkeit der erstellten Fragmentierungsregeln könnte überprüft werden, indem Datensätze unbekannter Strukturen mit den ermittelten Unterscheidungskriterien analysiert werden.

5. Zusammenfassung

Bufadienolide zählen zur Substanzklasse der herzwirksamen Steroidglykoside und sind unter anderem als Bestandteil der Traditionellen Chinesischen Medizin (TCM) volksmedizinisch verankert. Neben den gut untersuchten kardialen Wirkungen weisen Bufadienolide vielfältige pharmakologische Aktivitäten auf. Vor allem die antitumorale Wirkung wird momentan in unterschiedlichen Studien (vgl. dazu [BKM⁺13, BUG⁺13]) erforscht, welche schon vielversprechende Ergebnisse erzielen konnten. Die Strukturanalyse dieser Substanzklasse mittels massenspektrometrischer Methoden und vor allem das Fragmentierungsverhalten wurden bis jetzt jedoch noch nicht ausreichend untersucht. Kenntnisse über das Zerfallsverhalten von Bufadienoliden und deren Analyse mittels Massenspektrometrie könnten die Identifizierung von unbekanntem Substanzen jedoch in Zukunft beschleunigen und effizienter gestalten.

Diese Diplomarbeit beschäftigte sich mit der massenspektrometrischen Strukturanalyse von Bufadienolidaglyka und -glykosiden. Dabei wurden die mittels ESI-IT-Massenspektrometer erzeugten CID-Massenspektren hinsichtlich charakteristischer Fragmentationen und Abspaltungen untersucht und das Fragmentierungsverhalten der unterschiedlichen Bufadienolide studiert. Ein wichtiges Ziel war dabei die Ableitung von Regeln und Kriterien, die eine Unterscheidung von Bufadienoliden mit verschiedenen strukturellen Merkmalen anhand der erzeugten Massenspektren ermöglichen. Insgesamt wurden dabei 37 Bufadienolidaglyka und zwei Bufadienolidglykoside untersucht, welche Reinsubstanzen darstellen und aus der Naturstoffbibliothek des Departments Pharmakognosie der Universität Wien stammen. Auch die CID-Massenspektren von 24 Bufadienolid-Derivaten und Abbauprodukten wurden im Rahmen dieser Arbeit interpretiert, jedoch nicht für die Ableitung von Fragmentierungsregeln verwendet.

Die Struktur dieser Verbindungen wurde im Vorhinein mittels Kernresonanz-Spektroskopie ermittelt und die Substanzen aufgrund gemeinsamer struktureller Merkmale in Gruppen zusammengefasst. Diese Klassifizierung war notwendig, um die Massenspektren bestimmter Gruppen systematisch miteinander zu vergleichen und somit Merkmale, wie beispielsweise typische Fragmentationen oder signifikante Peaks zu bestimmen, die für eine Gruppe und damit für eine gewisse Bufadienolid-Struktur charakteristisch sind.

Die Analyse ergab dabei, dass sich die zuvor erstellte Gruppeneinteilung größtenteils in den Übereinstimmungen im Fragmentierungsverhalten der zugehörigen Verbindungen widerspiegelt. Die rein hydroxylierten Bufadienolidaglyka (Gruppe I) können durch intensive serielle Wasserabspaltungen und einen Markerpeak bei einem m/z-Wert von etwa 255, der dem vollständig dehydratisierten 10,13-Dimethylsterangrundkörper entspricht, charakterisiert werden. Bufadienolidaglyka mit Hydroxy-Substituenten und einer an Position 10 vorhandenen Formylgruppe (Gruppe V) weisen einen Markerpeak bei einem m/z-Wert von etwa 240 auf (entspricht dem mehrfach ungesättigter 13-Methylsterangrundkörper), bilden $[M-H_2O-CO+H]^+$ als typisches

Fragmentation und zeigen zusätzlich markante kombinierte Abspaltungen des Lactonringes und von Wassermolekülen. Der Basispeak innerhalb dieser Gruppe stammt meist vom gesättigten Bufadienolidgrundkörper nach Eliminierung aller Substituenten.

Bei Gruppe II (Bufadienolidaglyka mit Keto- und Hydroxysubstituenten) werden als Unterscheidungsmerkmale das Ausbleiben eines Markerpeaks bei einem m/z -Wert von etwa 255 definiert, sowie intensive kombinierte Wasser-CO-Verluste und die Bildung des charakteristischen Fragmentions $[M-H_2O-CO+H]^+$. Acetoxylierte Bufadienolidaglyka können anhand der Merkmale für Gruppe I und Gruppe V unterschieden werden, wobei die Acetoxygruppe durch einen typischen Neutralverlust des Essigsäuremoleküls von 60 Da identifiziert werden kann.

Eine Differenzierung zwischen 14,15-ständigen Epoxygruppen und anderen Funktionalitäten, wie Hydroxygruppen oder Ketogruppen, kann anhand der Massenspektren nicht vorgenommen werden. Zwar treten bei der Gegenüberstellung der entsprechenden Spektren häufig Intensitätsunterschiede auf, dennoch können keine eindeutigen Unterscheidungskriterien für Verbindungen mit 14,15-ständiger Epoxygruppe erstellt werden.

Dennoch liefert die Analyse Hinweise für 15-ständige OH-Gruppen in Form zweier Peaks im unteren m/z -Bereich. Zusätzlich kann festgestellt werden, dass eine Stellung der Acetoxygruppe an Position 16 bzw. eine am C-15 substituierte Keto-Funktion zu einer signifikanten Verminderung der relativen Intensitäten im MS^2 Spektrum führt.

6. Summary

Bufadienolides belong to the cardiac glycosides and are mainly found in the skin secretion of the genus *Bufo*. Bufadienolide – containing drugs, like the inspissated skin secretion of specific far eastern toads, are mainly used in the increasingly popular Traditional Chinese Medicine (TCM). Those substances provide a wide range of different pharmacologic activities. Beside the well known cardiac effects, the antineoplastic and immunosuppressive potential of bufadienolides are the focus of current research. Hence, a lot of effort is put in the isolation of unknown components from biological sources and the analysis of their therapeutic effects. For that, high performance liquid chromatography (HPLC) combined with mass spectrometric methods is used to separate complex mixtures of biological origin effectively. This enables the analysis of the individual components and allows the structural classification of the substances. In this context, mass spectrometry is an important analytical method to identify unknown compounds and to provide information about the compound's structure. In this diploma thesis, the fragmentation behaviour of the bufadienolides is analyzed by means of ESI-CID mass spectra. A classification of the bufadienolides into groups sharing the same structural features is used as a base for the systematic interpretation. This helps to find specific fragment-ions or neutral losses in the given mass spectra. This analysis enables the generation of rules for the effects of specific substituents on the fragmentation behaviour. The presence of these substituents, e.g., keto-, hydroxy-, formyl- or acetoxy-groups, can be predicted by these characteristic fragmentations. The future analysis of unknown bufadienolids can be simplified with the help of these developed rules of fragmentation and the presence and in some cases the position of specific existing substituents can be predicted. This allows a faster and easier identification of unknown bufadienolids and helps to support the additional, more extensive analysis of these substances.

Wissenschaftliche Literatur

- [Alb13] ALBABA, Fares: *Zugänglichkeit von Gamabufotalin-3-O- α -L-rhamnosid*, Universität Wien, Diplomarbeit, 2013
- [Böh00] BÖHM, Michael: *Herzinsuffizienz, RRK Referenz-Reihe Kardiologie*. Thieme, 2000
- [BKM⁺13] BANULS, Laetitia Moreno Y. ; KATZ, Adriana ; MIKLOS, Walter ; CIMMINO, Alessio ; TAL, Daniel M. ; AINBINDER, Elena ; ZEHL, Martin ; URBAN, Ernst ; EVIDENTE, Antonio ; KOPP, Brigitte ; BERGER, Walter ; FERON, Olivier ; KARLISH, Steven ; KISS, Robert: Hellebrin and its aglycone form hellebrigenin display similar in vitro growth inhibitory effects in cancer cells and binding profiles to the alpha subunits of the Na^+/K^+ -ATPase. In: *Molecular Cancer* 12 (2013)
- [BUG⁺13] BANULS, Laetitia Moreno Y. ; URBAN, Ernst ; GELBCKE, Michael ; DUFRASNE, Francois ; KOPP, Brigitte ; KISS, Robert ; ZEHL, Martin: Structure-Activity Relationship Analysis of Bufadienolide-Induced in Vitro Growth Inhibitory Effects on Mouse and Human Cancer Cells. In: *Journal of Natural Products* 76 (2013), S. 1078–1084
- [Del11] DELLAS, Claudia: *Crashkurs Pharmakologie*. 3. Auflage. Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag, 2011
- [DMH⁺68] DOLE, Malcolm ; MACK, L. L. ; HINES, R. L. ; MOBLEY, R. C. ; FERGUSON, L. D. ; ALICE, M. B.: Molecular Beams of Macroions. In: *The Journal of Chemical Physics* 49 (1968), Nr. 5, S. 2240–2249
- [Gee06] GEERING, Käthi: FXFD proteins: new regulators of Na-K-ATPase. In: *American Journal of Physiology. Renal Physiology* 290 (2006), S. 241–250
- [Ges97] GESCHWINDE, Thomas: *Rauschdrogen: Marktformen und Wirkungsweisen*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1997
- [Gey15] GEY, Manfred H.: *Instrumentelle Analytik und Bioanalytik Biosubstanzen, Trennmethode, Strukturanalytik, Applikationen*. 3. Auflage. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015
- [GHG07] GARG, A. ; HIPARGI, R. ; GANDHARE, A.: Toad skin-secretions: Potent source of pharmacologically and therapeutically significant compounds. In: *The Internet Journal of Pharmacology* 5 (2007), Nr. 2
- [GPKW11] GAO, Huimin ; POPESCU, Ruxandra ; KOPP, Brigitte ; WANG, Zhimin: Bufadienolides and their antitumor activity. In: *Natural Product Reports* 28 (2011), S. 953–969
- [Gro13] GROSS, Jürgen H.: *Massenspektrometrie Ein Lehrbuch*. Springer Spektrum, 2013
- [HCY92] HONG, Z. ; CHAN, K. ; YEUNG, H.W.: Simultaneous Determination of Bufadienolides in the Traditional Chinese Medicine Preparation, Liu-Shen-Wan, by Liquid Chromatography. In: *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1992, S. 1023–1026
- [HH96] HÄNSEL, Rudolf ; HÖLZL, Josef: *Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996

- [HMZ05] HESSE, Manfred ; MEIER, Herbert ; ZEEH, Bernd: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. Georg Thieme Verlag, 2005
- [HMZ11] HESSE, Manfred ; MEIER, Herbert ; ZEEH, Bernd: *Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie*. 8. Auflage. Georg Thieme Verlag, 2011
- [HS10] HÄNSEL, Rudolf ; STICHER, Otto: *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. 9. Auflage. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2010
- [HYL⁺15] HUANG, Huimei ; YANG, Yongge ; LV, Chao ; CHANG, Wanlin ; PENG, Chengcheng ; WANG, Shuping ; GE, Guangbo ; HAN, Lin ; ZHANG, Weidong ; LIU, Runhui: Pharmacokinetics and tissue distribution of five bufadienolides from the Shexiang Baoxin pill following oral administration to mice. In: *Journal of Ethnopharmacology* (2015), Nr. 161, S. 175–185
- [IT76] IRIBARNE, J. V. ; THOMSON, B. A.: On the evaporation of small ions from charged droplets. In: *Journal of Chemical Physics* 64 (1976), S. 2287
- [KBP⁺09] KREIENBERG, Rolf ; DU BOIS, Andreas ; PFISTERER, Jacobus ; SCHINDELHANN, Sabine ; SCHMALFELDT, Barbara: *Management des Ovarialkarzinoms Interdisziplinäres Vorgehen*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2009
- [Kie68] KIENITZ, H: *Einführung in die Massenspektrometrie*. Verlag Chemie, Weinheim, 1968
- [KK98] KRENN, Lieselotte ; KOPP, Brigitte: Bufadienolides from animal and plant sources. In: *Phytochemistry* 48 (1998), S. 1–29
- [KKS01] KRENN, Liselotte ; KOPP, Brigitte ; SPETA, Franz ; KUBELKA, Wolfgang: Chemotaxonomische Untersuchung der Gattung *Charybdis* SPETA (*Urgineoideae, Hyacinthaceae*). In: *Stapfia* 164 (2001), S. 101–120
- [KRK13] KAMBOJ, Anjoo ; RATHOUR, Aarti ; KAUR, Mandeep: Bufadienolides and their medicinal utility: a review. In: *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 5 (2013)
- [Kro10] KROMIDAS, Stavros (Hrsg.): *Der HPLC-Experte Möglichkeiten und Grenzen der modernen HPLC*. Wiley-VCH Verlag & Co, 2010
- [LB04] LEMMER, Björn ; BRUNE, Kay: *Pharmakotherapie, Klinische Pharmakologie*. 12. Auflage. Springer Verlag, 2004
- [LXX⁺10] LIU, Yanfang ; XIAO, Yuansheng ; XUE, Xingya ; ZHANG, Xiuli ; LIANG, Xinmiao: Systematic screening and characterization of novel bufadienolides from toad skin using ultra-performance liquid chromatography/electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. In: *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 24 (2010), S. 667–678
- [McB00] MCBRIDE, Michael C.: Bufotenine: toward an understanding of possible psychoactive mechanisms. In: *Journal of Psychoactive Drugs* 32 (2000), Nr. 3, S. 321–331
- [MKRD70] MACK, L.L. ; KRALIC, P. ; RHEUDE, A. ; DOLE, M.: Molecular beams of macroions II. In: *Journal of Chemical Physics* 52 (1970), S. 4977–4986
- [NYPB08] NEWMAN, Robert A. ; YANG, Peiying ; PAWLUS, Alison D. ; BLOCK, Keith I.: Cardiac Glycosides as Novel Cancer Therapeutic Agents. In: *Molecular Interventions* 8 (2008), Nr. 1, S. 36–49
- [Riz15] RIZZI, Univ. Prof. Dr. A.: *Vorlesungsunterlagen Massenspektrometrie I*.

2015. – Institut für Analytische Chemie Universität Wien
- [Sch07] SCHMELZER, Christian: *Massenspektrometrische Charakterisierung von Proteinhydrolysaten: Verdaustudien an β -Casein und Strukturuntersuchungen an Elastin*, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Biowissenschaften, Martin-Luther-Universität Halle Wittenberg, Diss., 2007
- [SE07] SCHMIDT, Harald ; ESTLER, Claus-Jürgen: *Pharmakologie und Toxikologie für Studium und Praxis*. 6. Auflage. Schattauer, 2007
- [TLM12] TEUSCHER, Eberhard ; LINDEQUIST, Ulrike ; MELZIG, Matthias F.: *Biogene Arzneimittel, Ein Lehrbuch der Pharmazeutischen Biologie*. 7. Auflage. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, 2012
- [Vat07] VATANSEVER, Bilgin: *Elektrospray-Ionisations-Massenspektrometrie als Tool für die Qualitative und Quantitative Protein- und Peptidanalytik*, Universität des Saarlandes, Diss., 2007
- [YG05] YE, Min ; GUO, De-an: Analysis of bufadienolides in the Chinese drug ChanSu by high-performance liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometry. In: *Rapid Communications in Mass Spectrometry* 19 (2005), S. 1881–1892

Internet Referenzen

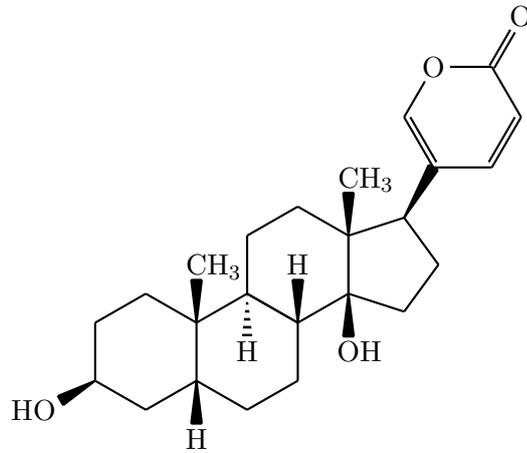
- [1] Spektrum Akademischer Verlag. Lexikon der Biologie, Bufadienolide, 1999. <http://www.spektrum.de/lexikon/biologie/bufadienolide/11118>, abgerufen am 12.03.2015.
- [2] Spektrum Akademischer Verlag. Lexikon der Biochemie, Na^+/K^+ -ATPase, 1999. <http://www.spektrum.de/lexikon/biochemie/na-k-atpase/4181>, abgerufen am 15.04.2015.
- [3] LLC themedicalbiochemistrypage.org. Medical biochemistry page, 1996-2014. <http://themedicalbiochemistrypage.org/membranes.phpnka>, abgerufen am 10.5.2015.
- [4] Spektrum. Lexikon der Chemie, Massenspektrometrie, 1998. <http://www.spektrum.de/lexikon/chemie/massenspektrometrie/5622>, abgerufen am 22.04.2015.
- [5] Chemie.de. Massenspektrometrie. <http://www.chemie.de/lexikon/Massenspektrometrie.html> abgerufen am 30.04.2015.
- [6] Wiley Information Services GmbH. Massenspektrometer - Der Detektor, 1999-2014. http://www.chemgapedia.de/vsengine/vlu/vsc/de/ch/3/anc/masse/ms_detektor_datensystem.vlu/Page/vsc/de/ch/3/anc/masse/2_massenspektrometer/2_5_detektor_ms/2_5_5_sev/sev_ms4ht0202.vscml.html abgerufen am 4.05.2015.
- [7] Bruker Corporation, 2015. <https://www.bruker.com/products/mass-spectrometry-and-separations/ms-software/compass/overview.html>, abgerufen am 21.05.2015.
- [8] Advanced Chemistry Development. ACD/ChemSketch for Academic and Personal Use, 1996-2015. <http://www.acdlabs.com/resources/freeware/chemsketch/>, abgerufen am 21.05.2015.

Anhang

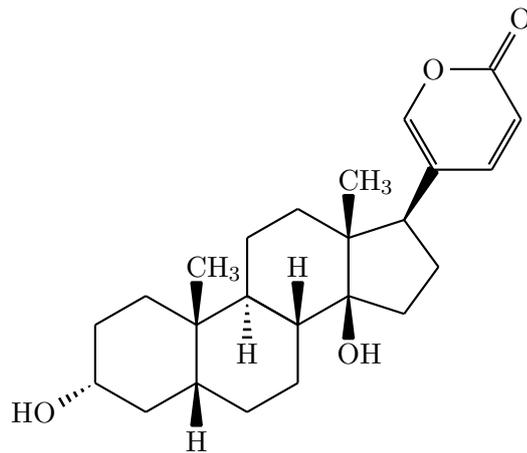
A. Strukturen

10Q	S.71	15c	S.81
10S	S.71	4I	S.81
10D	S.71	4L	S.82
2M	S.72	7B	S.82
15d	S.72	12A	S.82
22D	S.72	14D	S.83
60K	S.73	15B	S.83
2P	S.73	15C	S.83
Hel3	S.73	15D	S.84
10O	S.74	15H	S.84
10J	S.74	15S	S.84
32A	S.74	20F	S.85
21E	S.75	22N	S.85
15i	S.75	26K	S.86
2c	S.75	27F	S.86
Hel1	S.76	28K	S.86
10U	S.76	29b	S.87
5F	S.76	29C	S.87
16D	S.77	30M	S.87
6B	S.77	35B	S.88
12B	S.77	42C	S.88
48J	S.78	51D	S.88
19A	S.78	52I	S.89
2C	S.78	54E	S.89
Hel4	S.79	54Ee	S.89
Hel2	S.79	54v	S.90
2G	S.79	62A	S.90
7E	S.80	62F	S.90
10I	S.80	62I	S.91
5D	S.80	62J	S.91
16G	S.81		

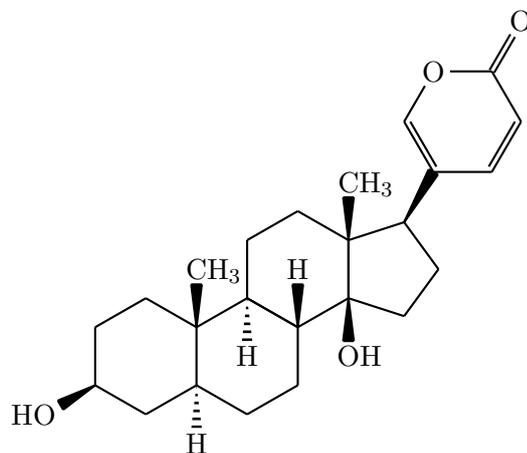
A.1. 10Q



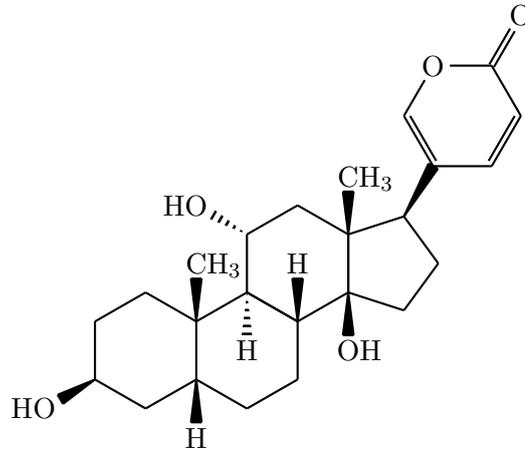
A.2. 10S



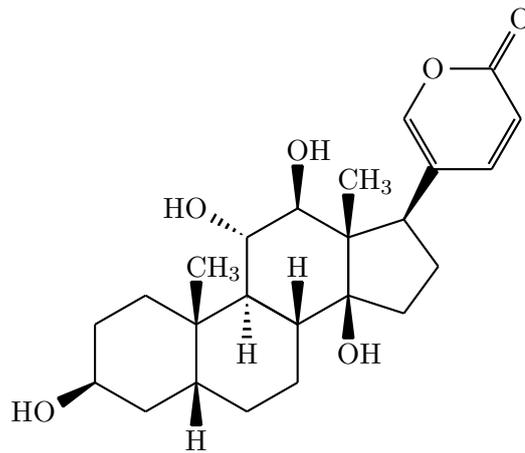
A.3. 10D



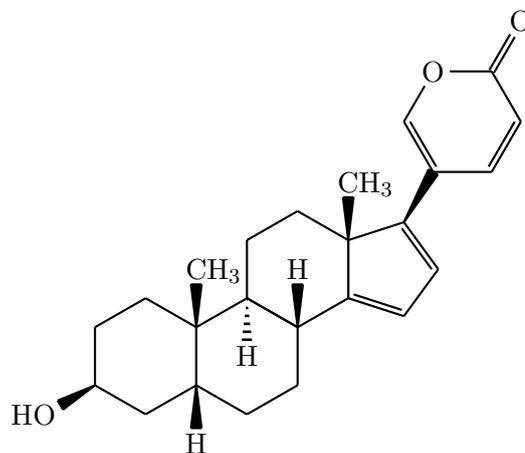
A.4. 2M



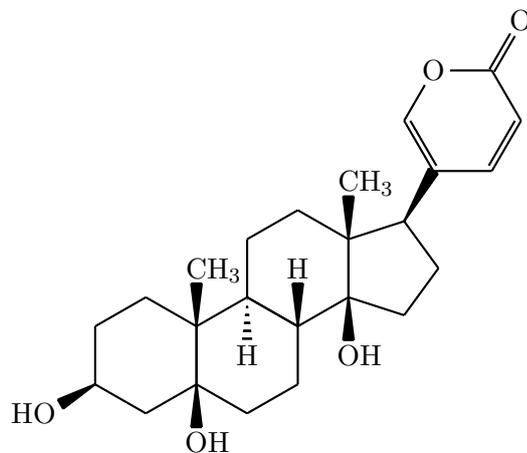
A.5. 15d



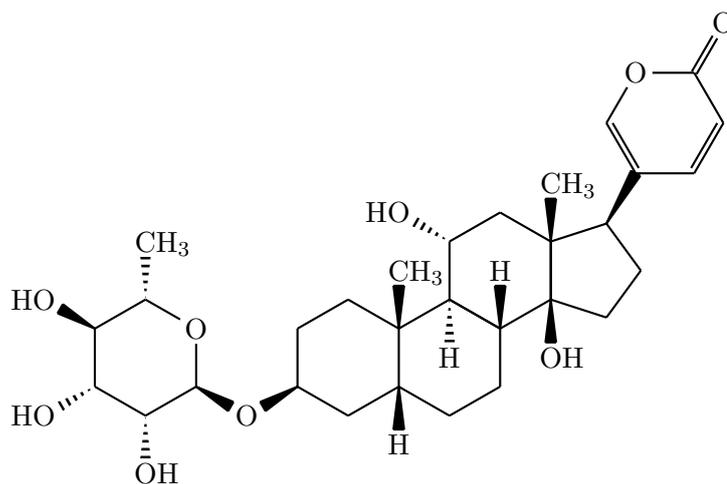
A.6. 22D



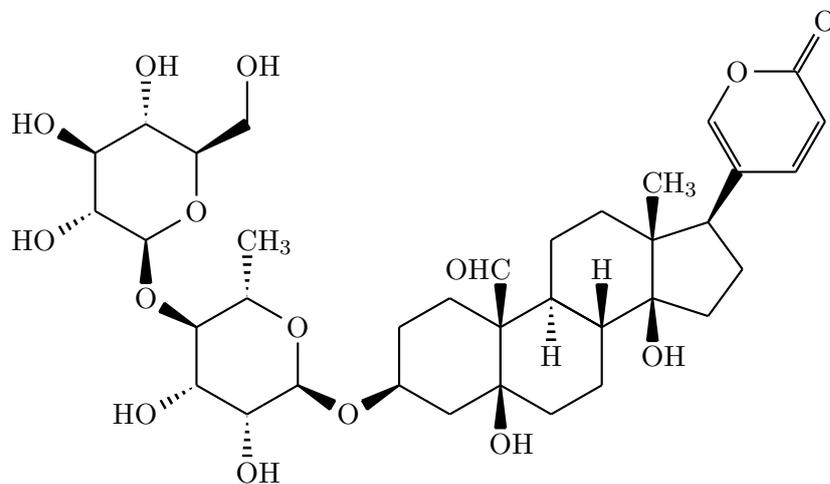
A.7. 60K



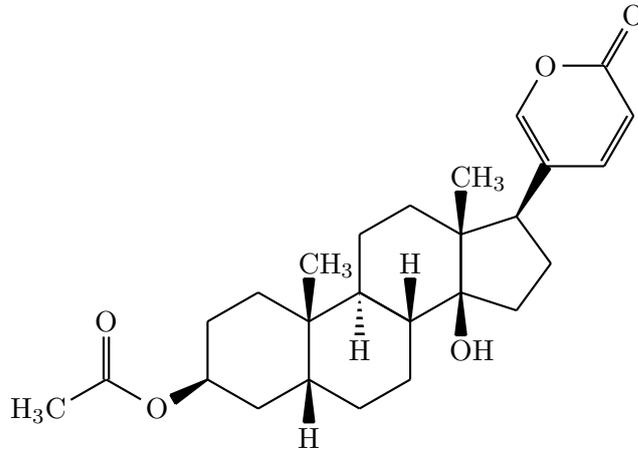
A.8. 2P



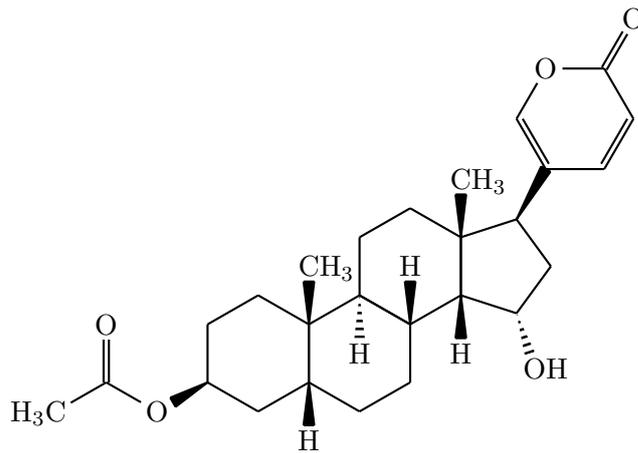
A.9. Hel3



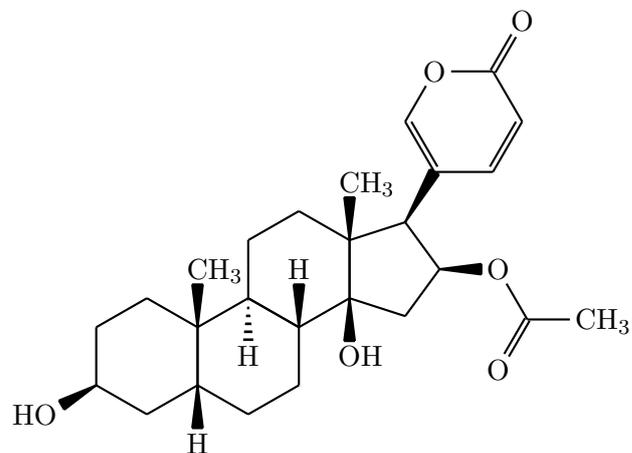
A.10. 10O



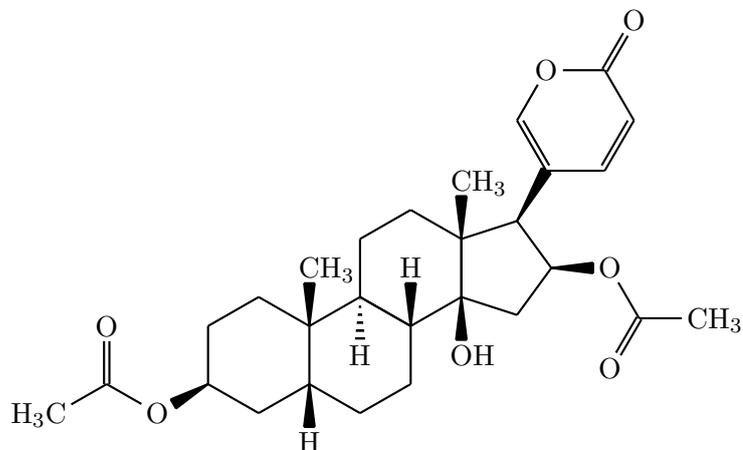
A.11. 10J



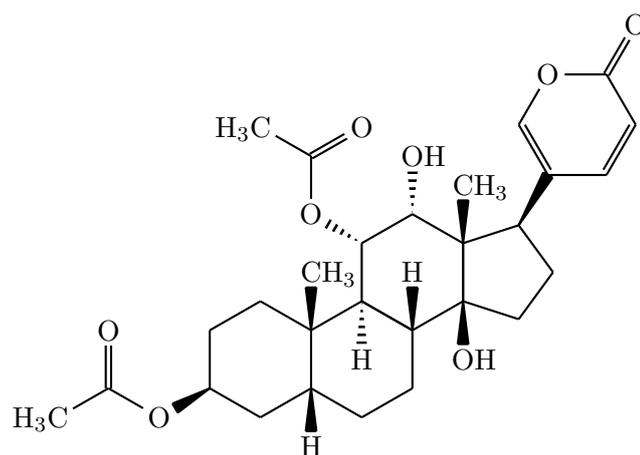
A.12. 32A



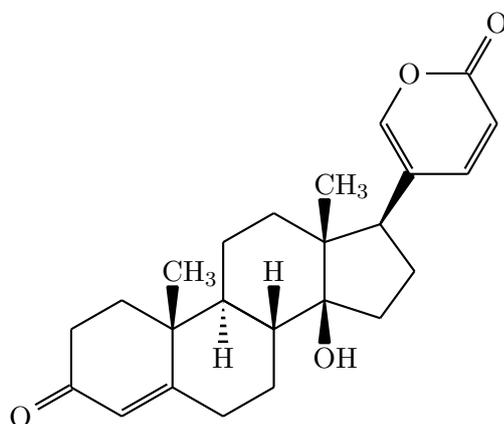
A.13. 21E



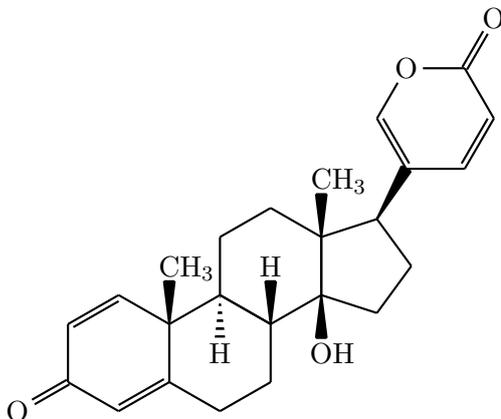
A.14. 15i



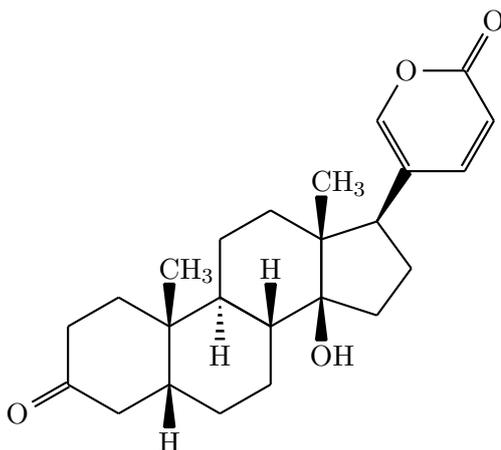
A.15. 2c



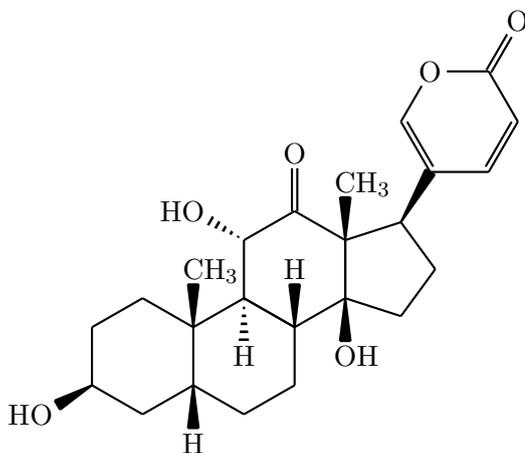
A.16. Hel1



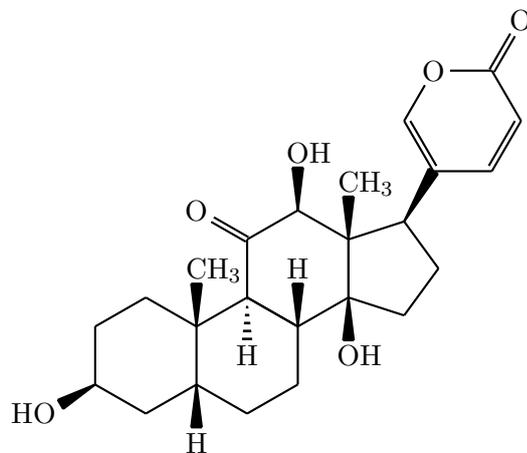
A.17. 10U



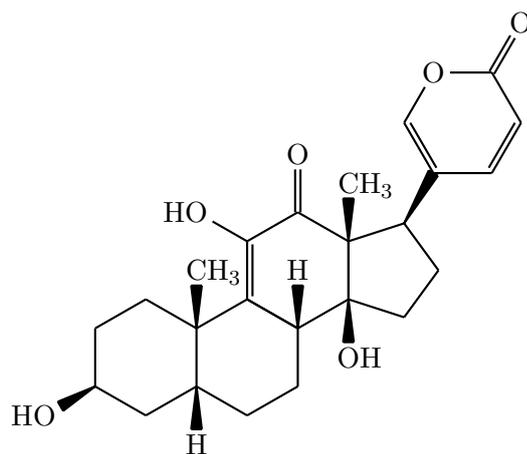
A.18. 5F



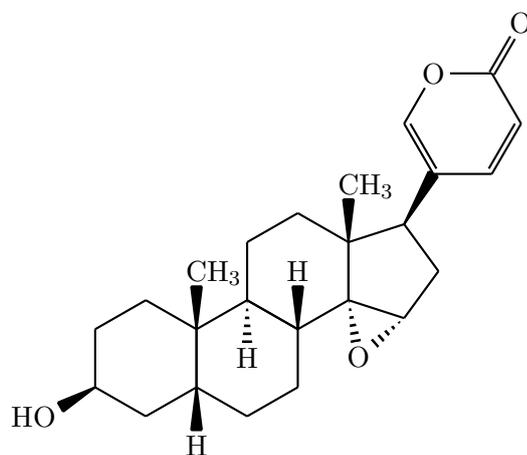
A.19. 16D



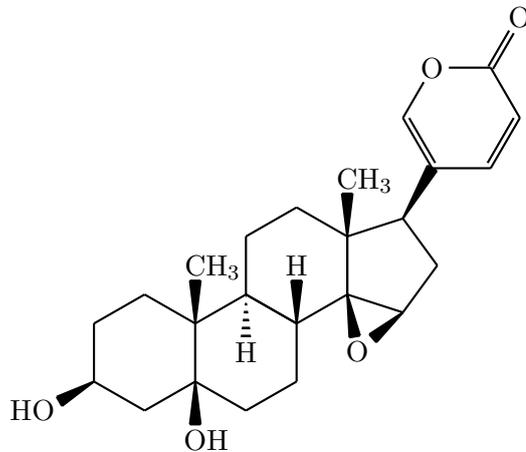
A.20. 6B



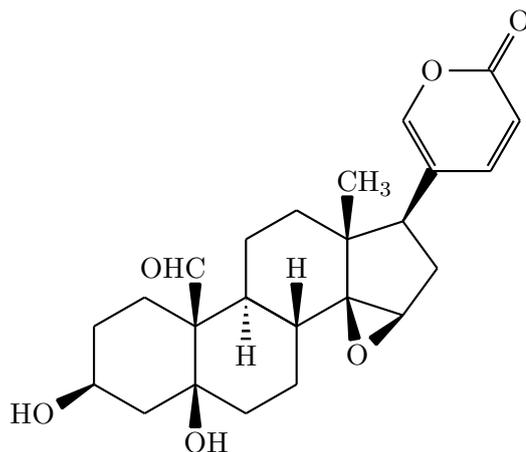
A.21. 12B



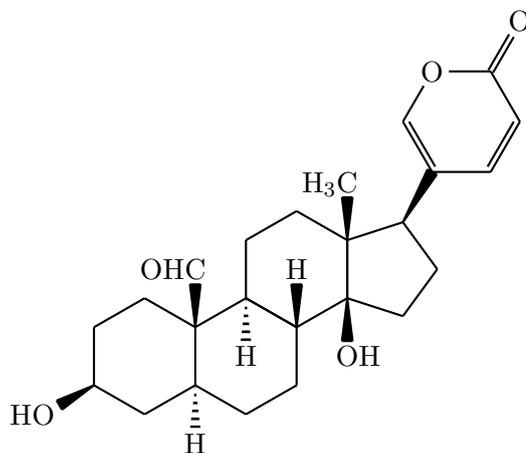
A.22. 48J



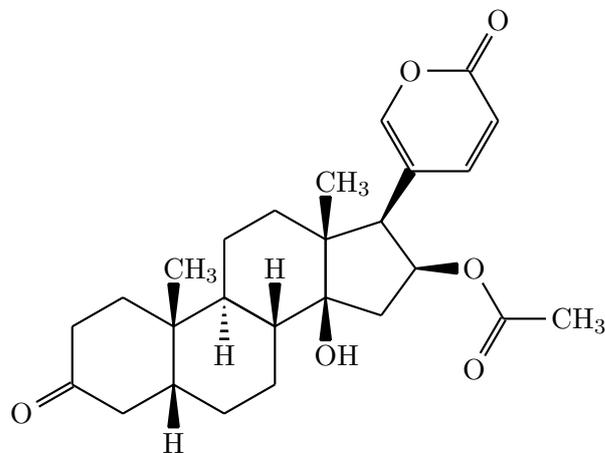
A.23. 19A



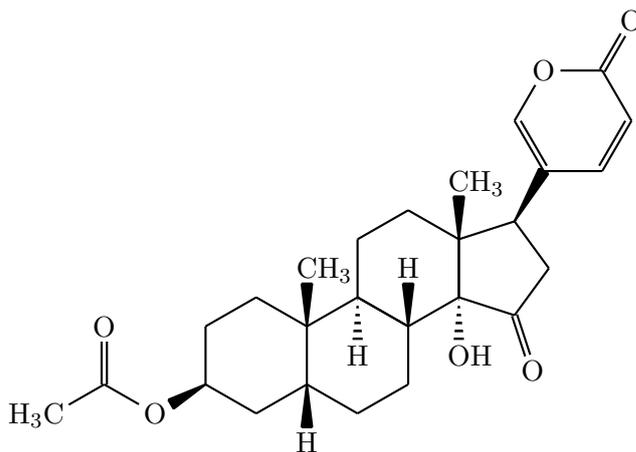
A.24. 2C



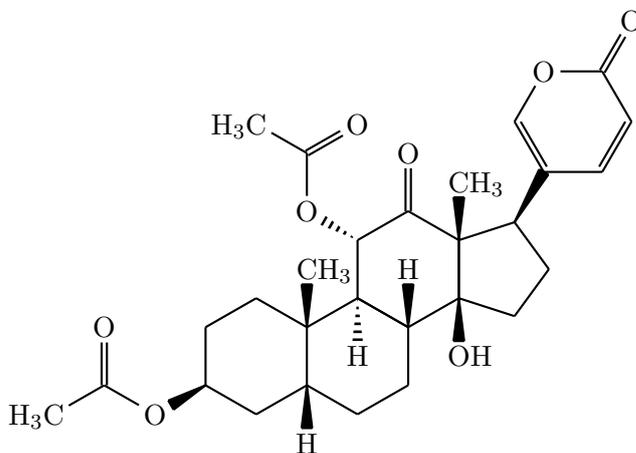
A.28. 7E



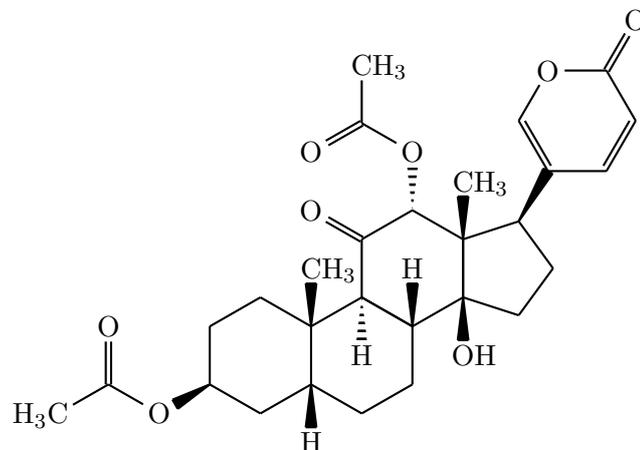
A.29. 10I



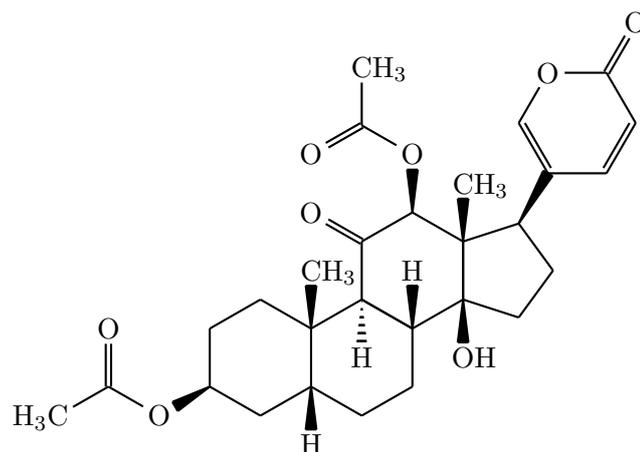
A.30. 5D



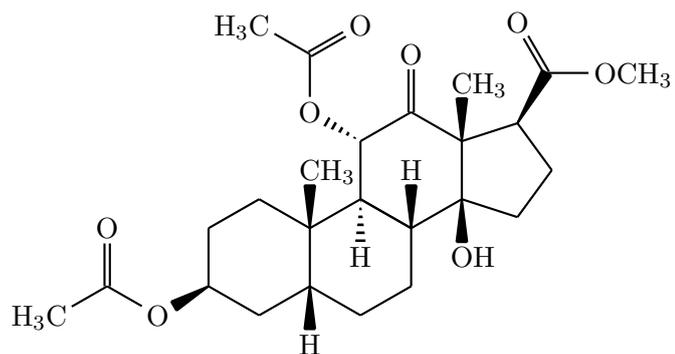
A.31. 16G



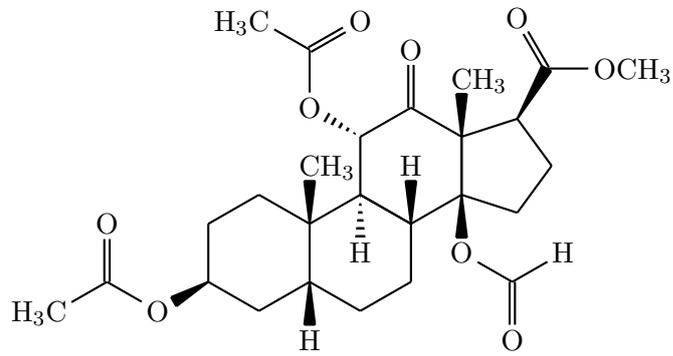
A.32. 15c



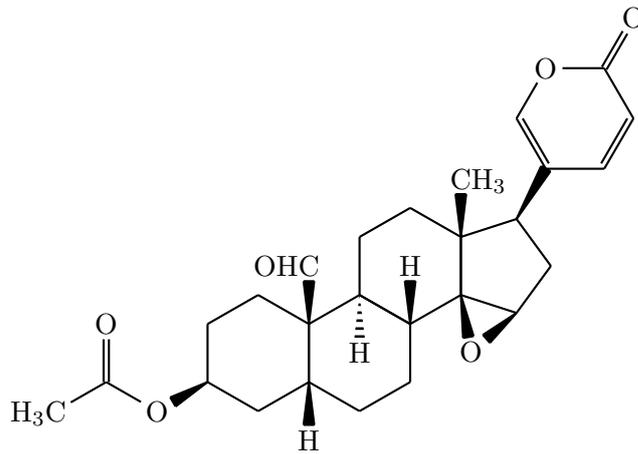
A.33. 4I



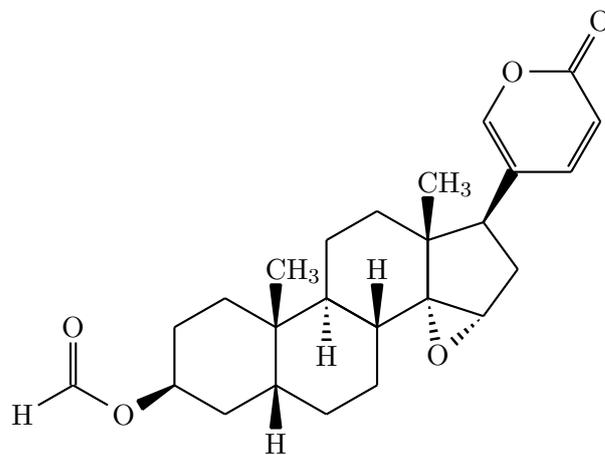
A.34. 4L



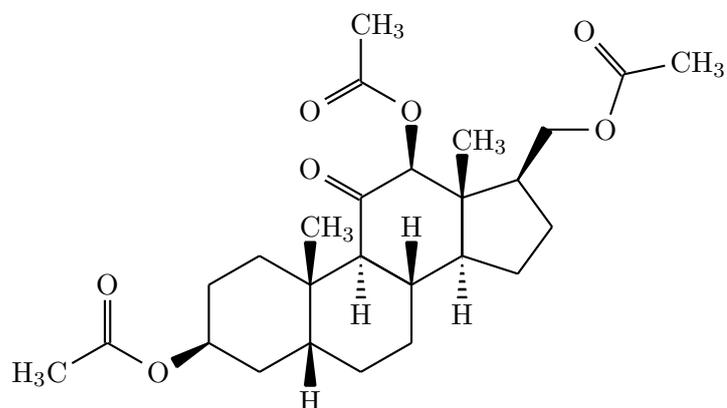
A.35. 7B



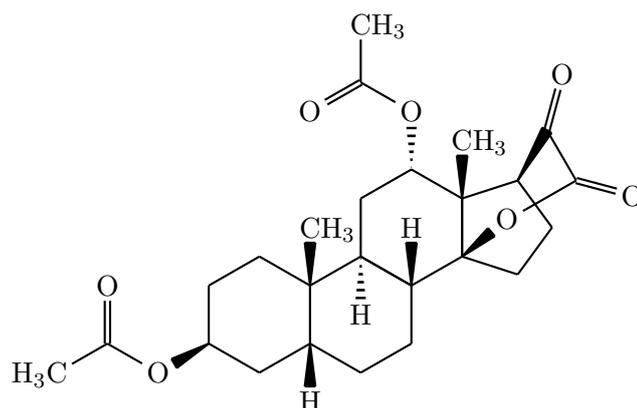
A.36. 12A



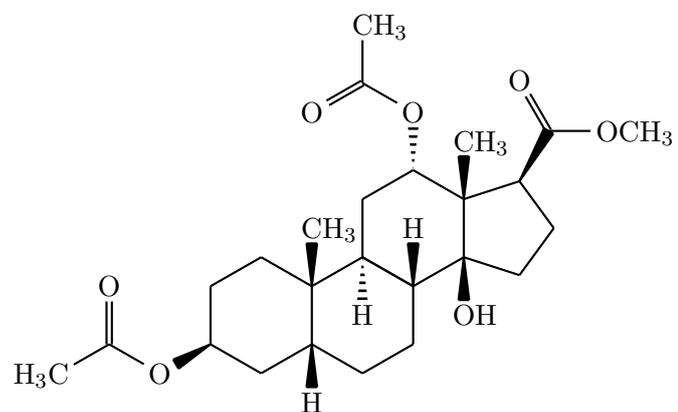
A.37. 14D



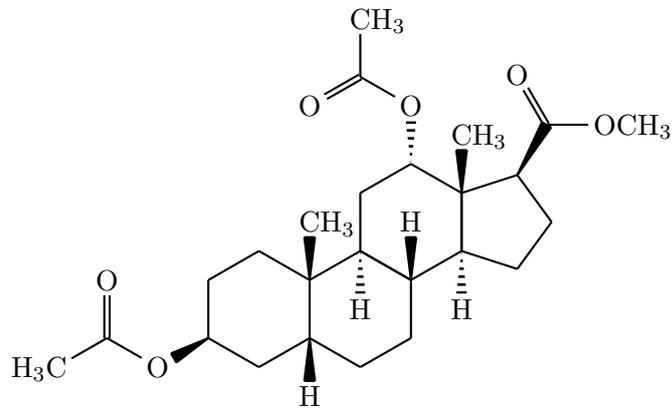
A.38. 15B



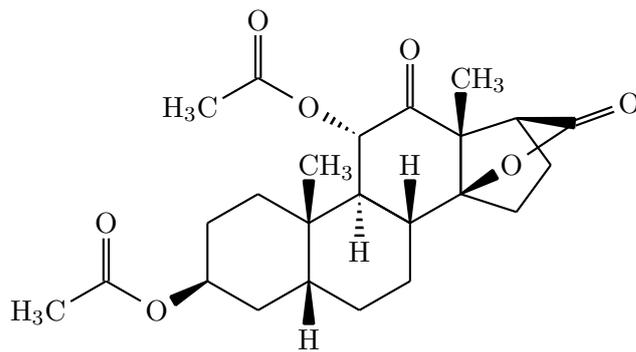
A.39. 15C



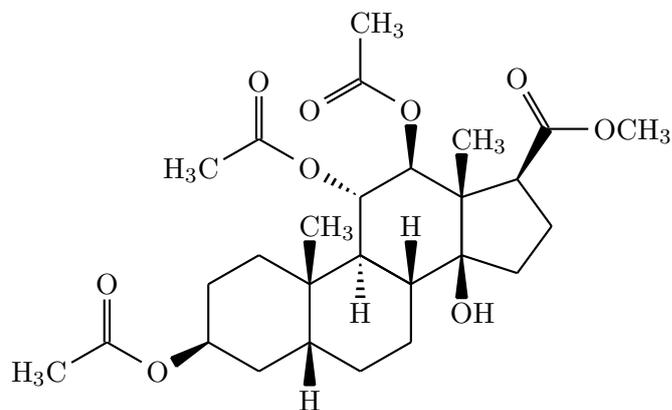
A.40. 15D



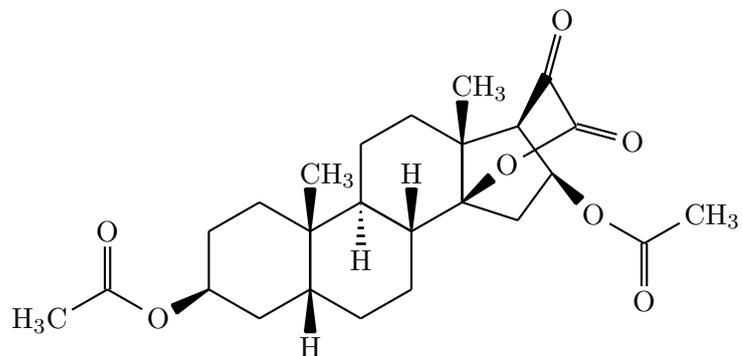
A.41. 15H



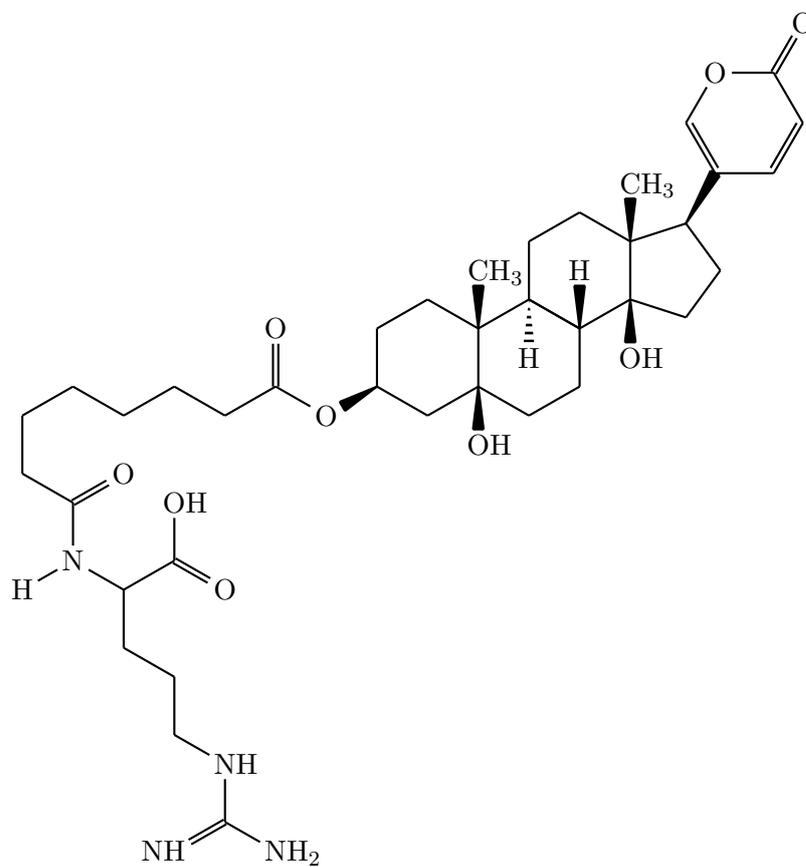
A.42. 15S



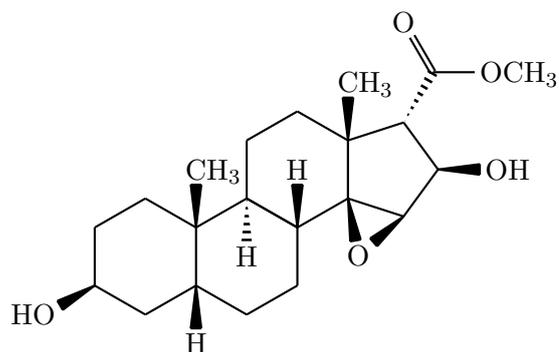
A.43. 20F



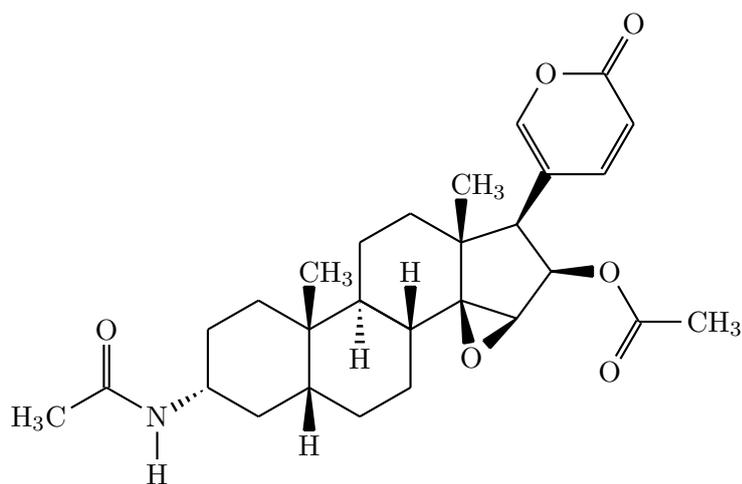
A.44. 22N



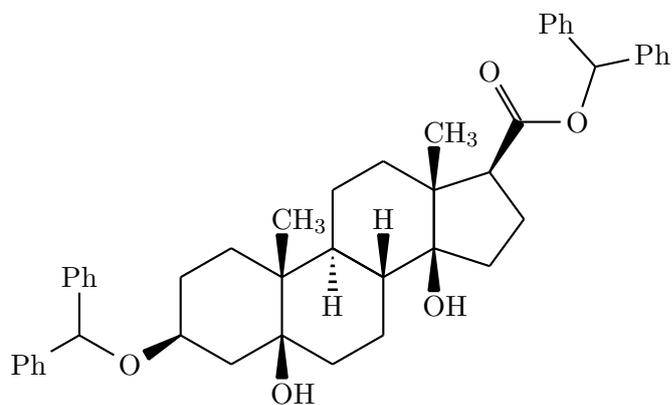
A.45. 26K



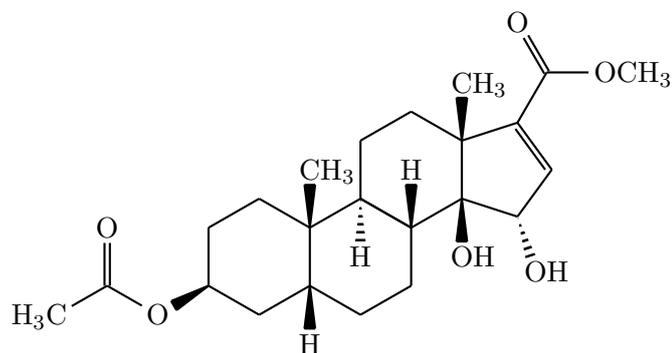
A.46. 27F



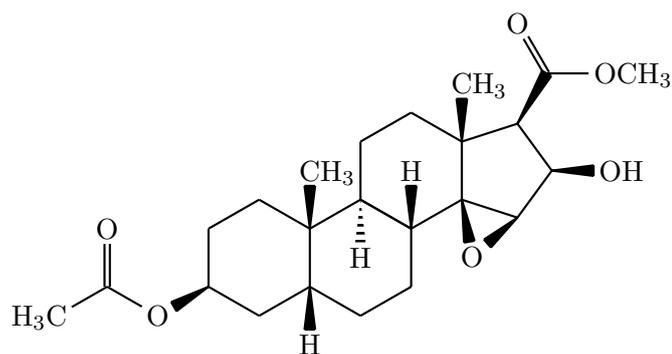
A.47. 28K



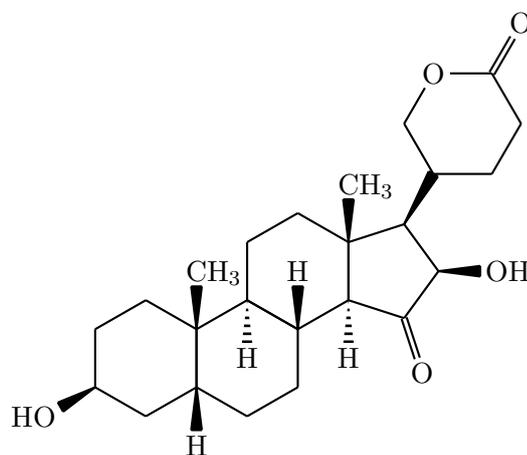
A.48. 29b



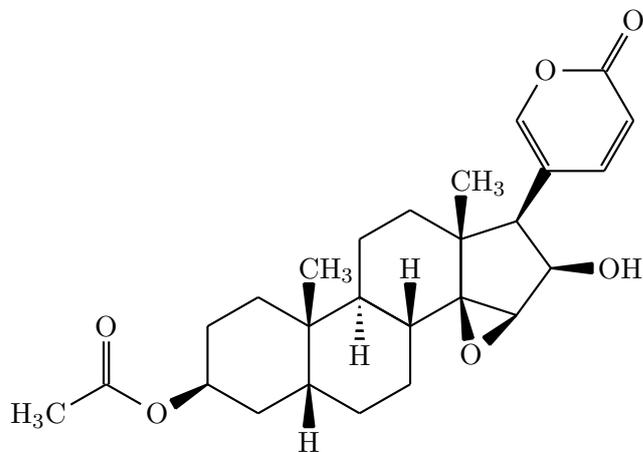
A.49. 29C



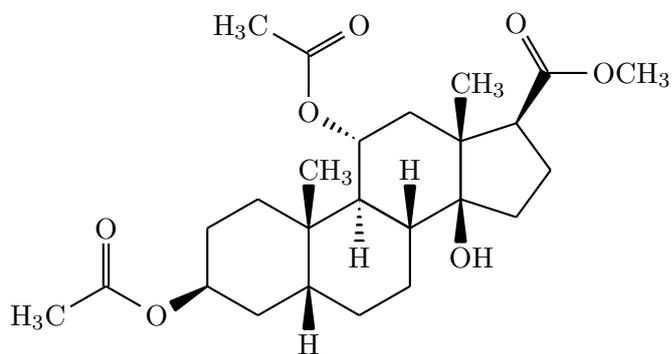
A.50. 30M



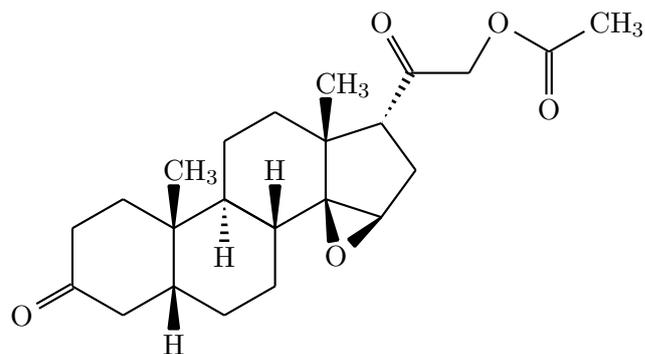
A.51. 35B



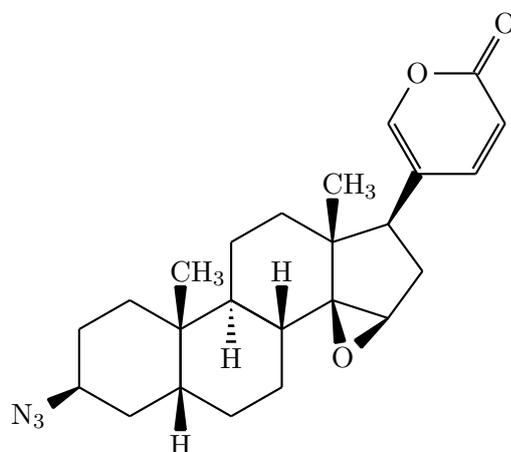
A.52. 42C



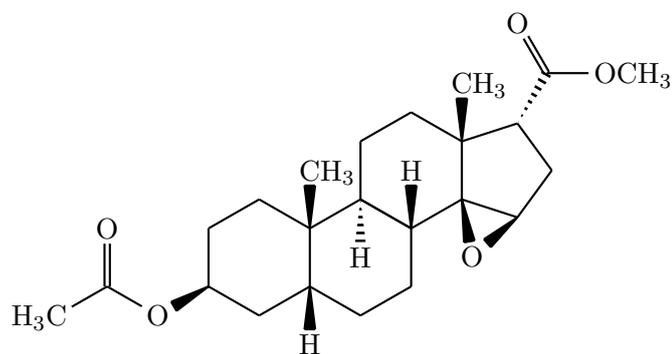
A.53. 51D



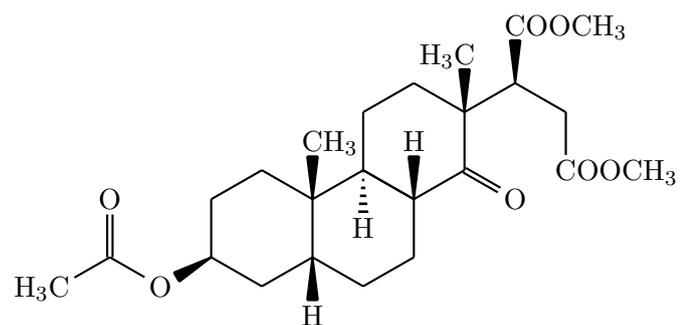
A.54. 52I



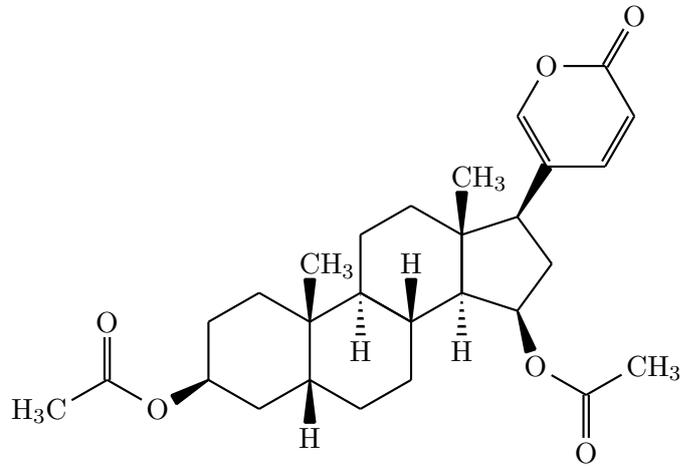
A.55. 54E



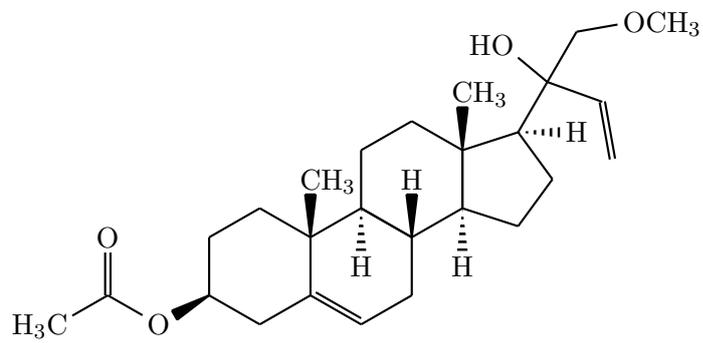
A.56. 54Ee



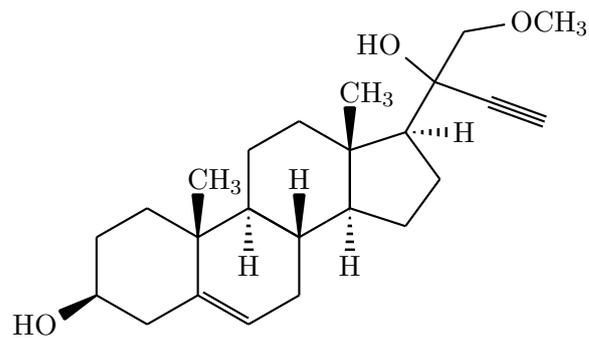
A.57. 54v



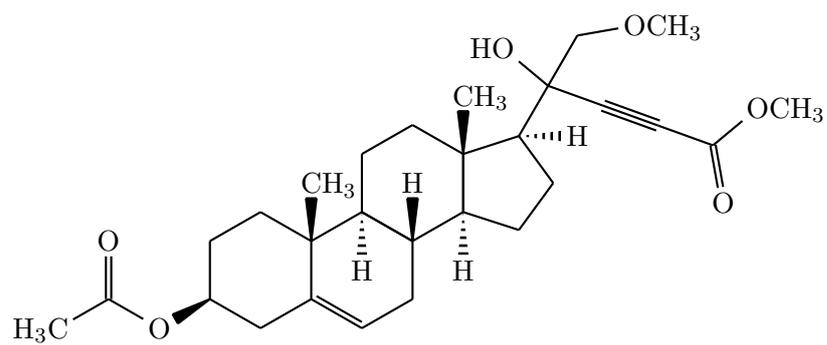
A.58. 62A



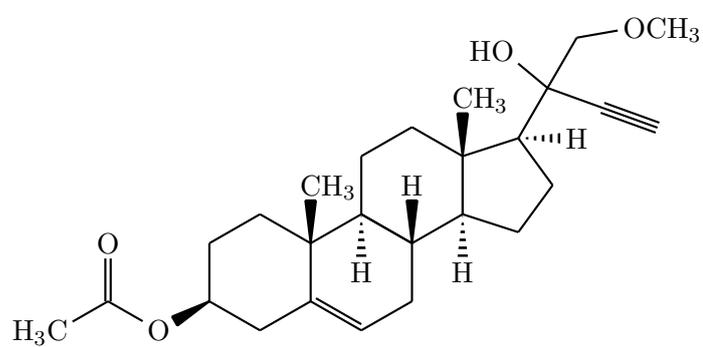
A.59. 62F



A.60. 62I



A.61. 62J



B. Spektren

10Q	S.93	15c	S.133
10S	S.94	4I	S.135
10D.....	S.95	4L	S.137
2M	S.96	7B	S.139
15d	S.97	12A	S.140
22D	S.98	14D	S.142
60K	S.99	15B.....	S.145
2P	S.100	15C	S.148
Hel3.....	S.102	15D	S.152
10O	S.104	15H	S.155
10J	S.105	15S.....	S.157
32A	S.106	20F.....	S.160
21E	S.107	22N.....	S.162
15i.....	S.109	26K	S.165
2c	S.112	27F	S.169
Hel1.....	S.113	28K	S.172
10U	S.114	29b.....	S.174
5F	S.115	29C	S.176
16D.....	S.116	30M	S.179
6B	S.117	35B	S.181
12B	S.118	42C	S.182
48J	S.119	51D	S.186
19A.....	S.121	52I	S.189
2C	S.122	54E.....	S.190
Hel4	S.123	54Ee.....	S.194
Hel2.....	S.124	54v	S.196
2G	S.125	62A.....	S.199
7E	S.126	62F.....	S.202
10I	S.128	62I	S.205
5D	S.130	62J	S.208
16G.....	S.131		

B.1. 10Q

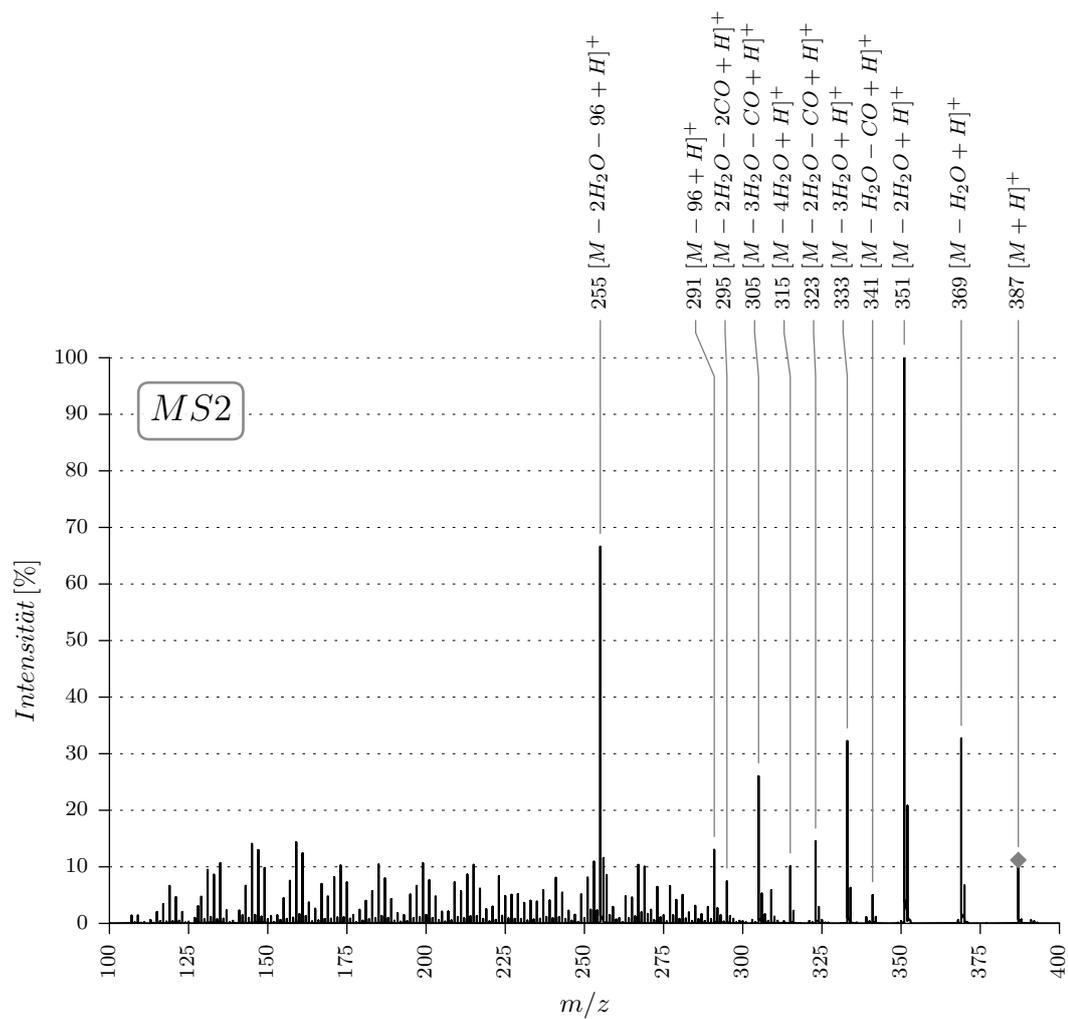
Trivialname: Bufalin

Summenformel: $C_{24}H_{34}O_4$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β)-3,14-Dihydroxy-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 465-21-4

Molekulargewicht: 386



B.2. 10S

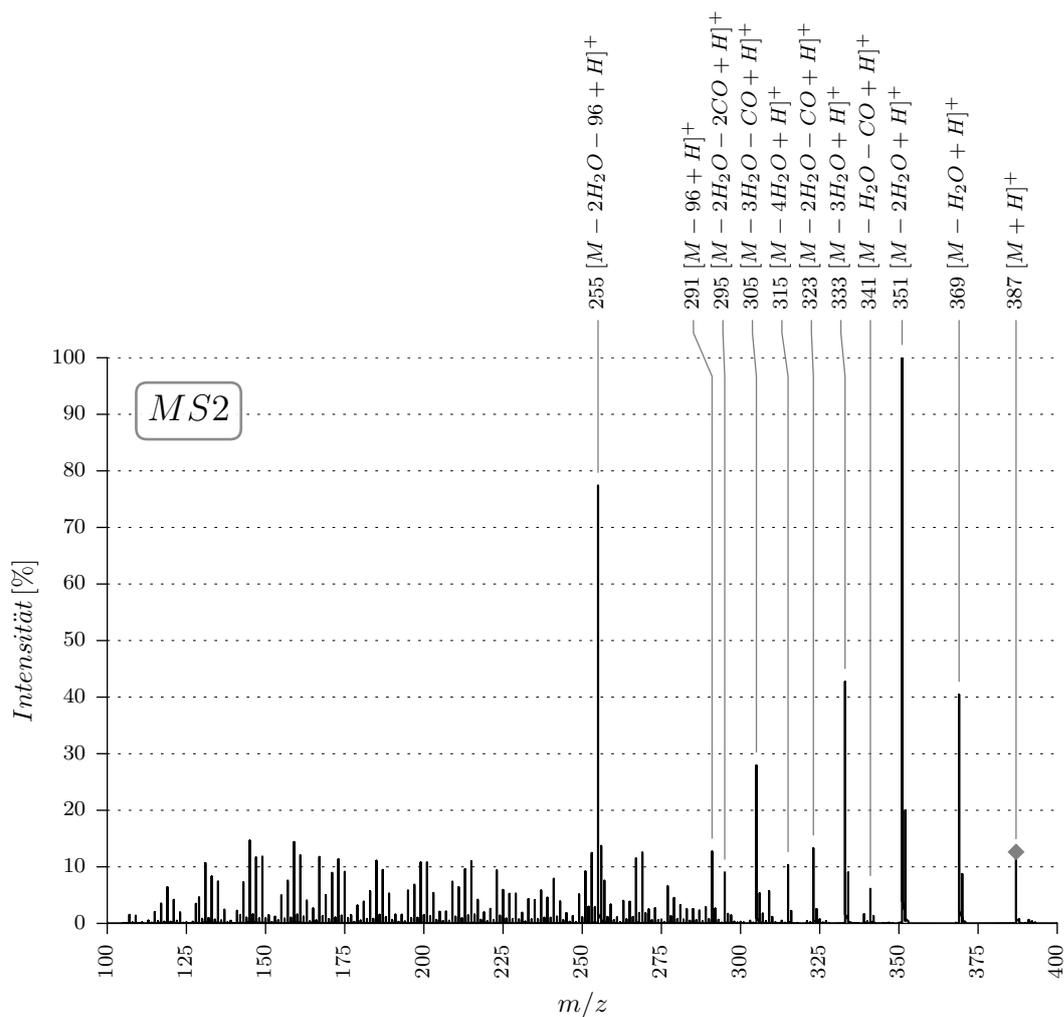
Trivialname: 3α Bufalin

Summenformel: $C_{24}H_{34}O_4$

Chem. Bezeichnung: $(3\alpha,5\beta)$ -3,14-Dihydroxy-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 465-20-3

Molekulargewicht: 386



B.3. 10D

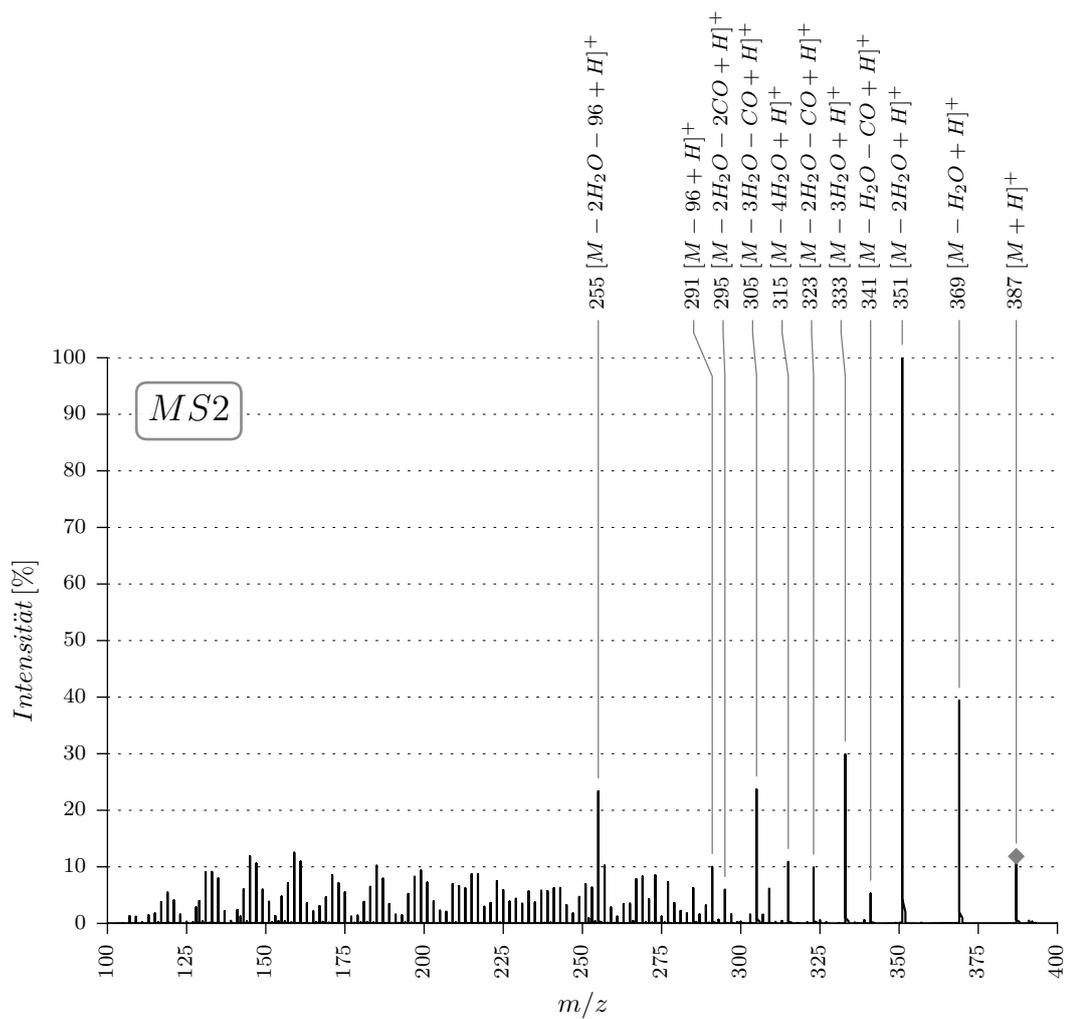
Trivialname: 3β 5α Bufalin

Summenformel: $C_{24}H_{34}O_4$

Chem. Bezeichnung: $(3\beta,5\alpha)$ -3,14-Dihydroxy-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 33766-62-0

Molekulargewicht: 386



B.4. 2M

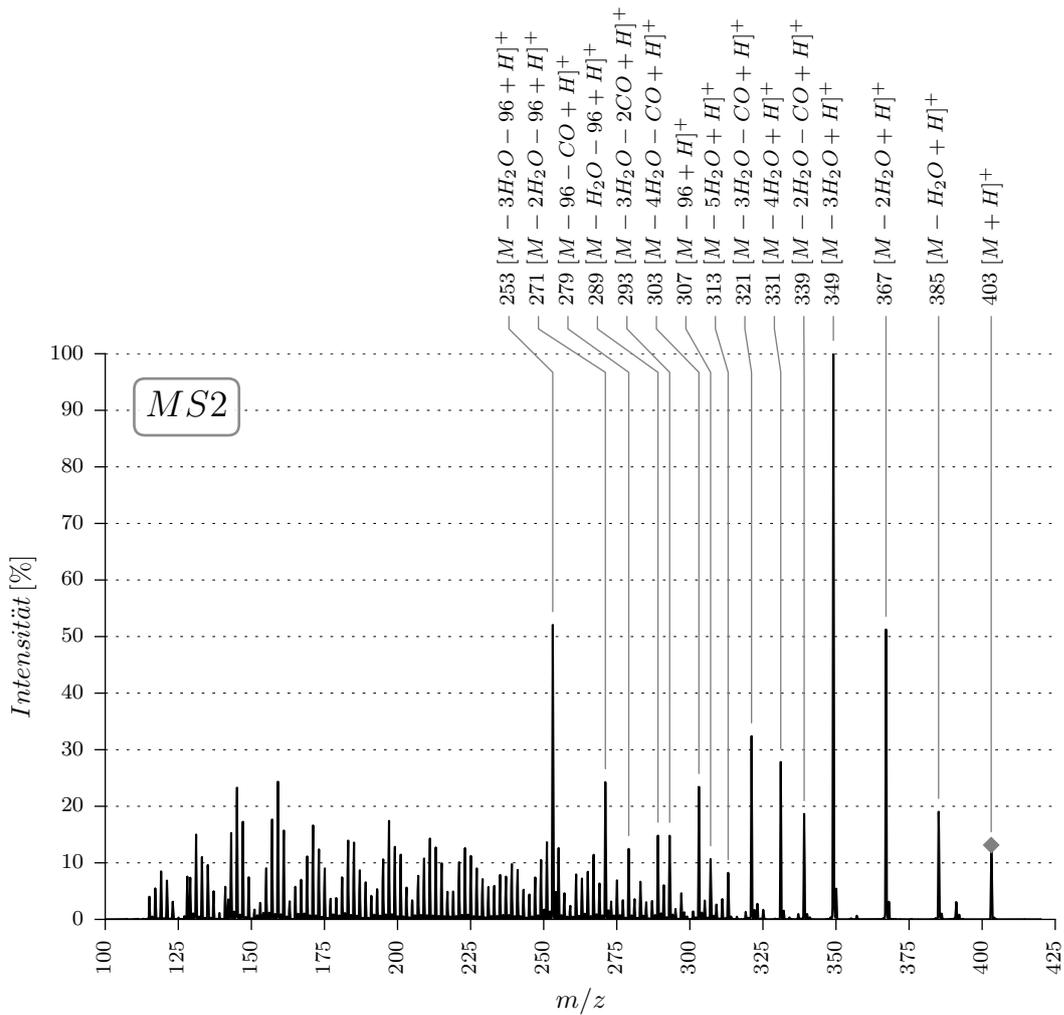
Trivialname: Gamabufotalin

Summenformel: $C_{24}H_{34}O_5$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,11 α)-3,11,14-Trihydroxy-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 0465-11-02

Molekulargewicht: 402



B.5. 15d

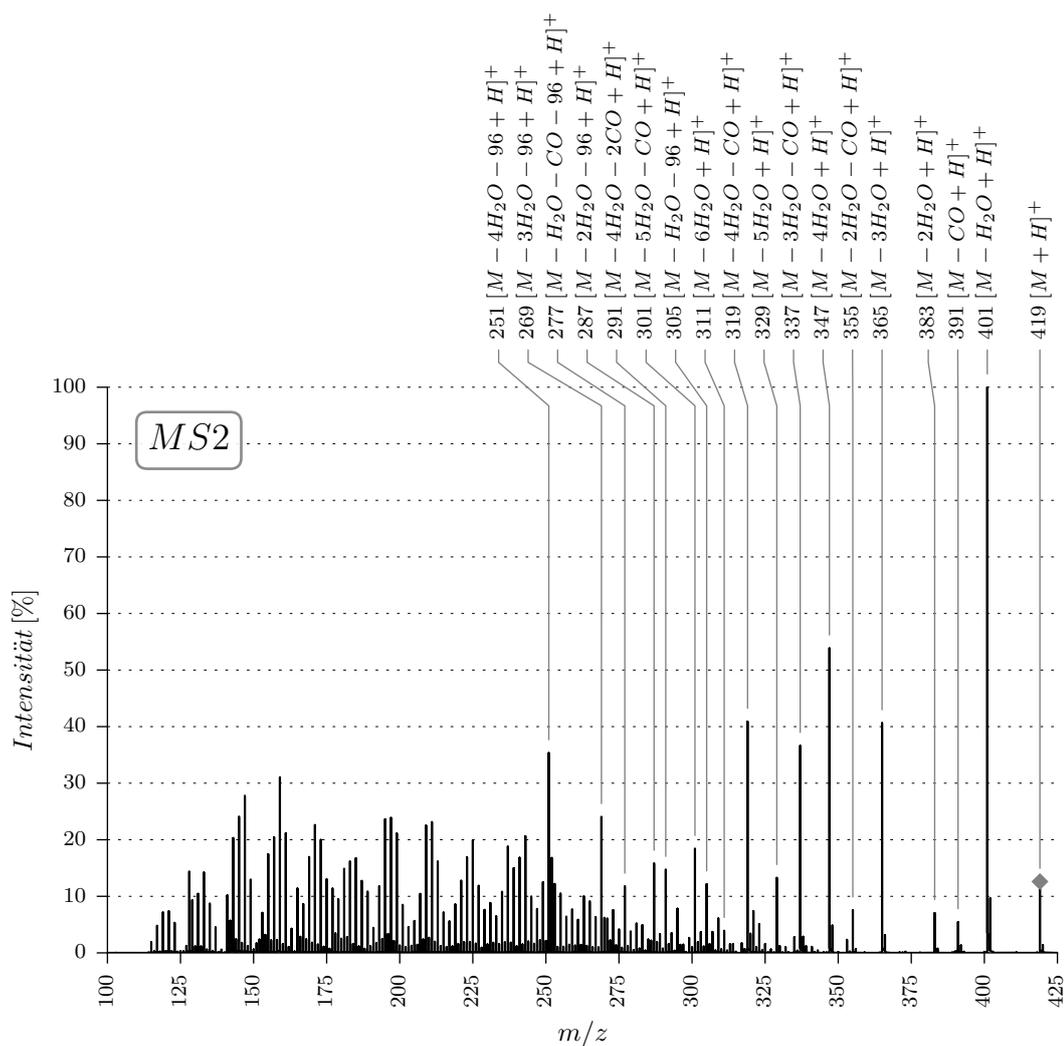
Trivialname: Dihydroxybufalin

Summenformel: $C_{24}H_{34}O_6$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,11 α ,12 β)-3,11,12,14-Tetrahydroxy-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 51227-38-4

Molekulargewicht: 418



B.6. 22D

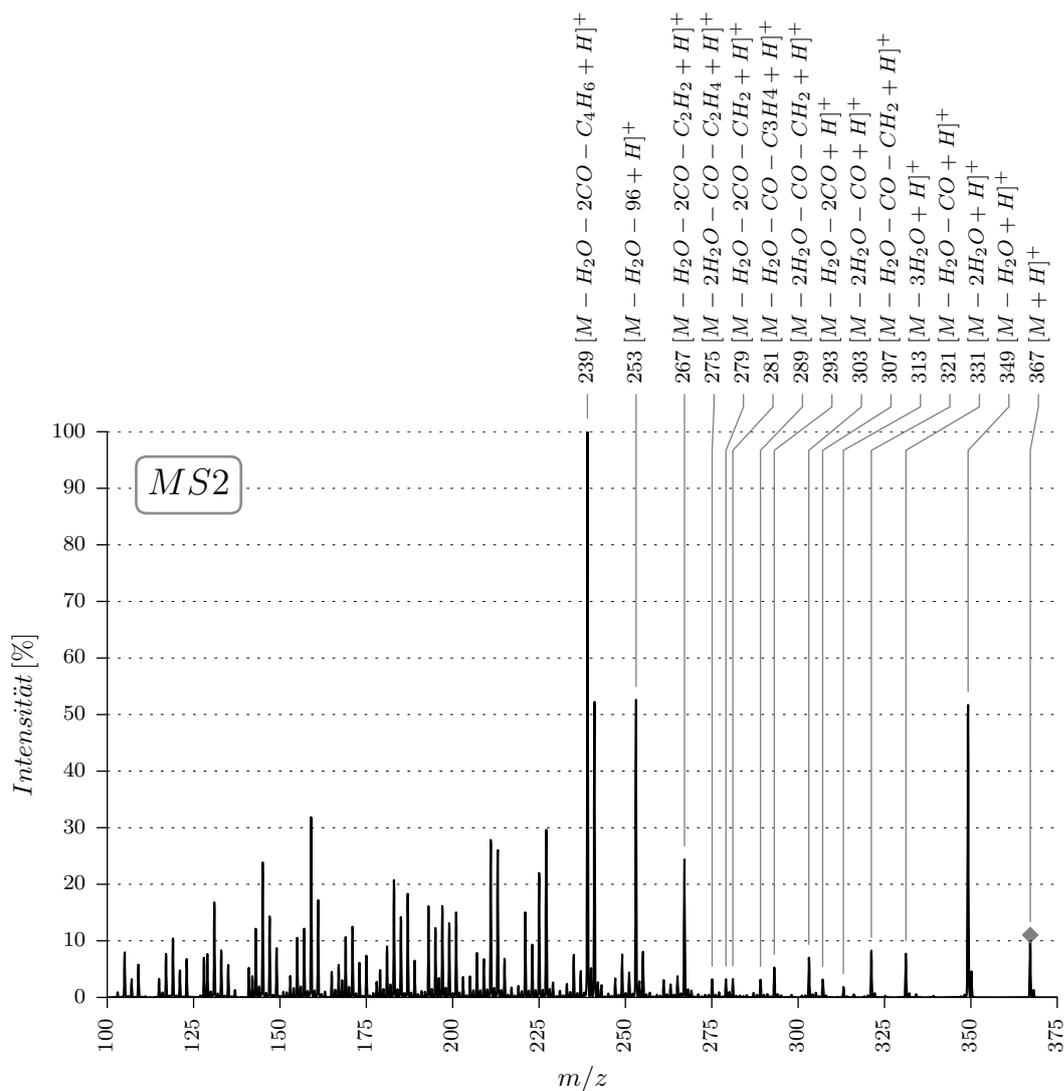
Trivialname: Bufotalien

Summenformel: $C_{24}H_{30}O_3$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β)-3-Hydroxy-bufa-14,16,20,22-tetraenolide

CAS-Nummer: 474-53-3

Molekulargewicht: 366



B.7. 60K

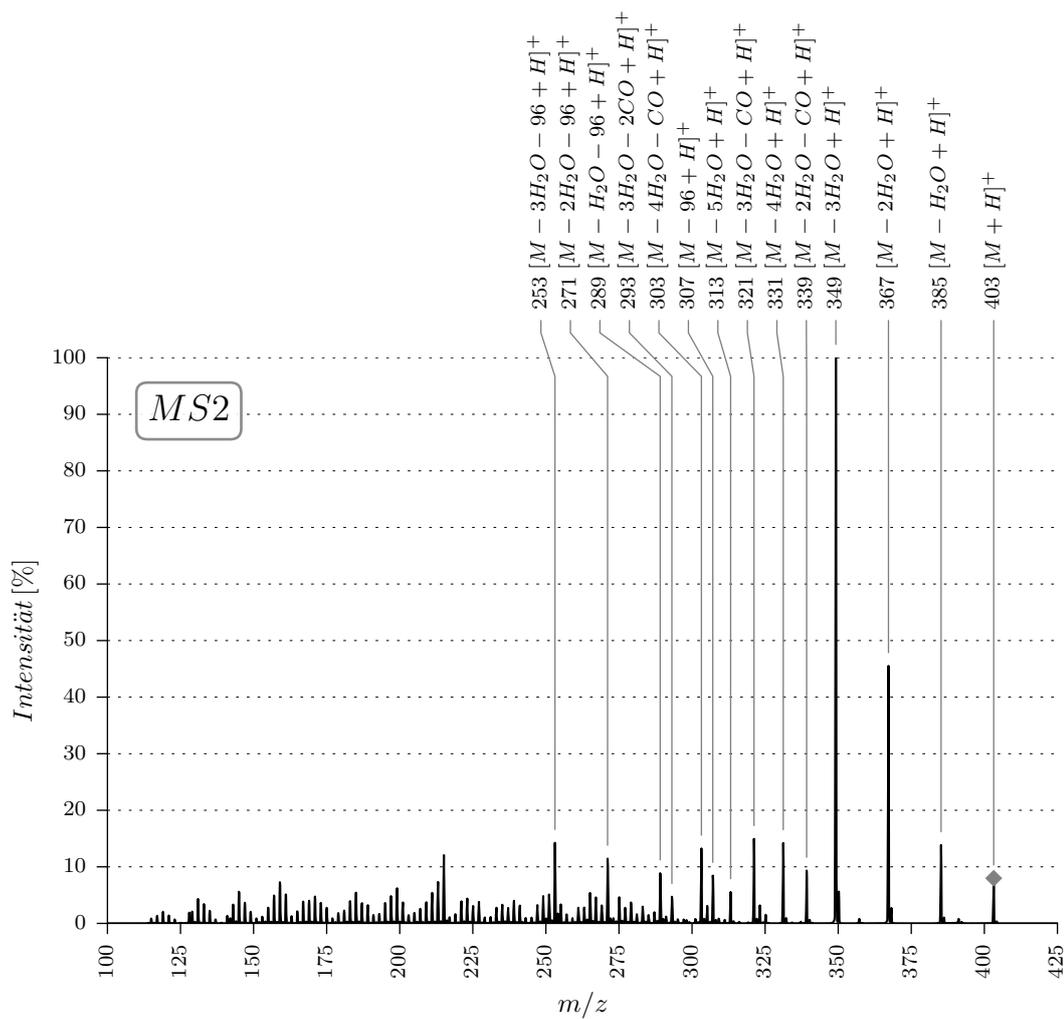
Trivialname: Telocinobufagin

Summenformel: $C_{24}H_{34}O_5$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β)-3,5,14-Trihydroxy-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 472-26-4

Molekulargewicht: 402



B.8. 2P

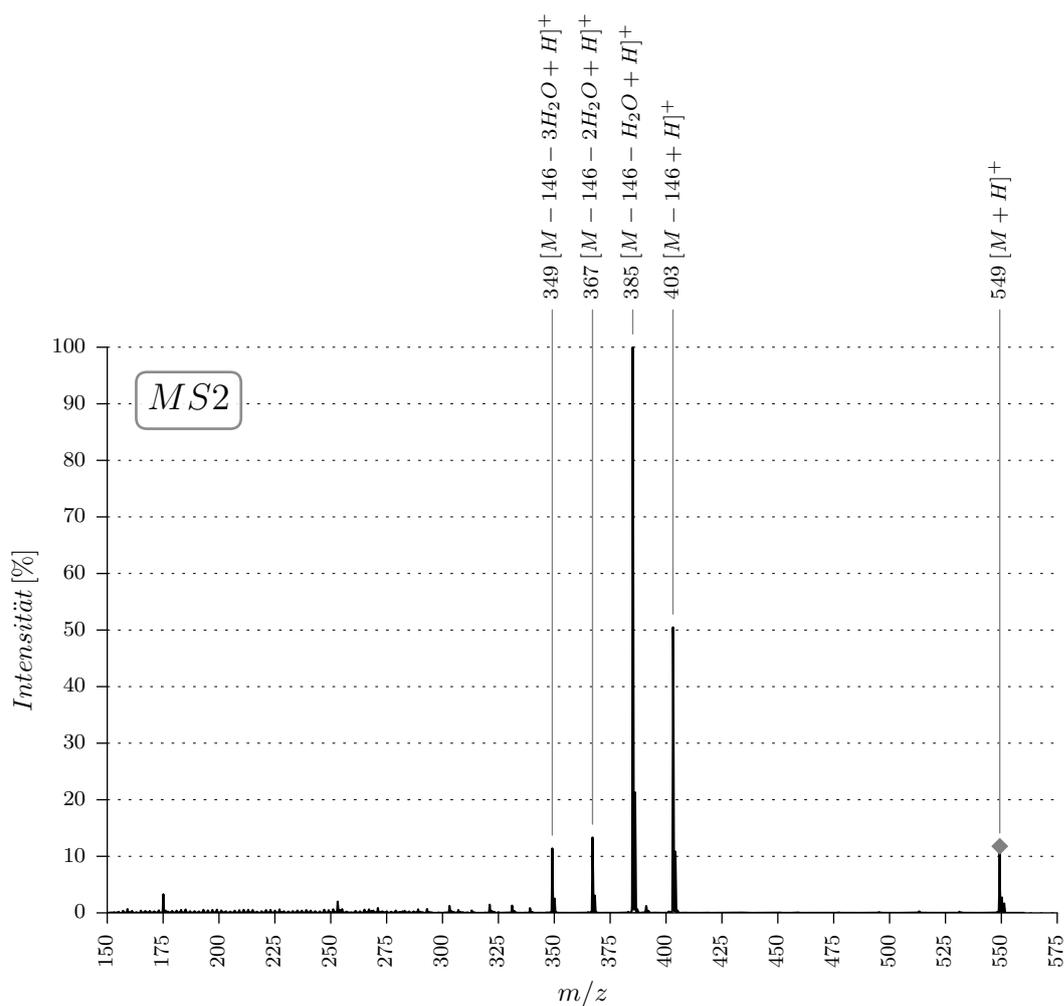
Trivialname: Gamabufotalinrhamnosid

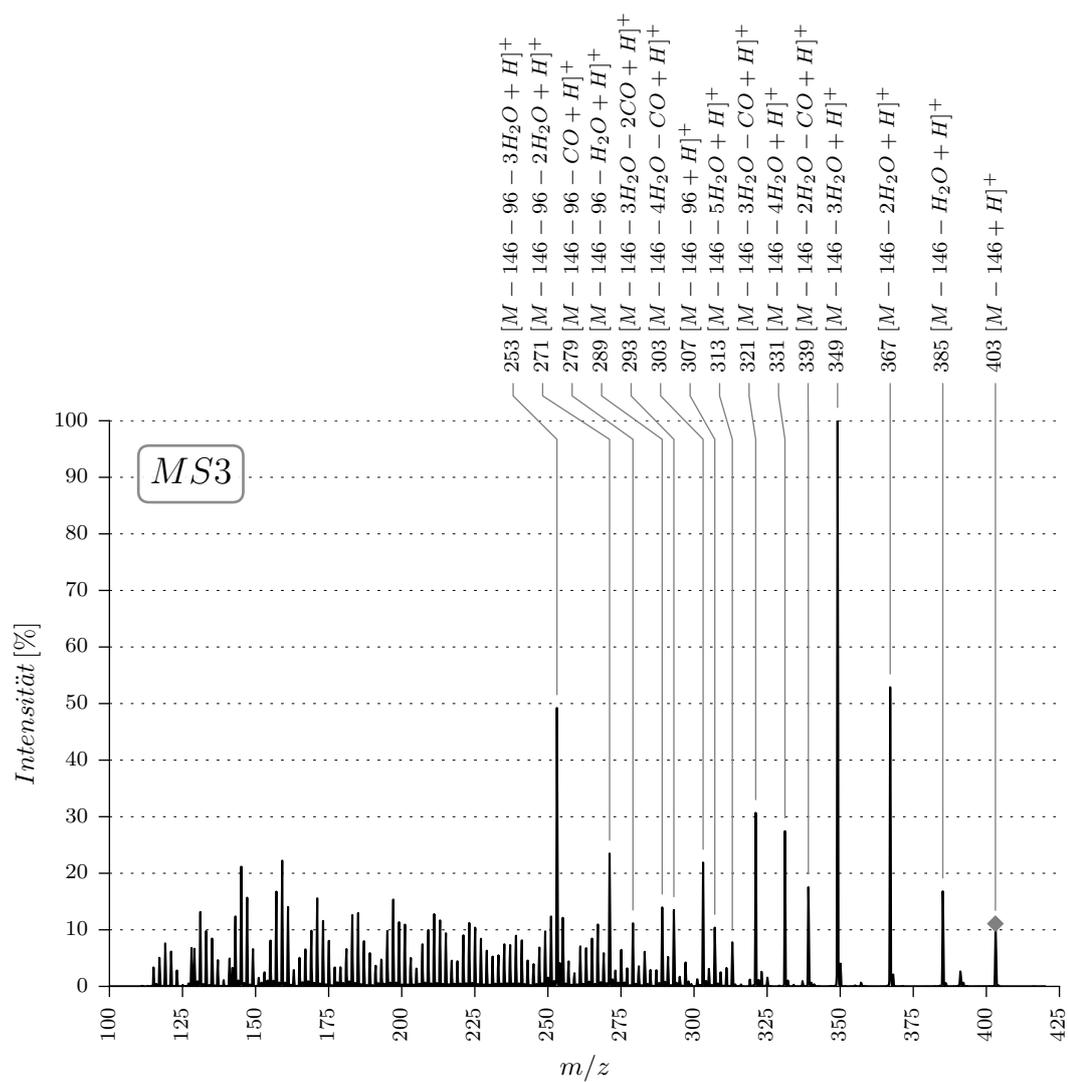
Summenformel: $C_{30}H_{44}O_9$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,11 α)-3-[(6-Deoxy- α -l-mannopyranosyl)oxy]-11,14-dihydroxy-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 85684-33-9

Molekulargewicht: 548





B.9. Hel3

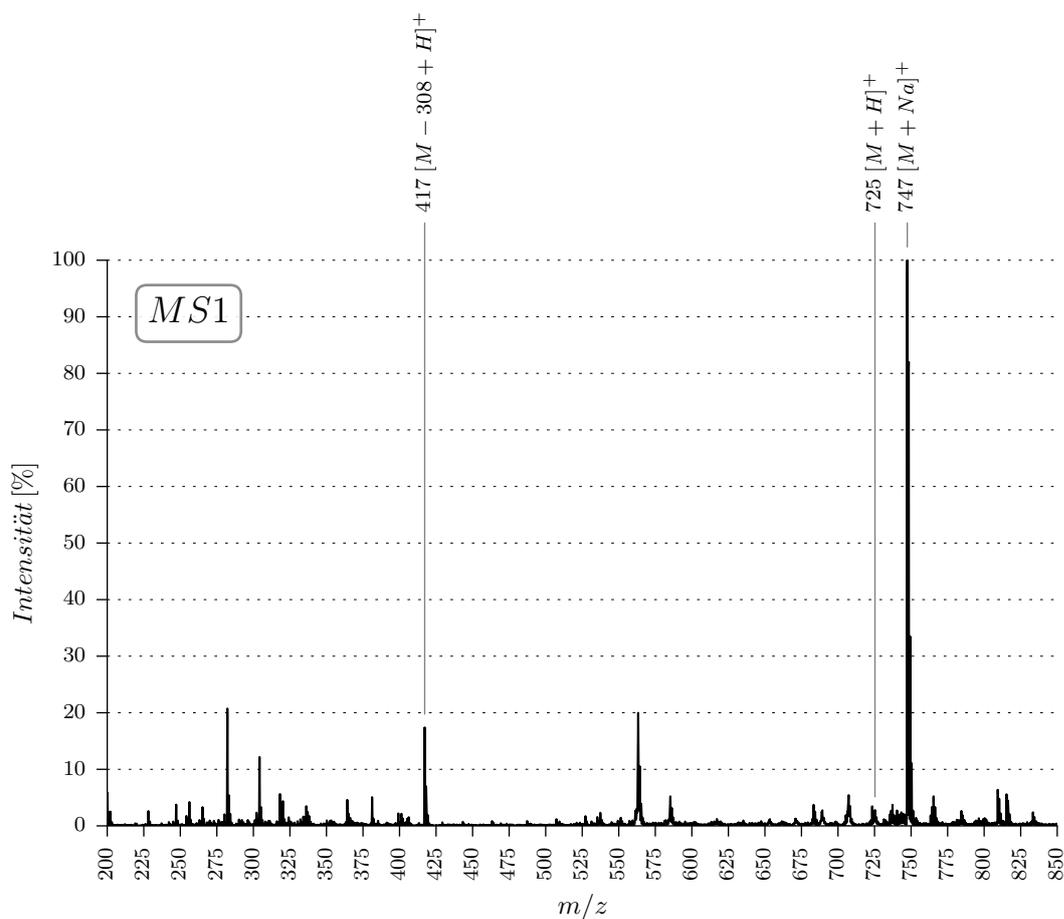
Trivialname: Hellebrin

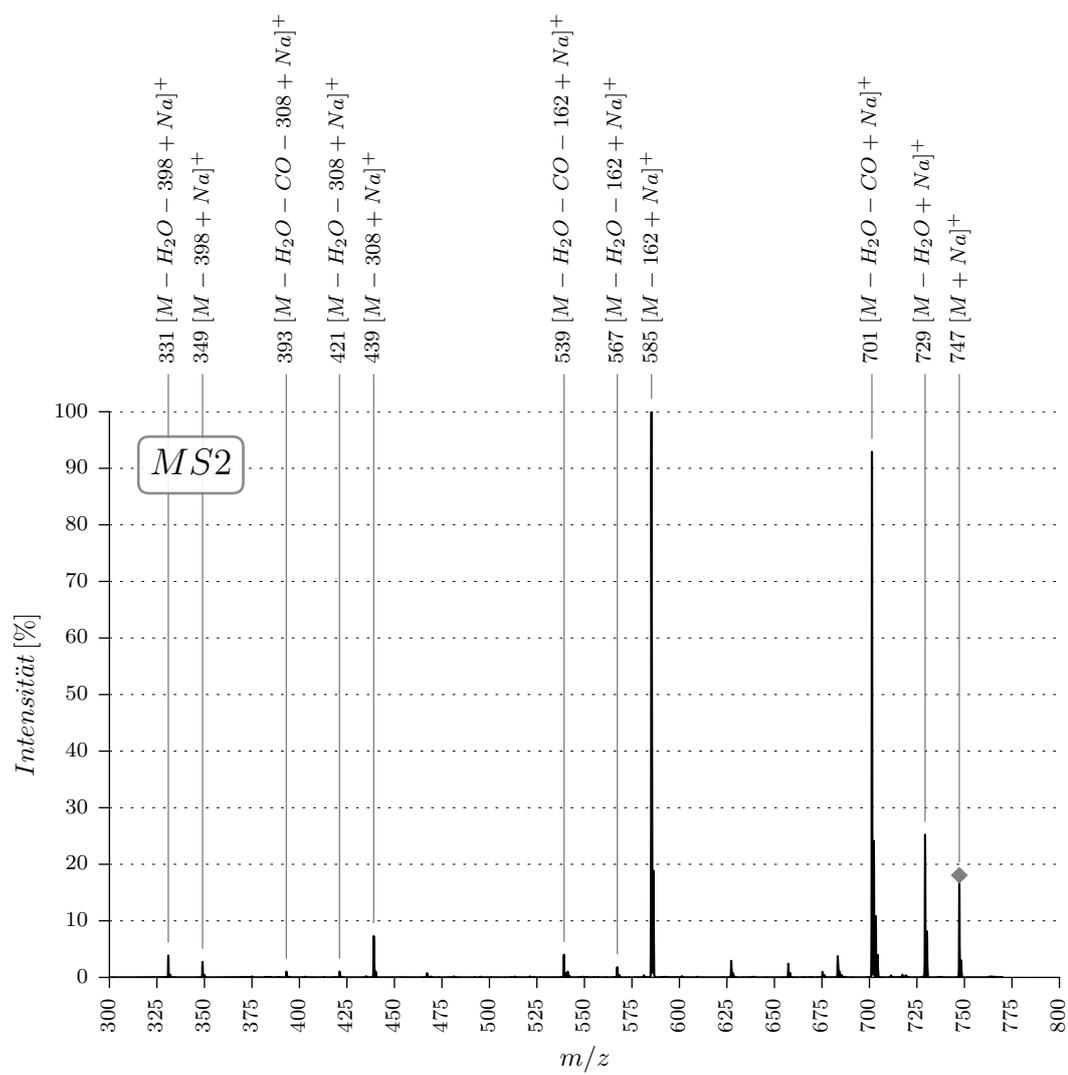
Summenformel: $C_{36}H_{52}O_{15}$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β)-3-[(6-Desoxy-4-O- β -d-glucopyranosyl- α -l-mannopyranosyl)oxy]-5,14-dihydroxy-19-oxo-bufa-20,22-dienolide

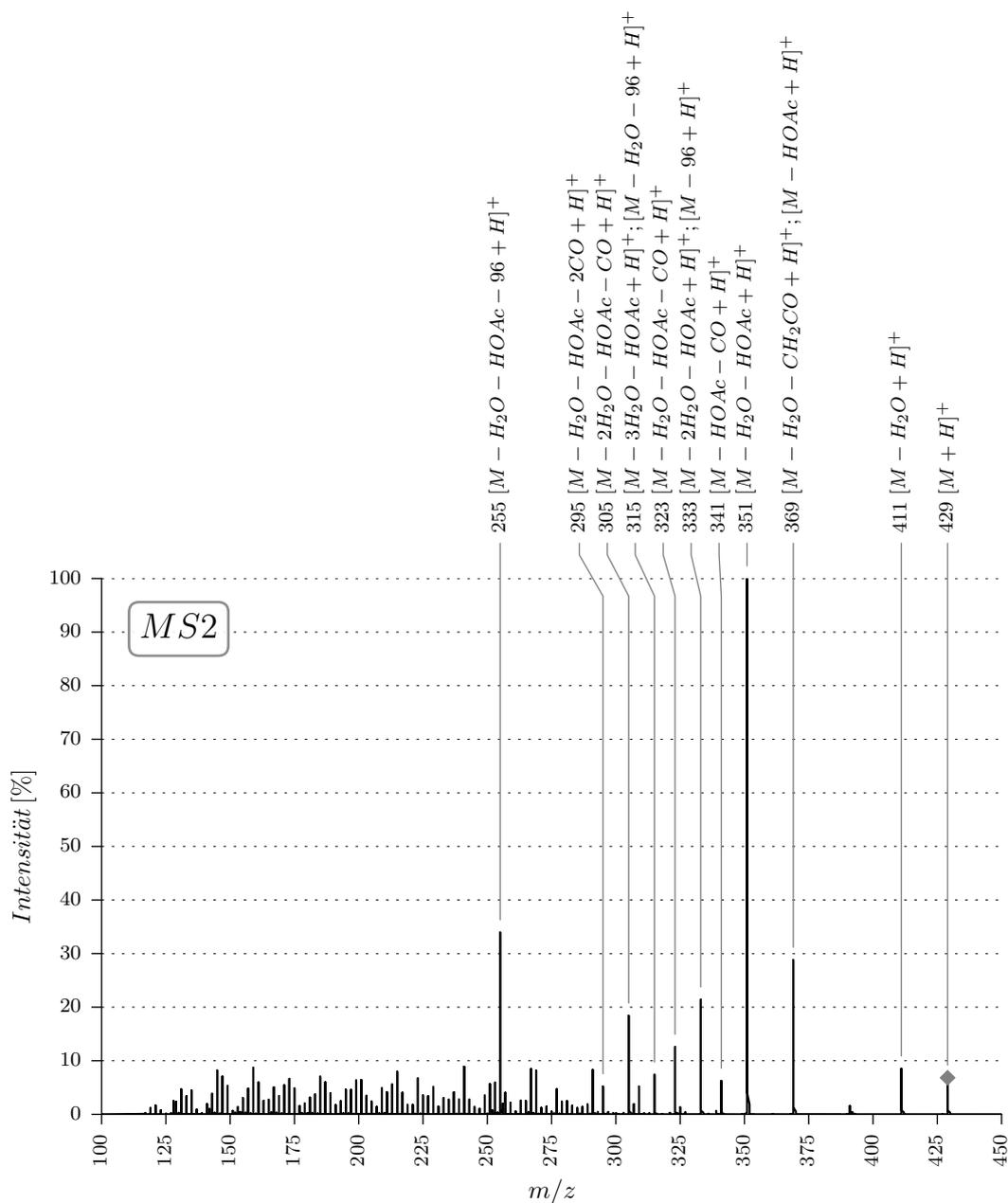
CAS-Nummer: 13289-18-4

Molekulargewicht: 724





B.10. 100

Trivialname: Bufalinacetat**Summenformel:** $C_{26}H_{36}O_5$ **Chem. Bezeichnung:** (3 β ,5 β)-3-(Acetyloxy)-14-hydroxy-bufa-20,22-dienolide**CAS-Nummer:** 4029-66-7**Molekulargewicht:** 428

B.11. 10J

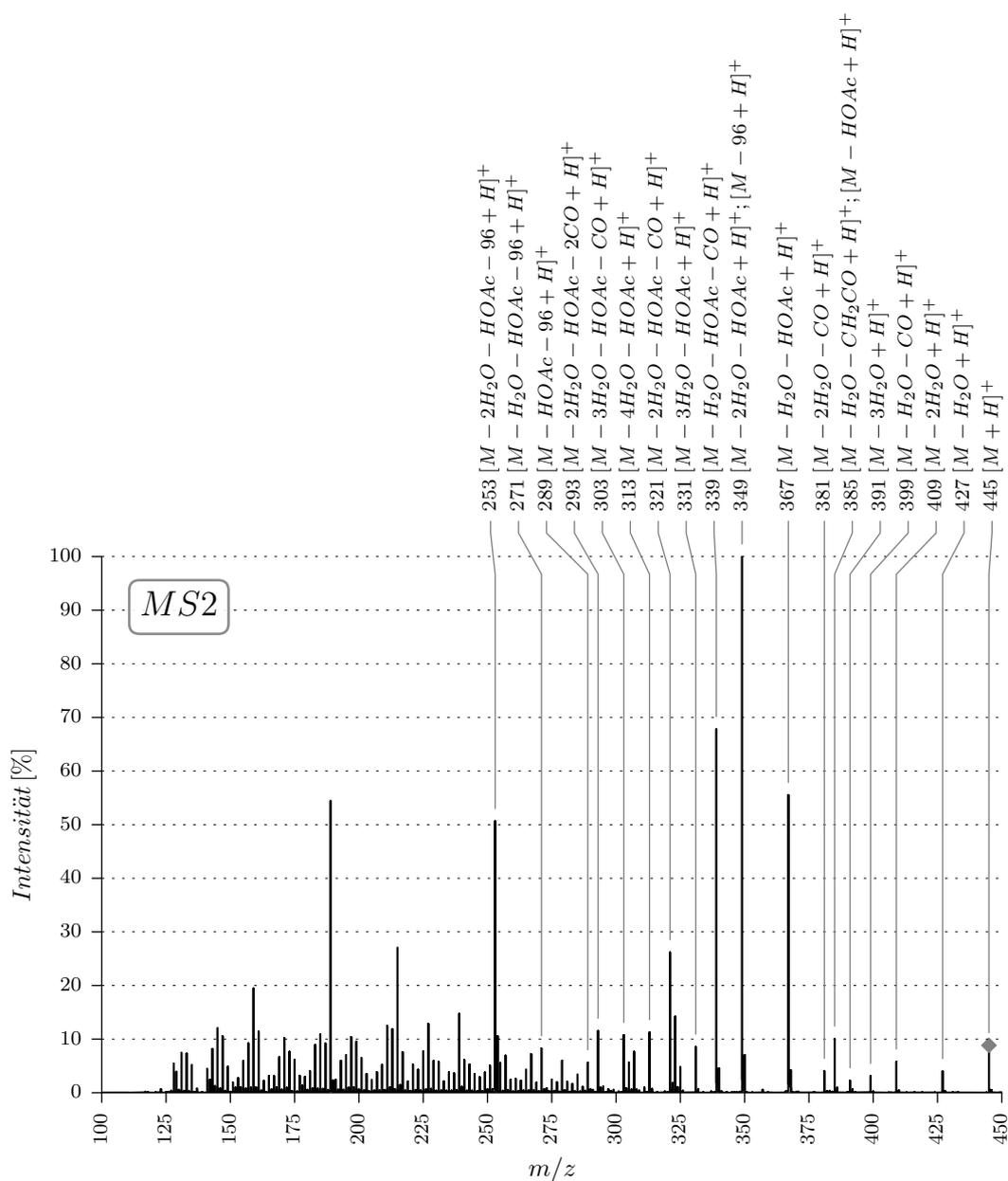
Trivialname: 3 β OAc 15 β OH Bufalin

Summenformel: C₂₆H₃₆O₆

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,15 α)-3-(Acetyloxy)-14,15-dihydroxy-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 4534-19-4

Molekulargewicht: 444



B.12. 32A

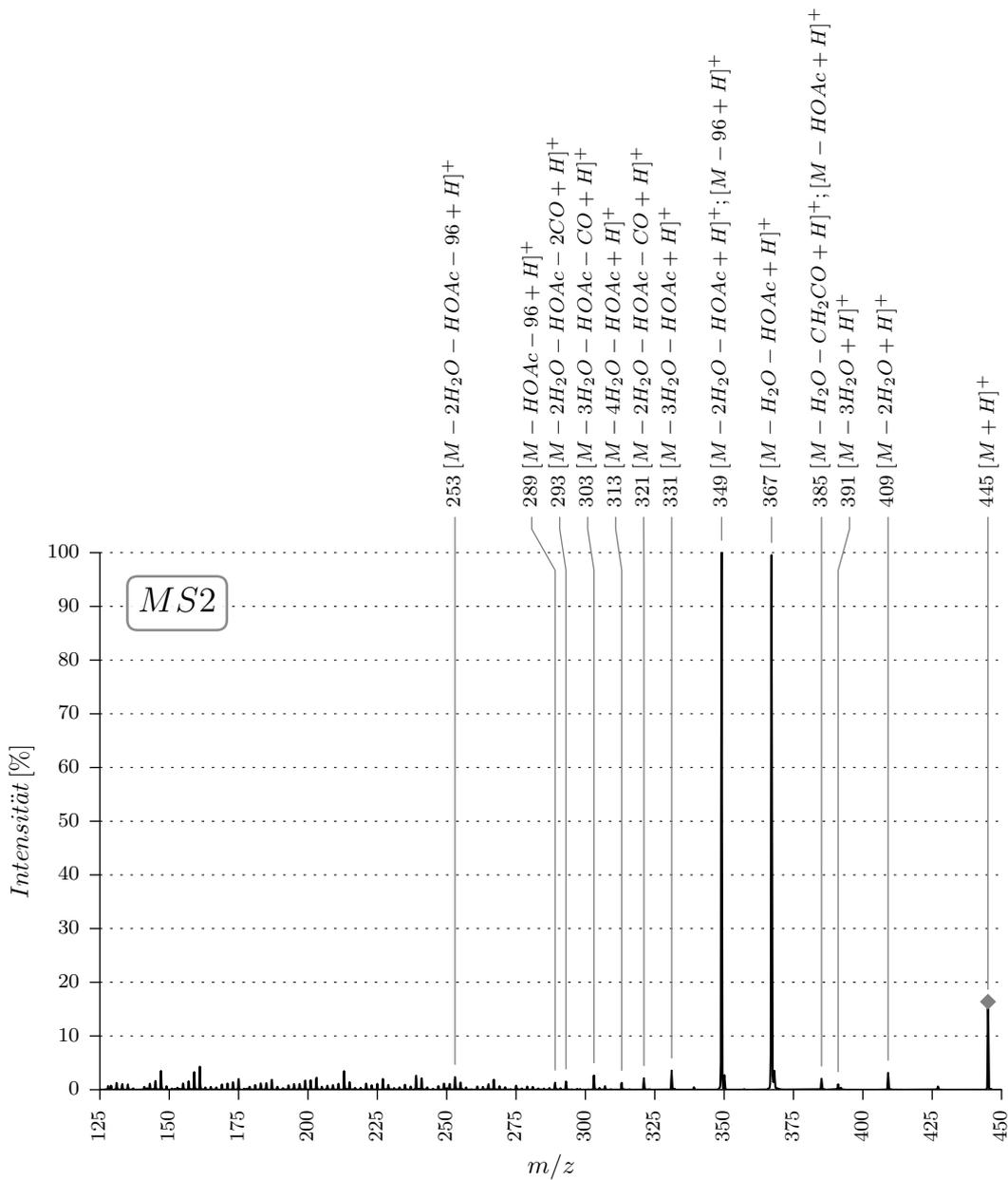
Trivialname: Bufotalin

Summenformel: $C_{26}H_{36}O_6$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,14 β ,16 β ,17 β)-16-(Acetyloxy)-3,14-dihydroxy-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 471-95-4

Molekulargewicht: 444



B.13. 21E

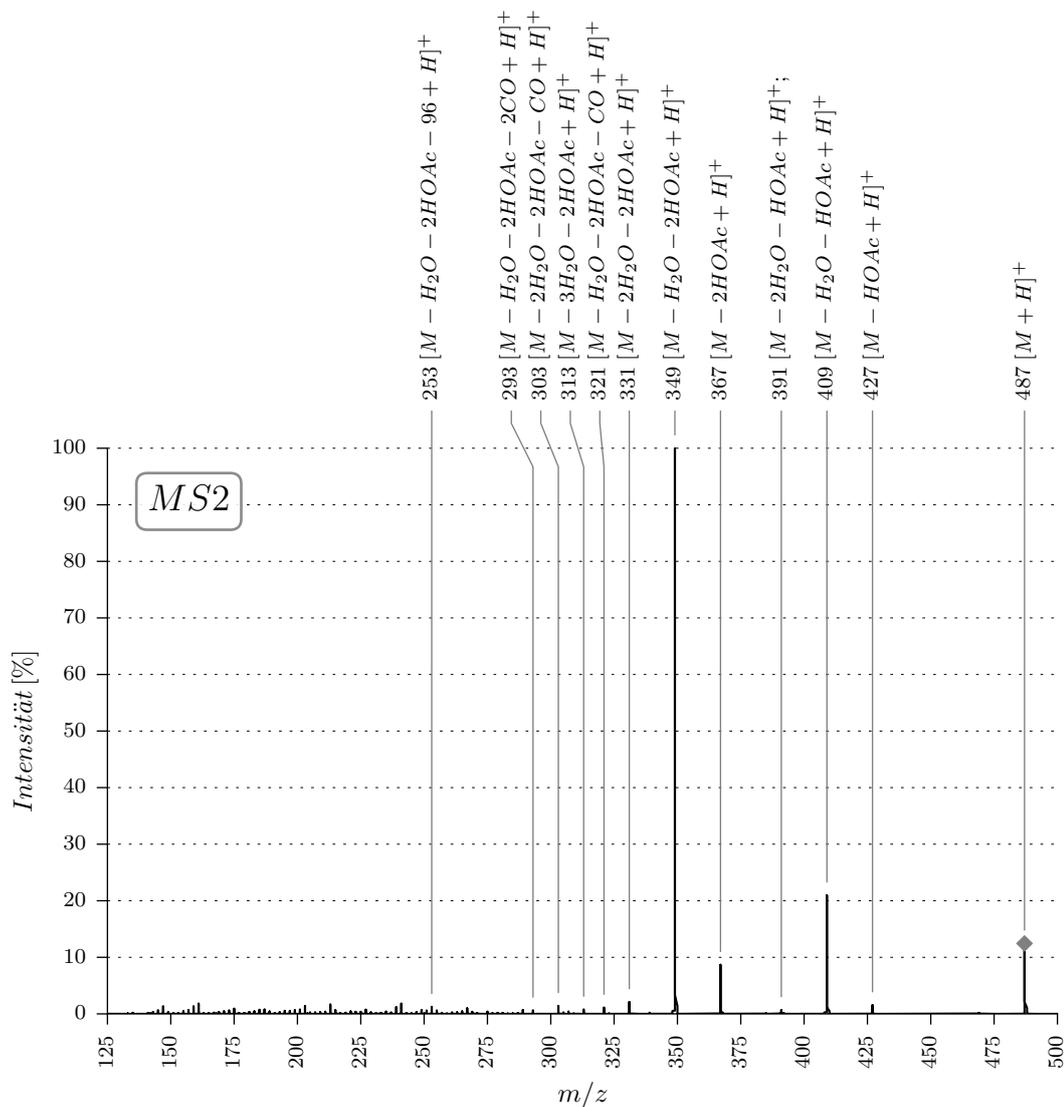
Trivialname: Bufotalinacetat

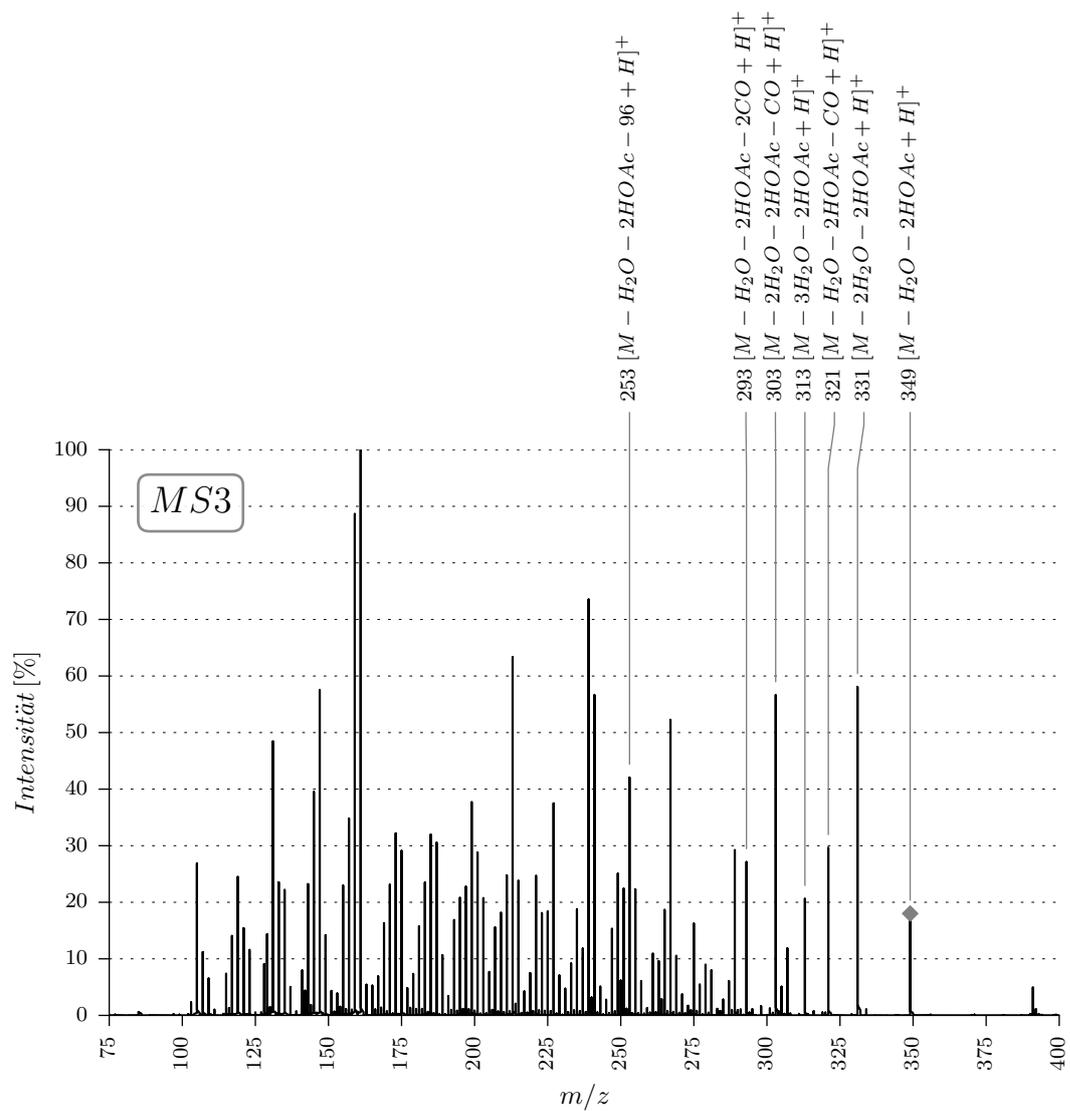
Summenformel: $C_{28}H_{38}O_7$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,16 β)-3,16-Bis(acetyloxy)-14-hydroxy-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 4029-69-0

Molekulargewicht: 486

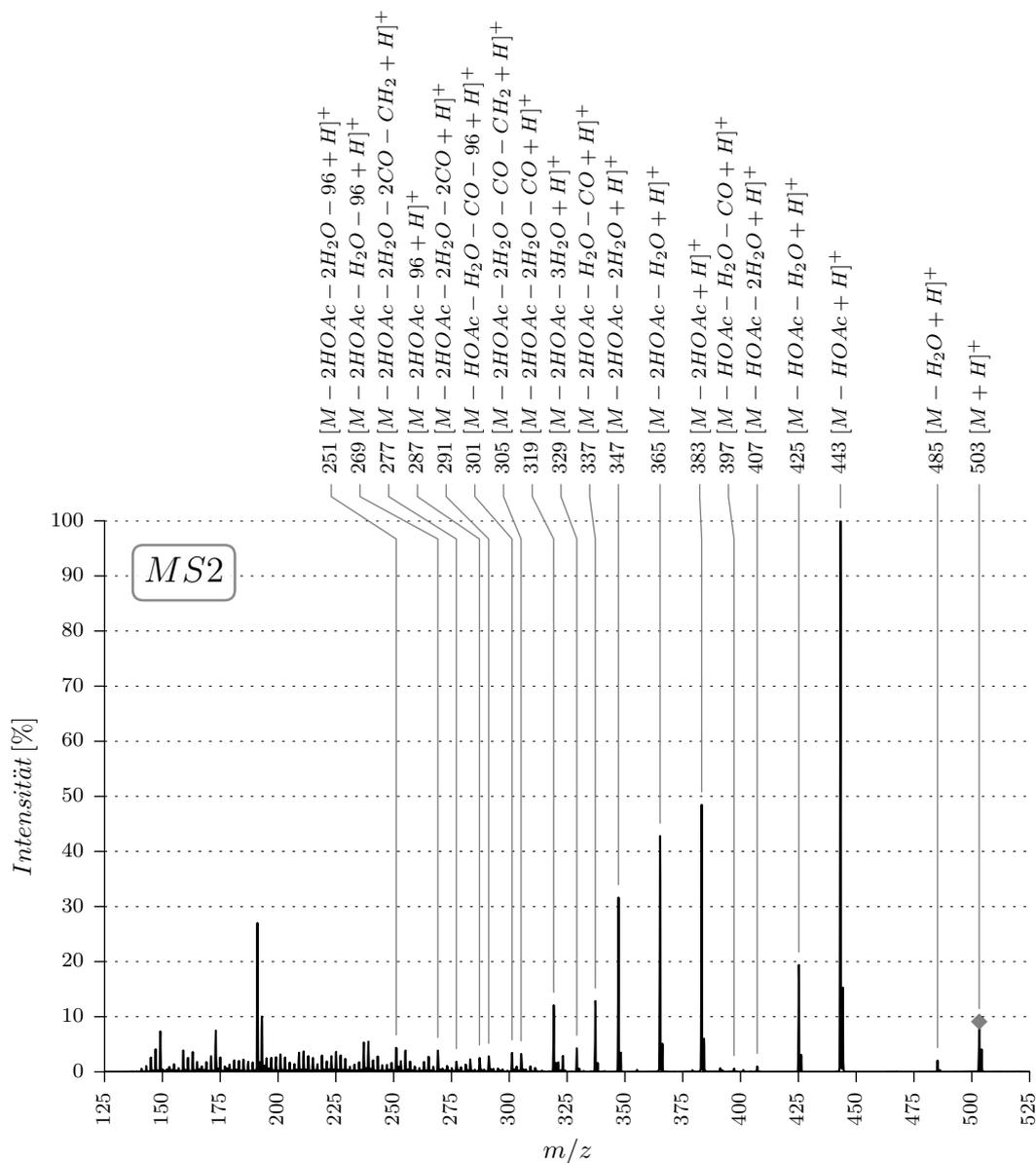


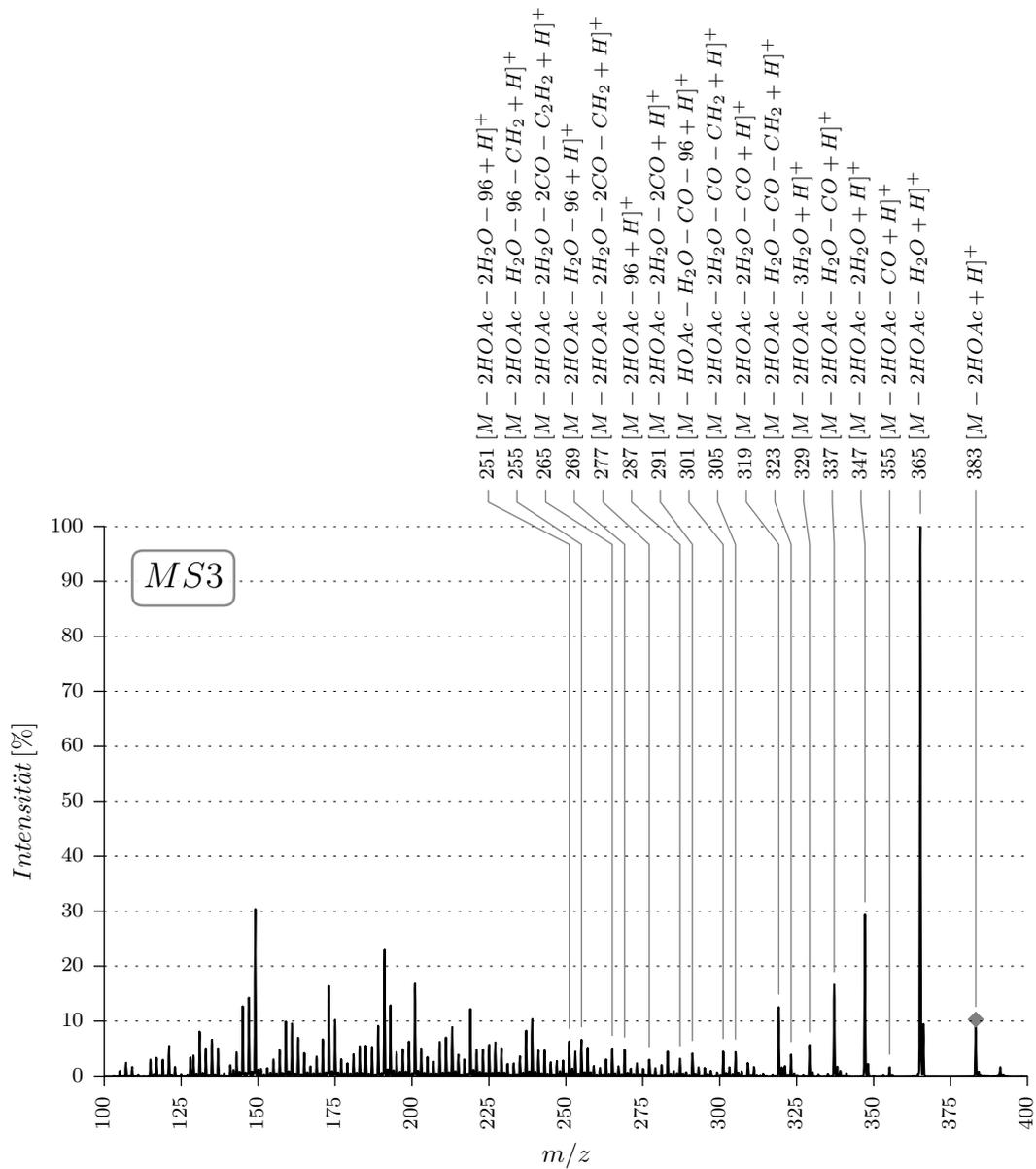


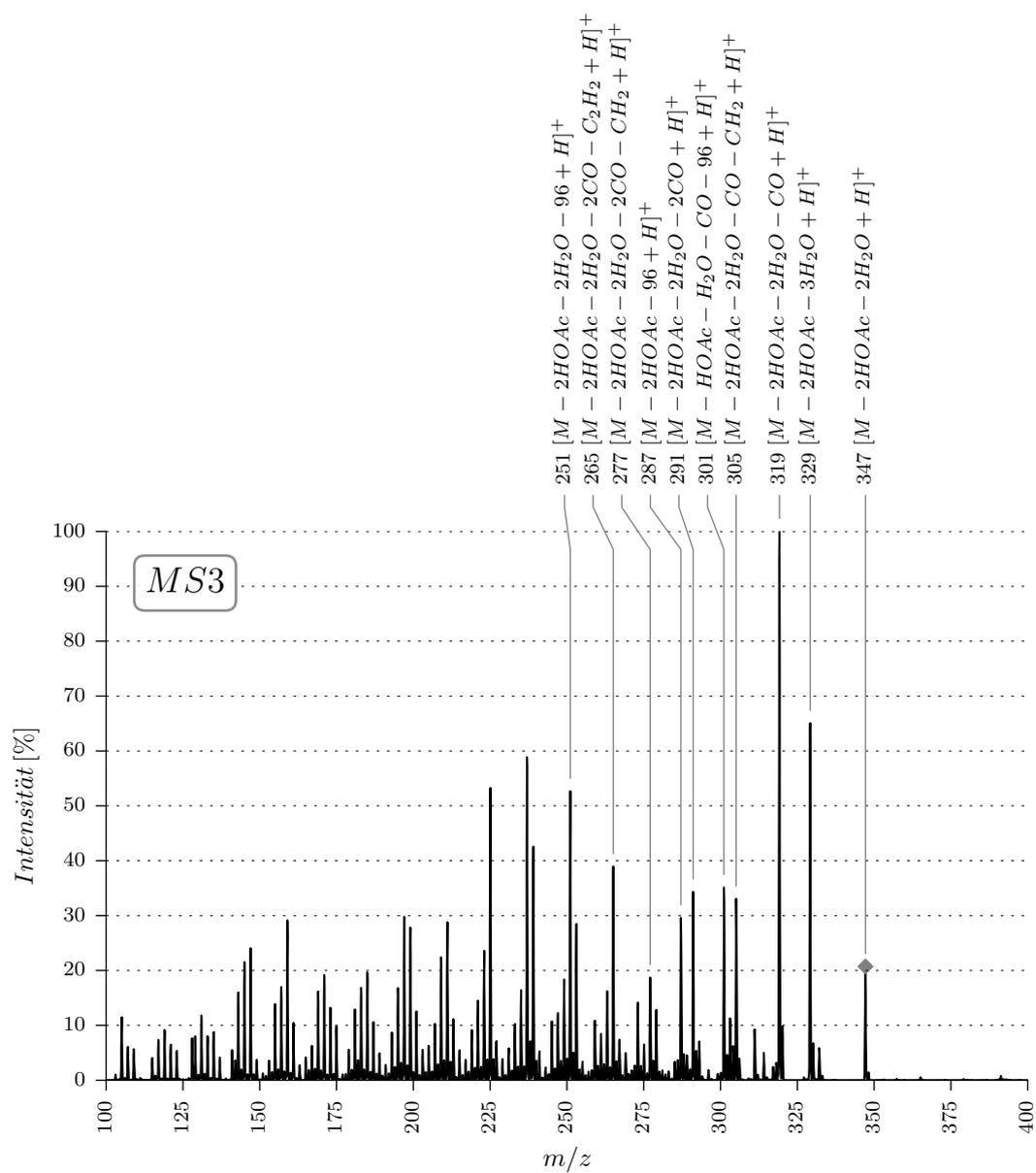
B.14. 15i

Summenformel: $C_{28}H_{38}O_8$ Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,11 α ,12 α ,14 β ,17 β)-3,11-bis(Acetyloxy)-12,14-dihydroxy-bufa-20,22-dienolide

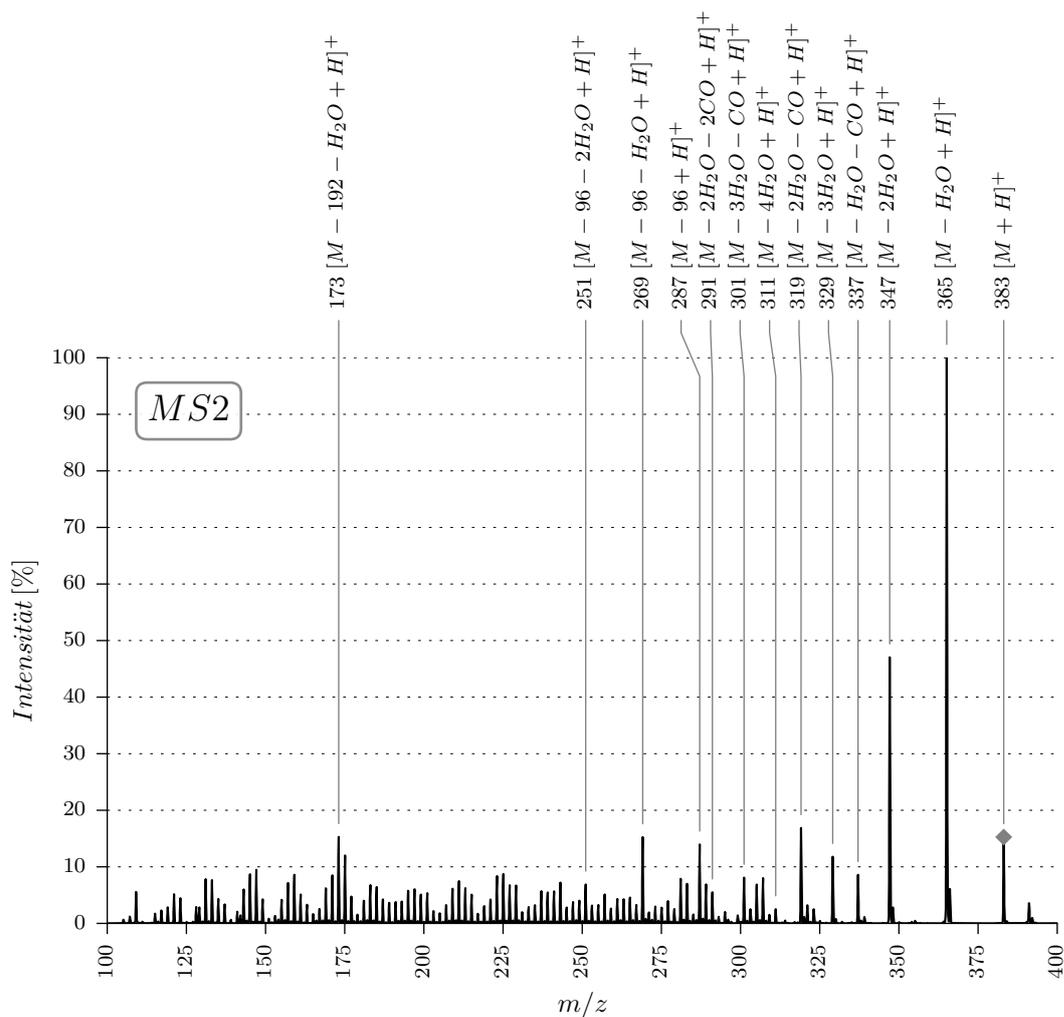
Molekulargewicht: 502







B.15. 2c

Trivialname: Scillarenon**Summenformel:** $C_{24}H_{30}O_4$ **Chem. Bezeichnung:** 14-Hydroxy-3-oxo-bufa-4,20,22-trienolide**CAS-Nummer:** 545-28-8**Molekulargewicht:** 382

B.16. Hel1

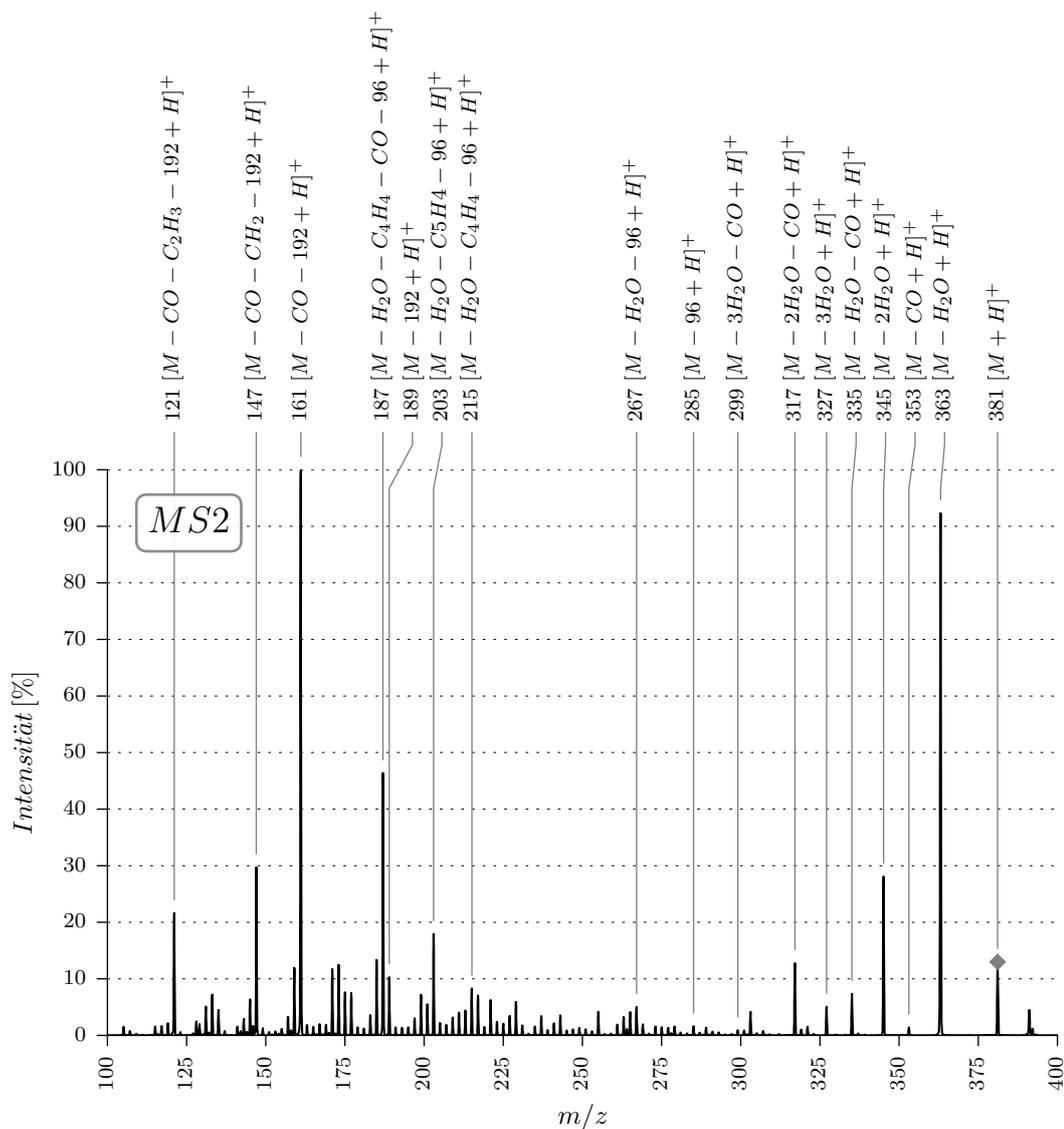
Trivialname: Helleborogenone

Summenformel: $C_{24}H_{28}O_4$

Chem. Bezeichnung: 14-Hydroxy-3-oxo-bufa-1,4,20,22-tetraenolide

CAS-Nummer: 41059-91-0

Molekulargewicht: 380



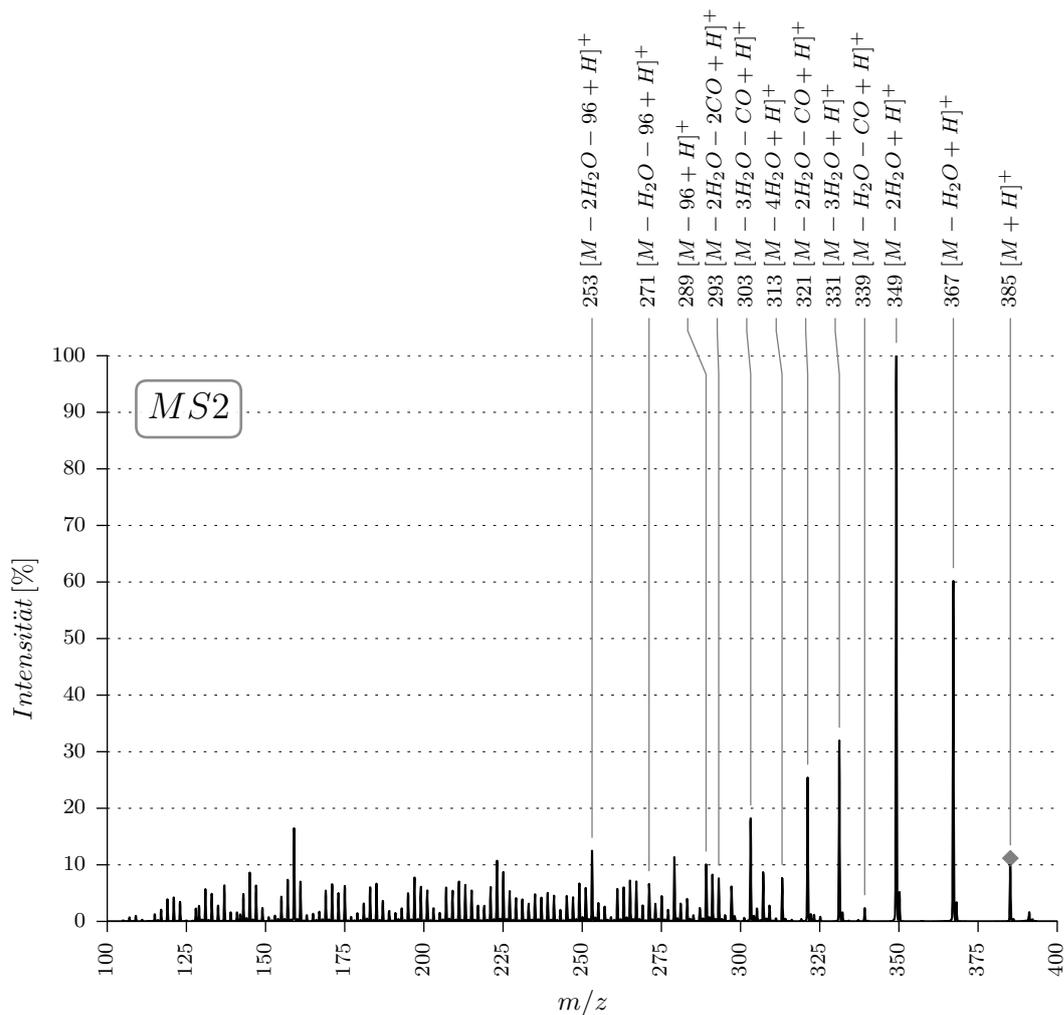
B.17. 10U

Trivialname: Bufalon

Summenformel: $C_{24}H_{32}O_4$ Chem. Bezeichnung: (5 β)-14-Hydroxy-3-oxo-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 4029-65-6

Molekulargewicht: 384



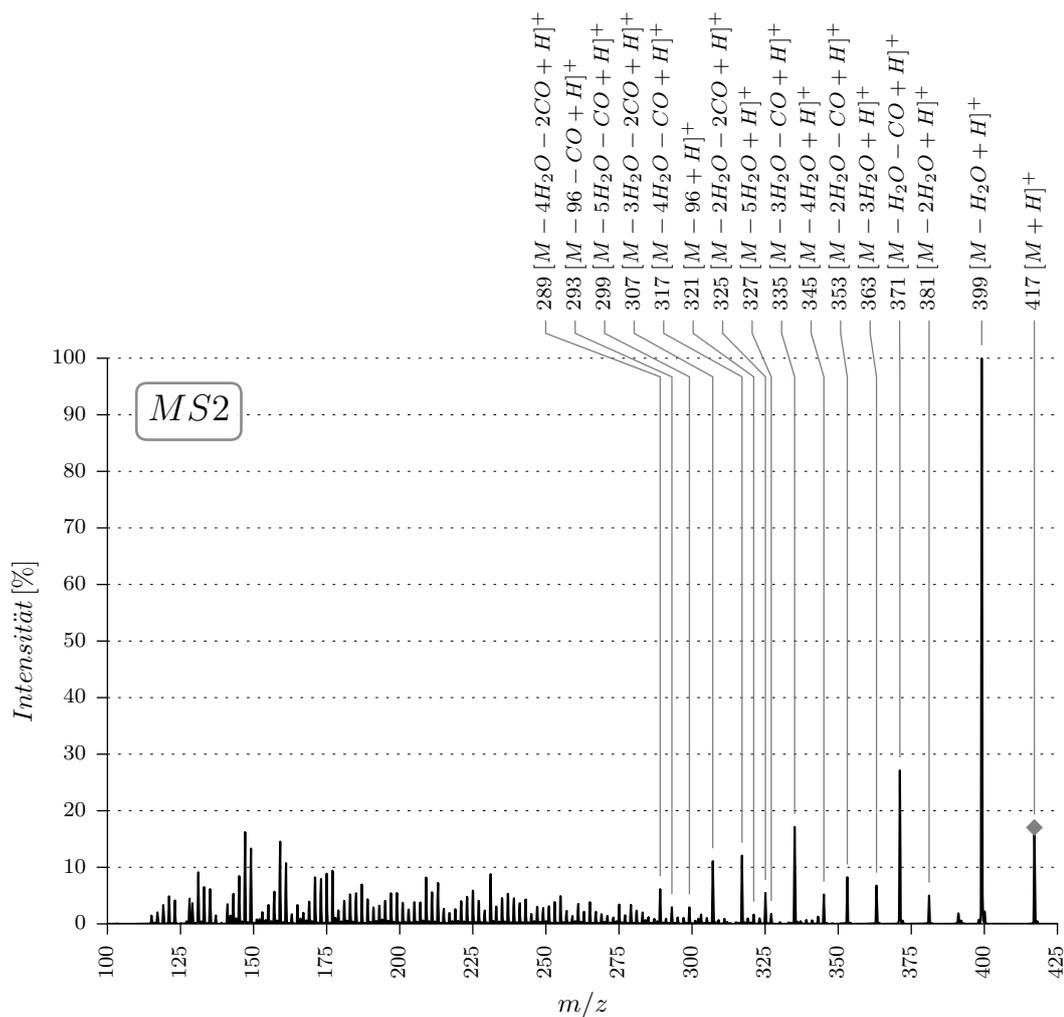
B.18. 5F

Trivialname: Arenobufagin

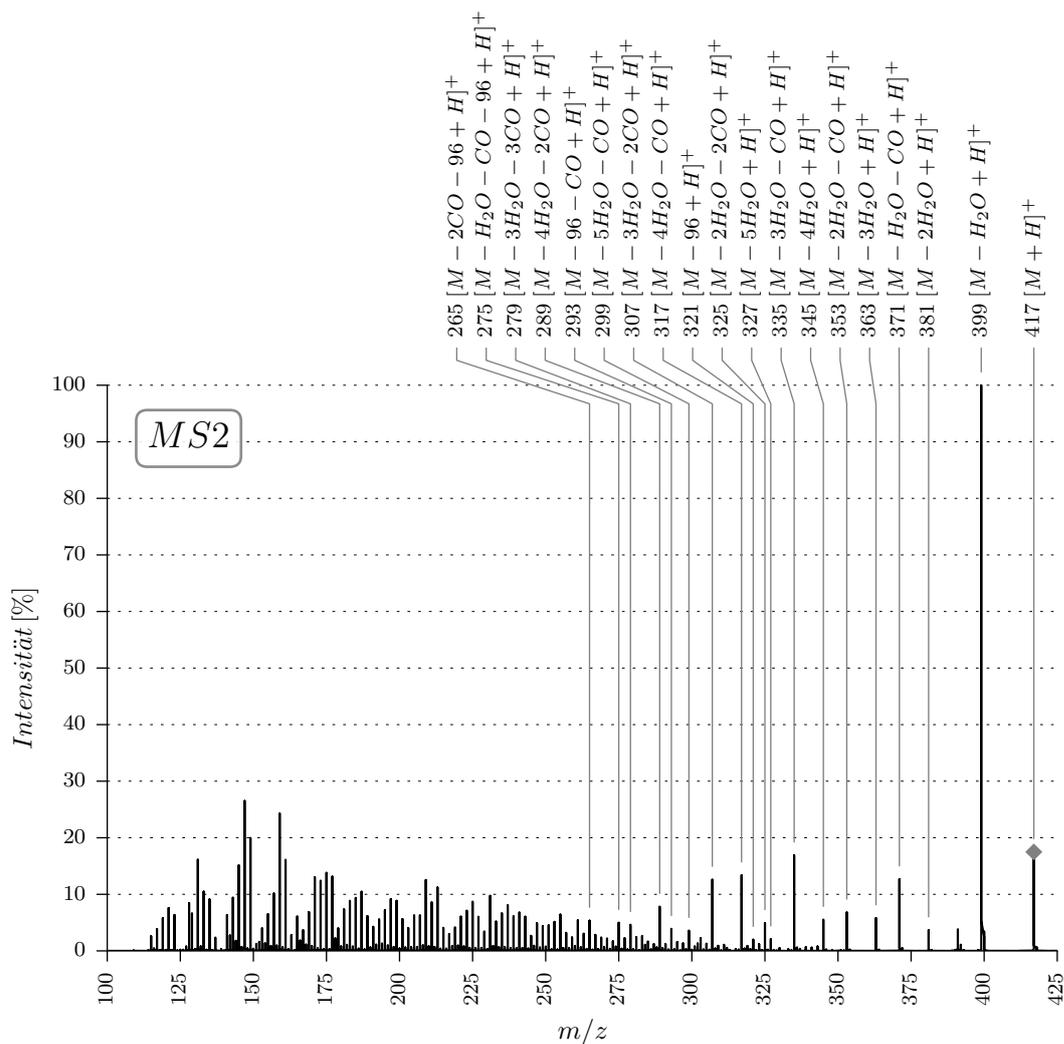
Summenformel: $C_{24}H_{32}O_6$ Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,11 α)-3,11,14-Trihydroxy-12-oxo-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 464-74-4

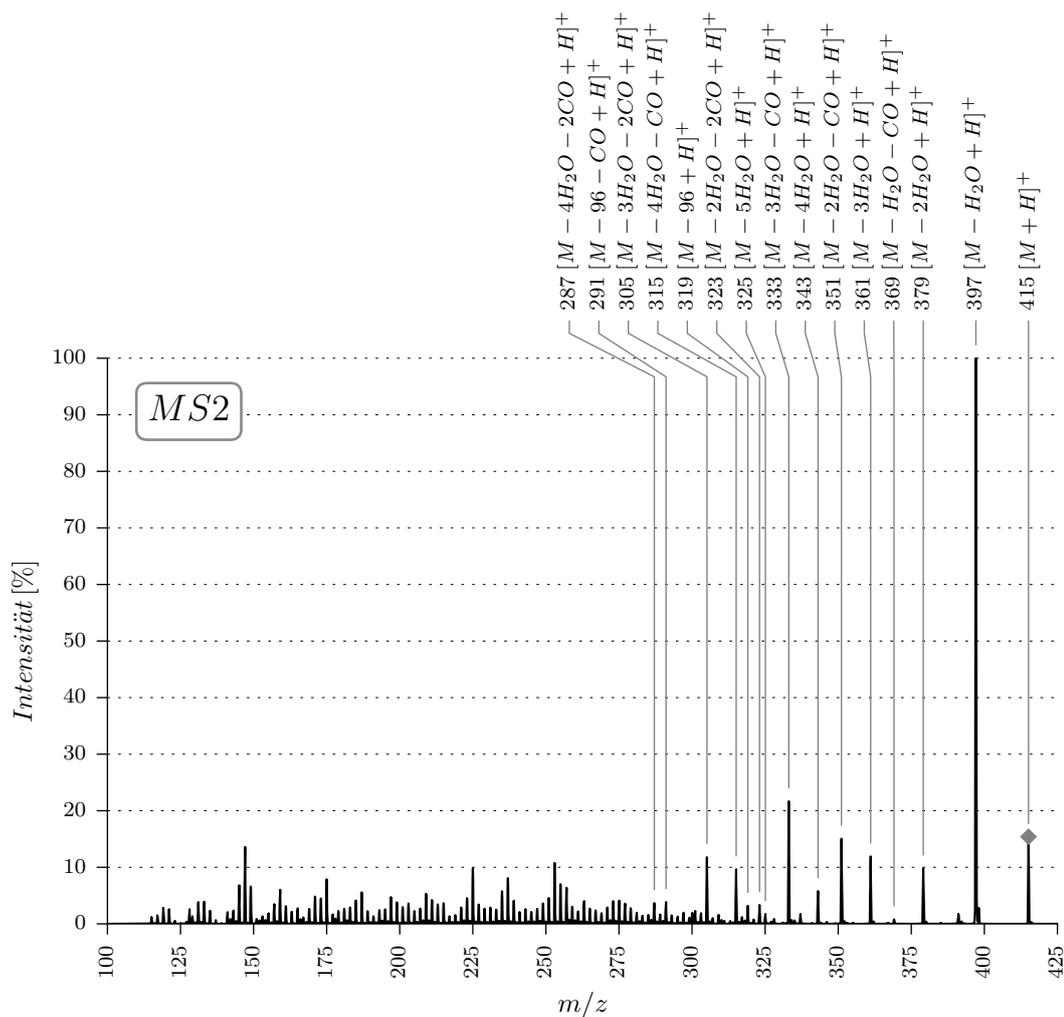
Molekulargewicht: 416



B.19. 16D

Trivialname: τ Bufarenogin**Summenformel:** $C_{24}H_{32}O_6$ **Chem. Bezeichnung:** (3 β ,5 β ,12 β)-3,12,14-Trihydroxy-11-oxo-bufa-20,22-dienolide**CAS-Nummer:** 17008-65-0**Molekulargewicht:** 416

B.20. 6B

Trivialname: Argentinogenin**Summenformel:** $C_{24}H_{30}O_6$ **Chem. Bezeichnung:** (3 β ,5 β)-3,11,14-Trihydroxy-12-oxo-bufa-9(11),20,22-trienolide**CAS-Nummer:** 4236-48-0**Molekulargewicht:** 414

B.21. 12B

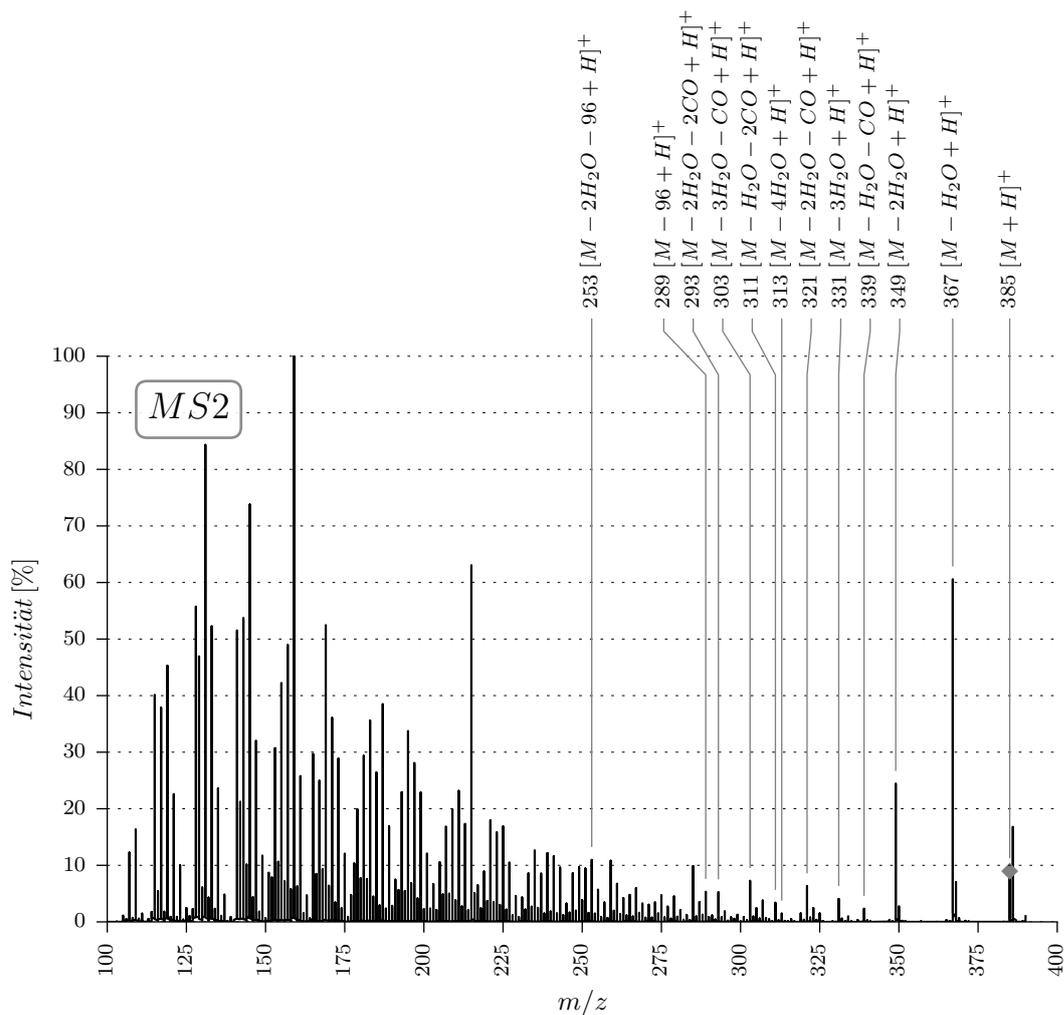
Trivialname: Bufalin-Derivat

Summenformel: $C_{24}H_{32}O_4$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,14 α ,15 α)-14,15-Epoxy-3-hydroxy-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 24183-15-1

Molekulargewicht: 384



B.22. 48J

Trivialname: Marinobufagin

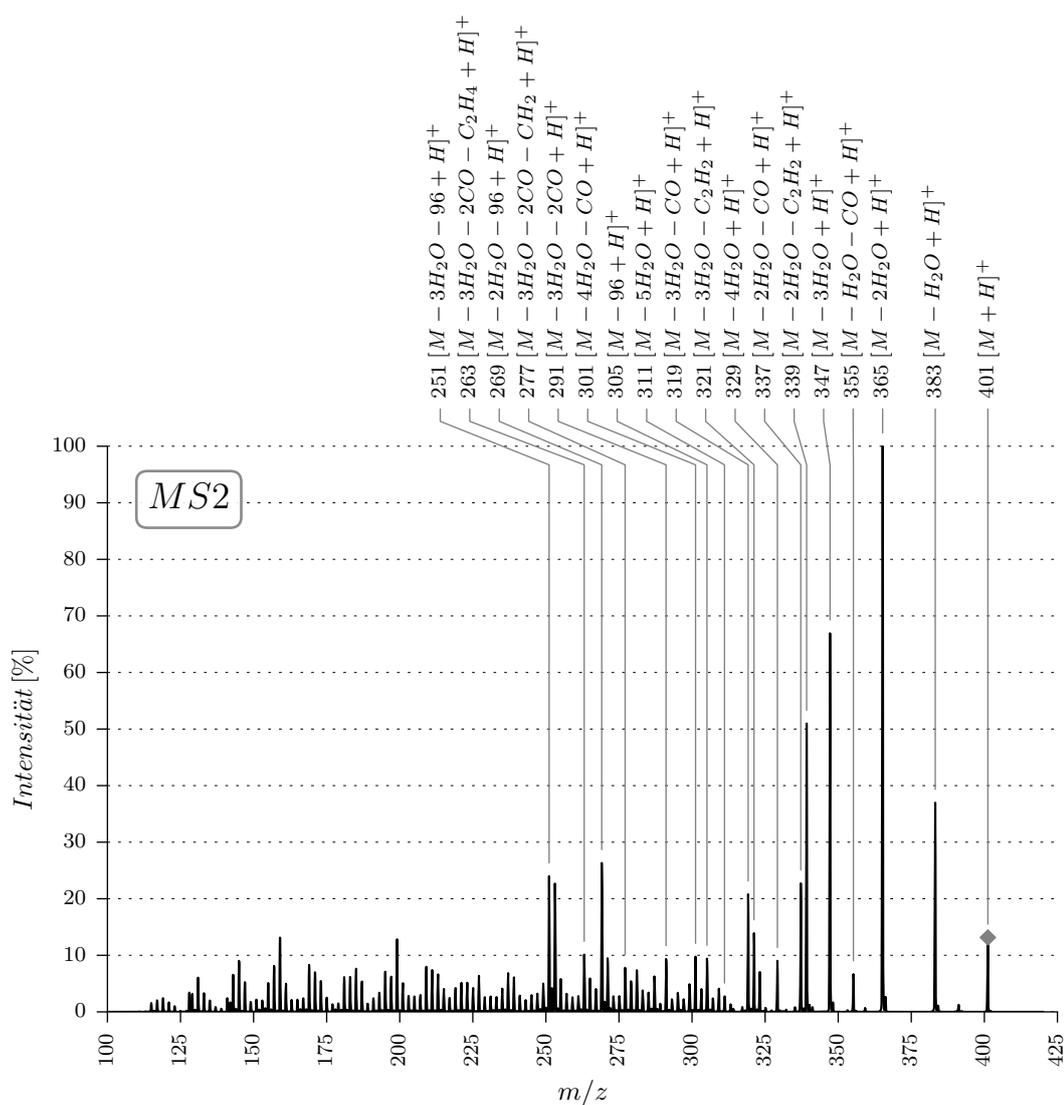
Summenformel: $C_{24}H_{32}O_5$

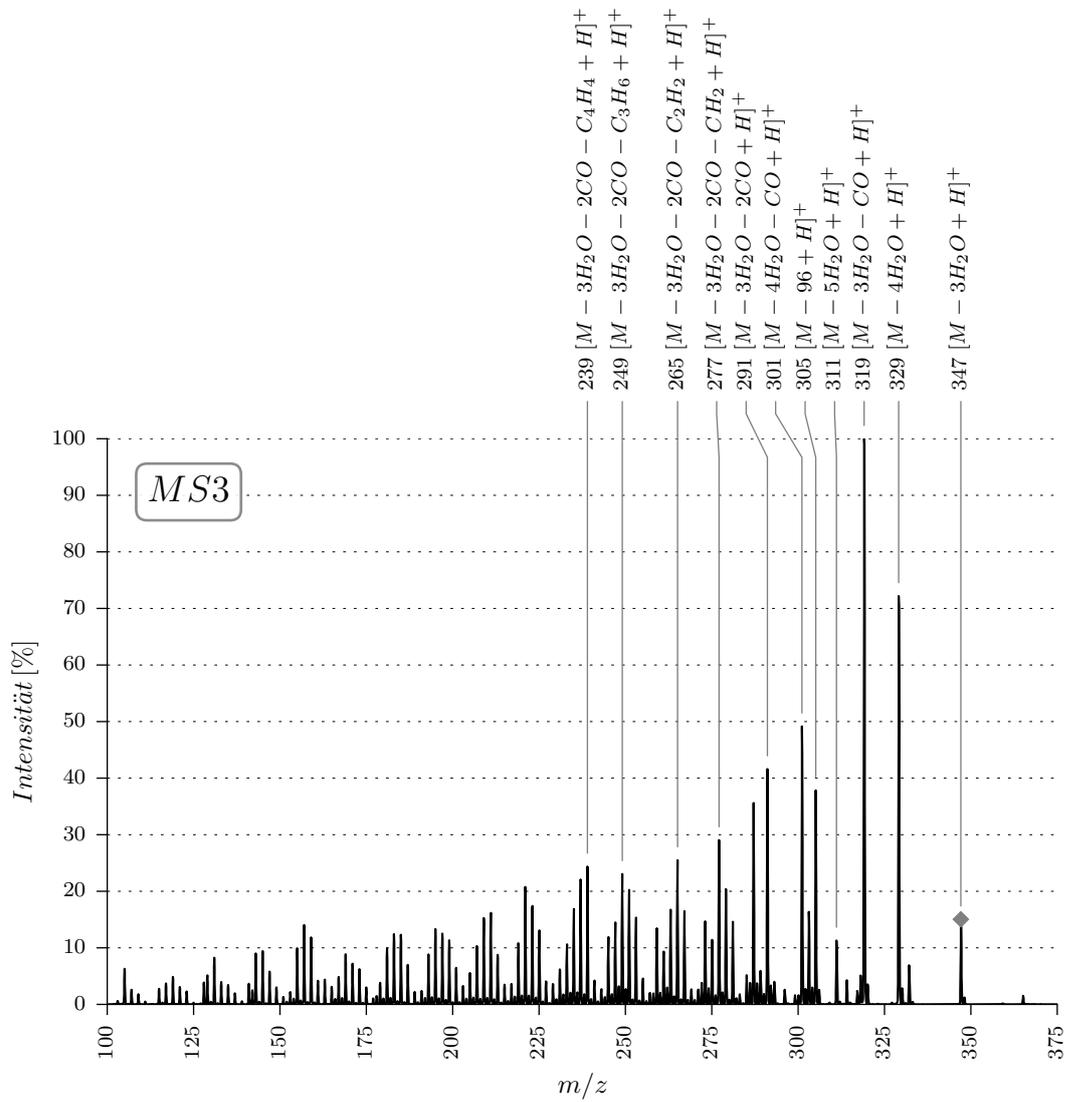
Chem. Bezeichnung:

(3 β ,5 β ,15 β)-3,5-Dihydroxy-14,15-epoxy-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 470-42-8

Molekulargewicht: 400





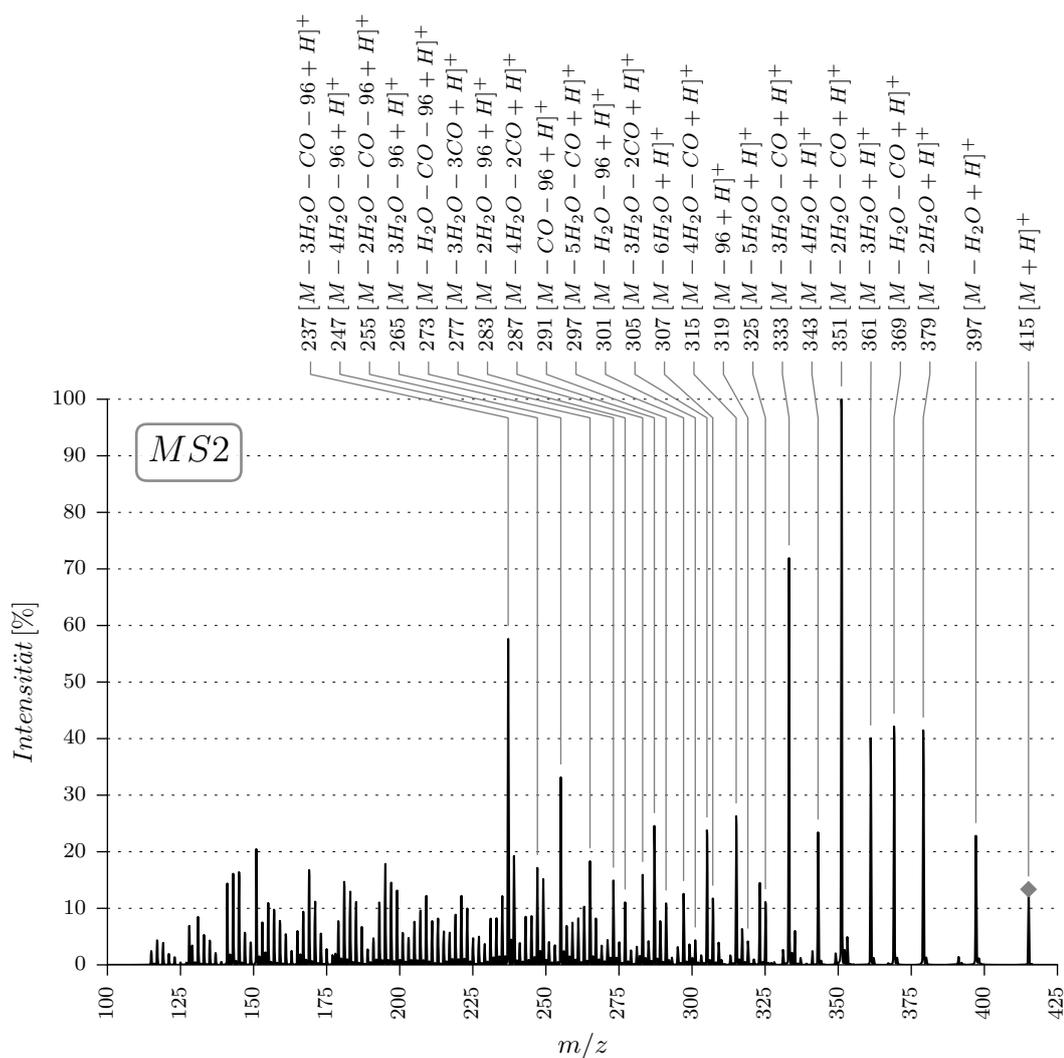
B.23. 19A

Trivialname: Bufotalinin

Summenformel: $C_{24}H_{30}O_6$ Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,15 β)-19-Oxo-3,5-dihydroxy-14,15-epoxy-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 562-21-0

Molekulargewicht: 414



B.24. 2C

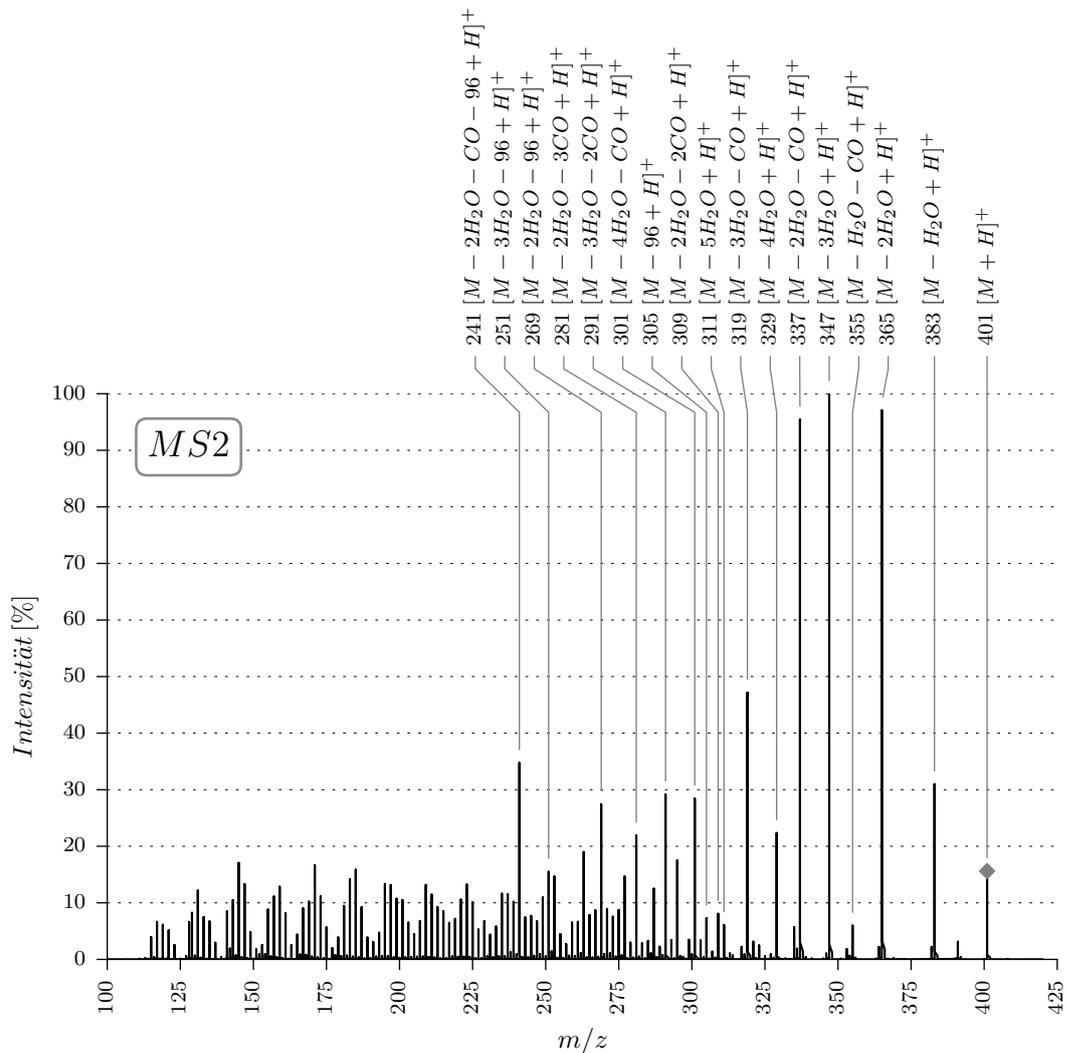
Trivialname: Bovogenin A

Summenformel: $C_{24}H_{32}O_5$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 α)-3,14-Dihydroxy-19-oxo-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 468-18-8

Molekulargewicht: 400



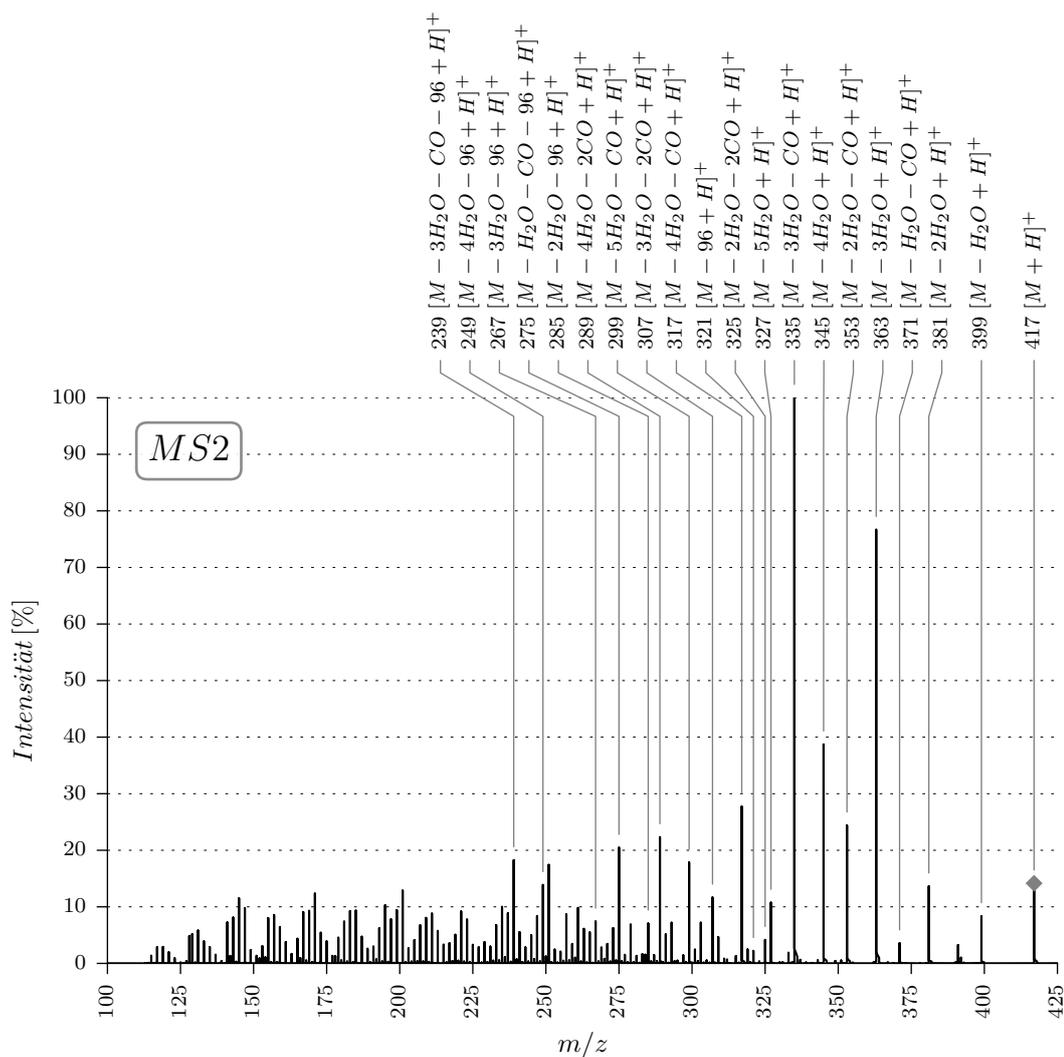
B.25. Hel4

Trivialname: Hellebrigenin

Summenformel: $C_{24}H_{32}O_6$ Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β)-3,5,14-Trihydroxy-19-oxo-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 465-90-7

Molekulargewicht: 416



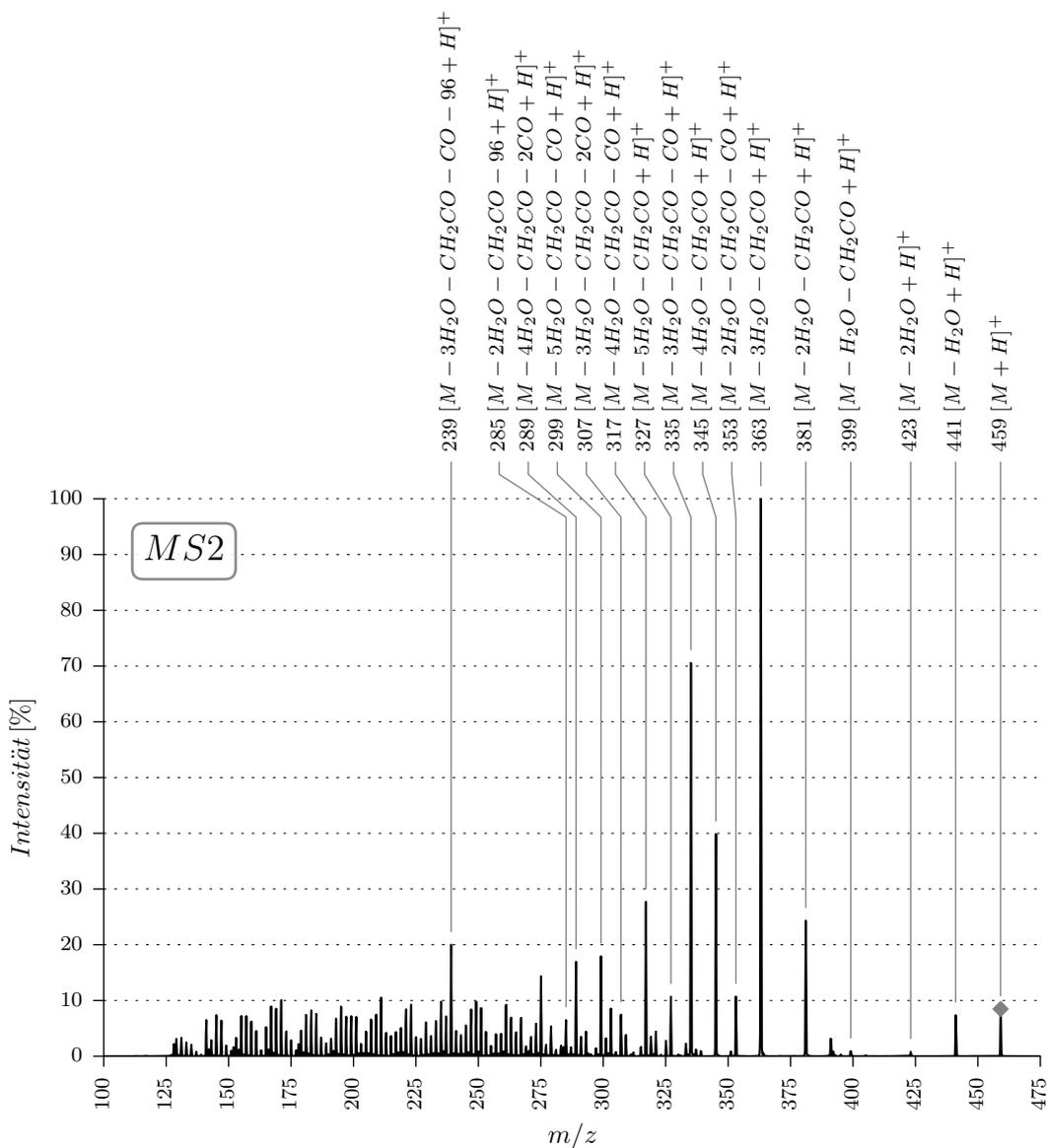
B.26. Hel2

Trivialname: Hellebrigeninacetat

Summenformel: $C_{26}H_{34}O_7$ Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β)-3-(Acetyloxy)-5,14-dihydroxy-19-oxo-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 4064099

Molekulargewicht: 458



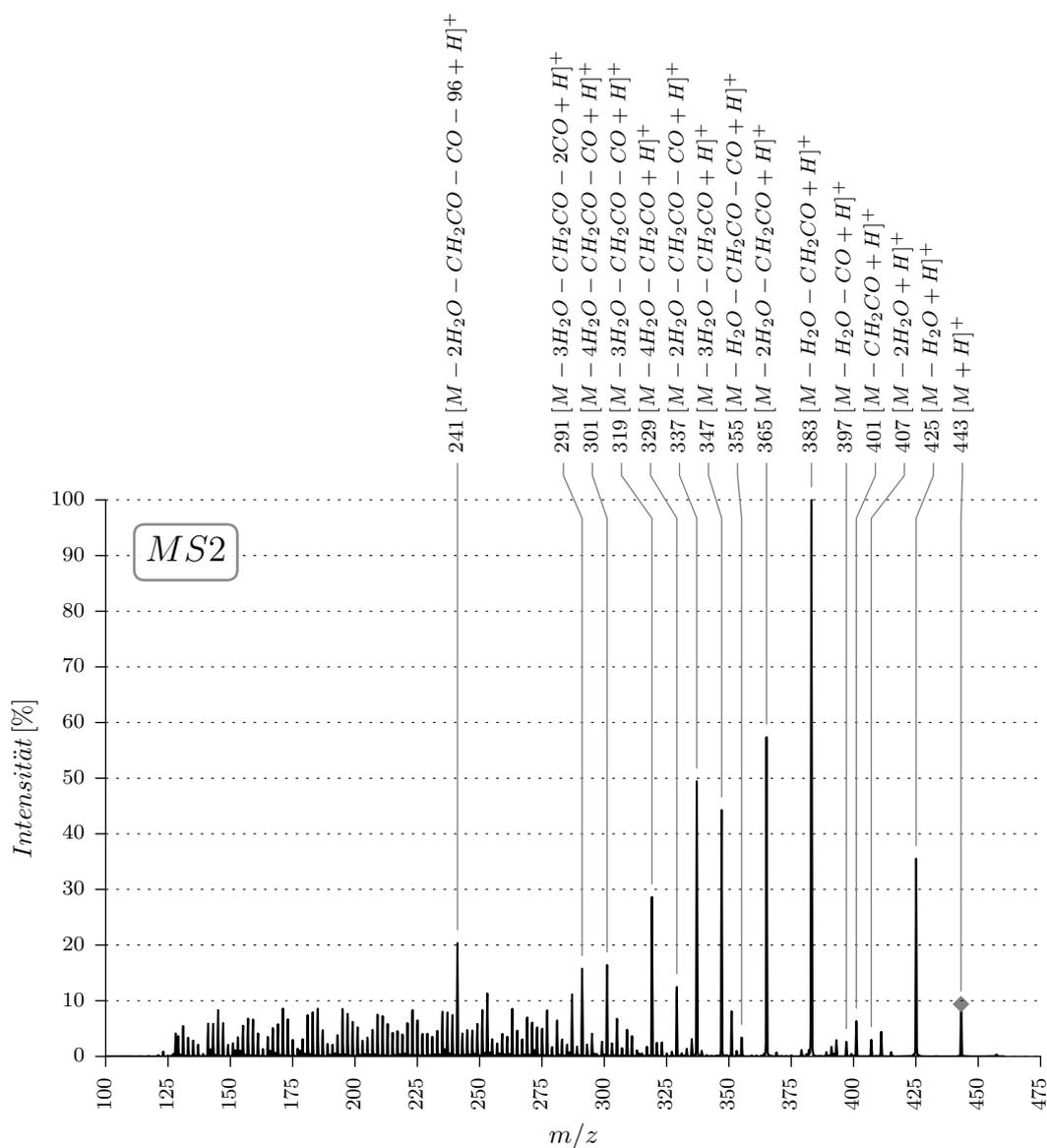
B.27. 2G

Trivialname: 3OAc Bovogenin

Summenformel: $C_{26}H_{34}O_6$ Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 α)-3-(Acetyloxy)-14-hydroxy-19-oxo-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 21857-75-0

Molekulargewicht: 442



B.28. 7E

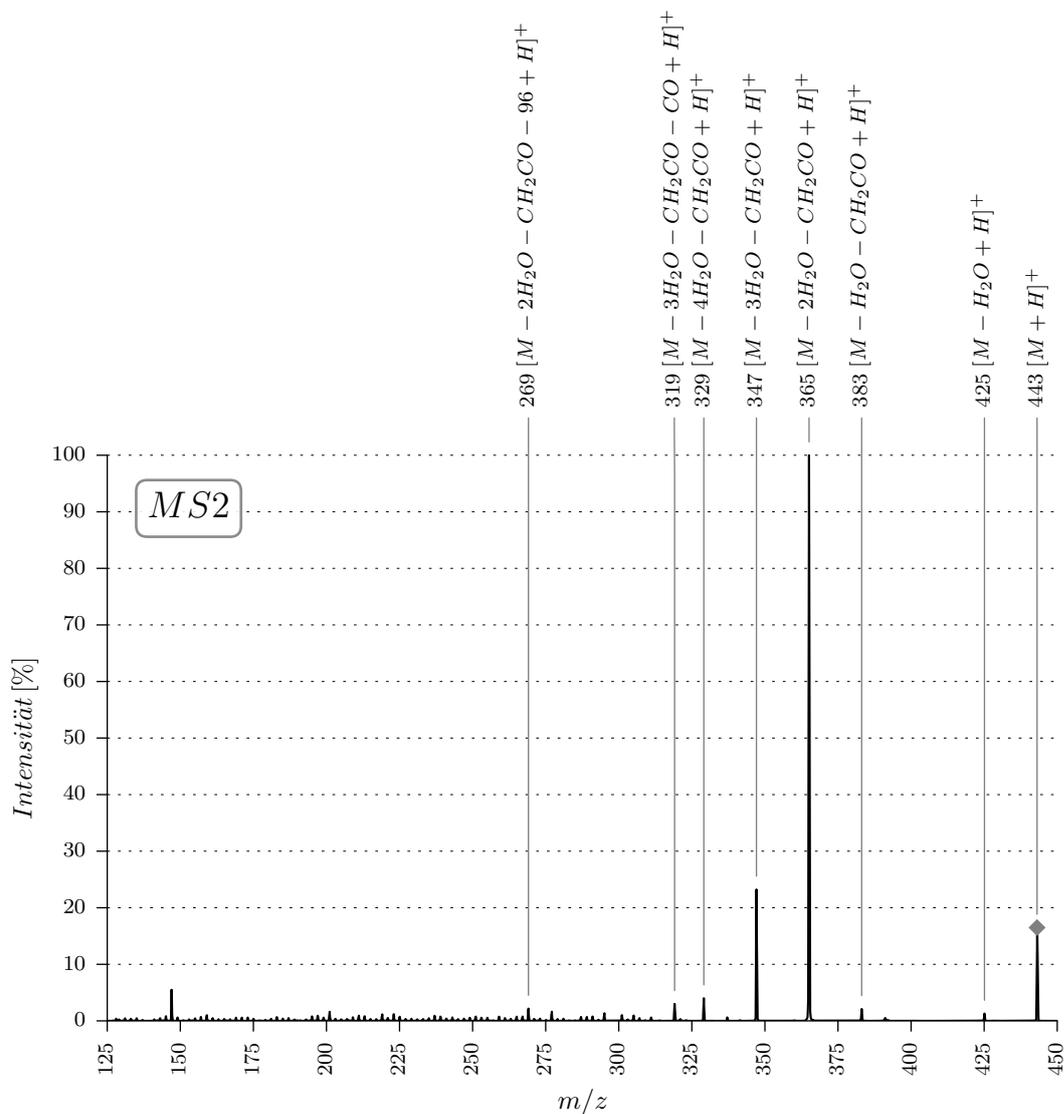
Trivialname: Bufotalon

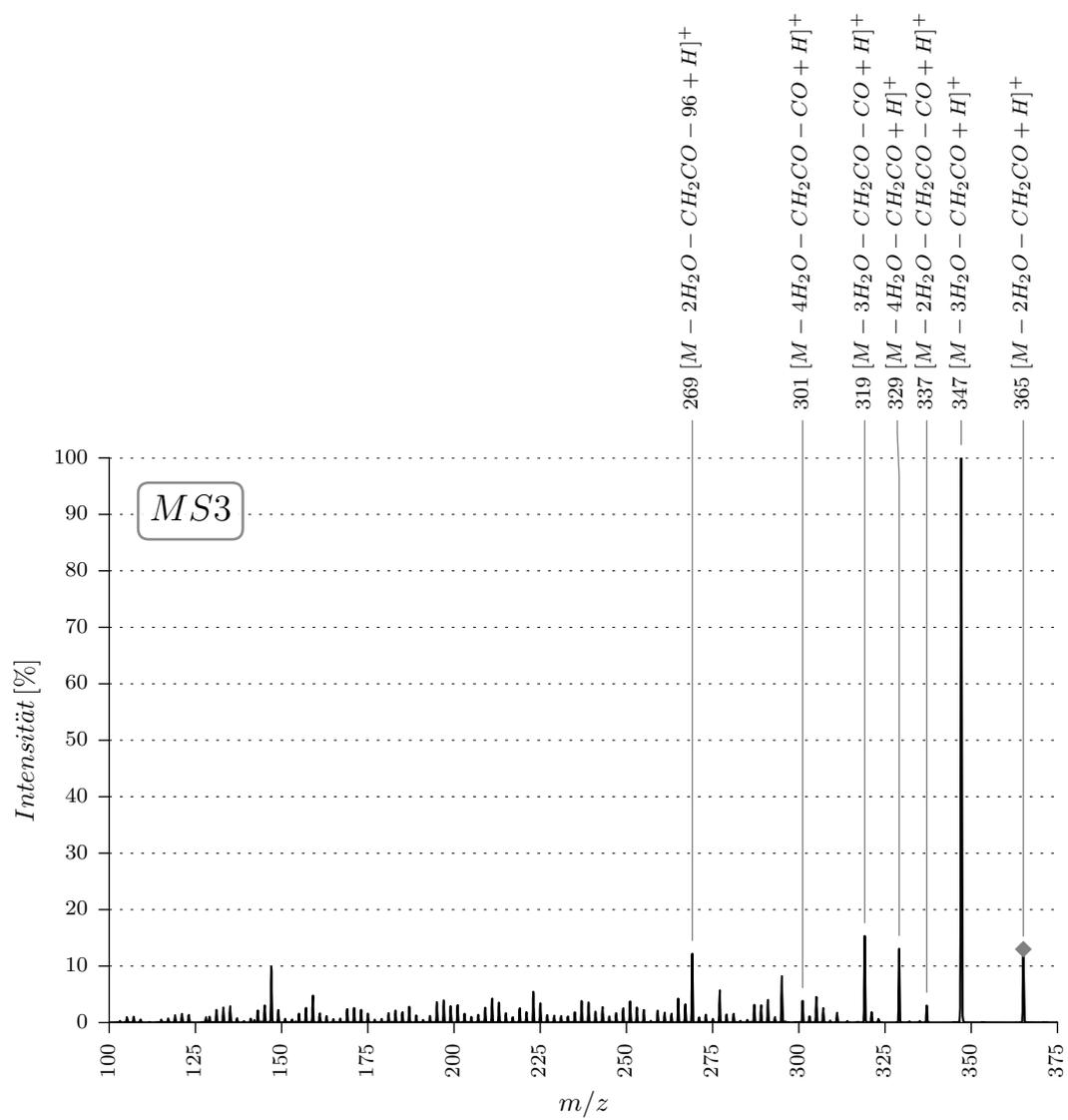
Summenformel: $C_{26}H_{34}O_6$

Chem. Bezeichnung: (5 β ,16 β)-16-(Acetyloxy)-14-hydroxy-3-oxo-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 4266-46-0

Molekulargewicht: 442





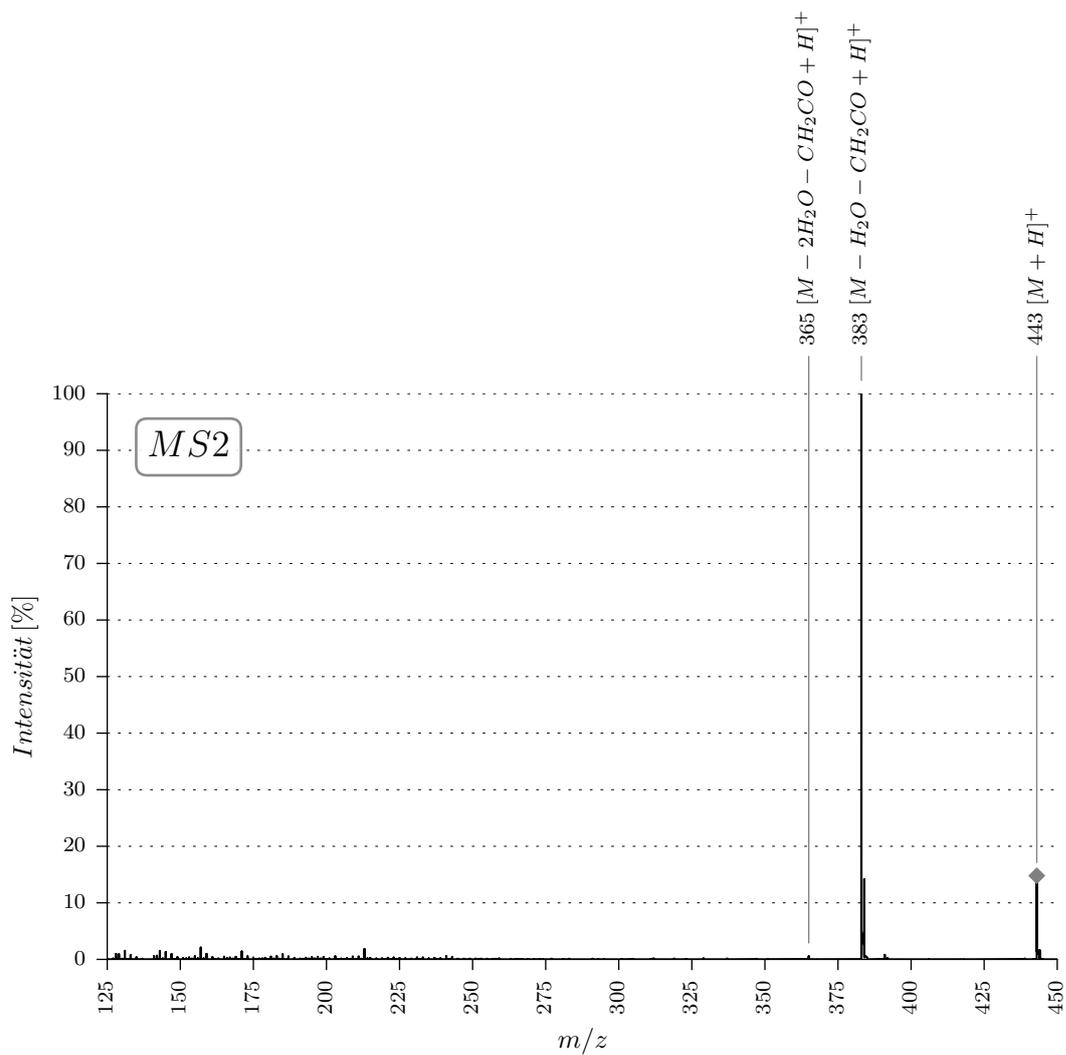
B.29. 10I

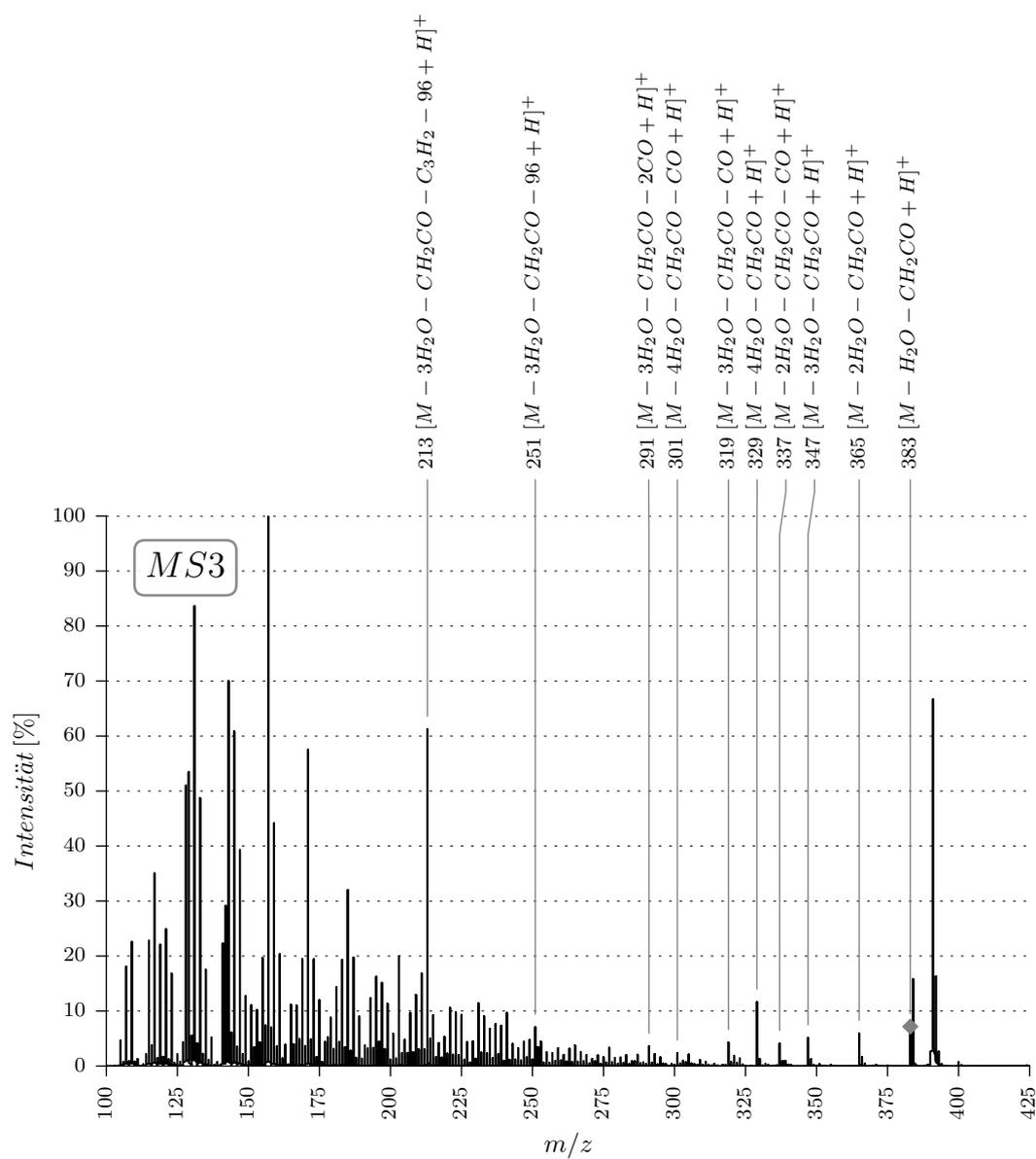
Trivialname: 3 β OAc 14 α OH 15 Keto Bufalin

Summenformel: $C_{26}H_{34}O_6$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,14 α)-3-(Acetyloxy)-14-hydroxy-15-oxo-bufa-20,22-dienolide

Molekulargewicht: 442





B.30. 5D

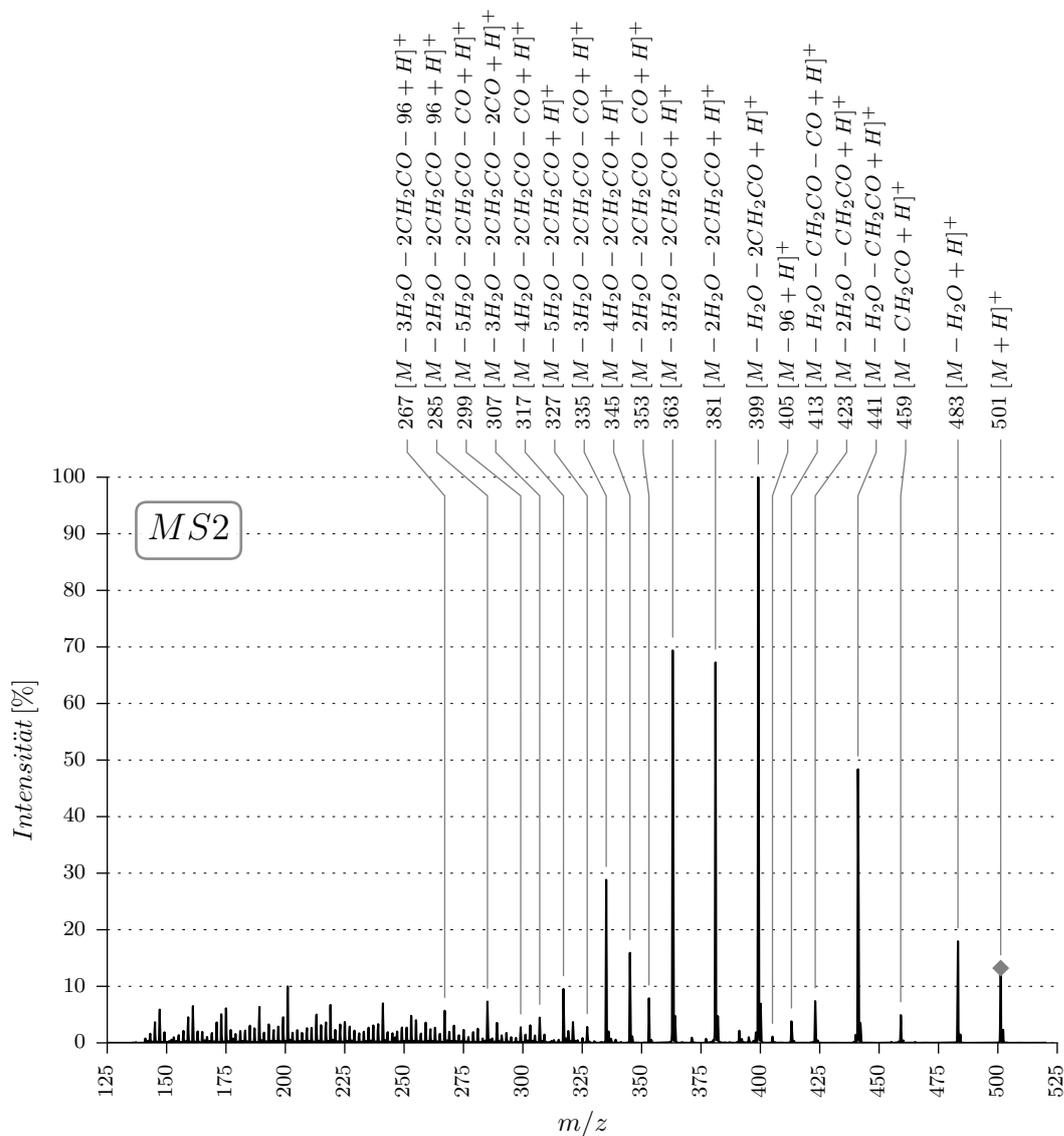
Trivialname: Arenobufagindiacetat

Summenformel: $C_{28}H_{36}O_8$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,11 α)-3,11-Bis(acetyloxy)-14-hydroxy-12-oxo-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 7208-26-6

Molekulargewicht: 500



B.31. 16G

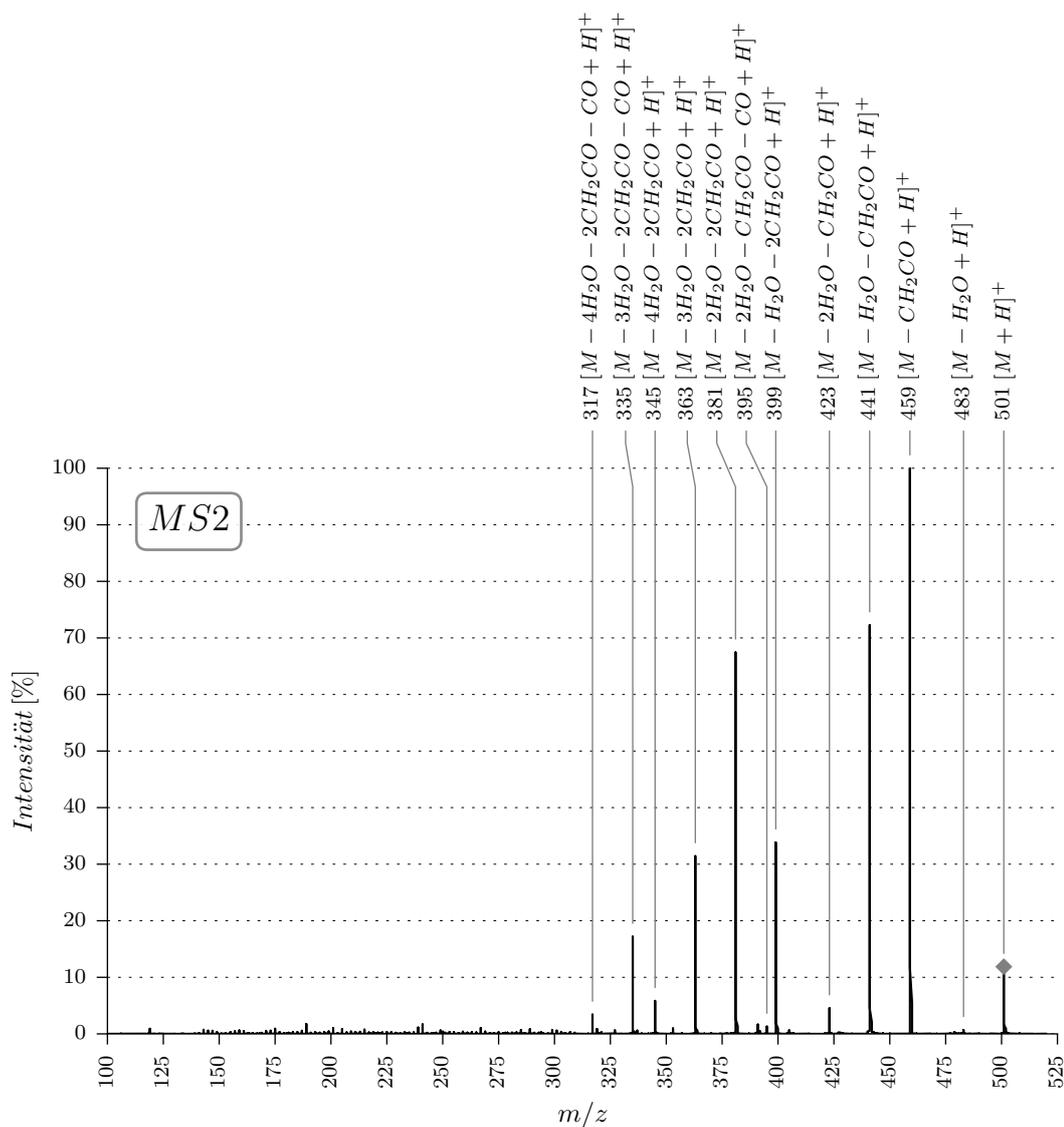
Trivialname: Bufarenogindiacetat

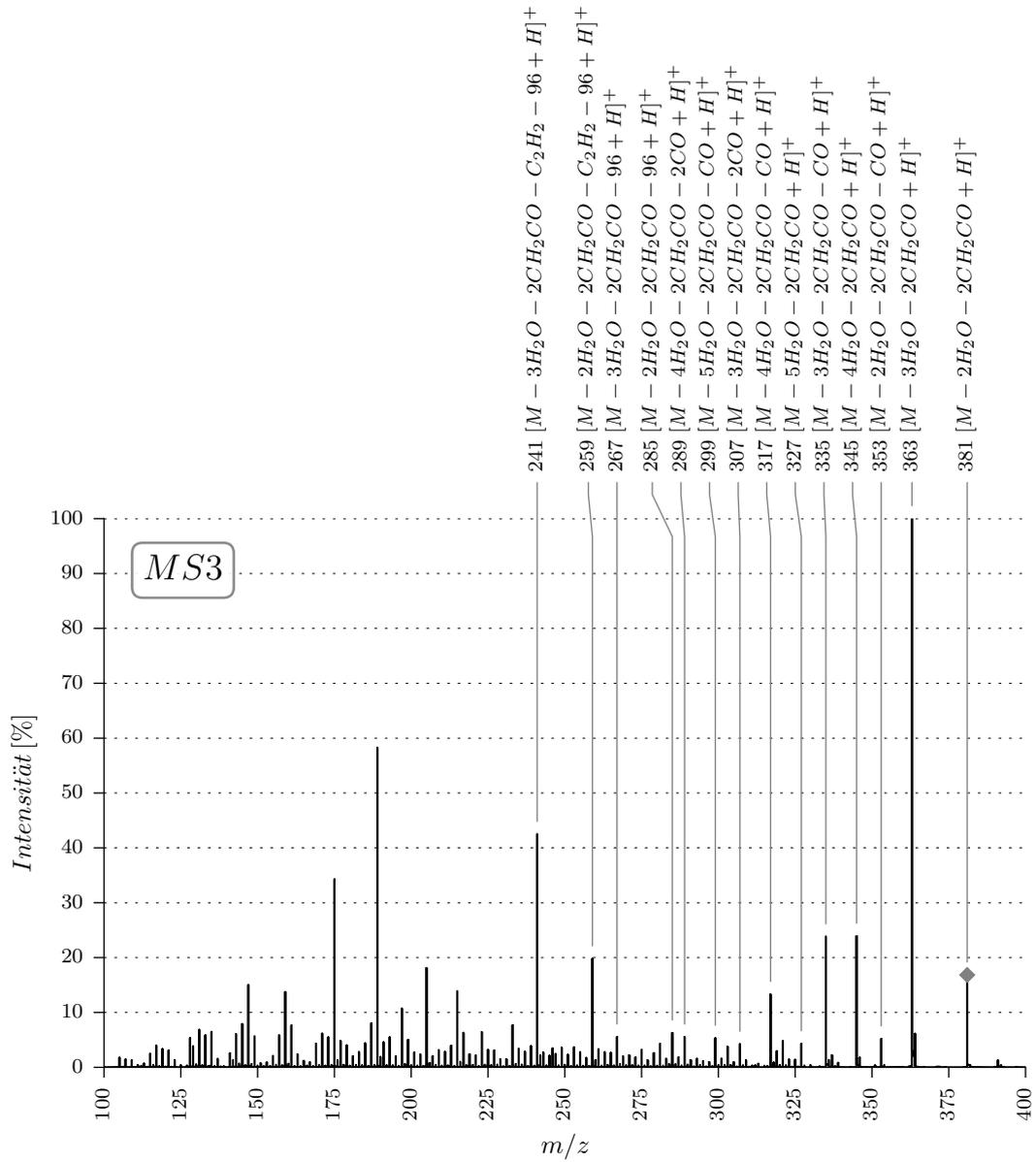
Summenformel: $C_{28}H_{36}O_8$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,12 α)-3,12-Bis(acetyloxy)-14-hydroxy-11-oxo-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 17008-70-7

Molekulargewicht: 500





B.32. 15c

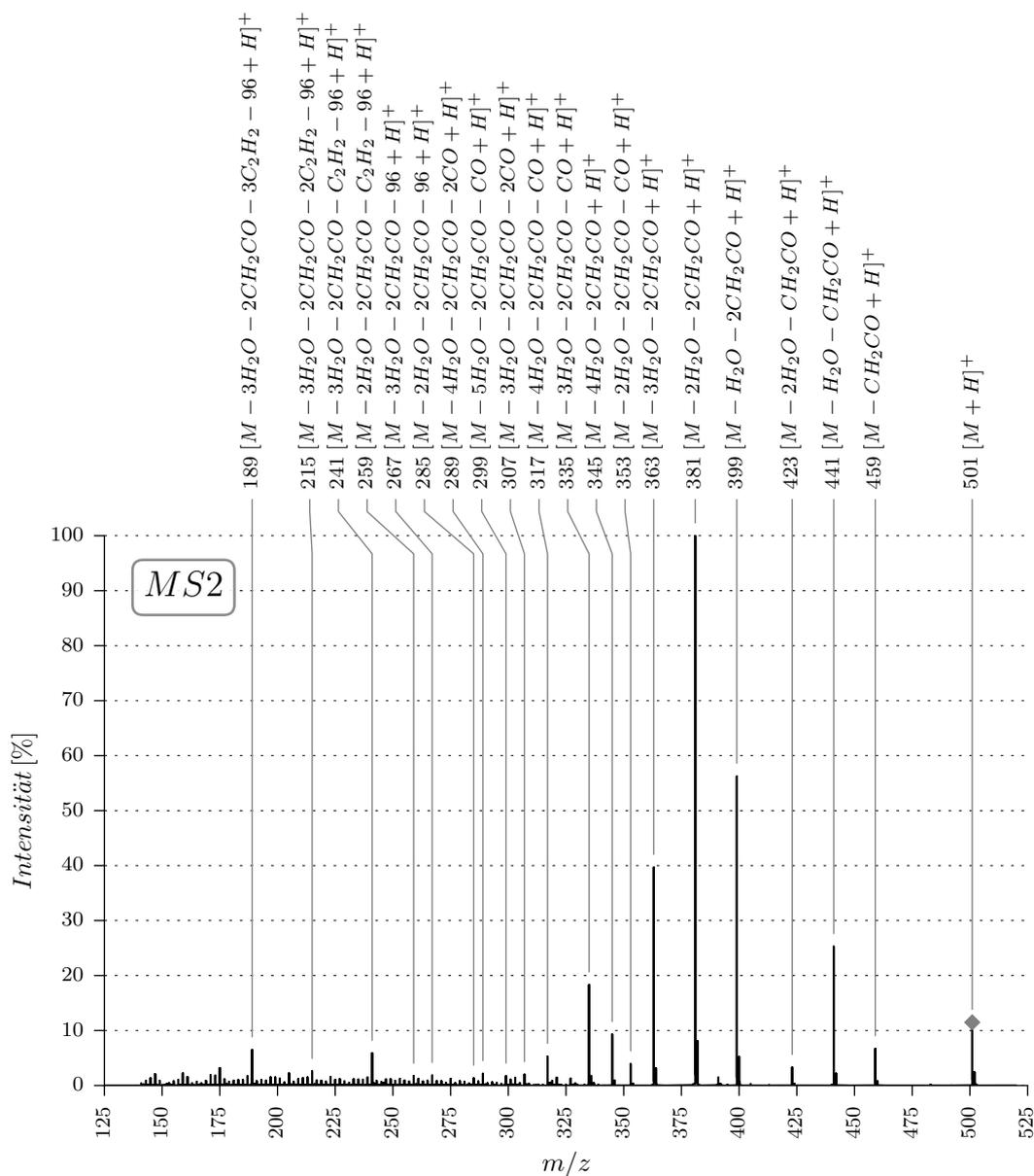
Trivialname: 12 β Bufarenogindiacetat

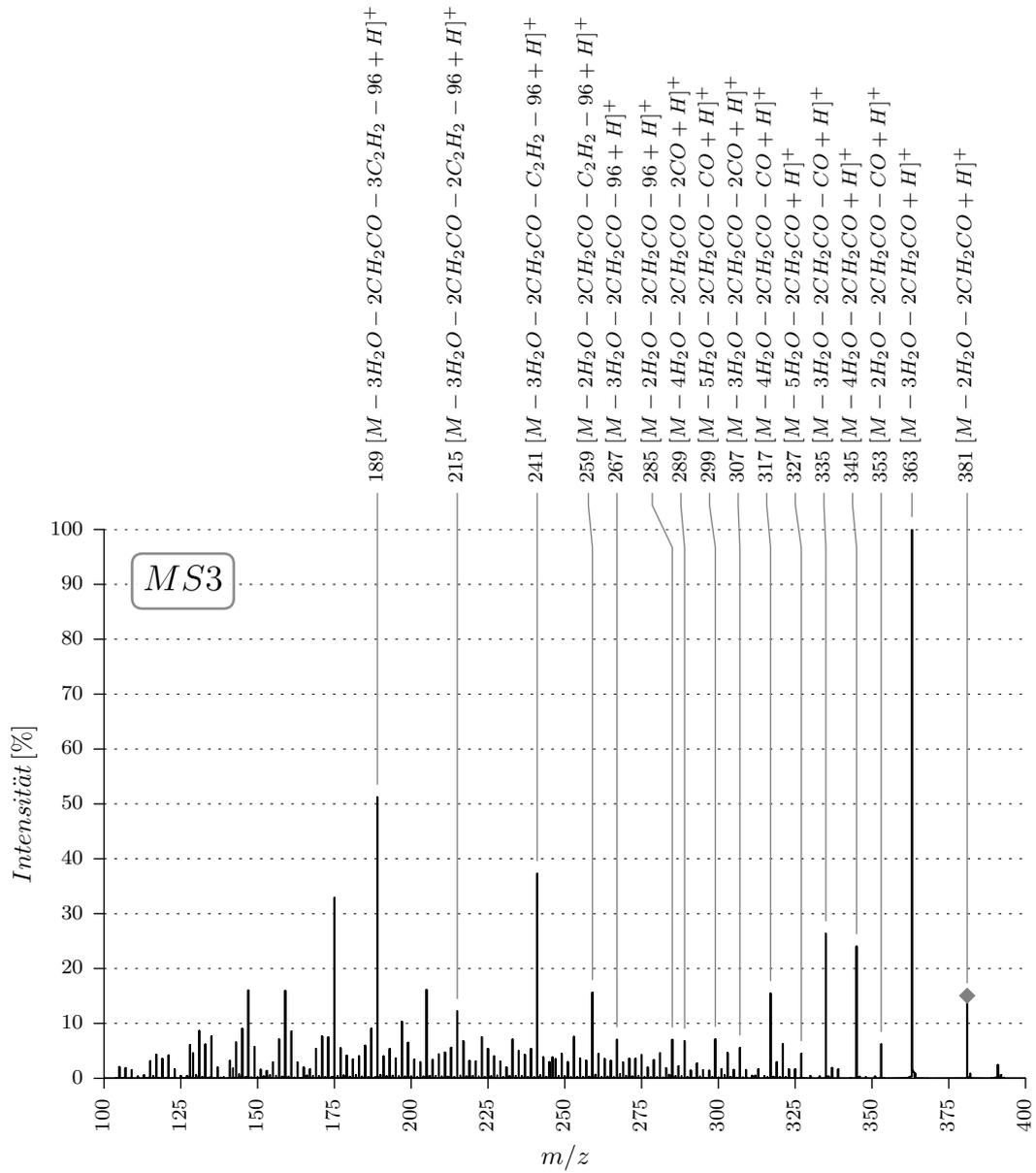
Summenformel: C₂₈H₃₆O₈

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,12 β)-3,12-Bis(acetyloxy)-14-hydroxy-11-oxo-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 17008-66-1

Molekulargewicht: 500





B.33. 4I

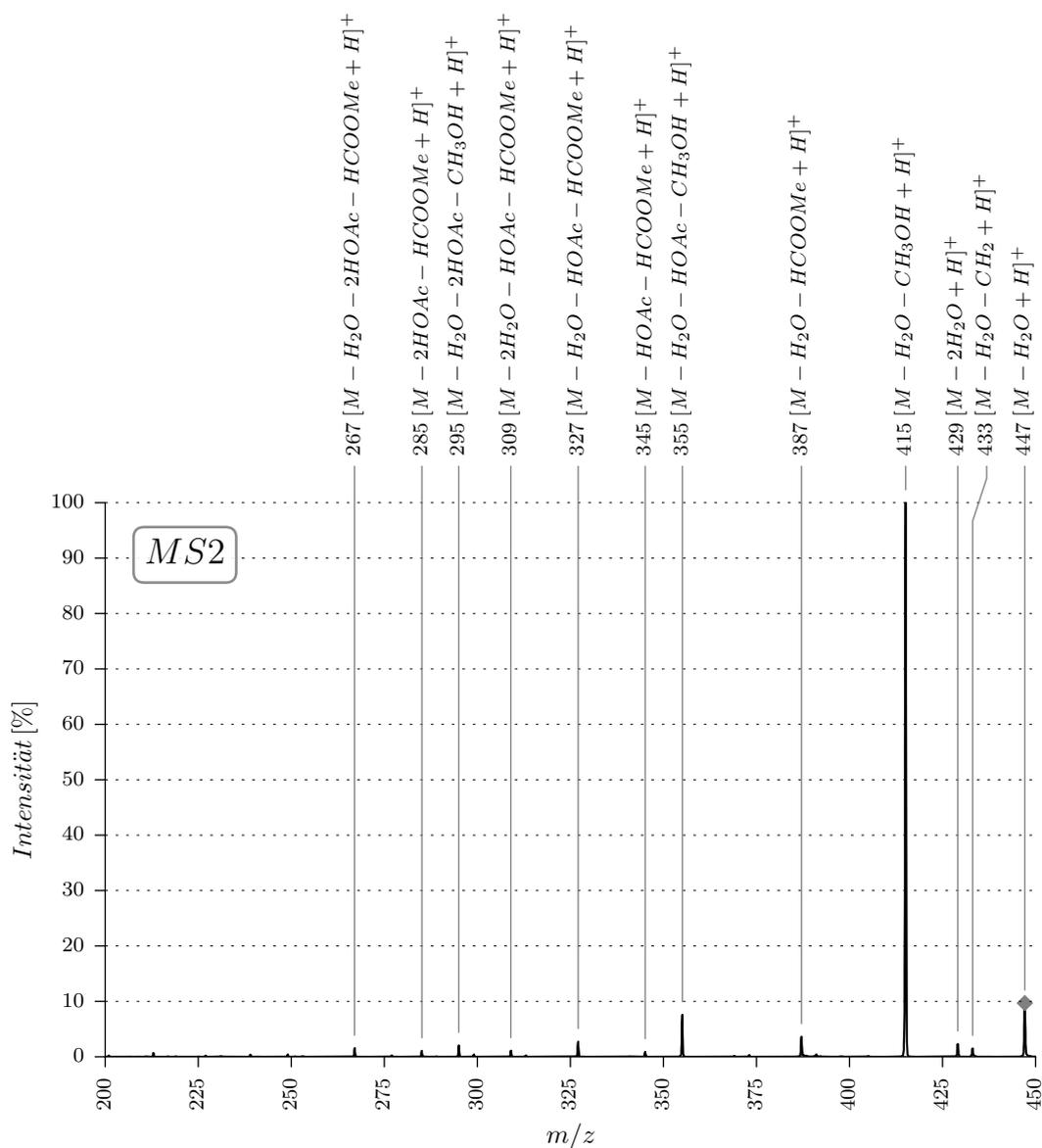
Trivialname: Arenobufagin-Derivat

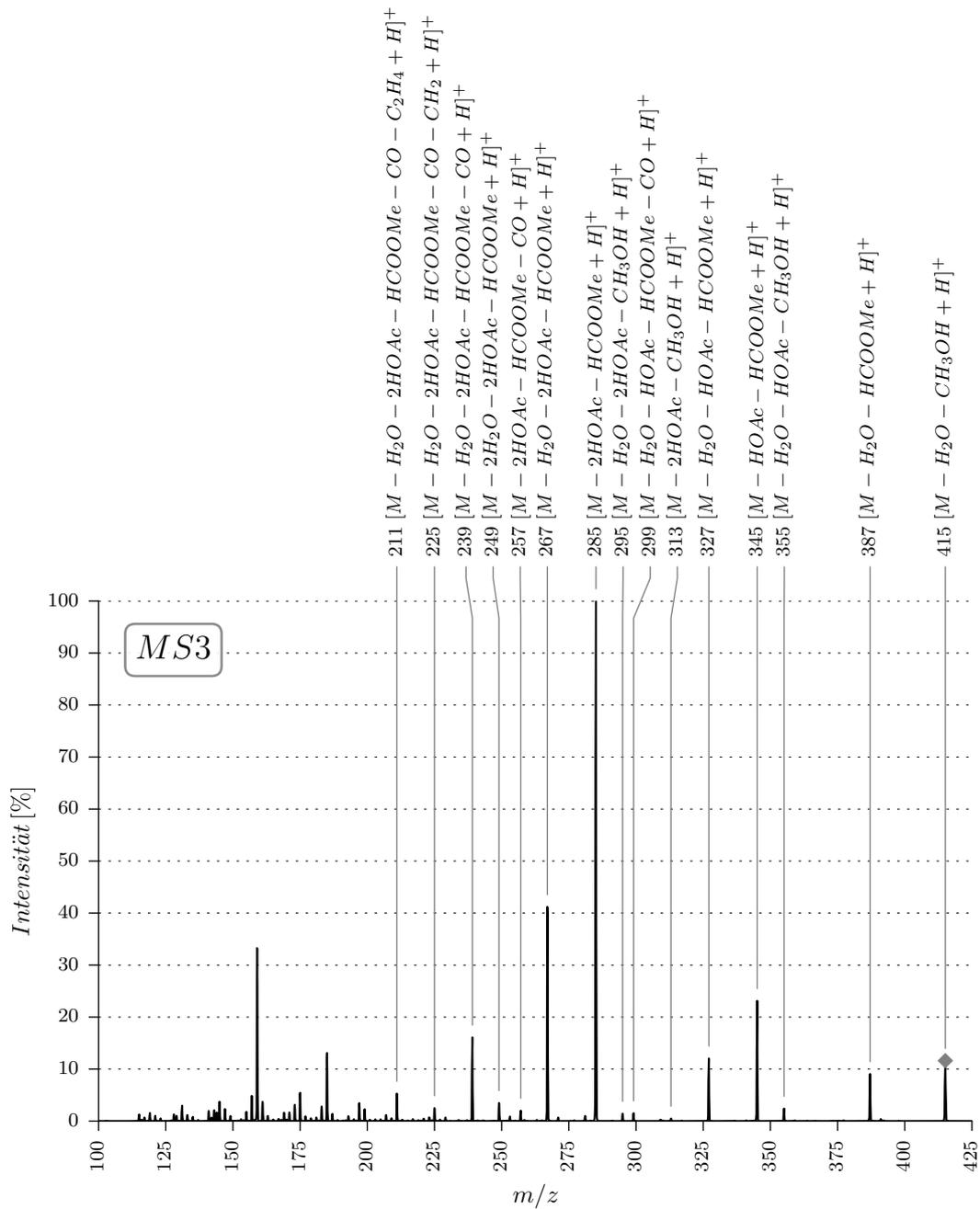
Summenformel: $C_{25}H_{36}O_8$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,11 α ,14 β ,17 β)-3,11-Bis(acetyloxy)-14-hydroxy-12-oxo-androstane-17-carboxylic acid methyl ester

CAS-Nummer: 17008-73-0

Molekulargewicht: 464





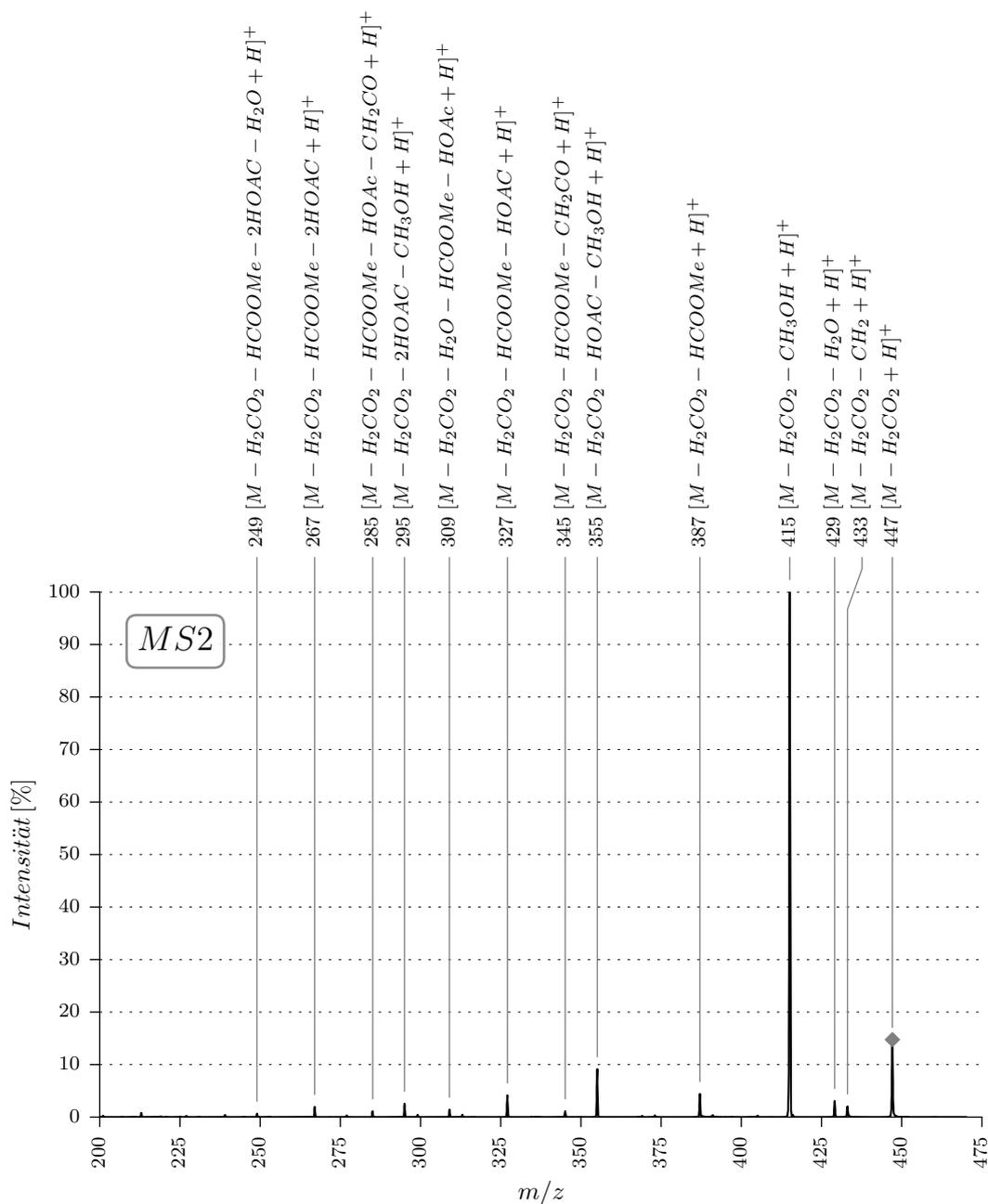
B.34. 4L

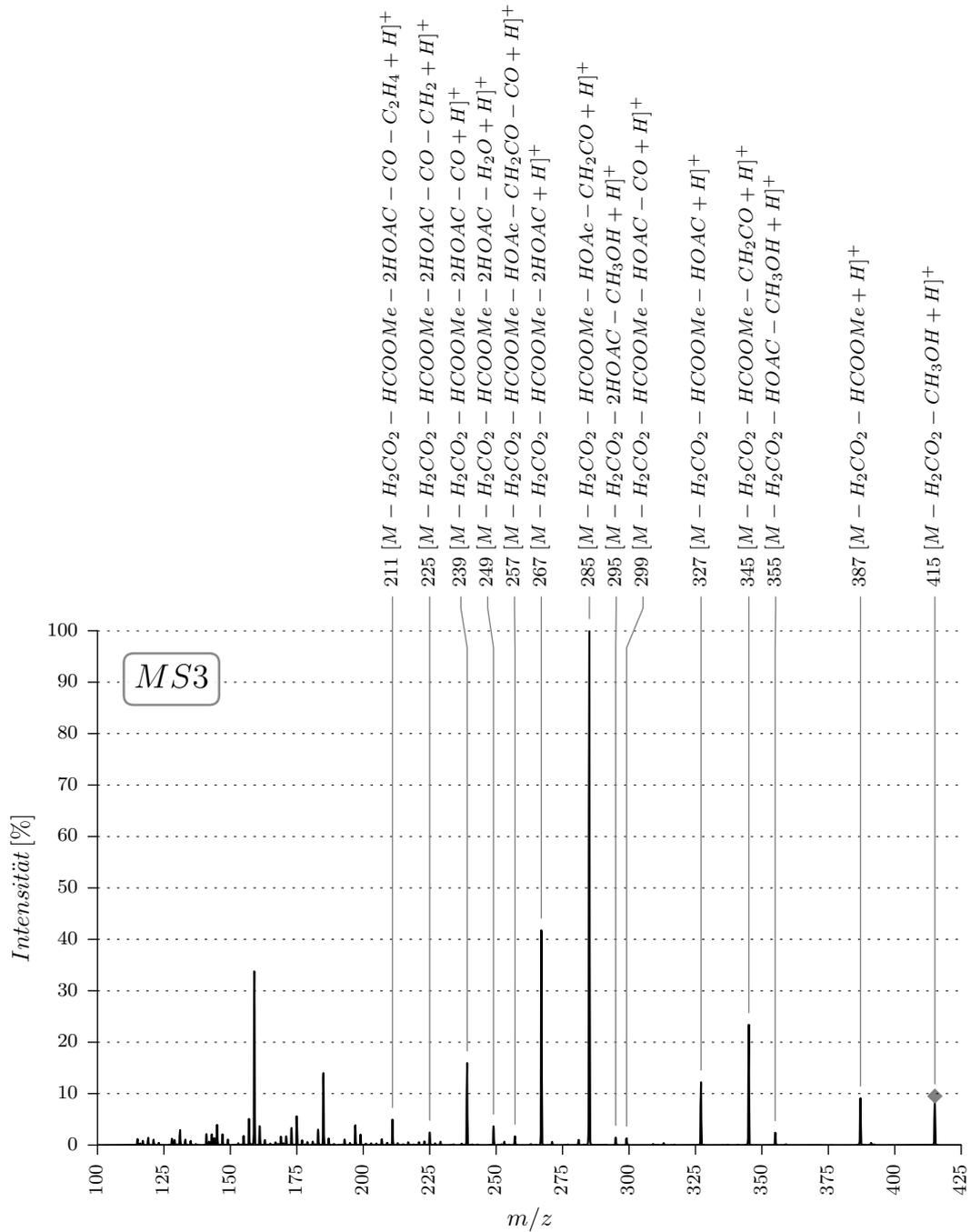
Trivialname: Arenobufagin-Derivat

Summenformel: $C_{26}H_{36}O_9$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,11 α ,14 β ,17 β)-3,11-Bis(acetyloxy)-14-(formyloxy)-12-oxo-androstane-17-carboxylic acid methyl ester

Molekulargewicht: 492





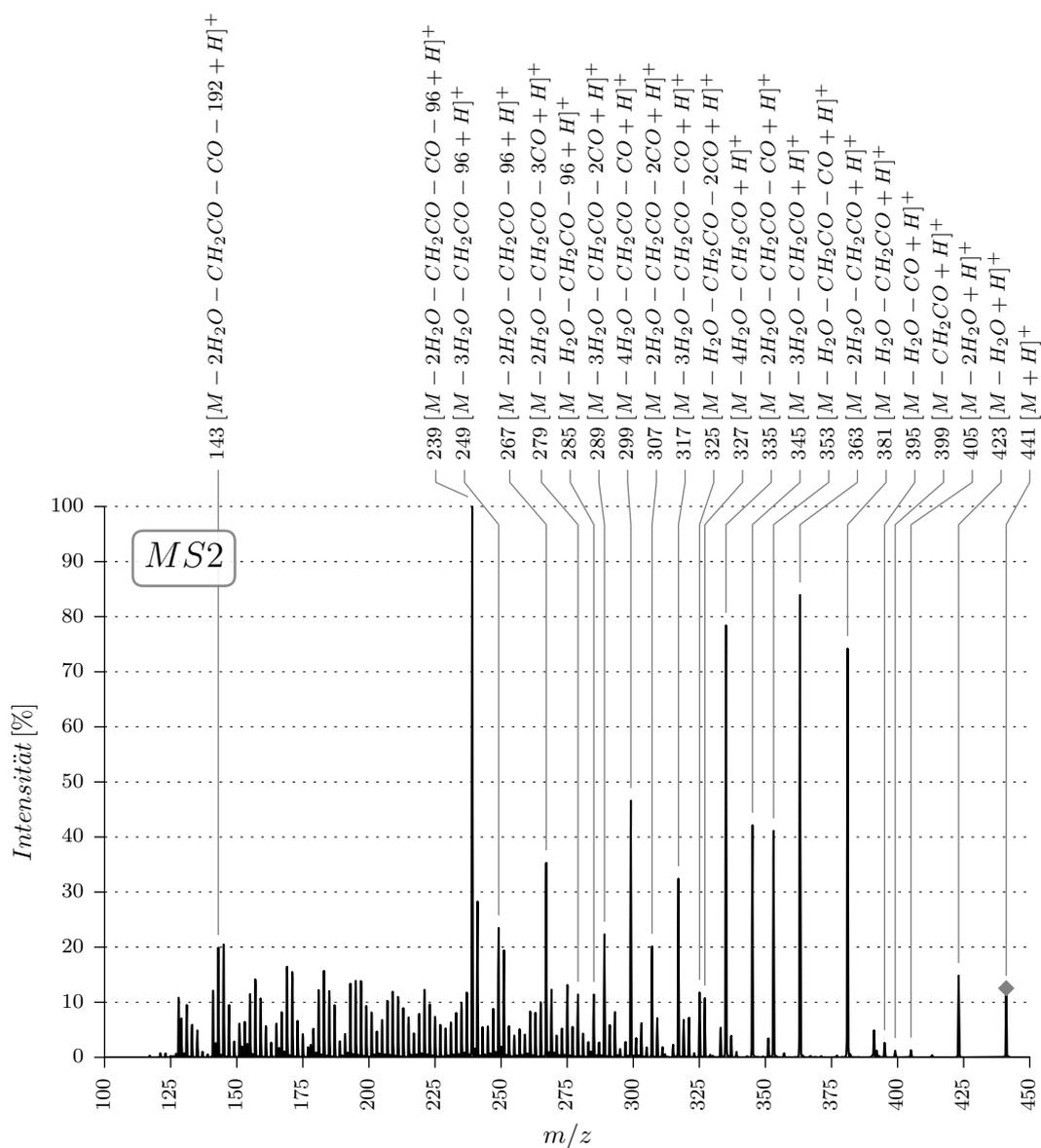
B.35. 7B

Trivialname: 3OAc Resibufagin

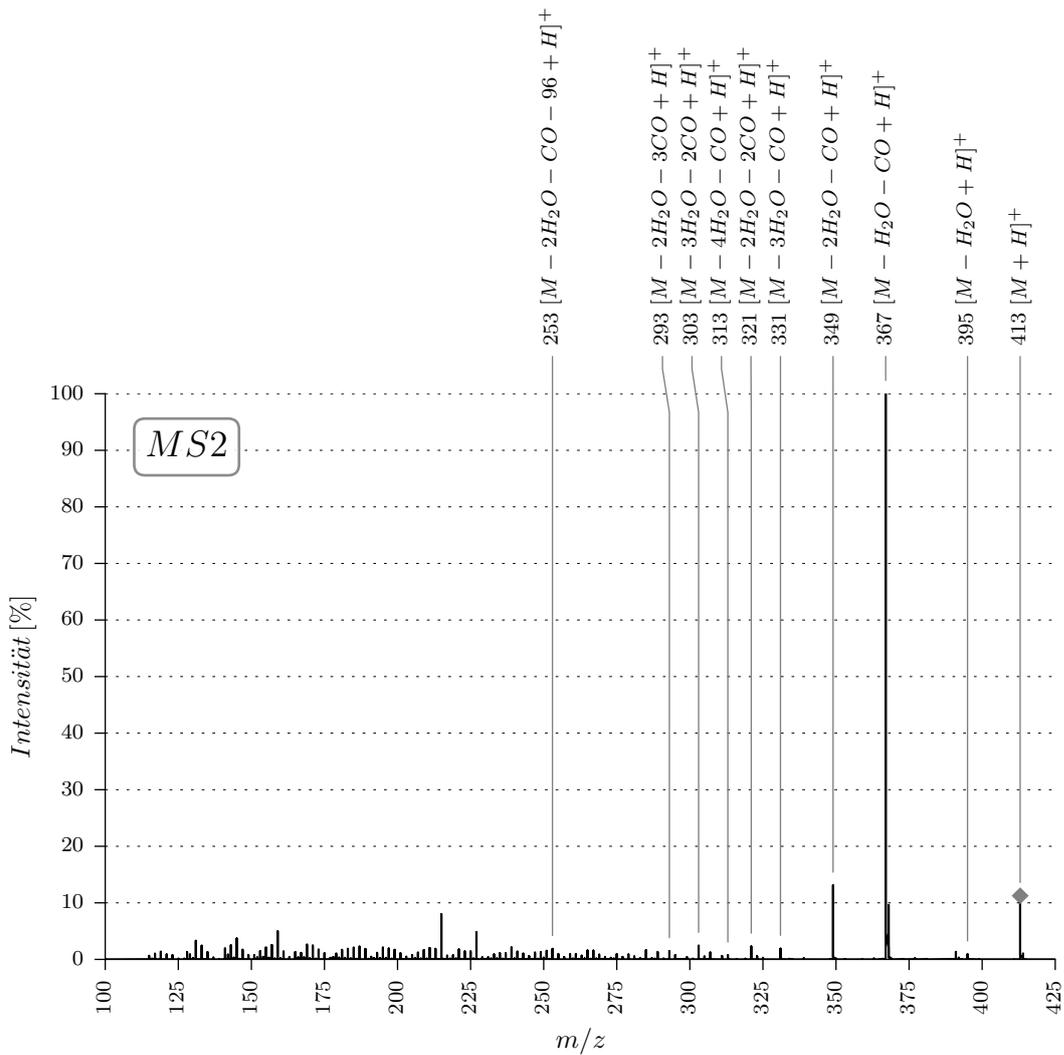
Summenformel: $C_{26}H_{32}O_6$ Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,15 β)-3-(Acetyloxy)-14,15-epoxy-19-oxo-bufa-20,22-dienolide

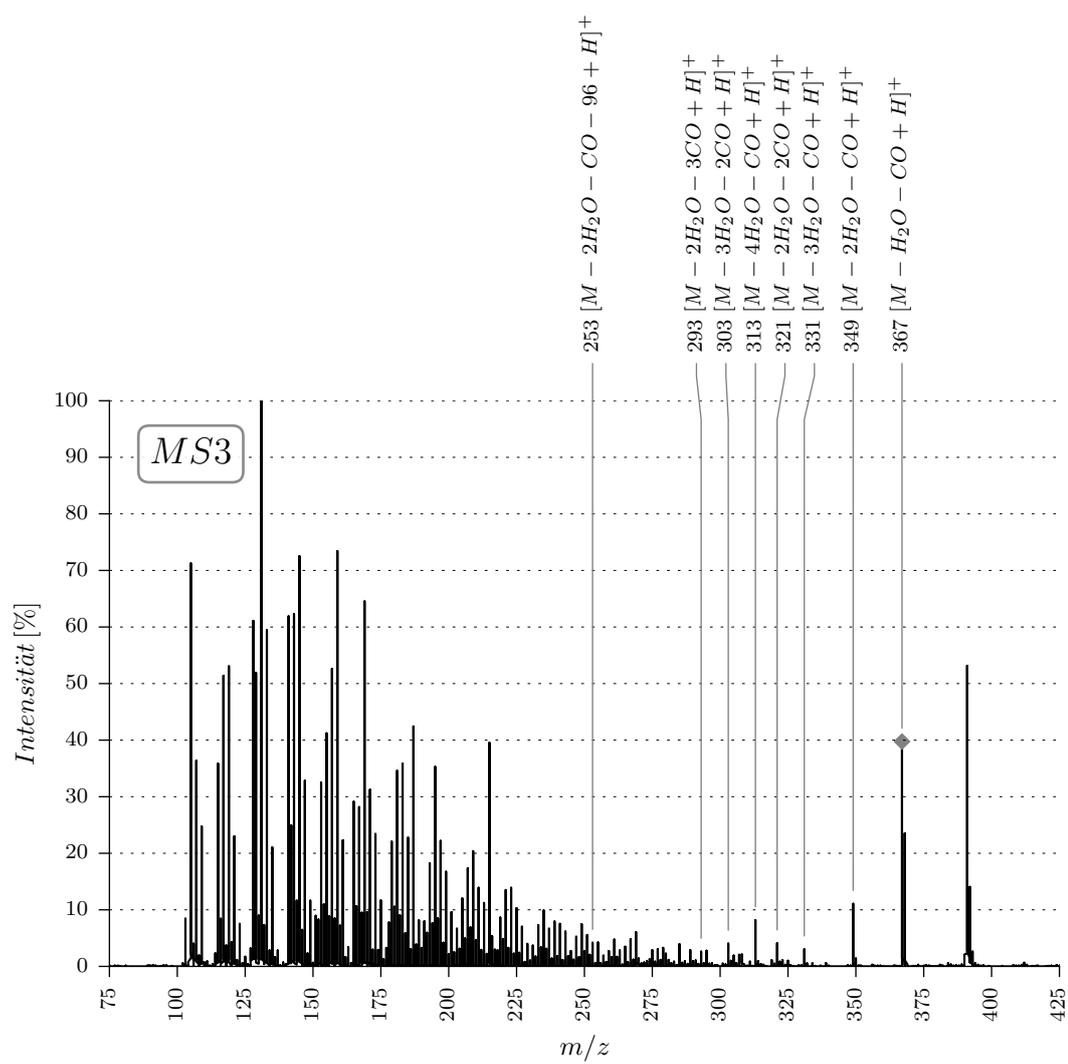
CAS-Nummer: 20987-25-1

Molekulargewicht: 440



B.36. 12A

Trivialname: Bufalin-Derivat**Summenformel:** $C_{25}H_{32}O_5$ **Chem. Bezeichnung:** (3 β ,5 β ,14 α ,15 α)-14,15-Epoxy-3-(formyloxy)-bufa-20,22-dienolide**Molekulargewicht:** 412



B.37. 14D

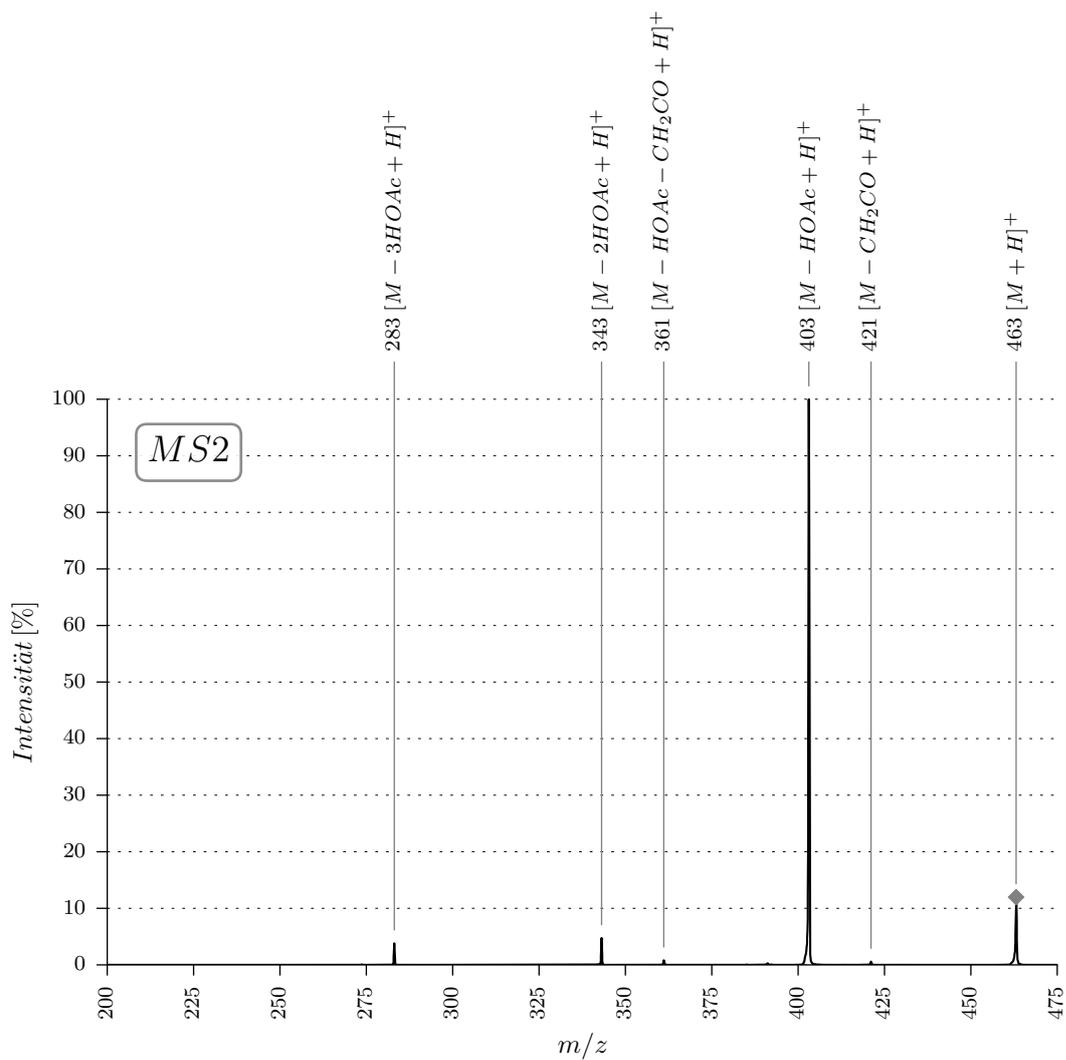
Trivialname: Buforenogin-Derivat

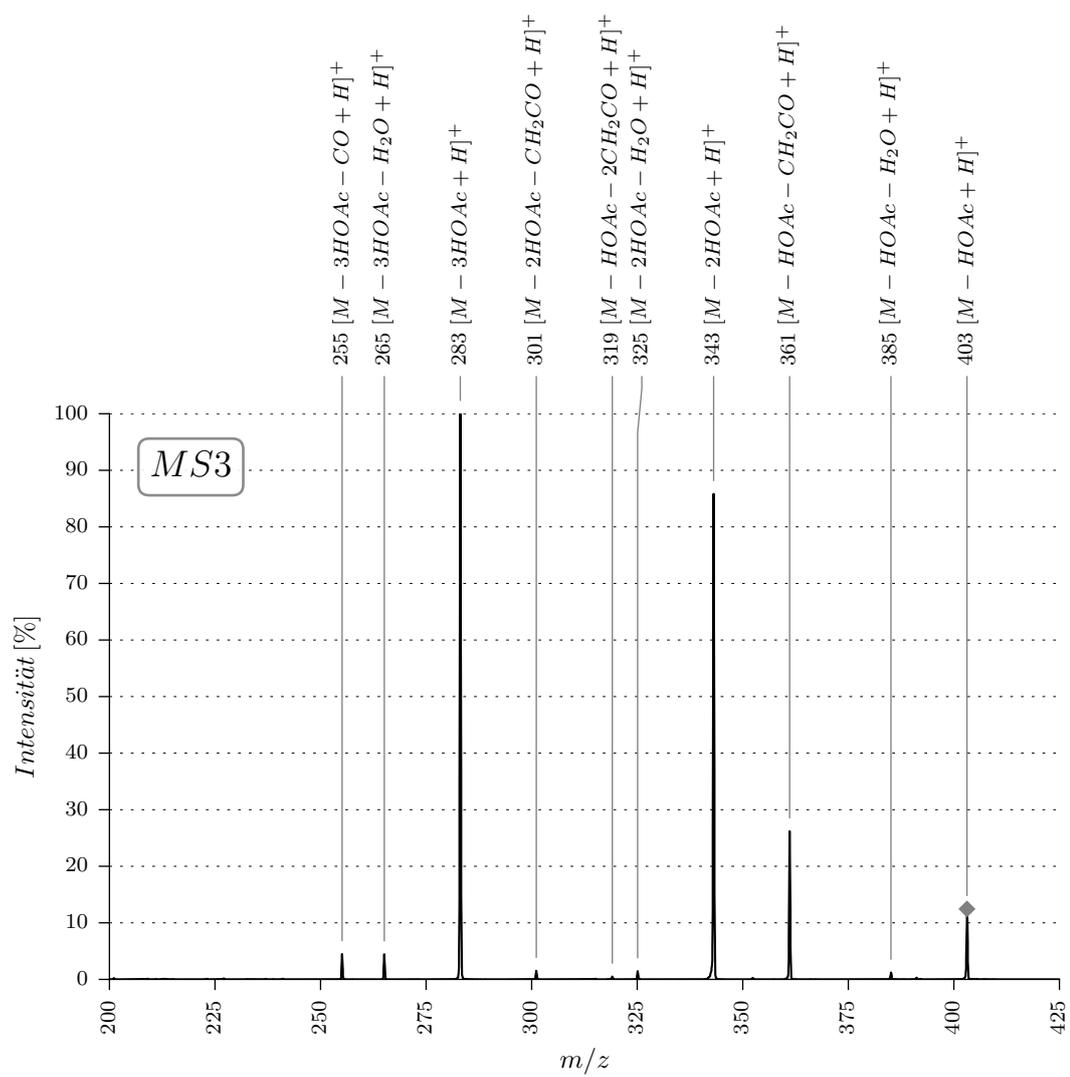
Summenformel: $C_{26}H_{38}O_7$

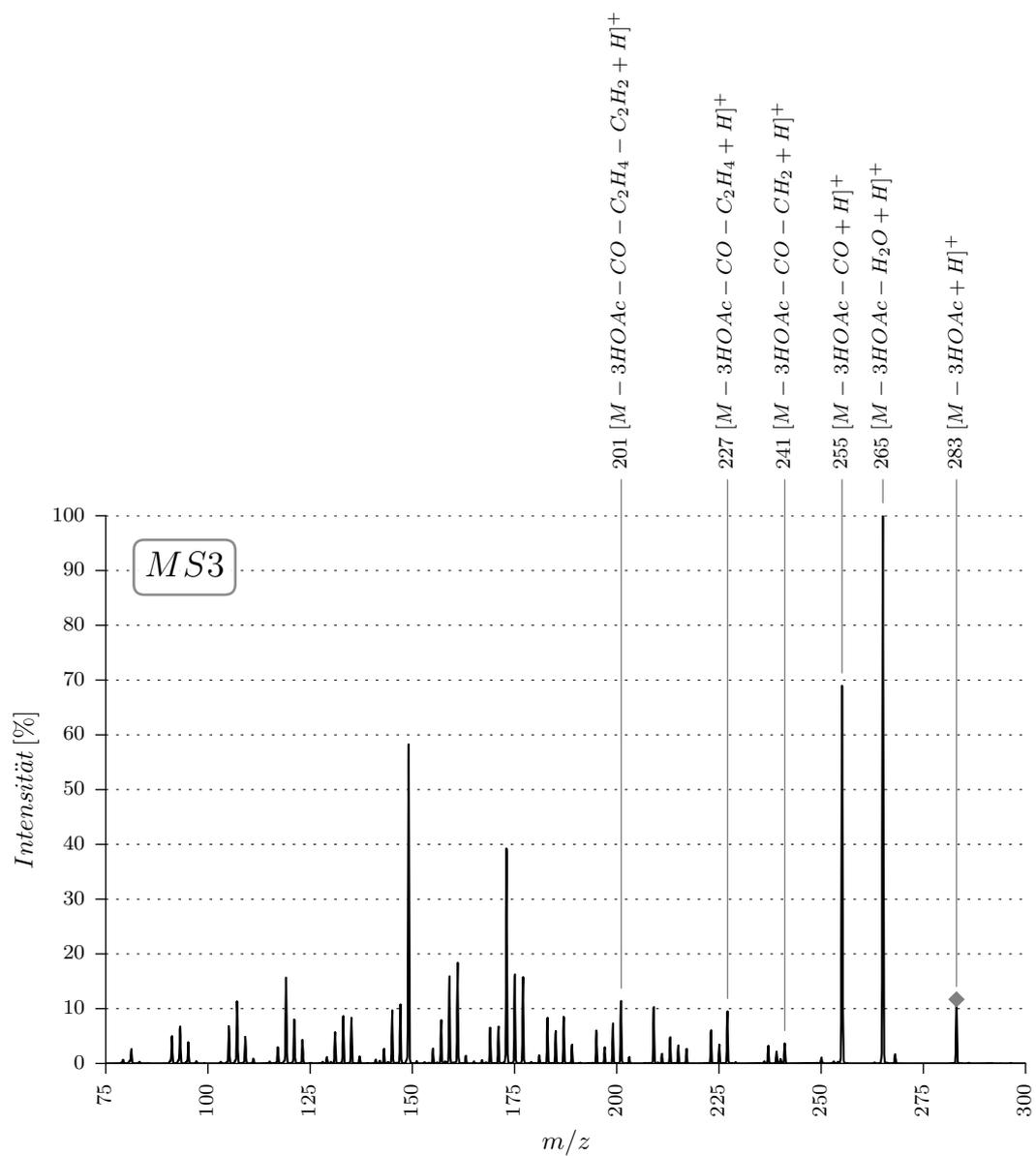
Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,12 β ,17 β)-3,12-Bis(acetyloxy)-11-oxo-androstane-17-hydroxymethyl- α -acetate

CAS-Nummer: 17007-97-5

Molekulargewicht: 462





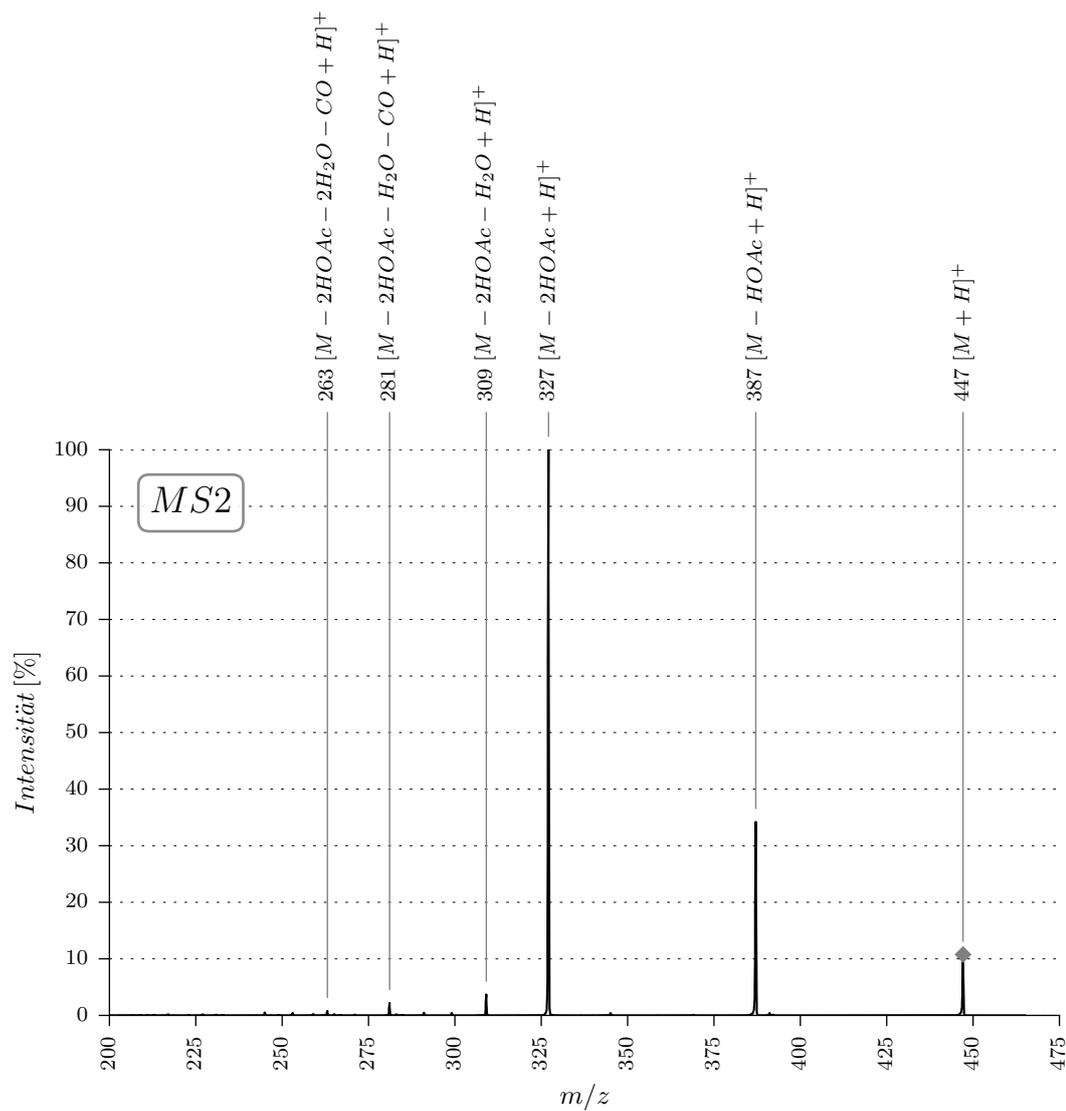


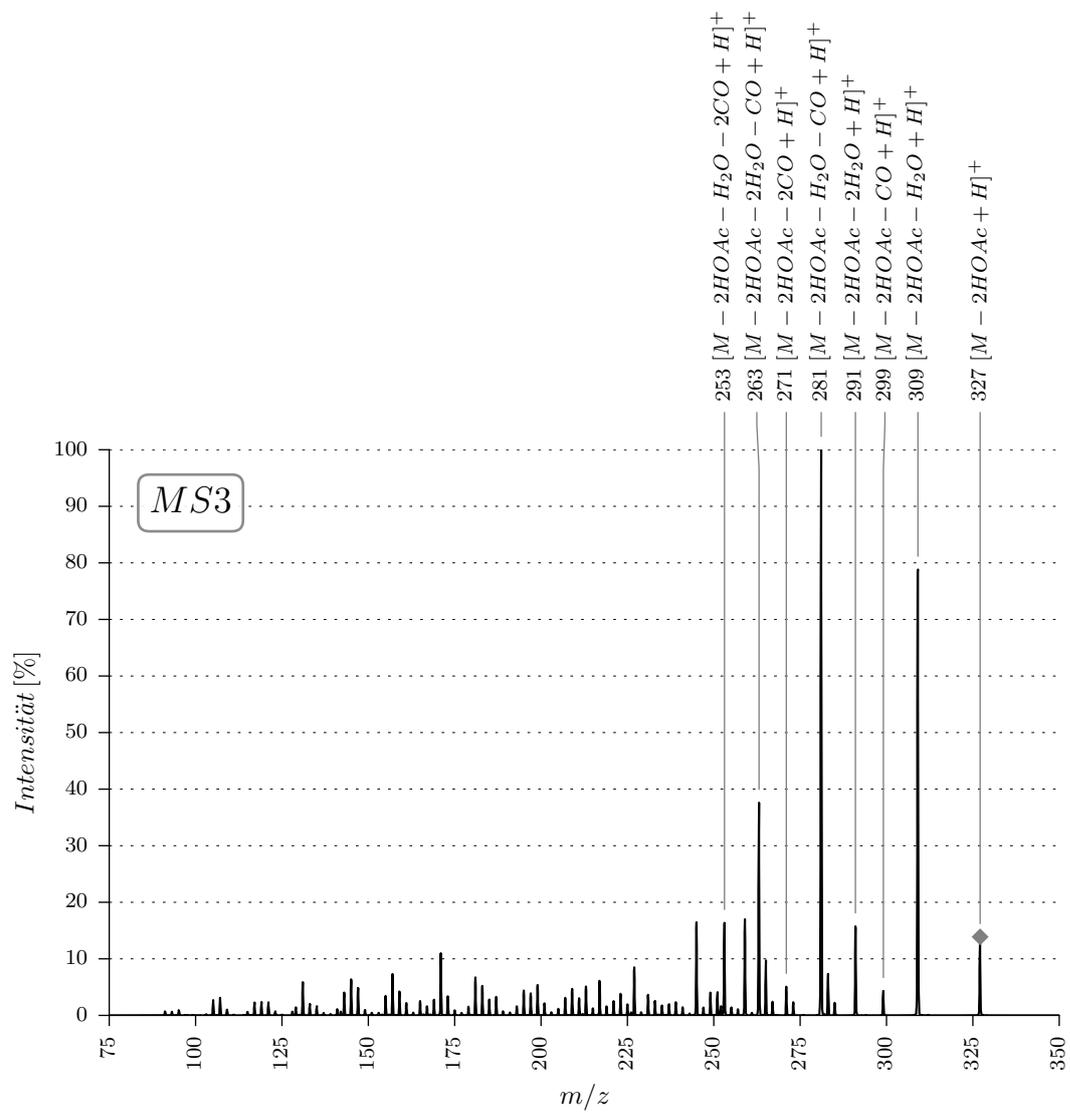
B.38. 15B

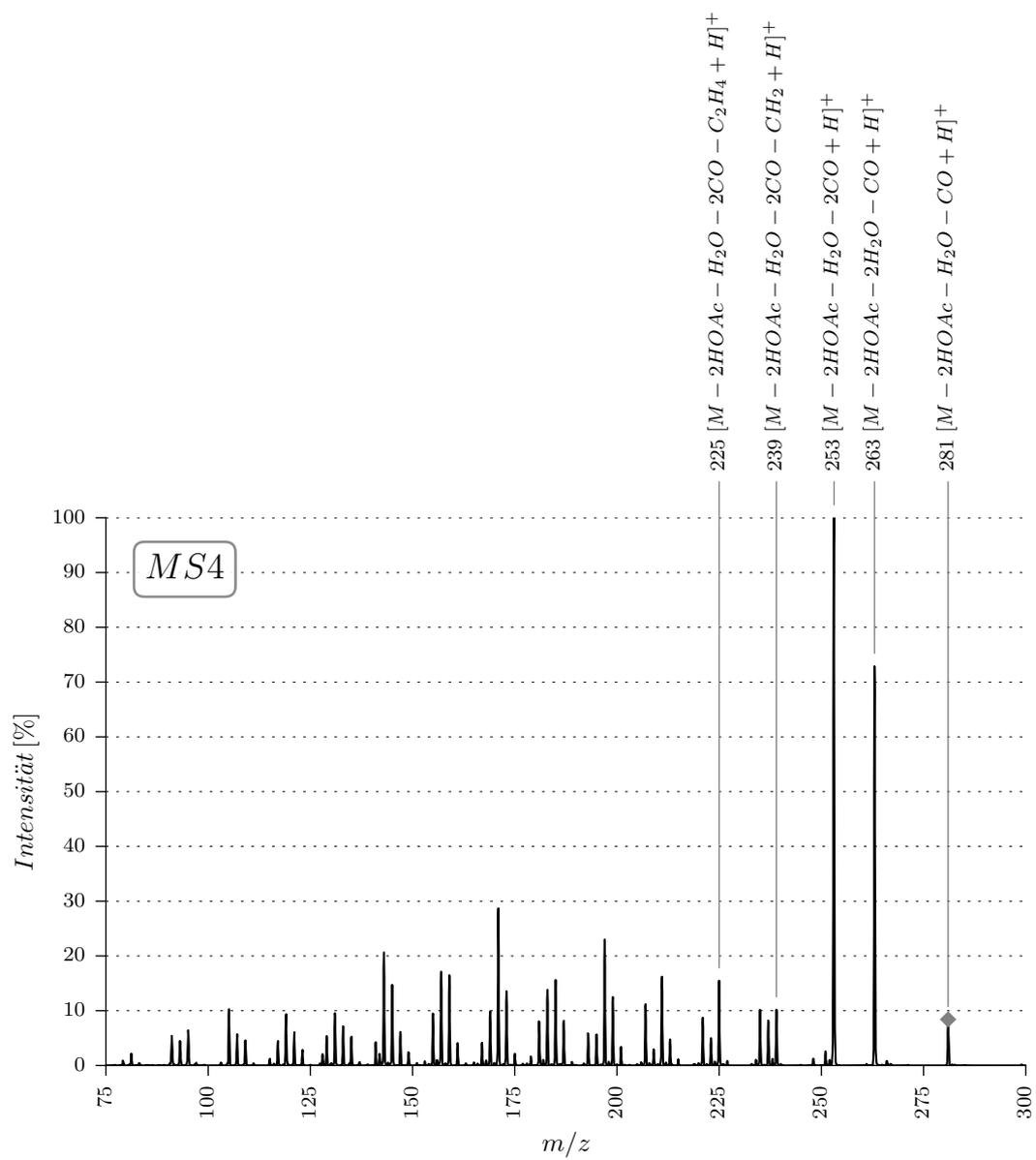
Summenformel: $C_{25}H_{34}O_7$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,12 α ,14 β ,17 β)-3,12-bis(Acetyloxy)-14-hydroxy-20-oxo-pregnan-21-oic acid δ -lactone

Molekulargewicht: 446







B.39. 15C

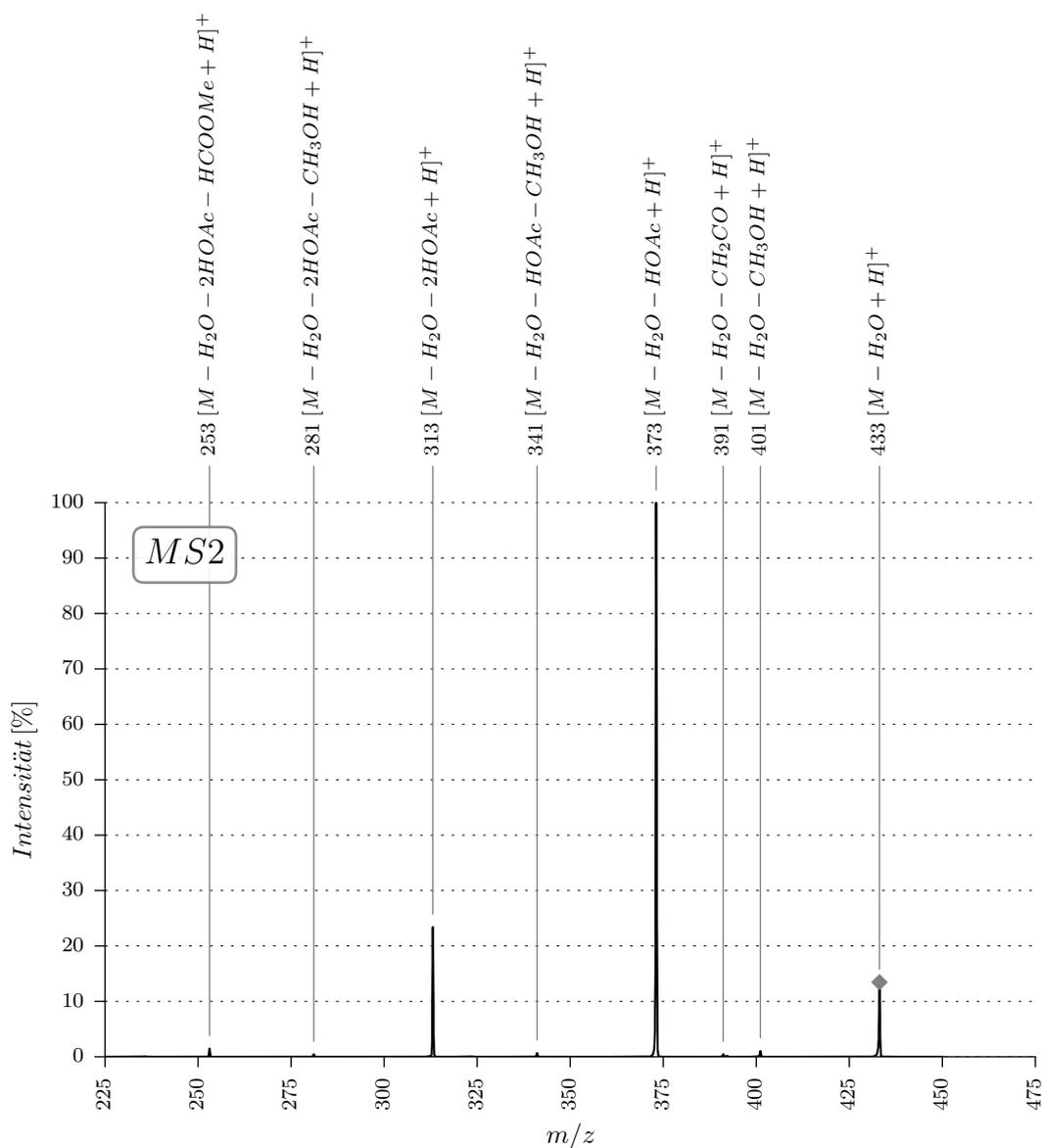
Trivialname: Buforenogin-Abbauprodukt

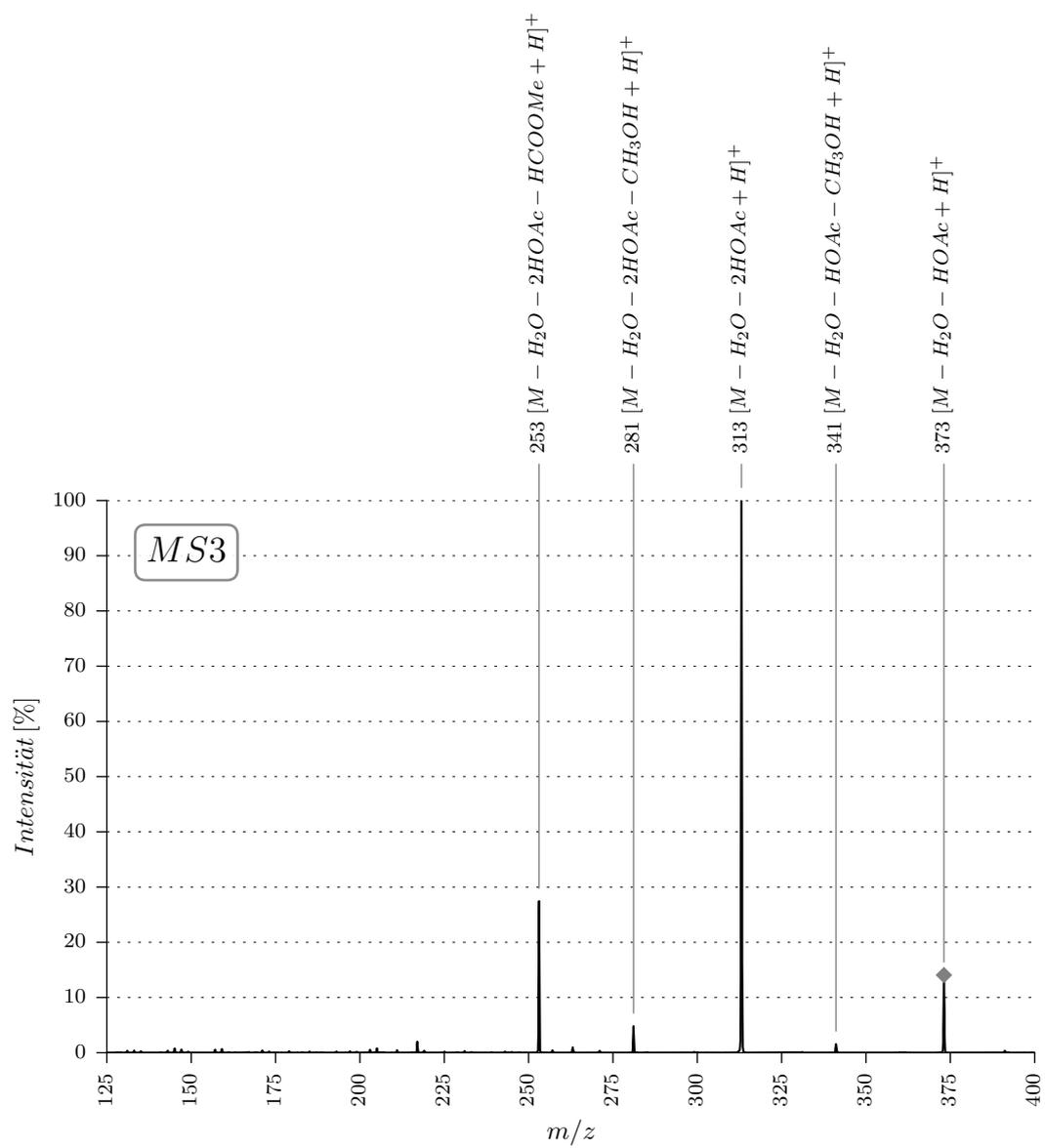
Summenformel: $C_{25}H_{38}O_7$

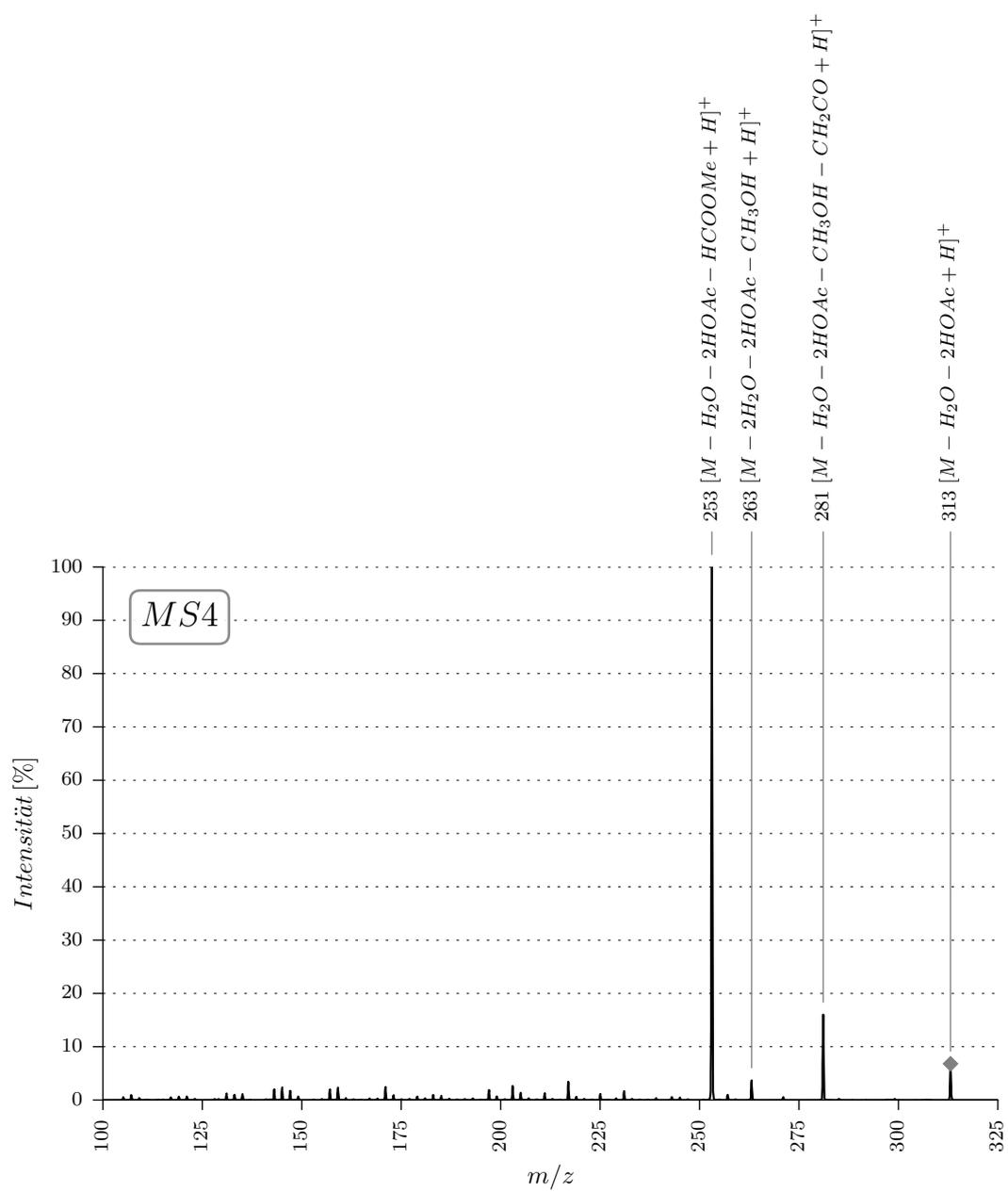
Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,12 α ,14 β ,17 β)-3,12-bis(Acetoxy)-14-hydroxy-androstane-17-carboxylic acid methyl ester

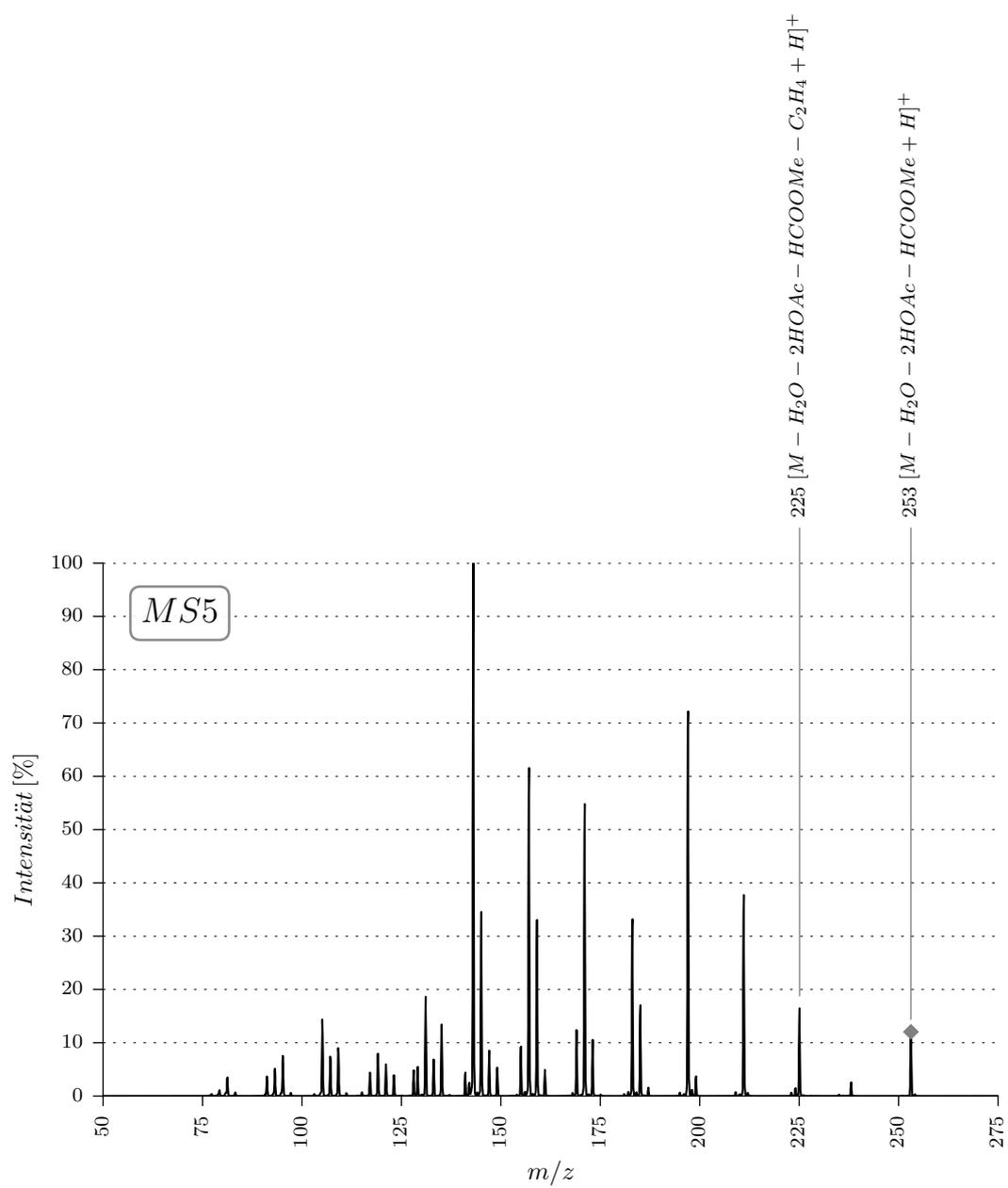
CAS-Nummer: 2842-89-9

Molekulargewicht: 450









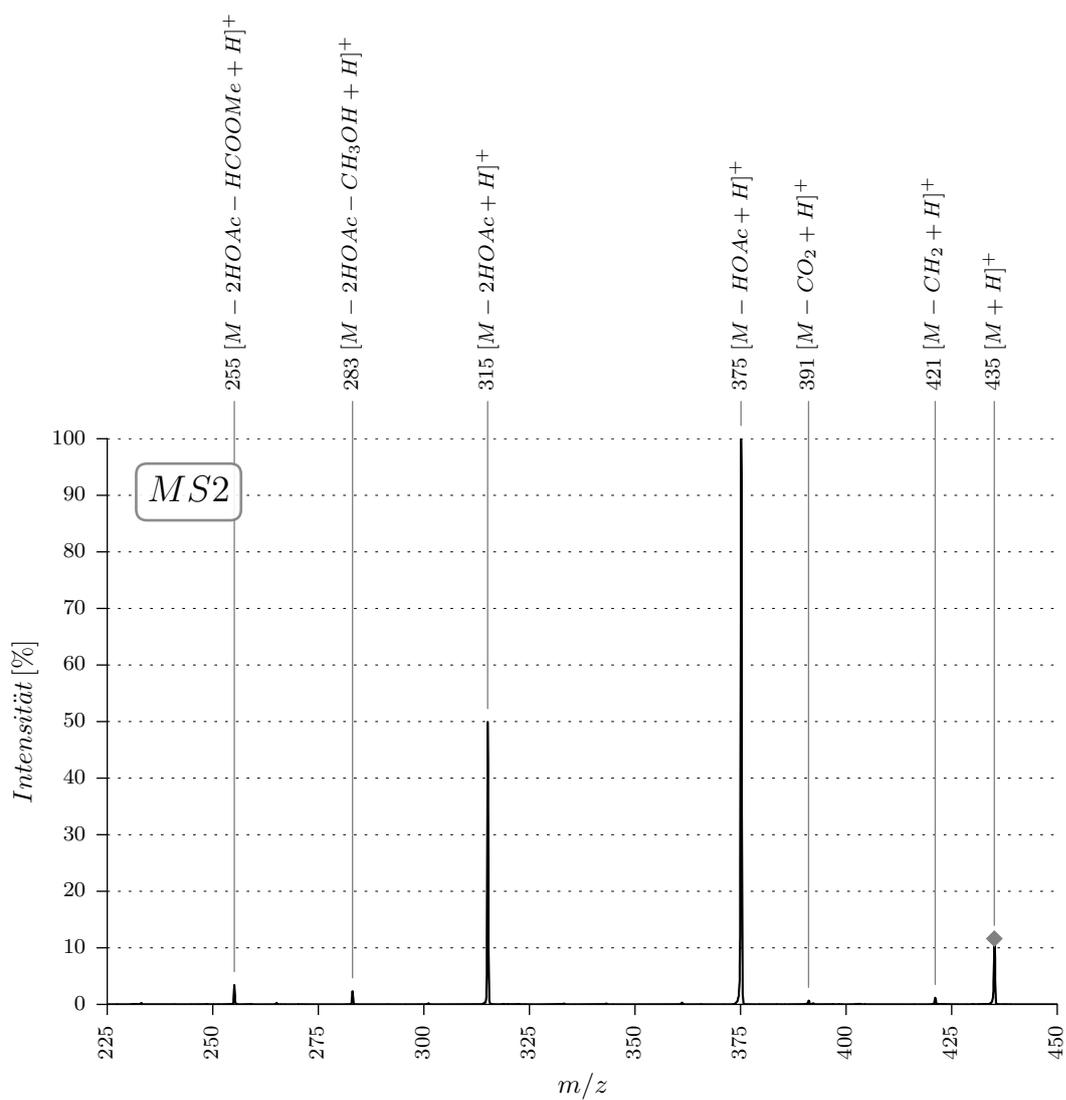
B.40. 15D

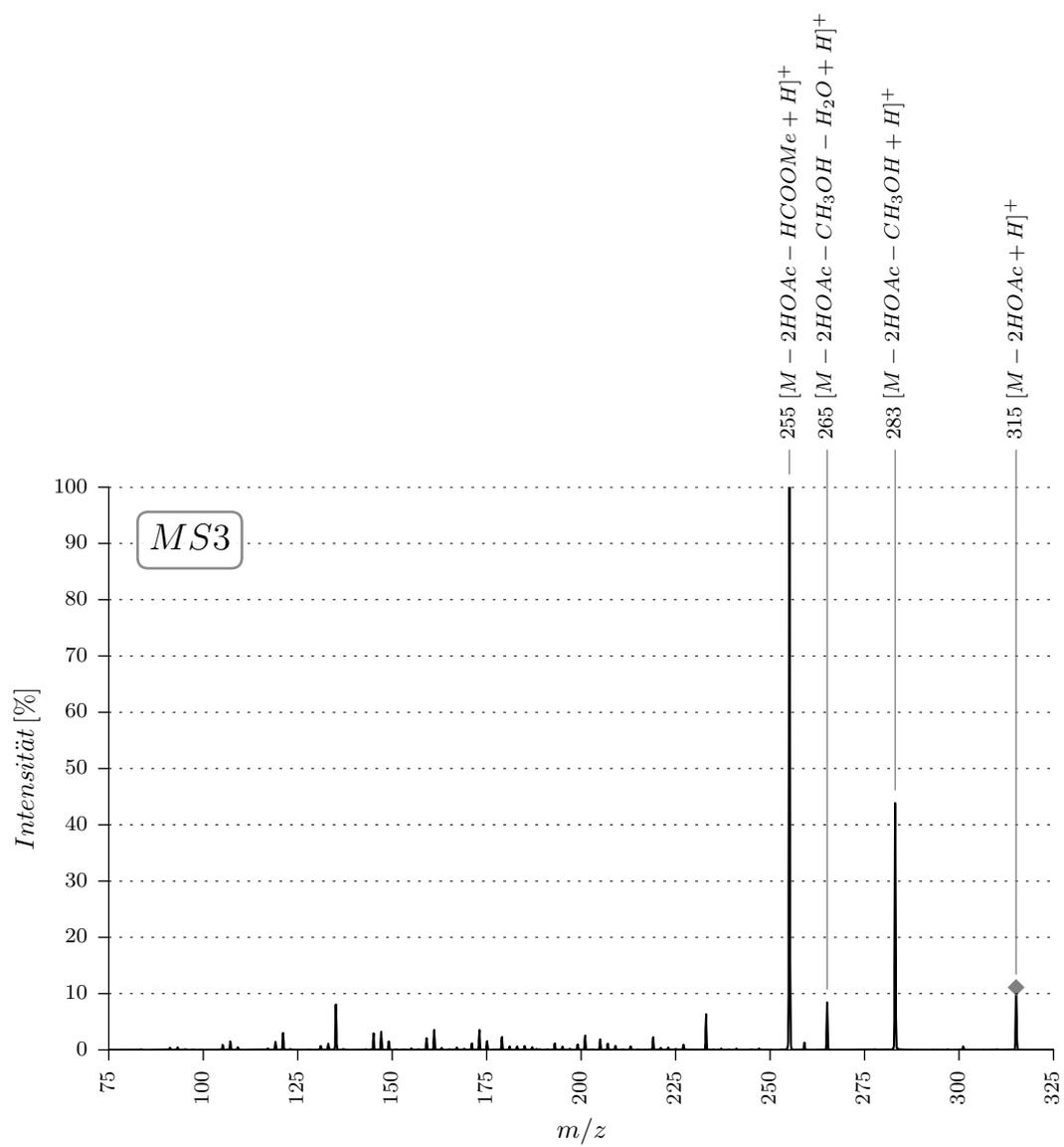
Trivialname: Buforenogin-Abbauprodukt

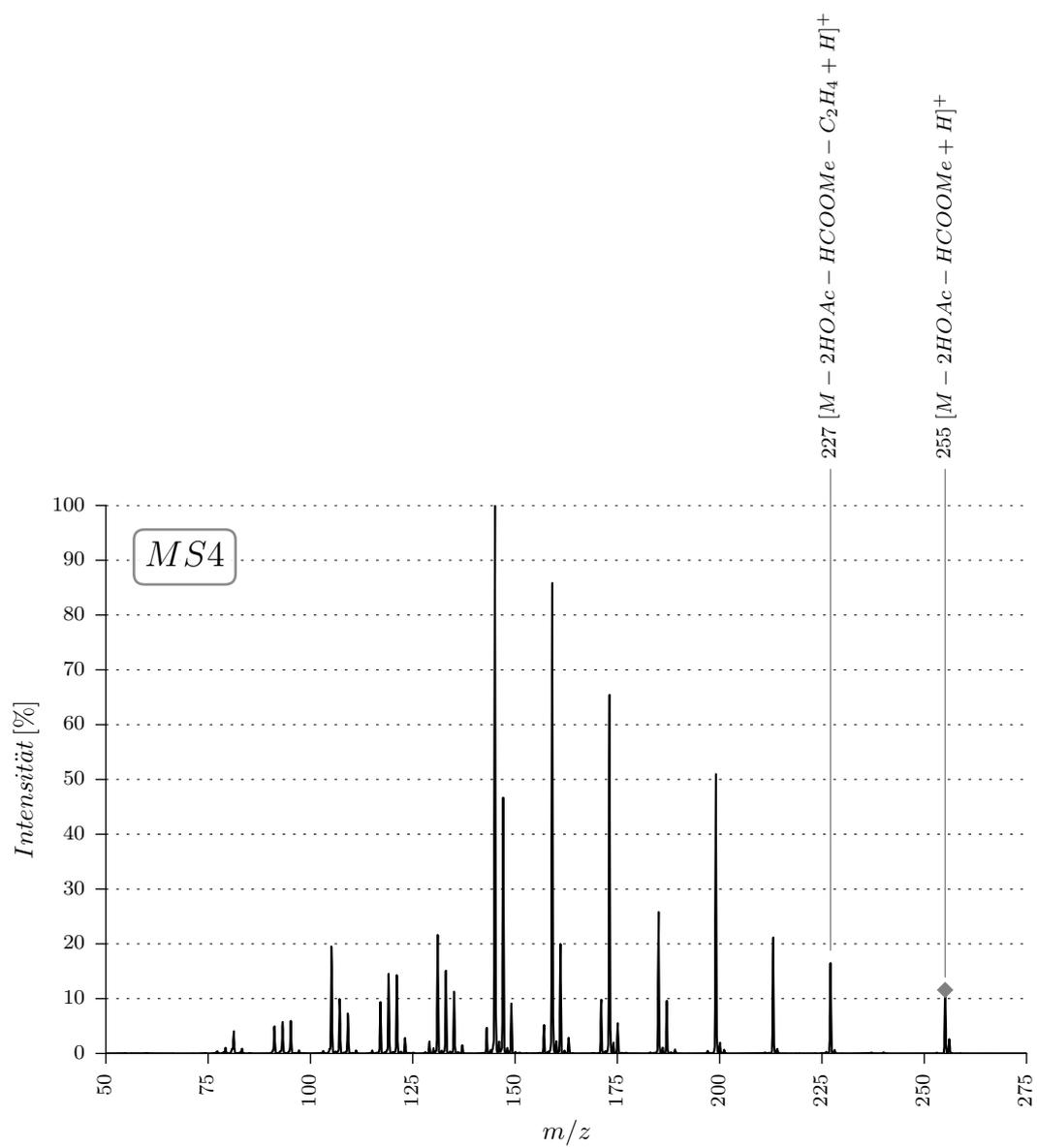
Summenformel: $C_{25}H_{38}O_6$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,12 α)-3,12-bis(Acetyloxy)-etiocholanic acid methyl ester

Molekulargewicht: 434







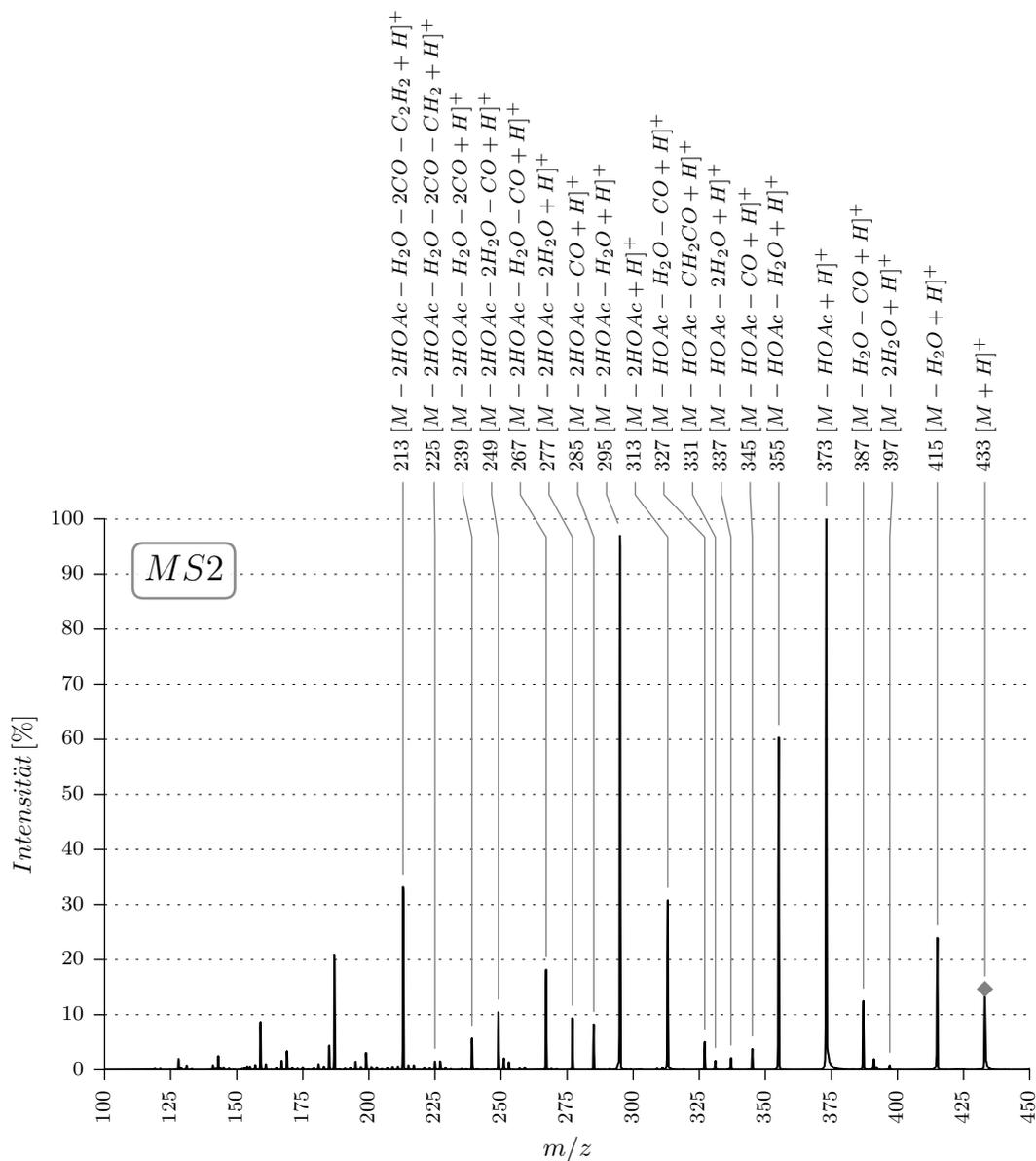
B.41. 15H

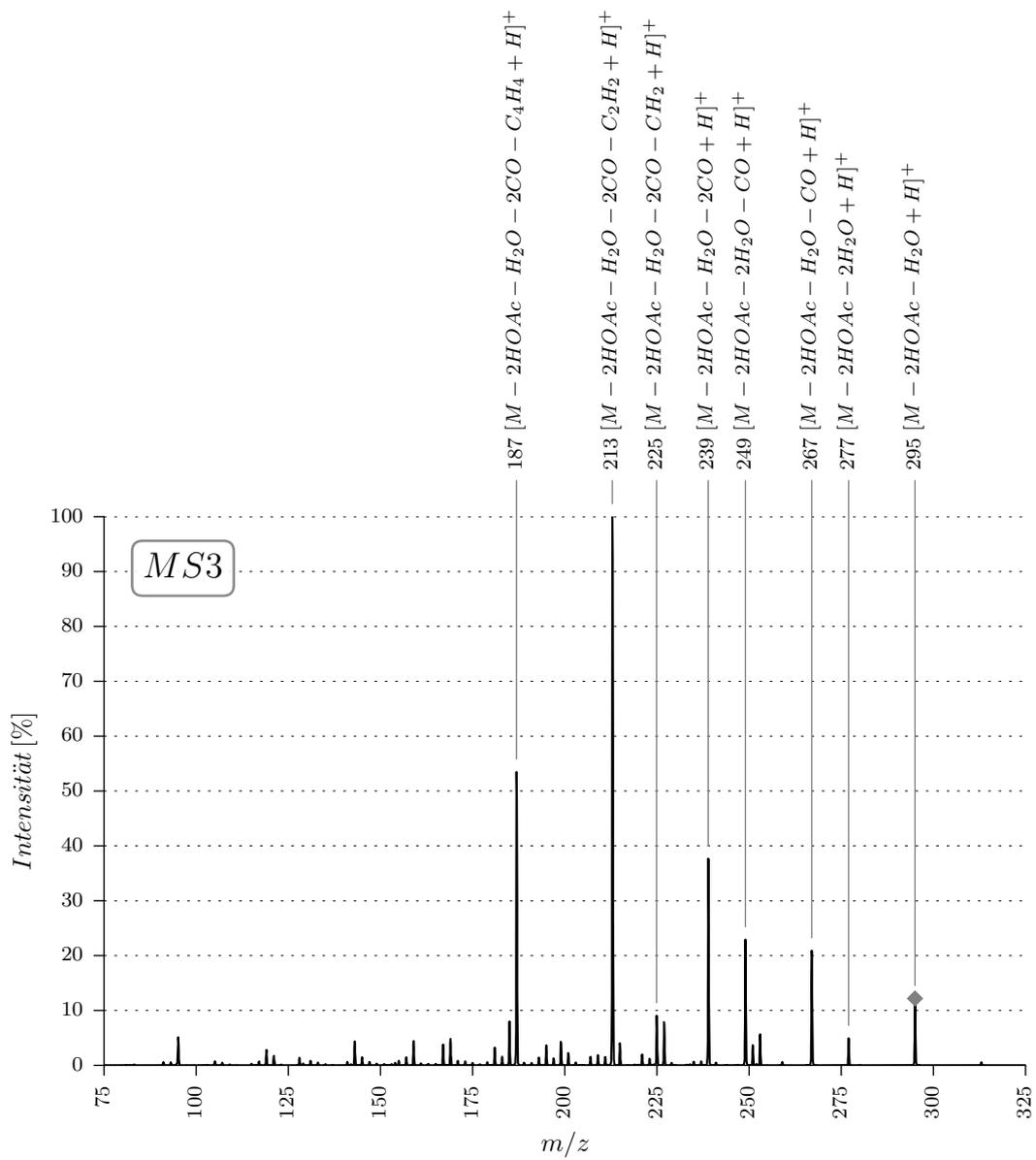
Trivialname: Buforenogin-Abbauprodukt

Summenformel: $C_{24}H_{32}O_7$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,11 α ,14 β ,17 β)-3,11-Bis(acetyloxy)-14-hydroxy-12-oxo-androstane-17-carboxylic acid γ -lactone

Molekulargewicht: 432



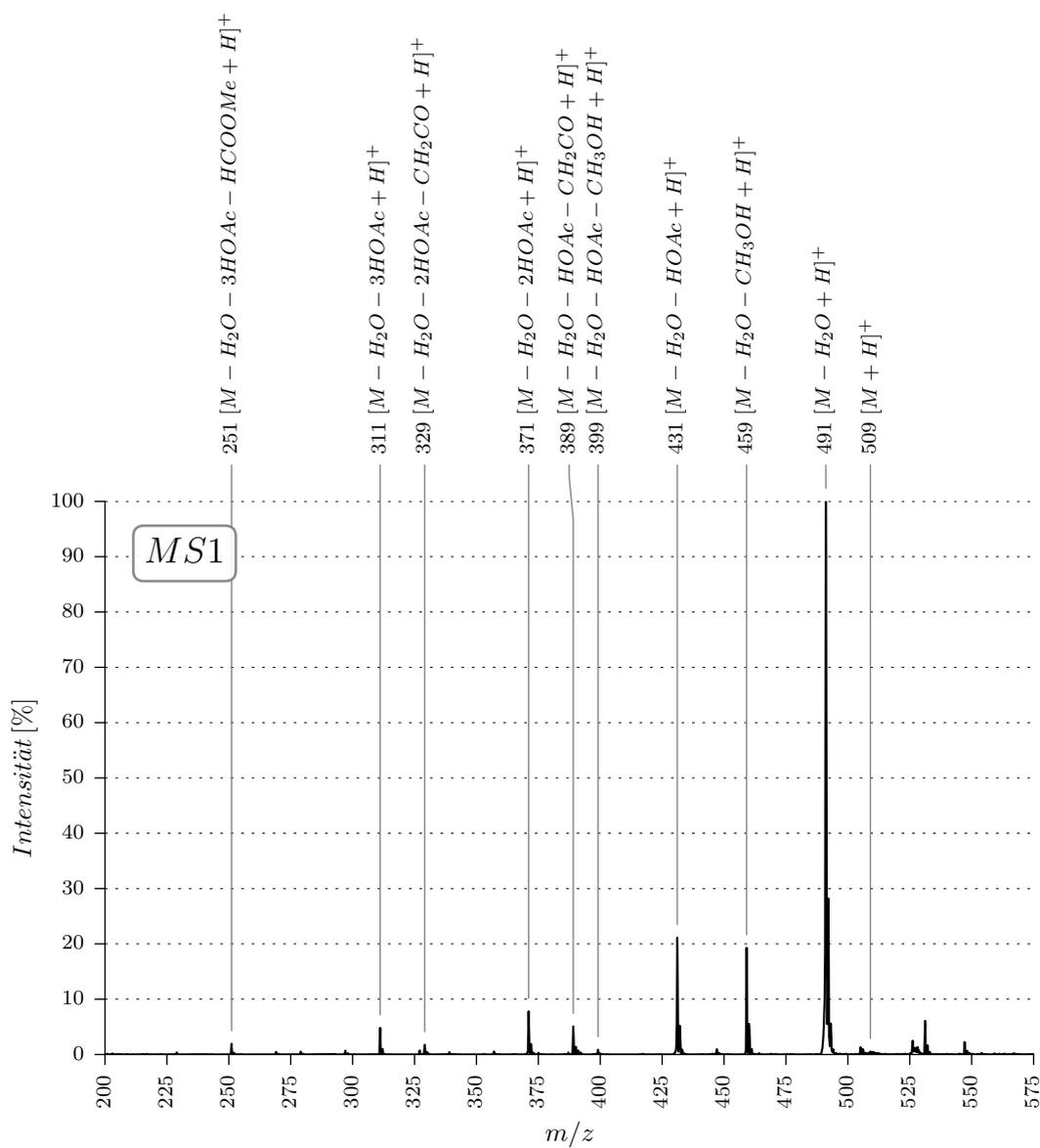


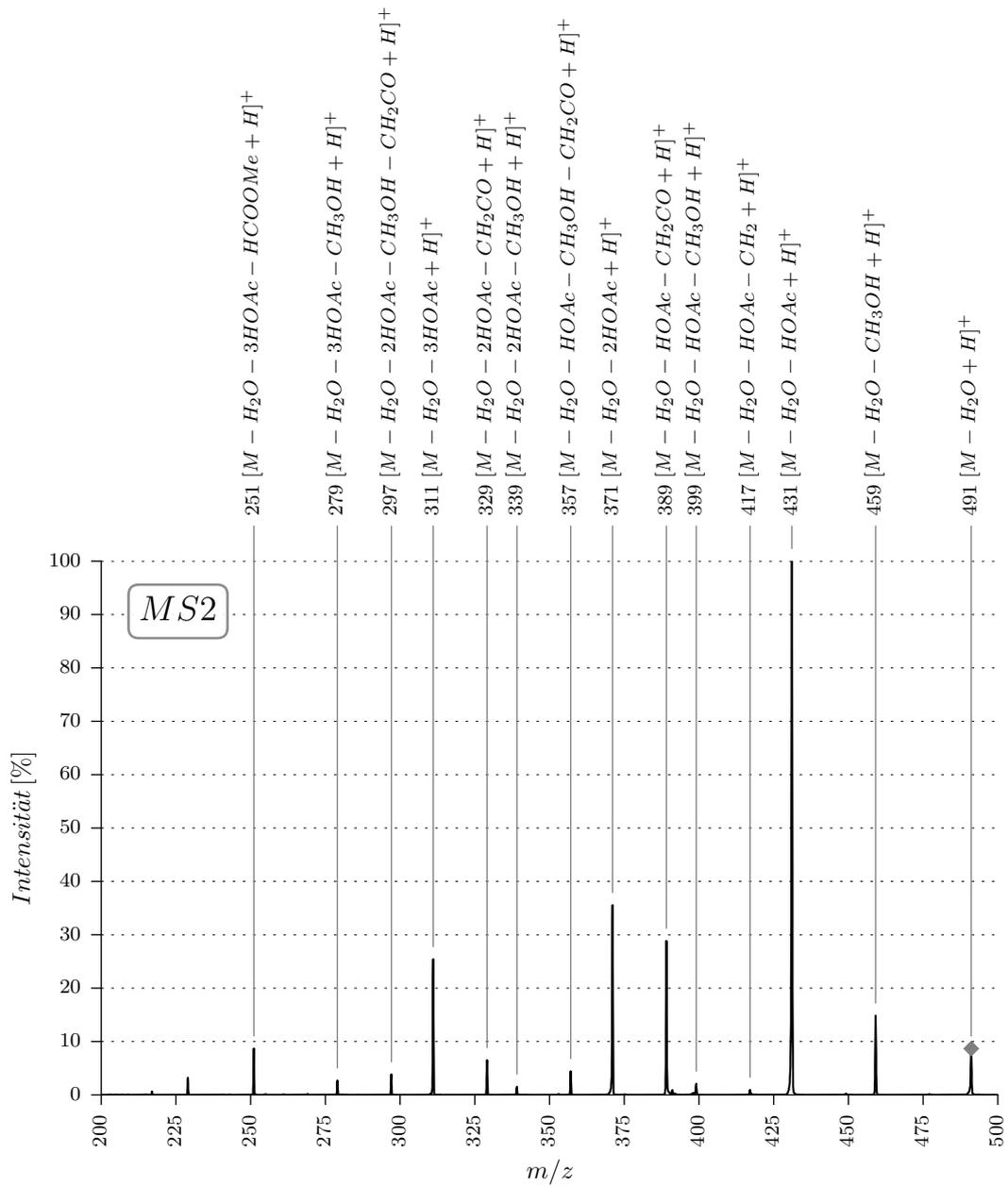
B.42. 15S

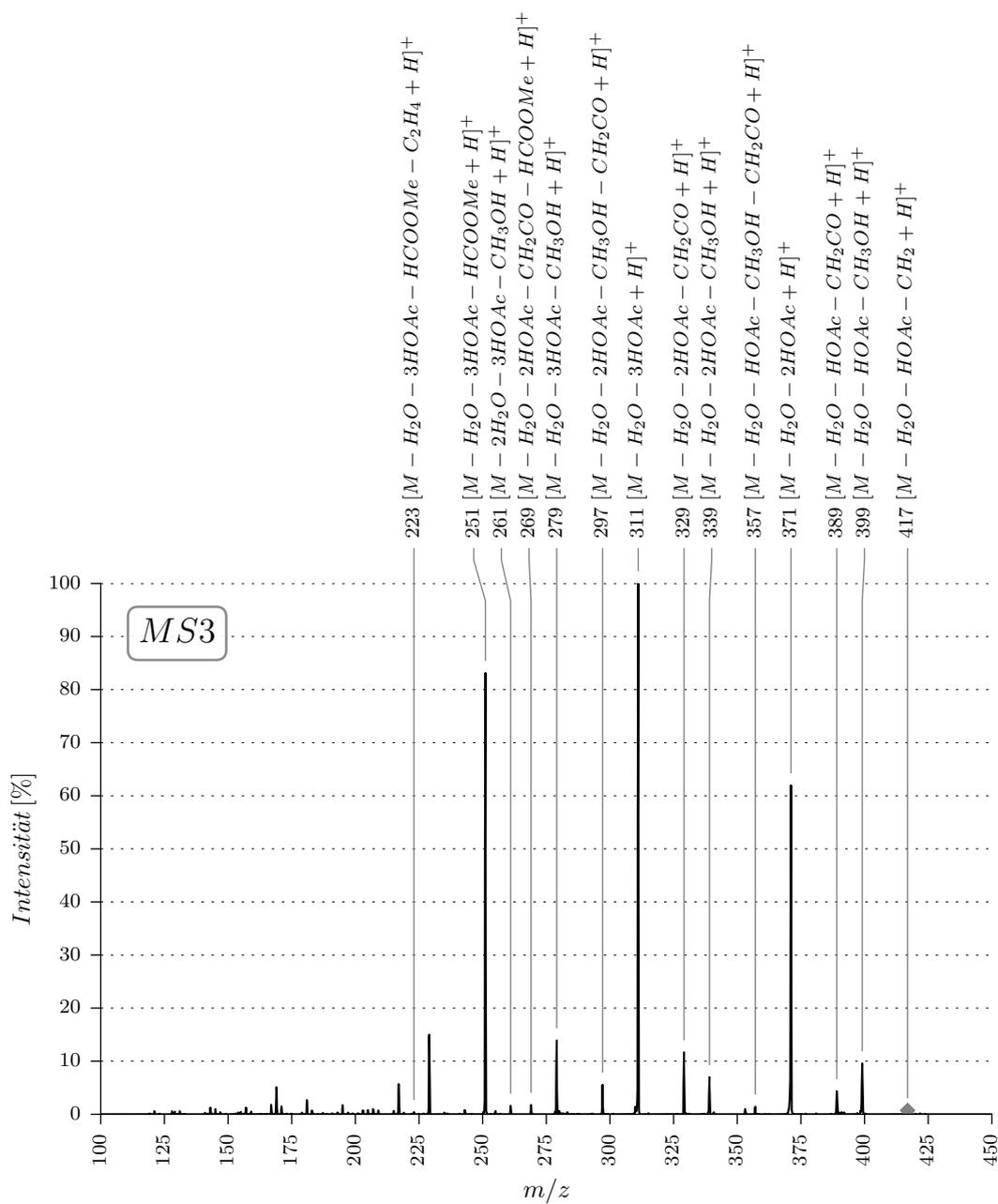
Summenformel: $C_{27}H_{40}O_9$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,11 α ,12 β ,14 β ,17 β)-3,11,12-Tris(acetyloxy)-14-hydroxy-androstane-17-carboxylic acid methyl ester

Molekulargewicht: 508



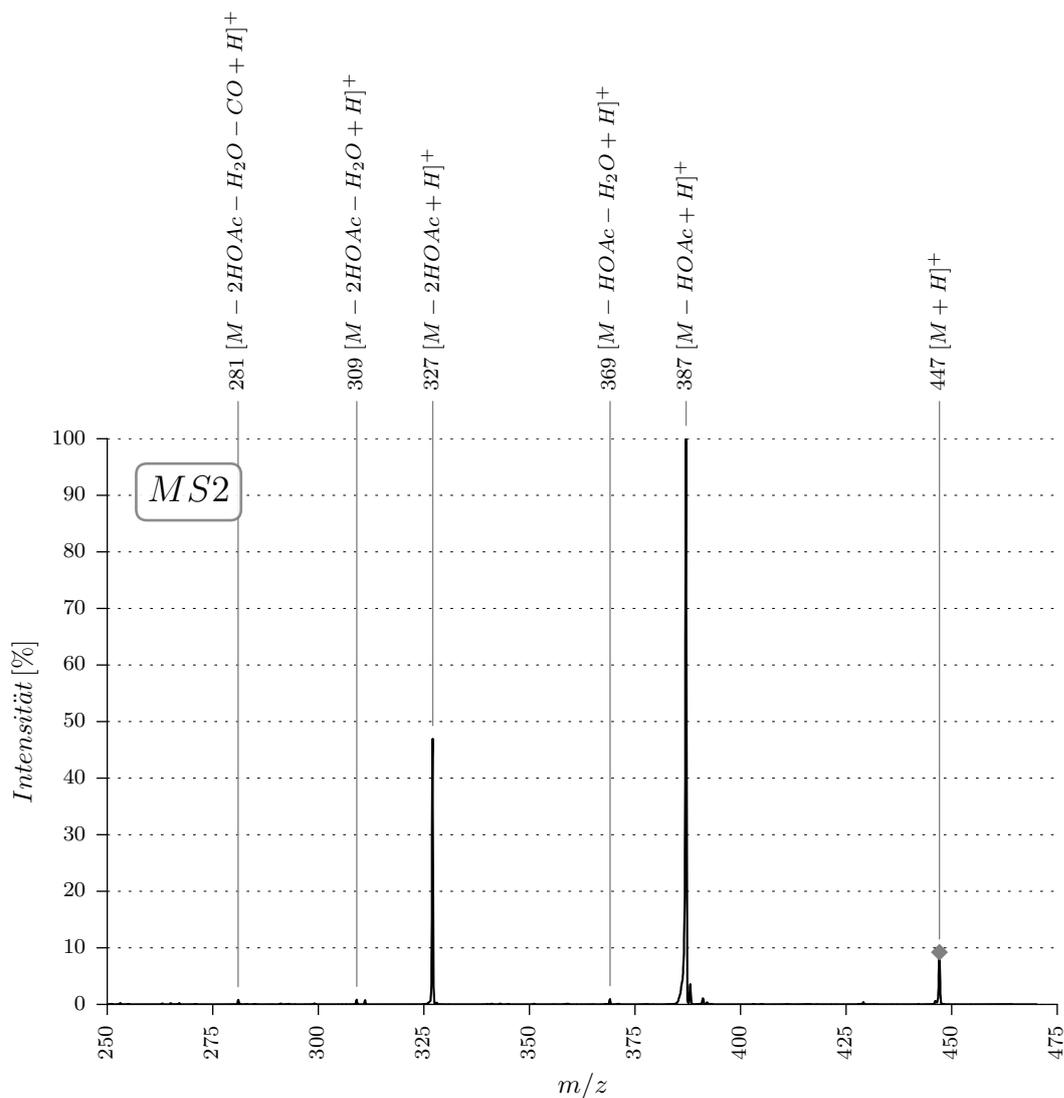


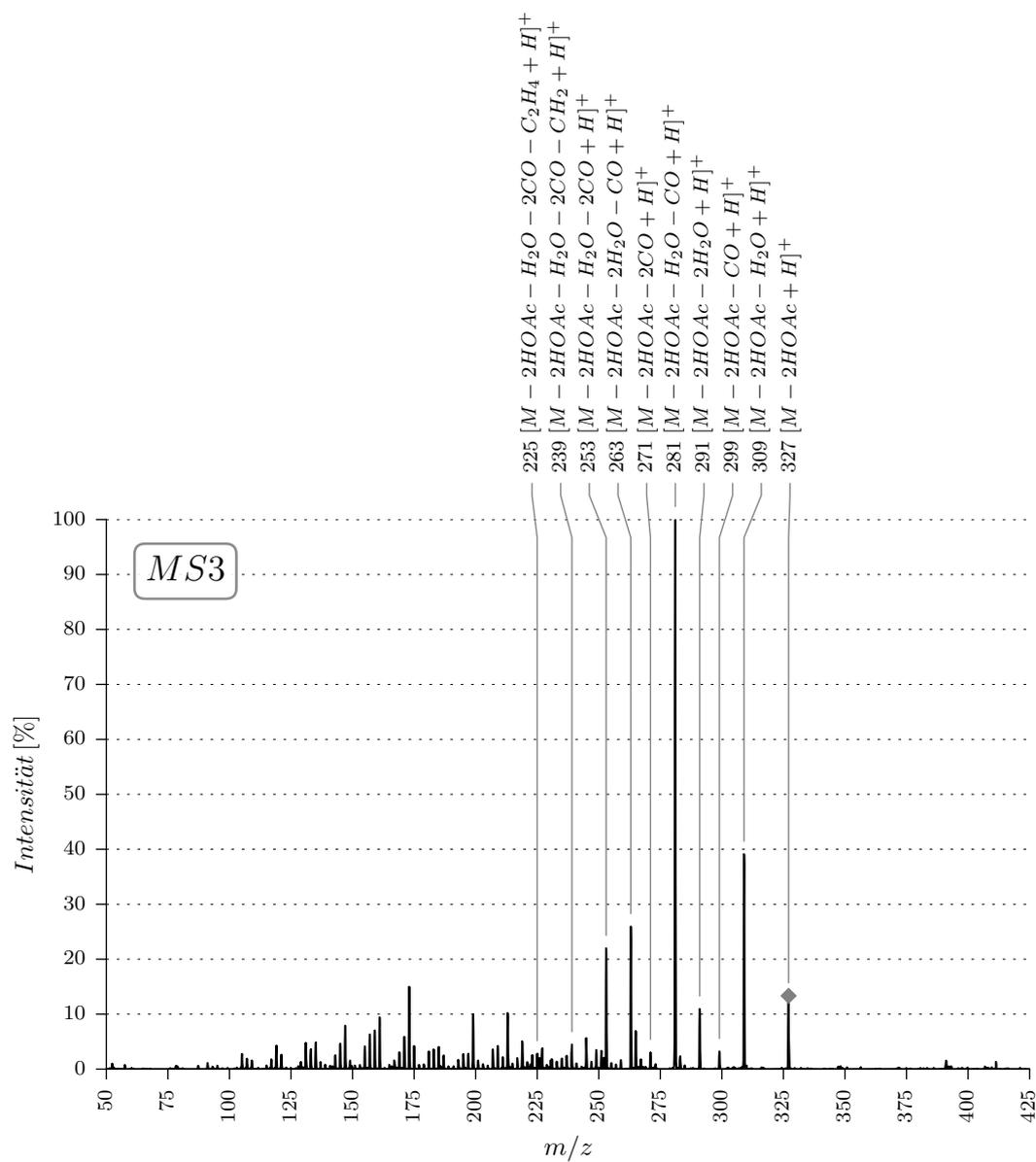


B.43. 20F

Summenformel: $C_{25}H_{34}O_7$ Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,14 β ,16 β ,17 β)-3,16-bis(Acetyloxy)-14-hydroxy-20-oxo-pregnan-21-oic acid δ -lactone

Molekulargewicht: 446





B.44. 22N

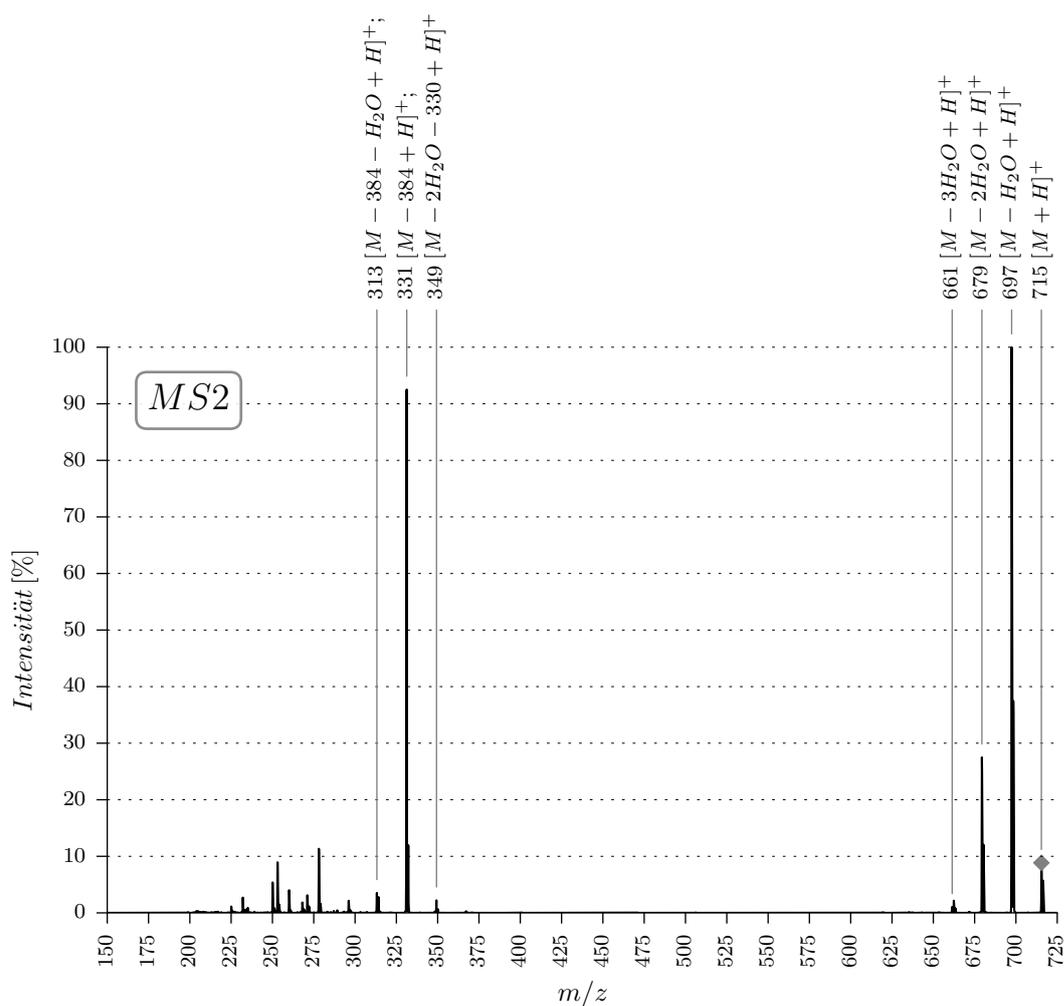
Trivialname: Telocinobufatoxin

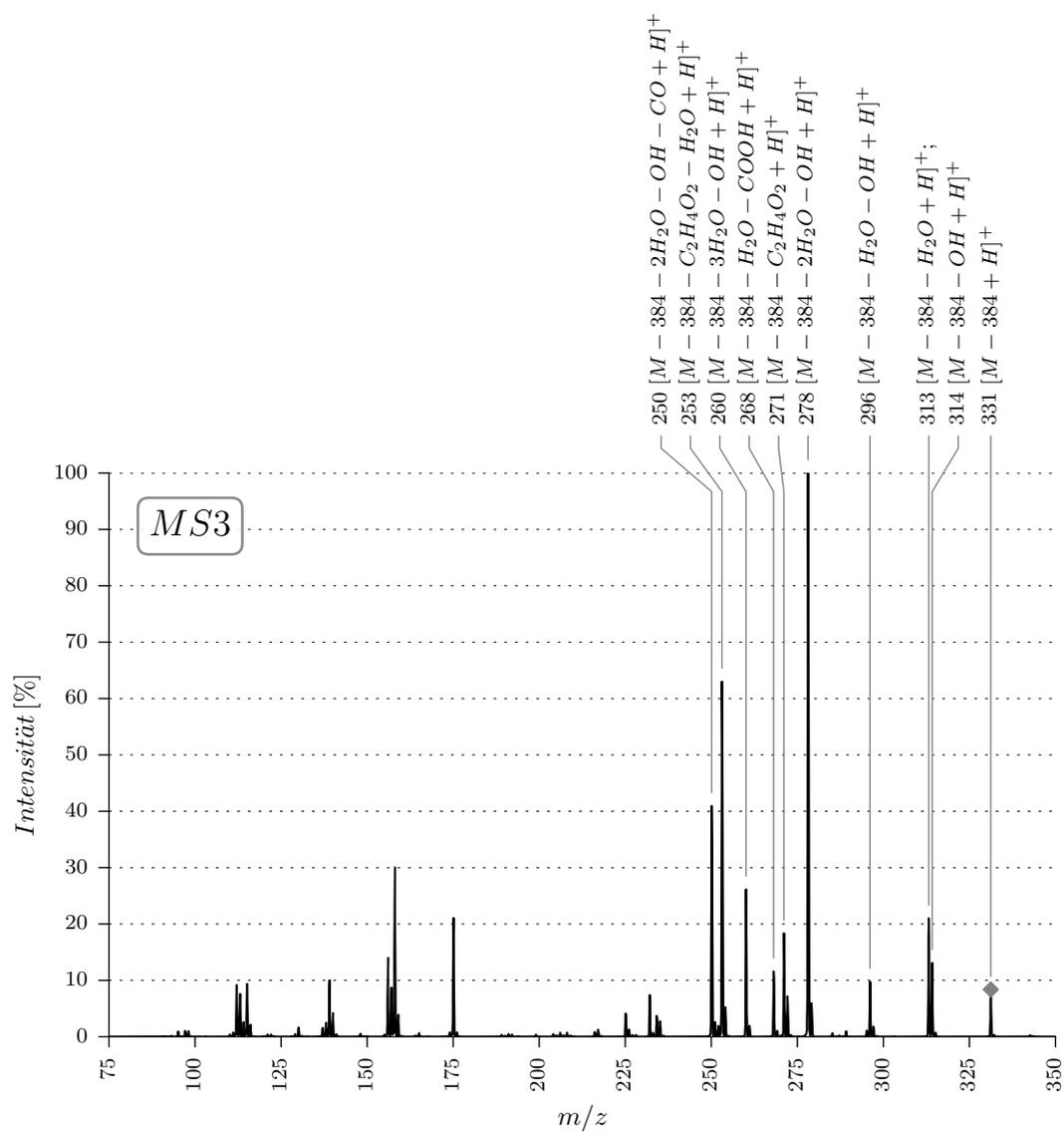
Summenformel: $C_{38}H_{58}N_4O_9$

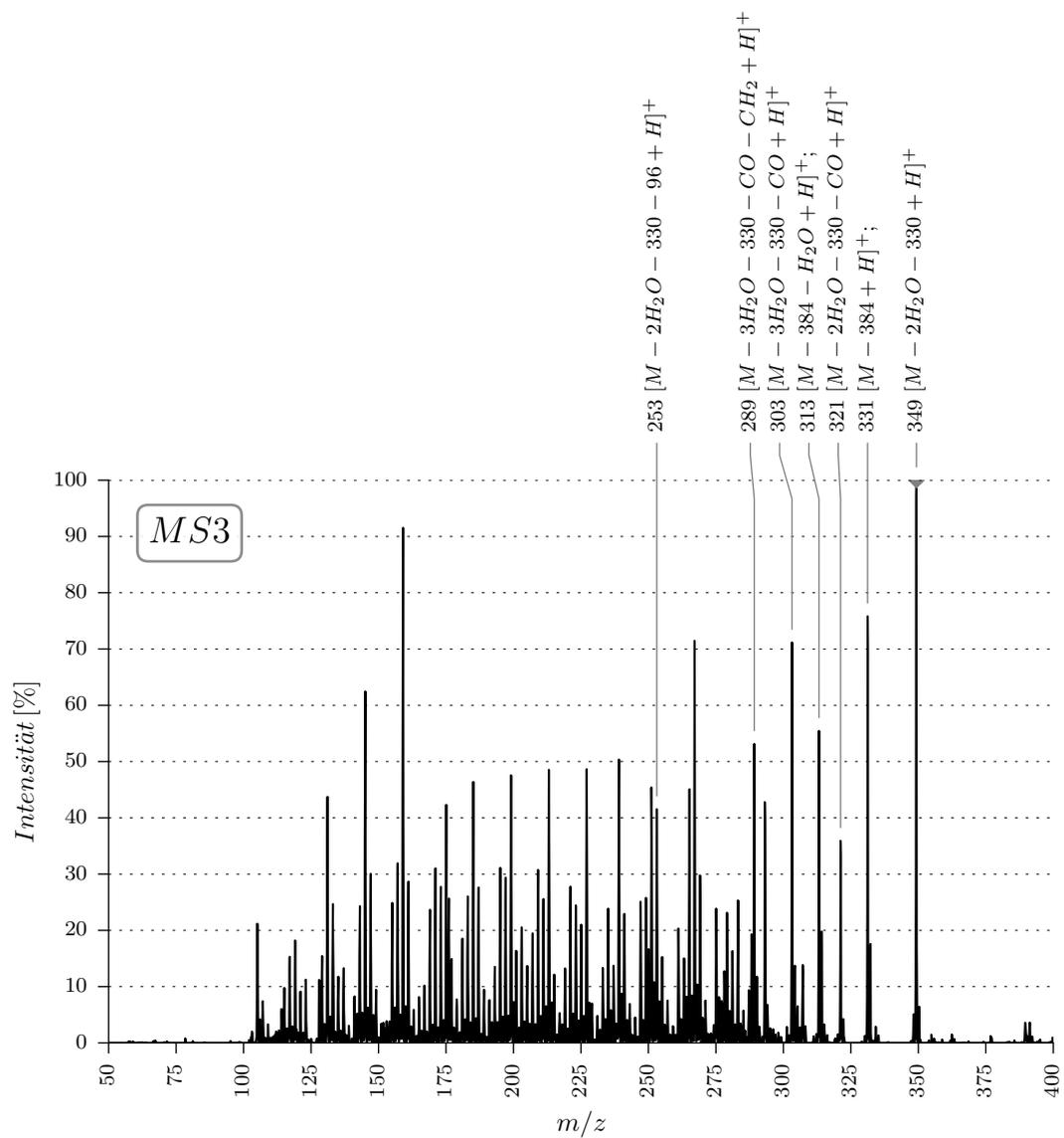
Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β)-3-[[8-[[4-[(aminoiminomethyl)amino]-1-carboxybutyl]amino]-1,8-dioxooctyl]oxy]-5,14-dihydroxy-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 72093-20-0

Molekulargewicht: 714





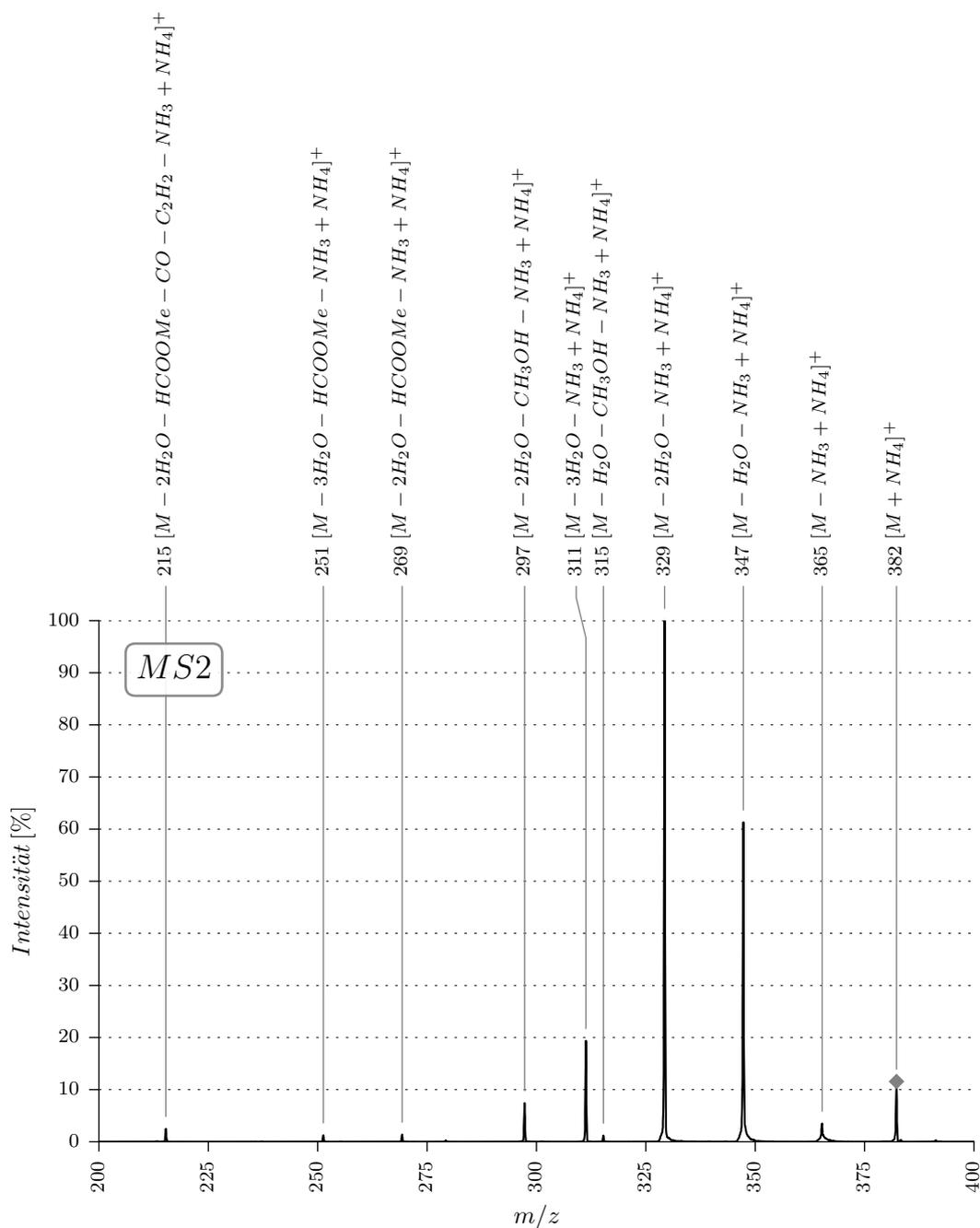


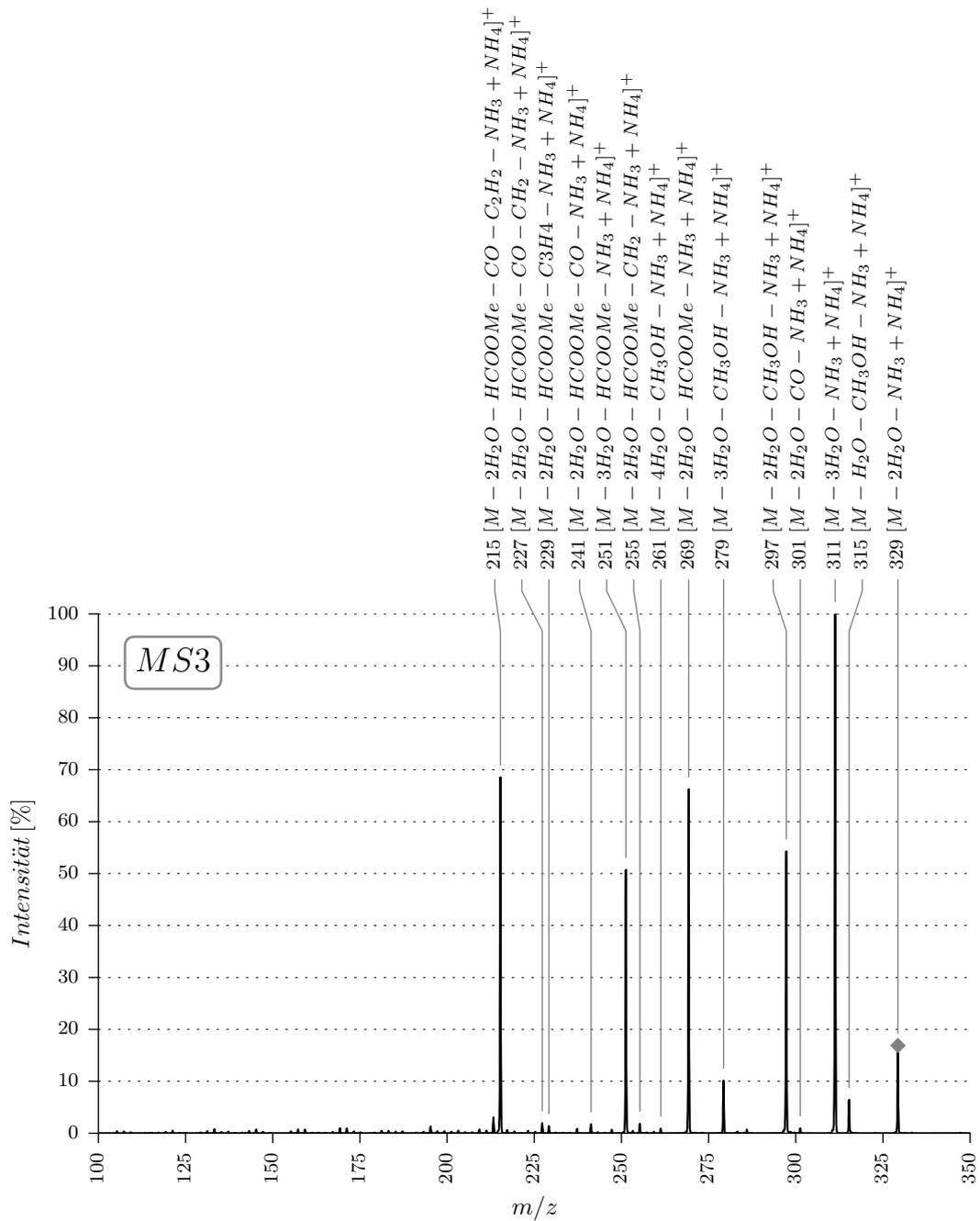
B.45. 26K

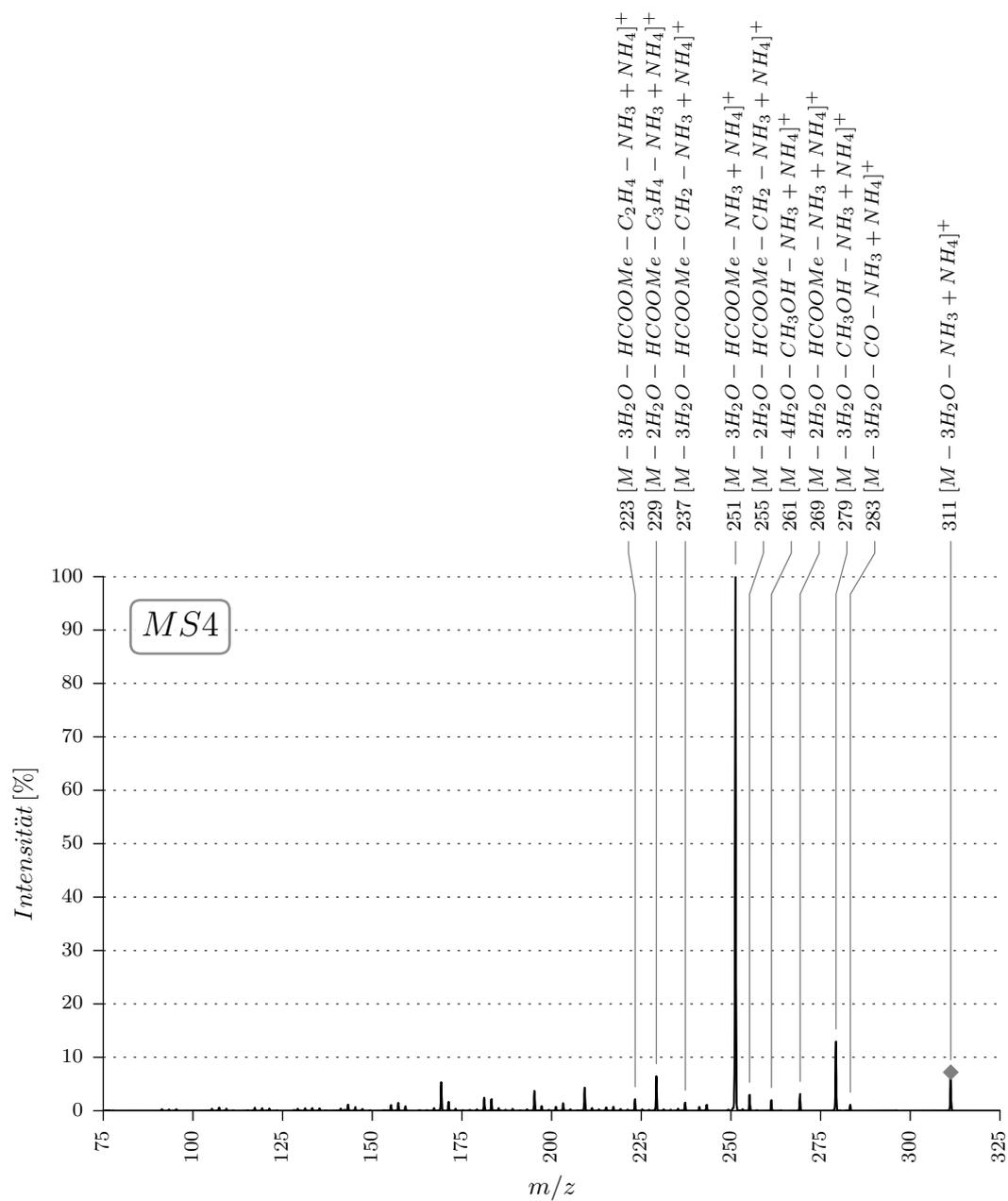
Summenformel: $C_{21}H_{32}O_5$ Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,14 β ,15 β ,16 β ,17 α)-14,15-Epoxy-3,16-dihydroxy-androstane-17 α -carboxylic acid methyl ester

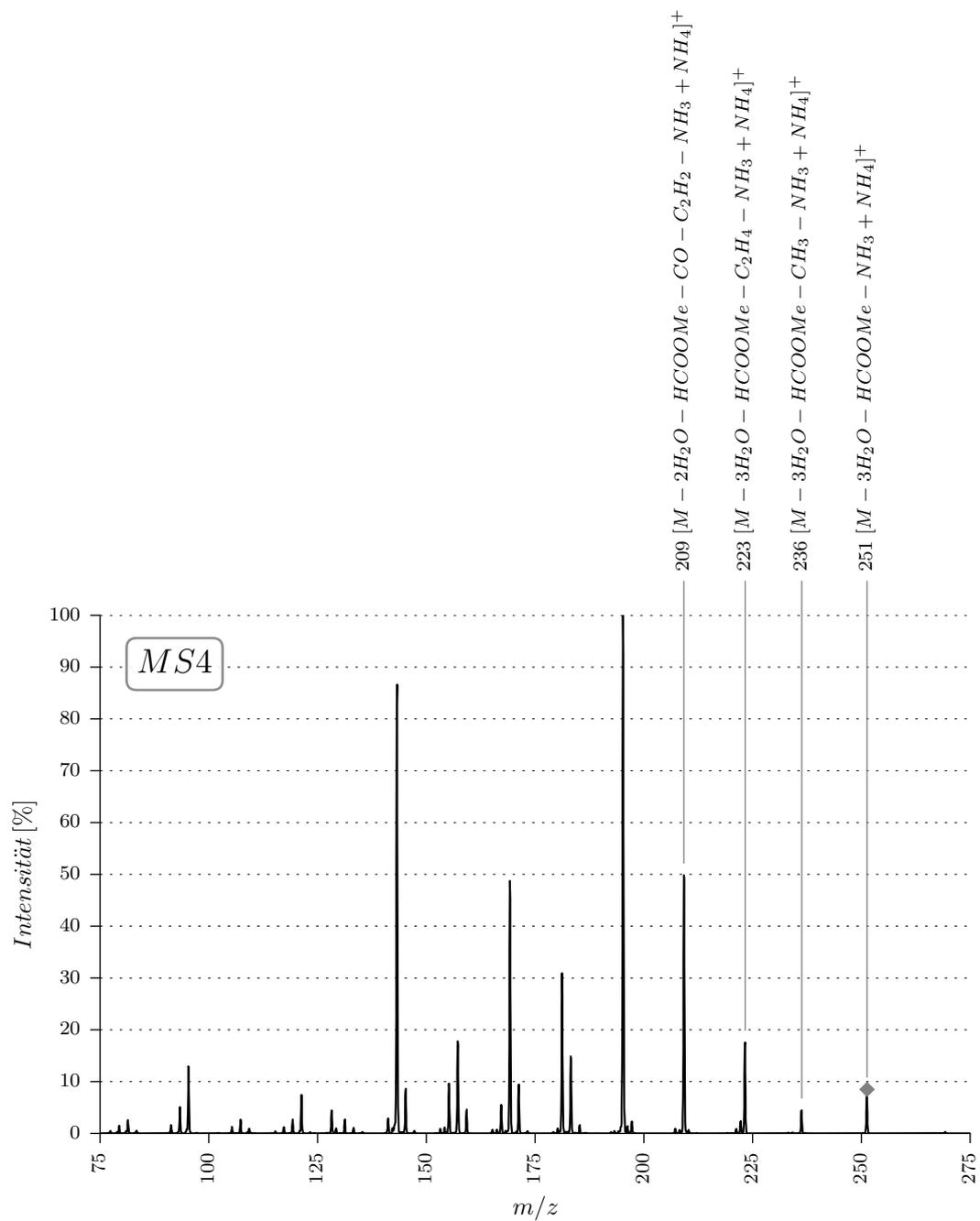
CAS-Nummer: 113749-90-9

Molekulargewicht: 364









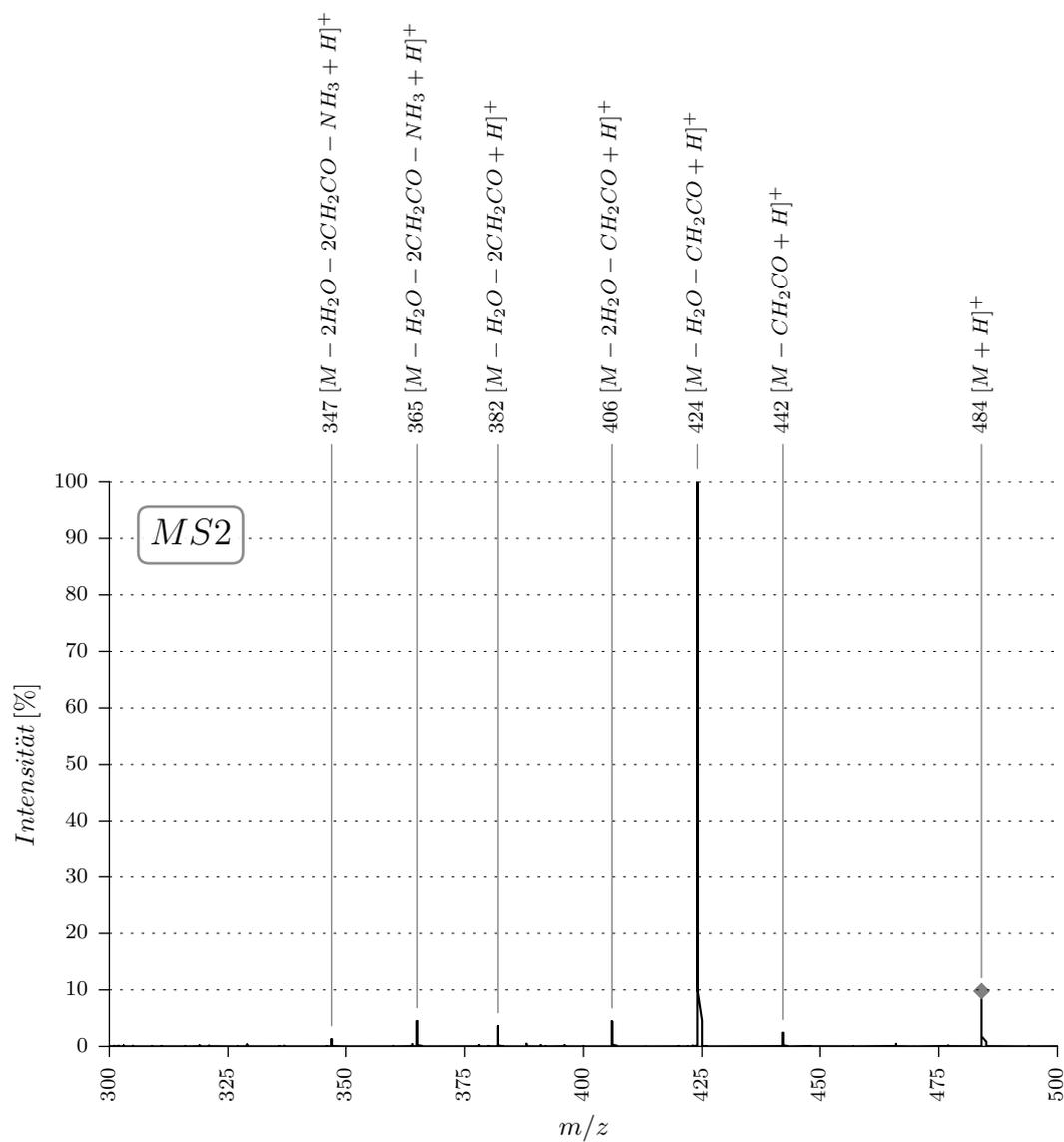
B.46. 27F

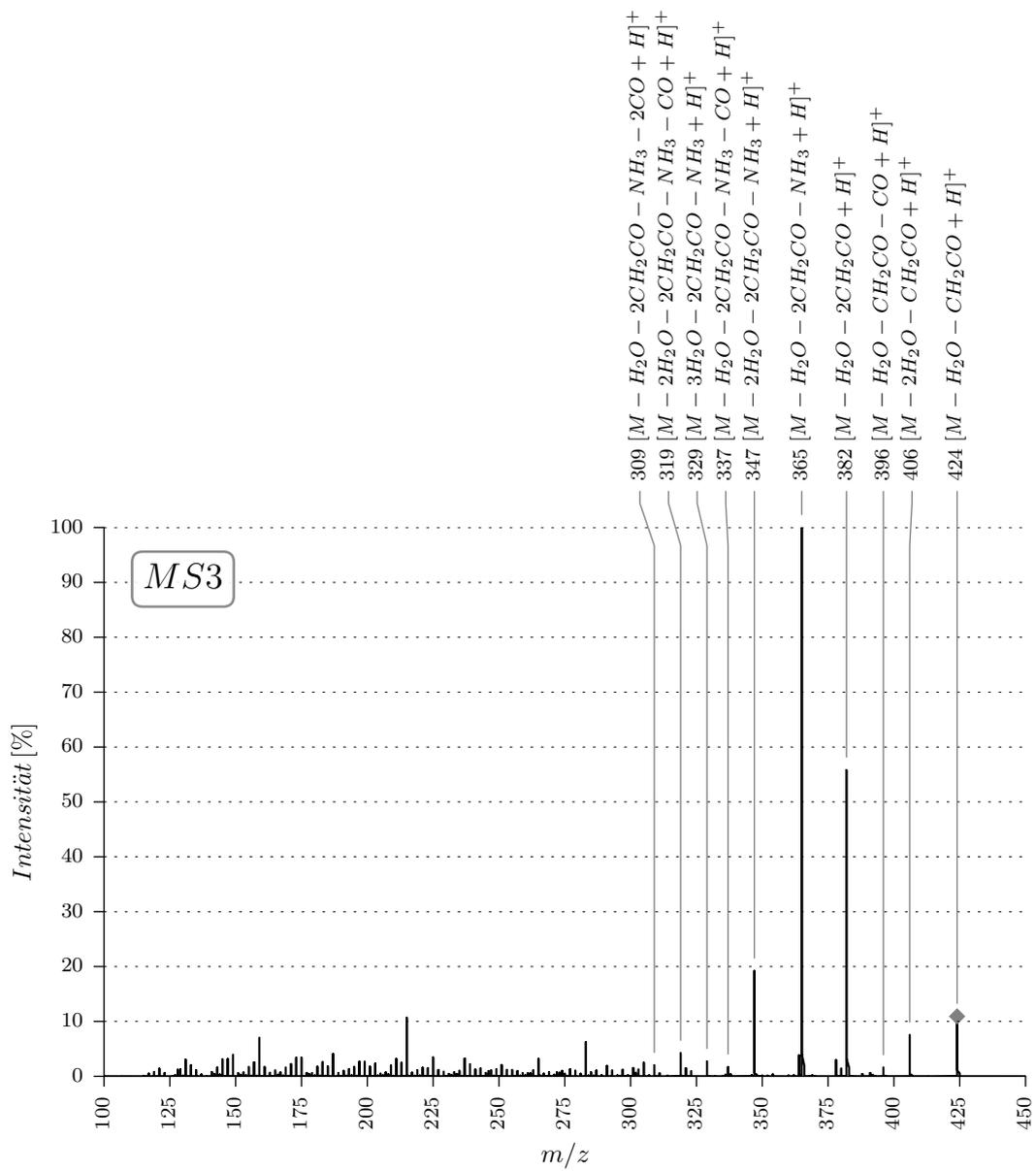
Trivialname: 3 α Acetylamino Cinobufagin

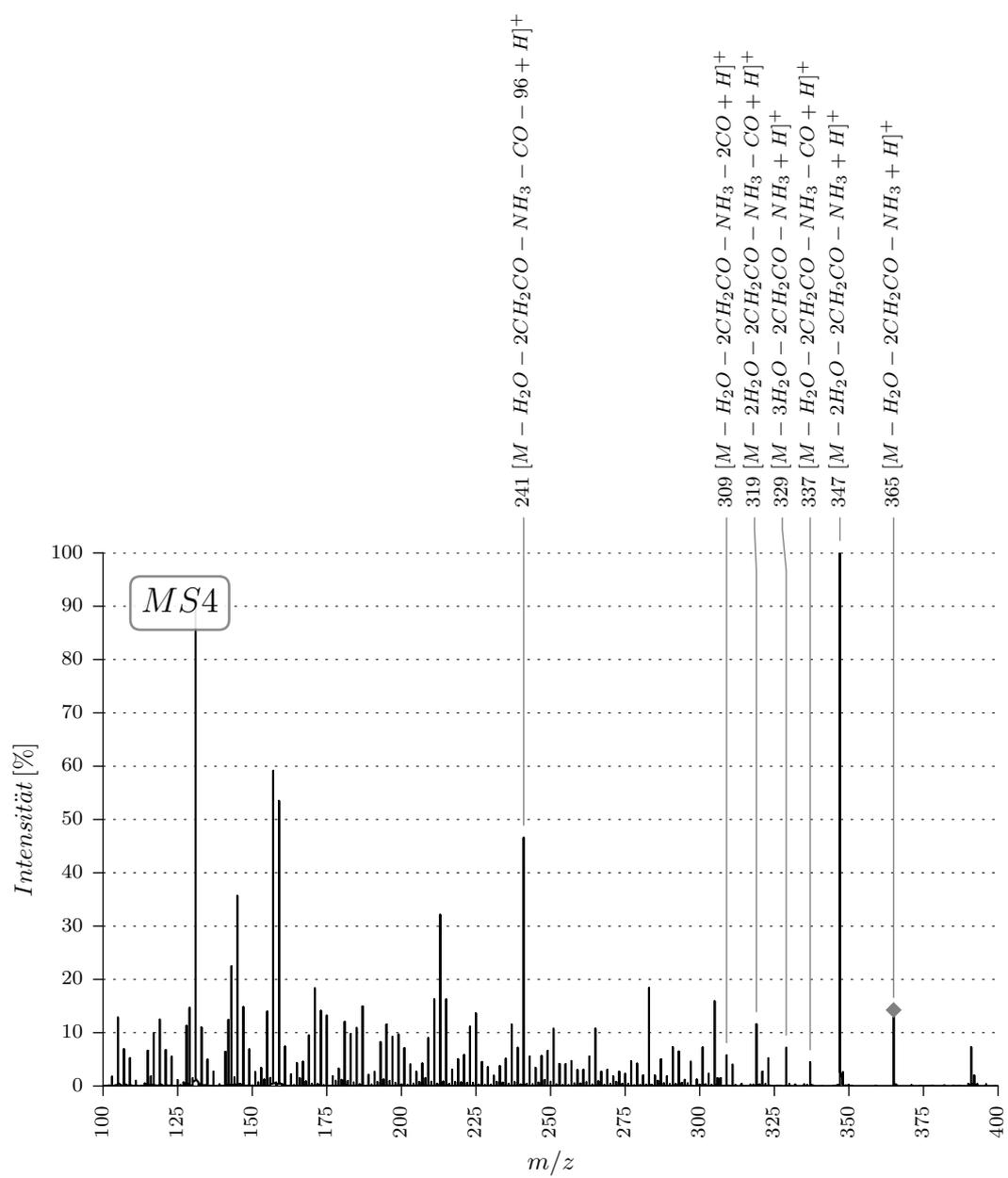
Summenformel: $C_{28}H_{37}NO_6$

Chem. Bezeichnung: (3 α ,5 β ,15 β ,16 β)-3-(Acetylamino)-16-(acetyloxy)-14,15-epoxy-bufa-20,22-dienolide

Molekulargewicht: 483







B.47. 28K

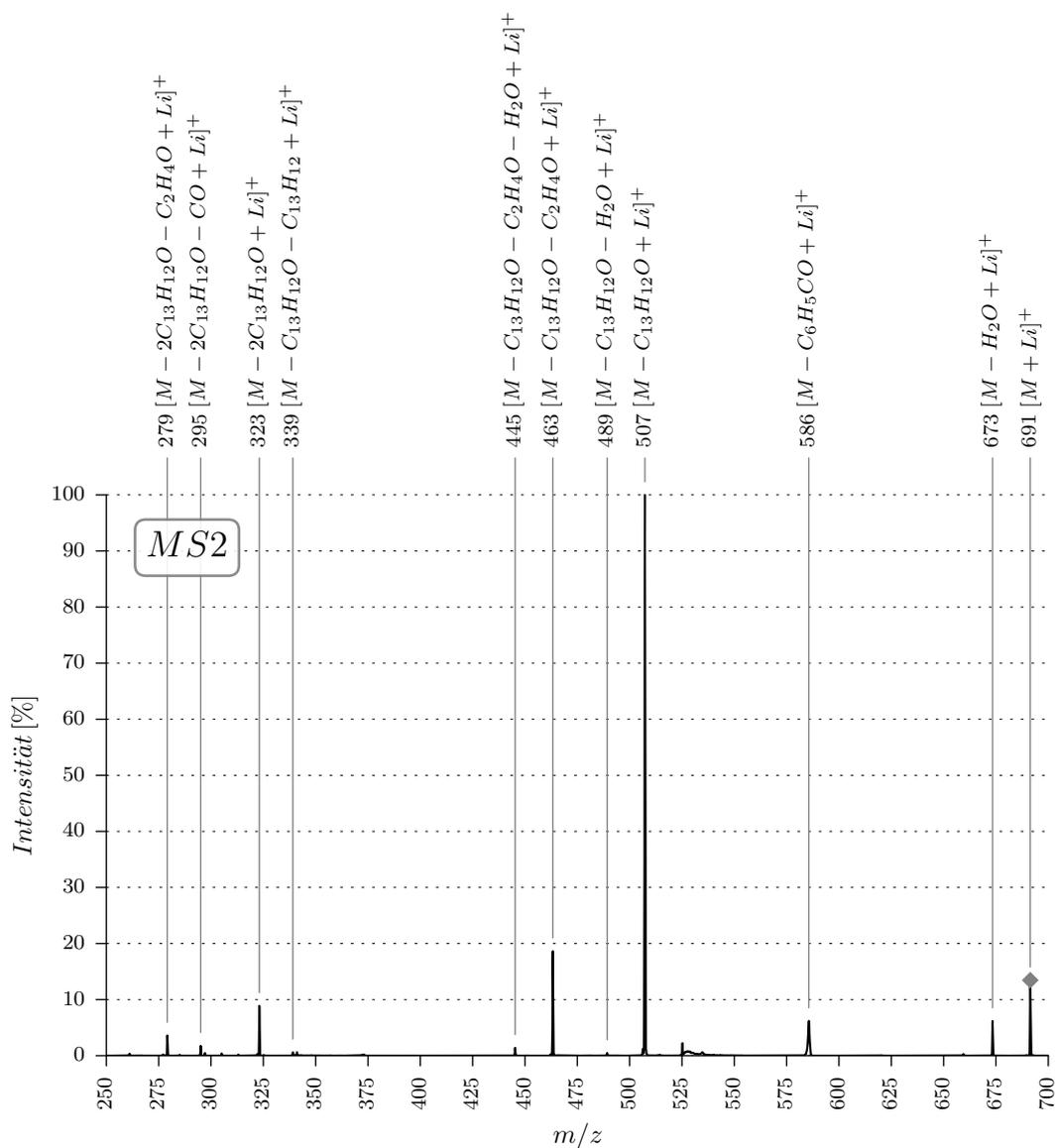
Trivialname: Cinobufagin-Derivat

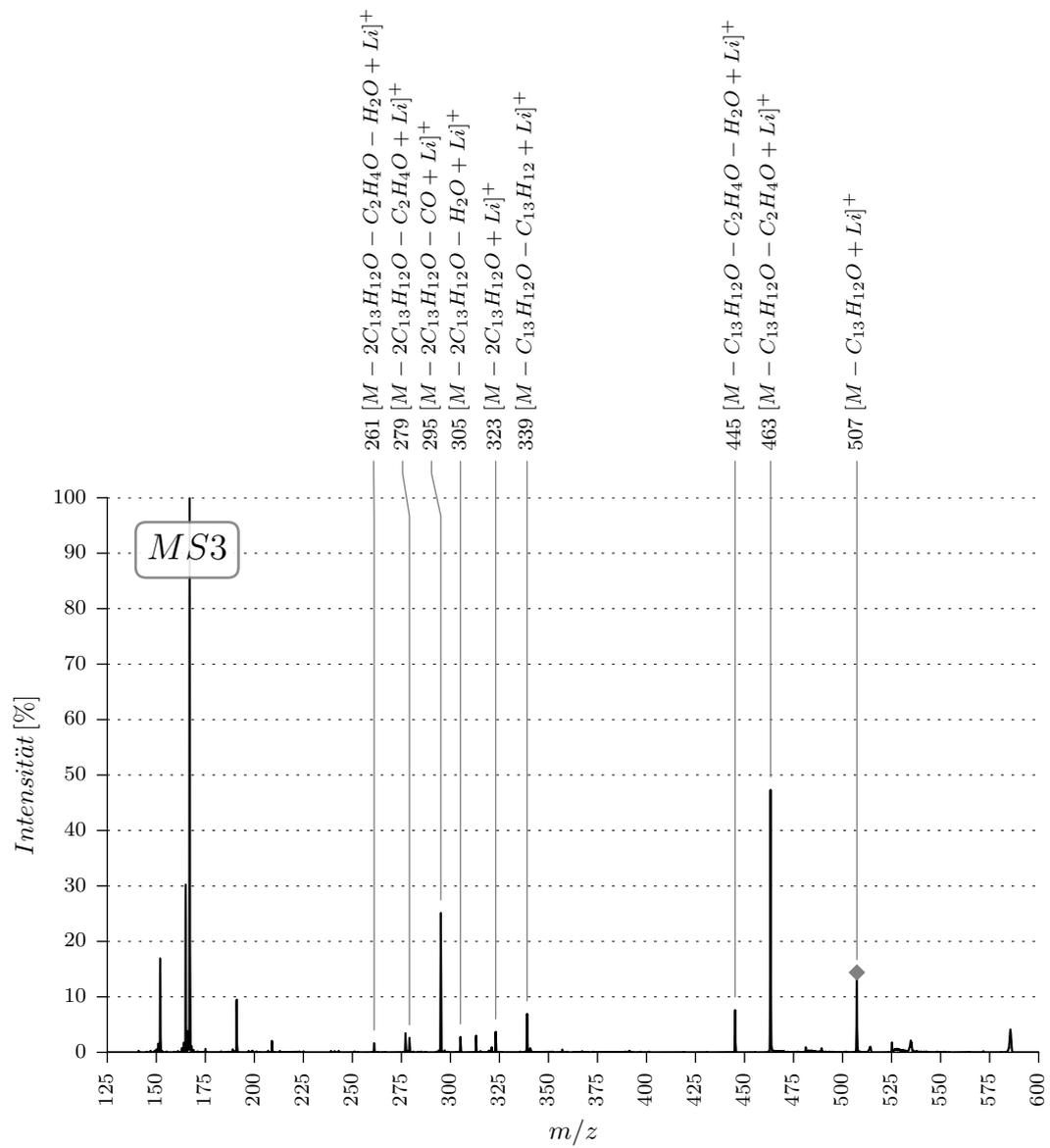
Summenformel: $C_{46}H_{52}O_5$

Chem. Bezeichnung: (5 β ,14 β ,17 β)-5,14-Dihydroxy-3-diphenylmethoxy-androstane-17 β -carboxylic acid diphenylmethyl ester

CAS-Nummer: 98016-57-0

Molekulargewicht: 684



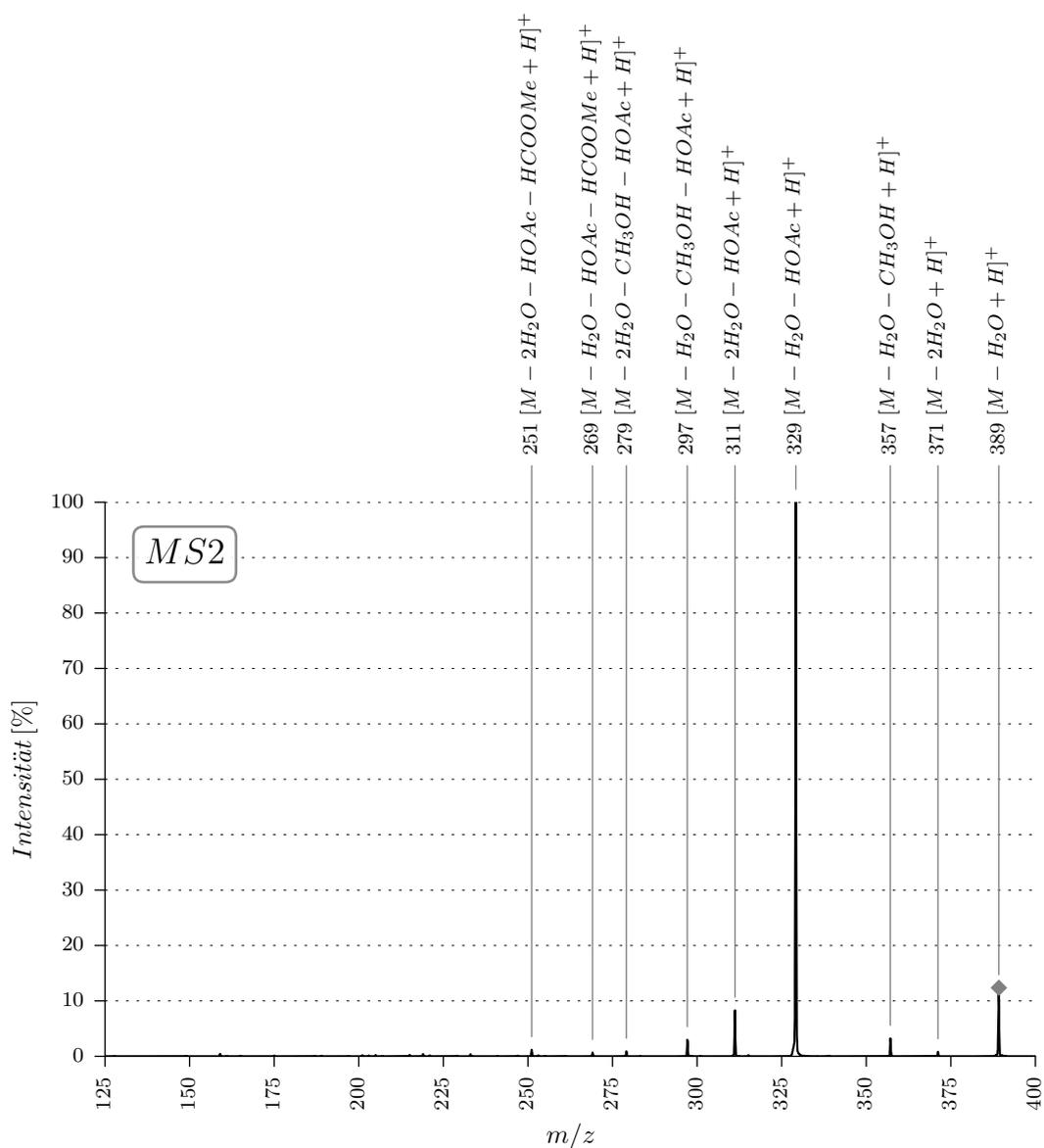


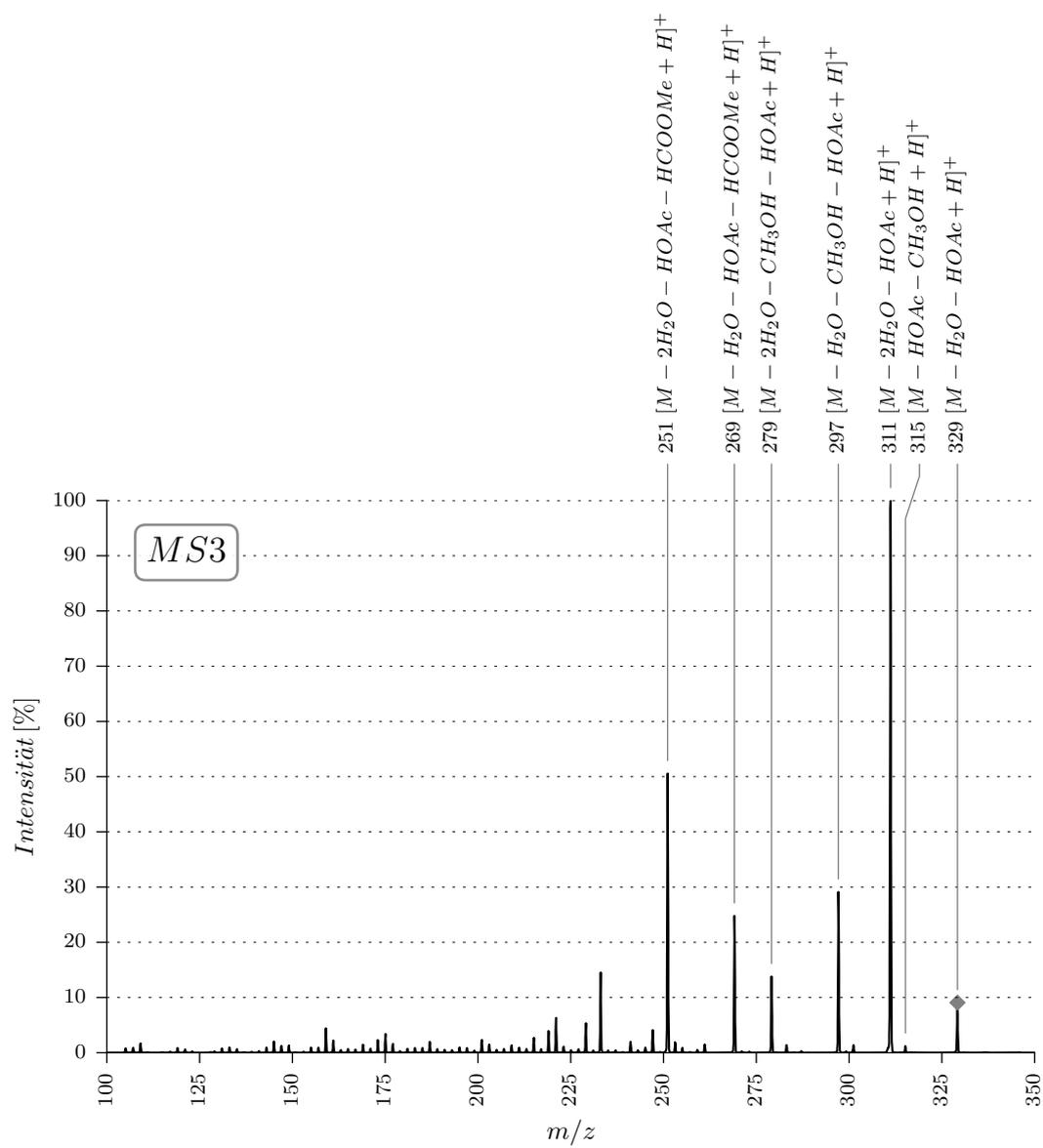
B.48. 29b

Summenformel: $C_{23}H_{34}O_6$ Chem. Bezeichnung: Methyl (3 β ,5 β ,14 β ,15a)-3-Acetoxy-15-hydroxy-androst-16-ene-17-carboxylate

CAS-Nummer: 113752-75-3

Molekulargewicht: 406





B.49. 29C

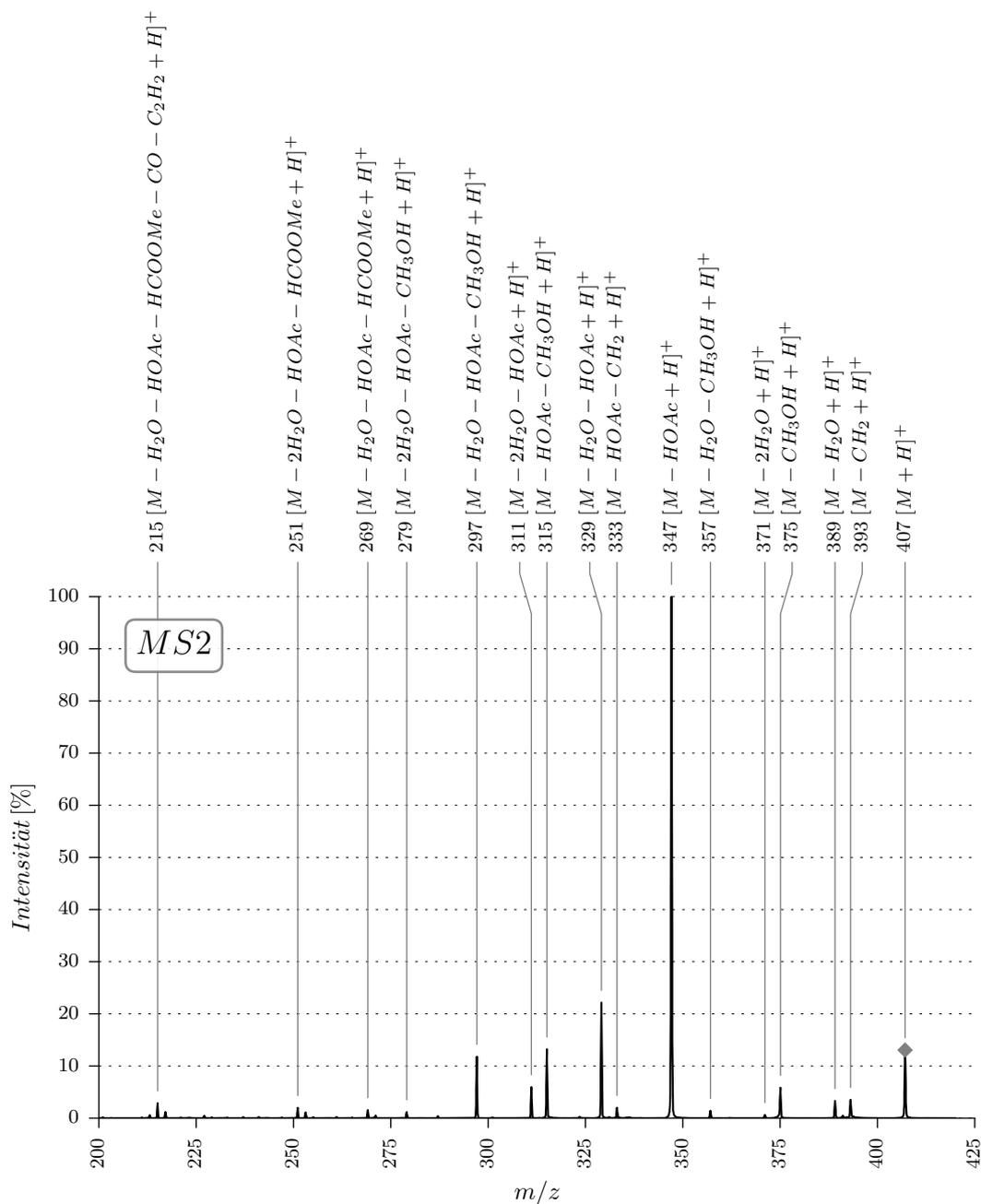
Trivialname: Cinobufagin-Derivat

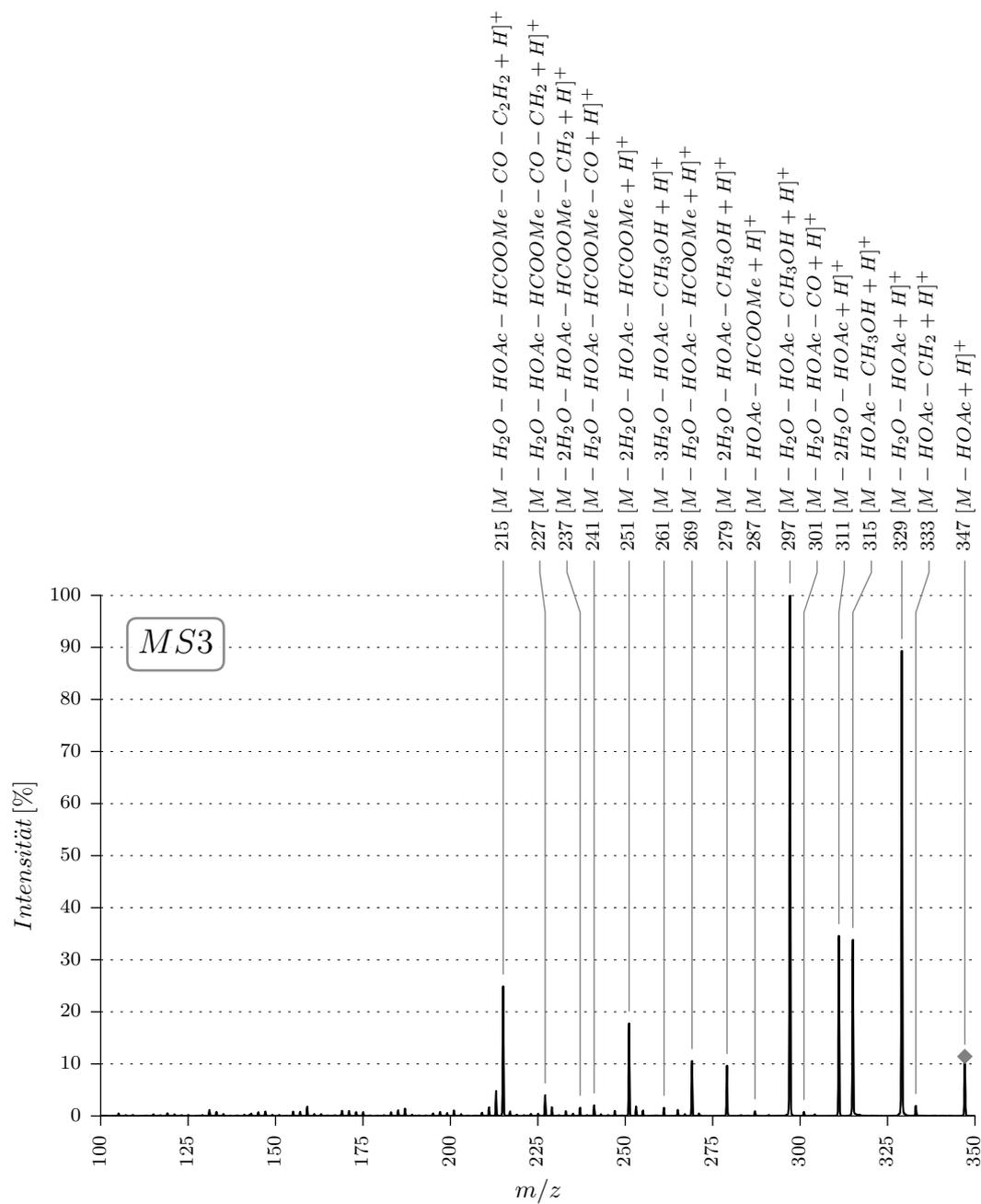
Summenformel: $C_{23}H_{34}O_6$

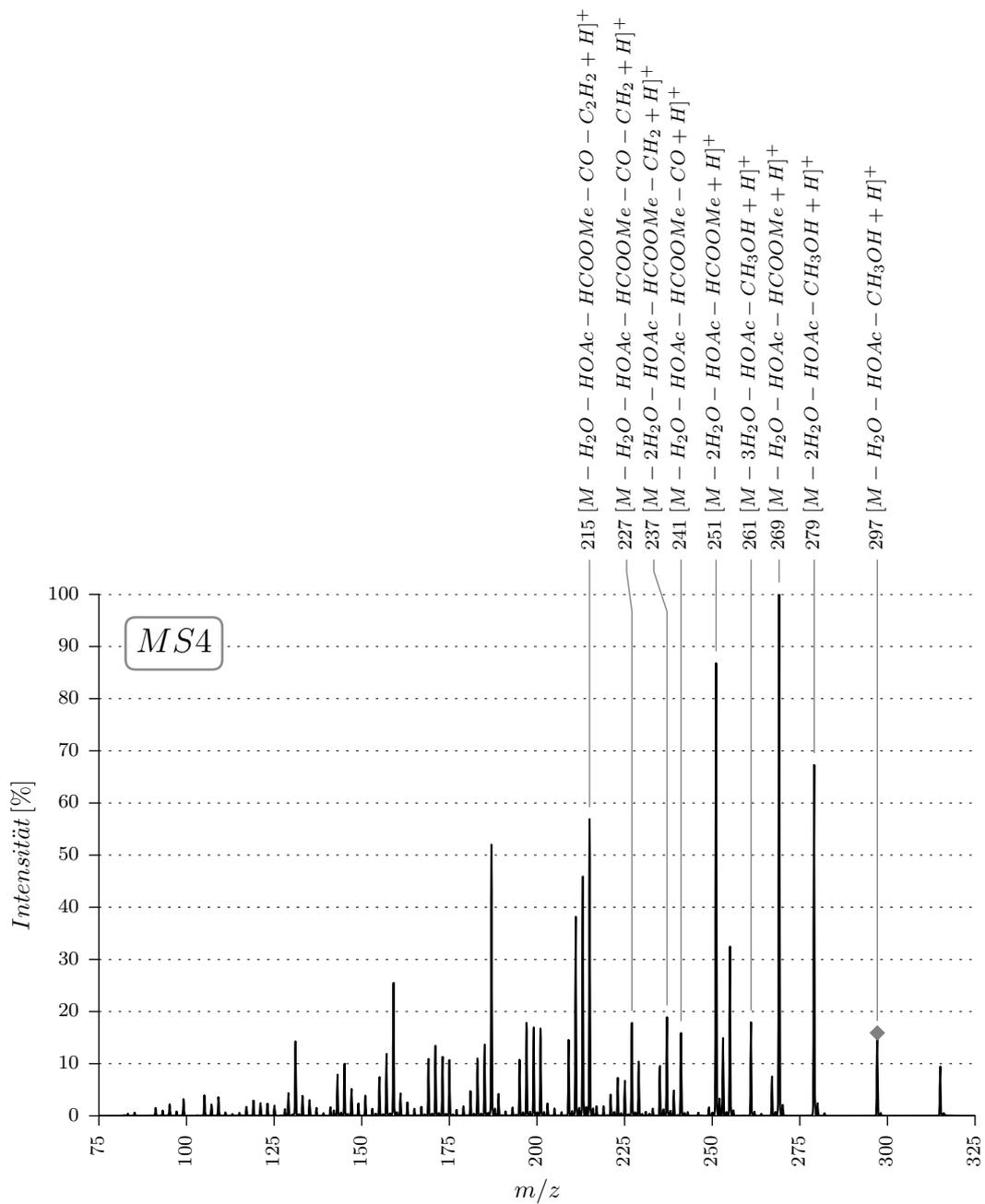
Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,14 β ,15 β ,16 β ,17 β)-3-(Acetyloxy)-14,15-epoxy-16-hydroxy-androstane-17-carboxylic acid methyl ester

CAS-Nummer: 115000-49-2

Molekulargewicht: 406



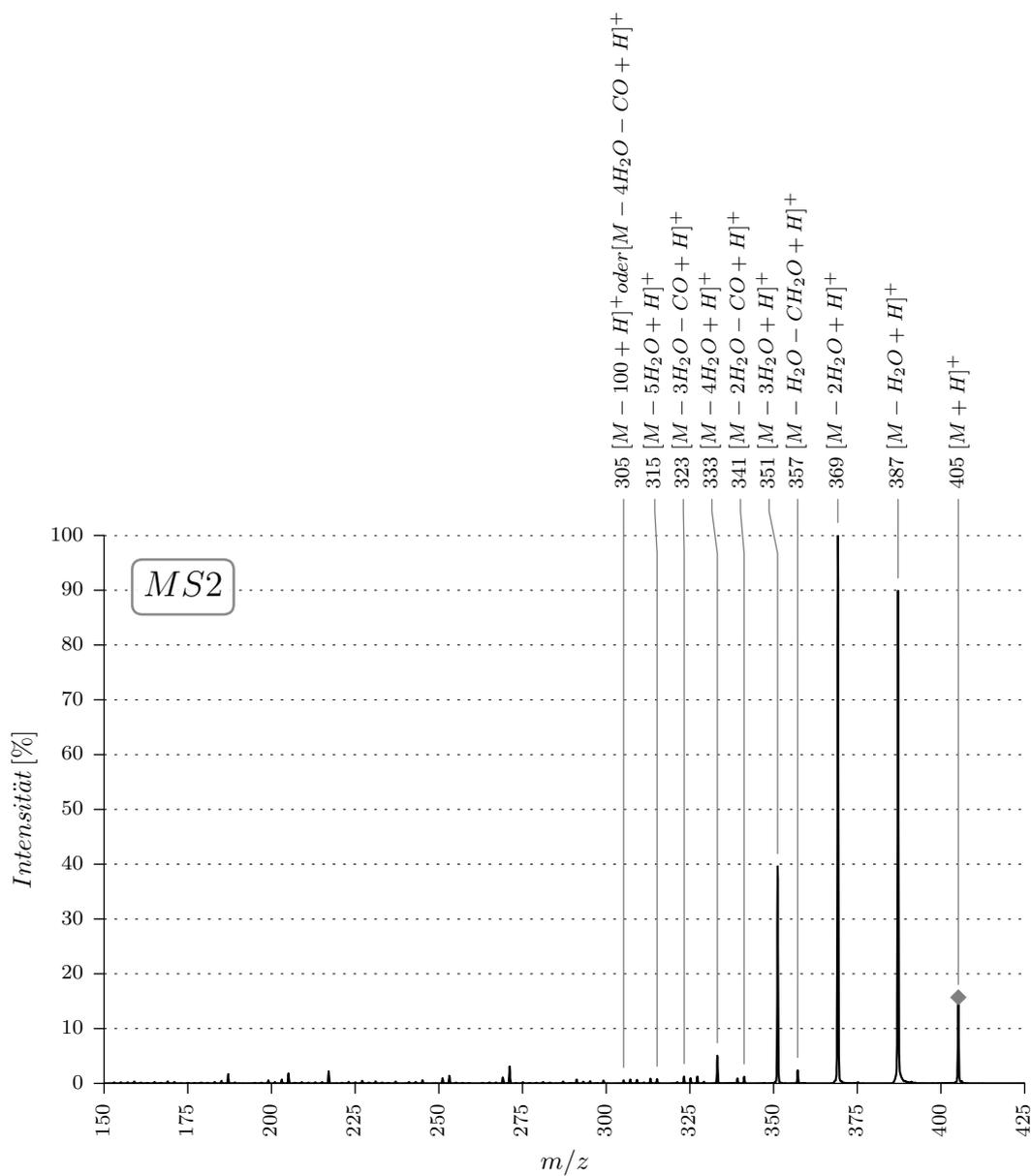


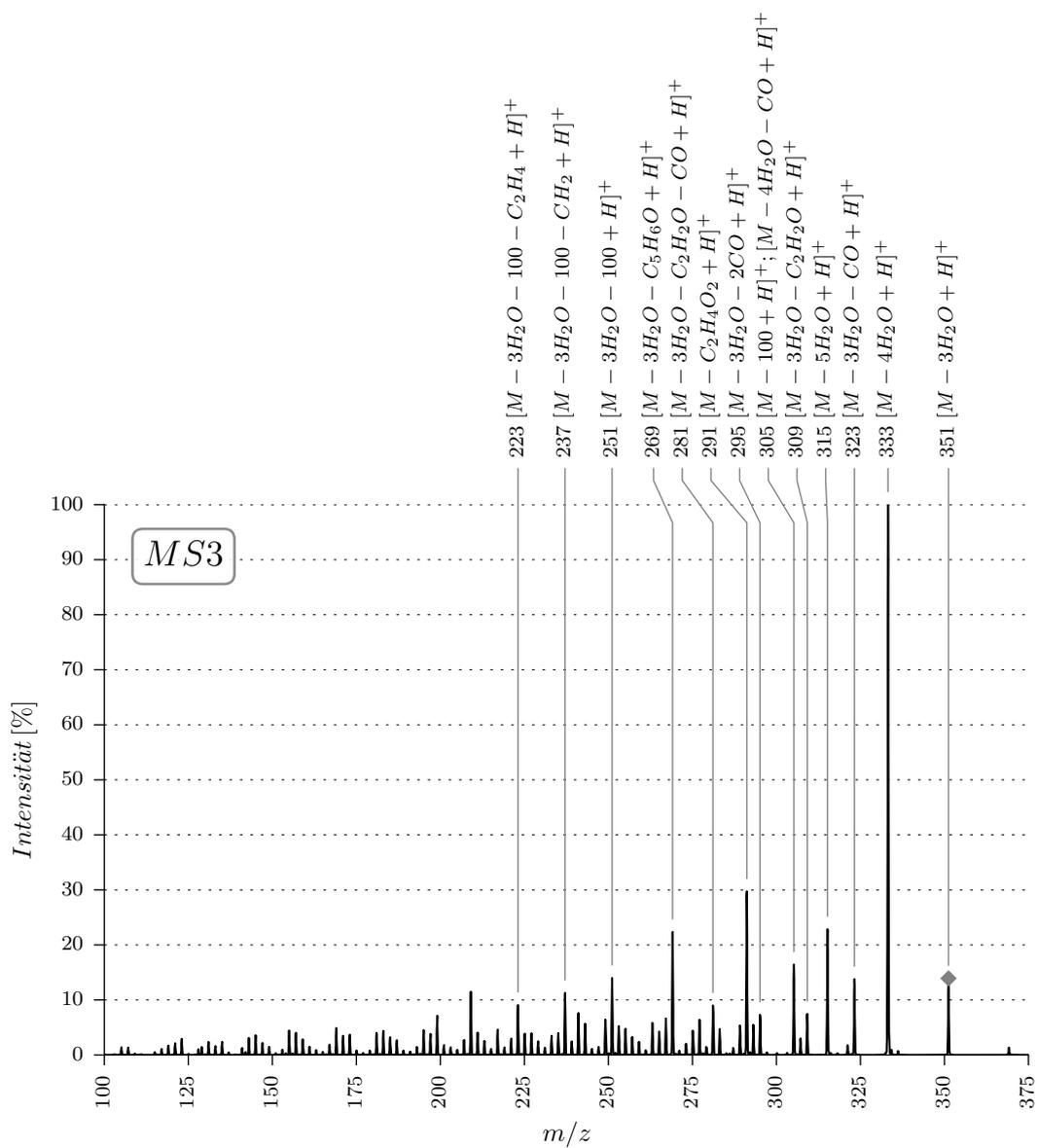


B.50. 30M

Summenformel: $C_{24}H_{36}O_5$ Chem. Bezeichnung: (3b,5 β ,14 α ,16b)-3,16-Dihydroxy-15-oxo-bufanolide

Molekulargewicht: 404





B.51. 35B

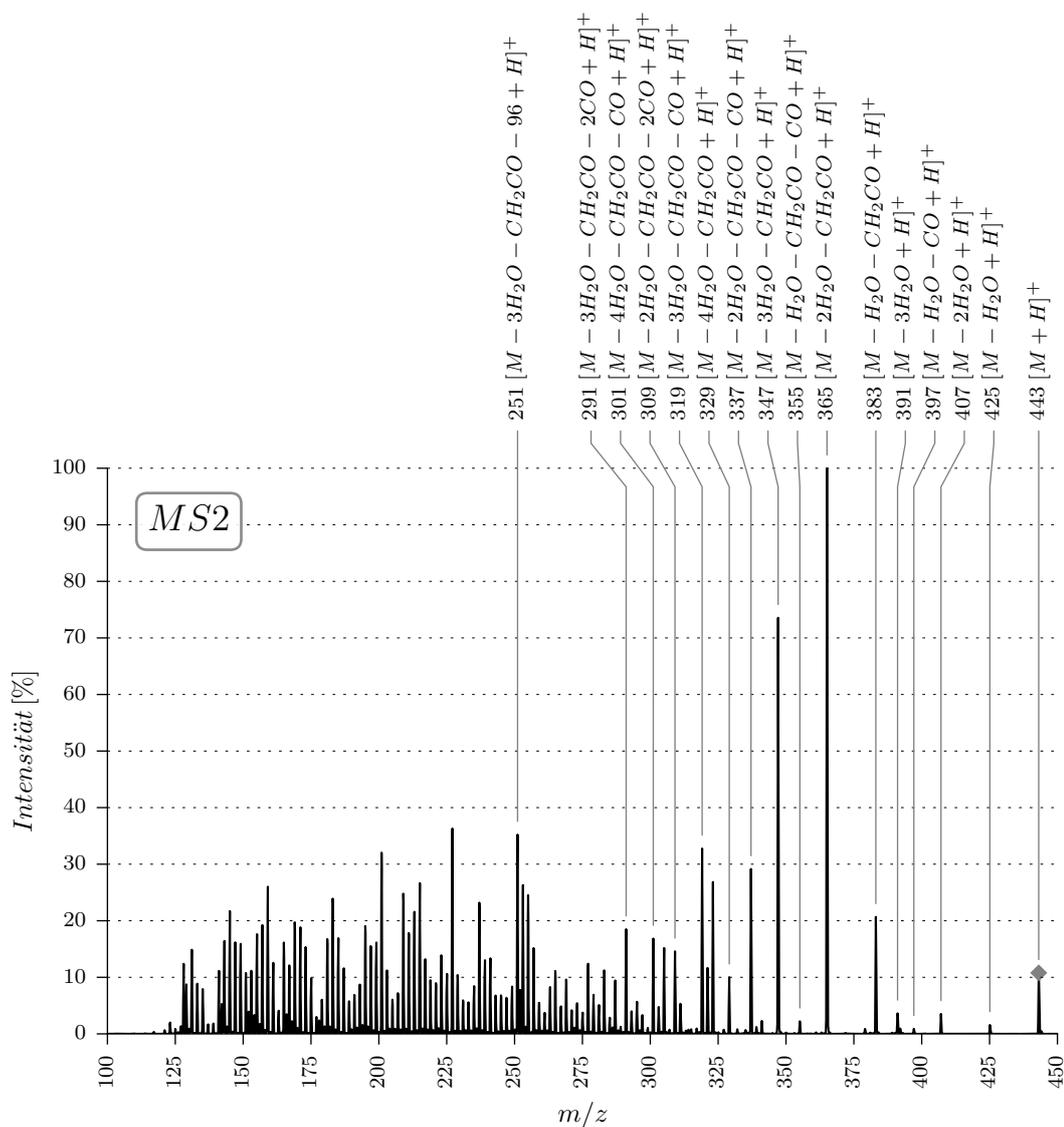
Trivialname: Desacetyl-Aceetyl-Cinobufagin

Summenformel: $C_{26}H_{34}O_6$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,15 β ,16 β)-3-(Acetyloxy)-14,15-epoxy-16-hydroxy-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 4026-96-4

Molekulargewicht: 442



B.52. 42C

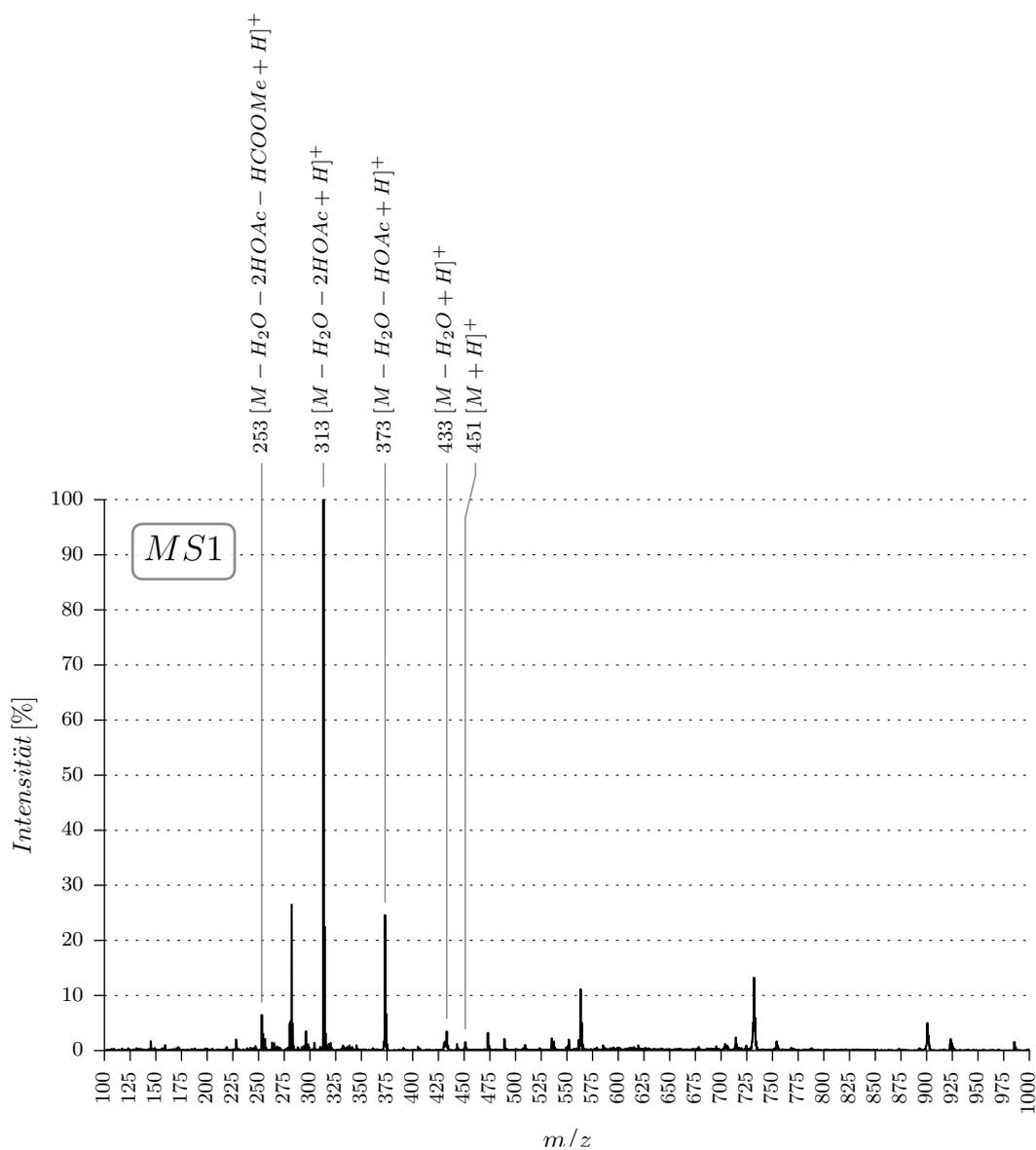
Trivialname: Gamabufotalin

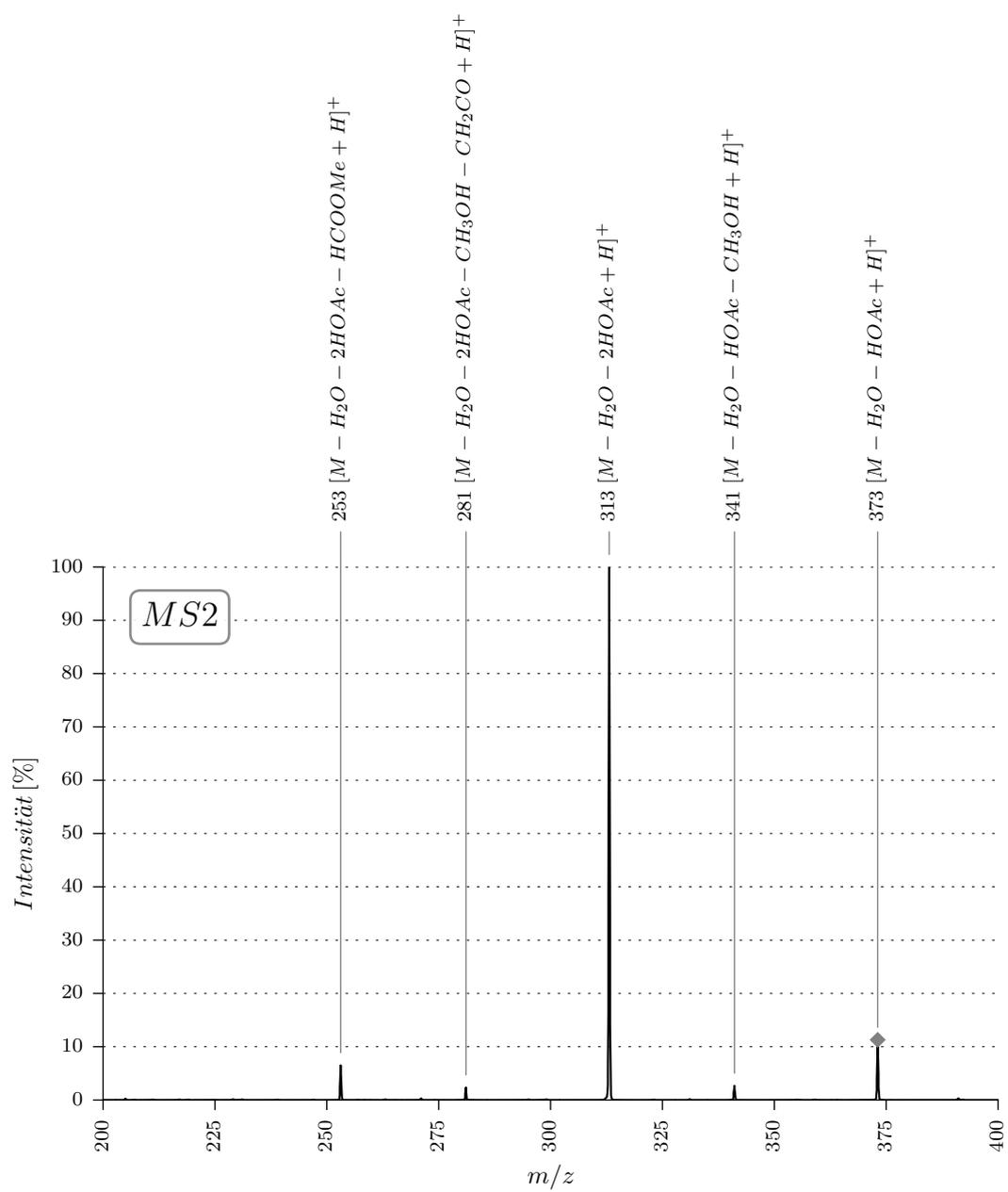
Summenformel: $C_{25}H_{38}O_7$

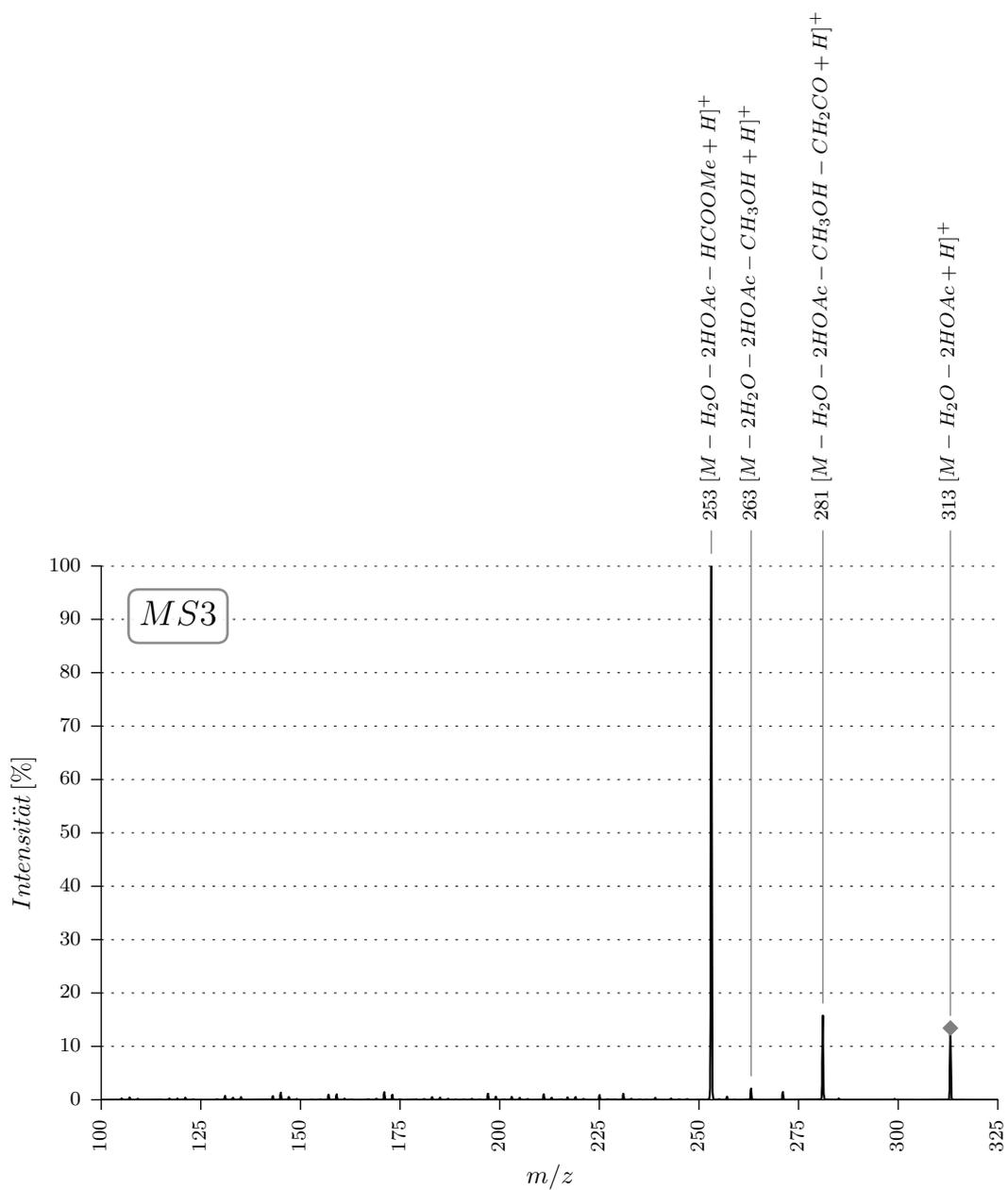
Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,11 α ,14 β ,17 β)-3,11-Bis(acetyloxy)-14-hydroxy-androstane-17-carboxylic acid methyl ester

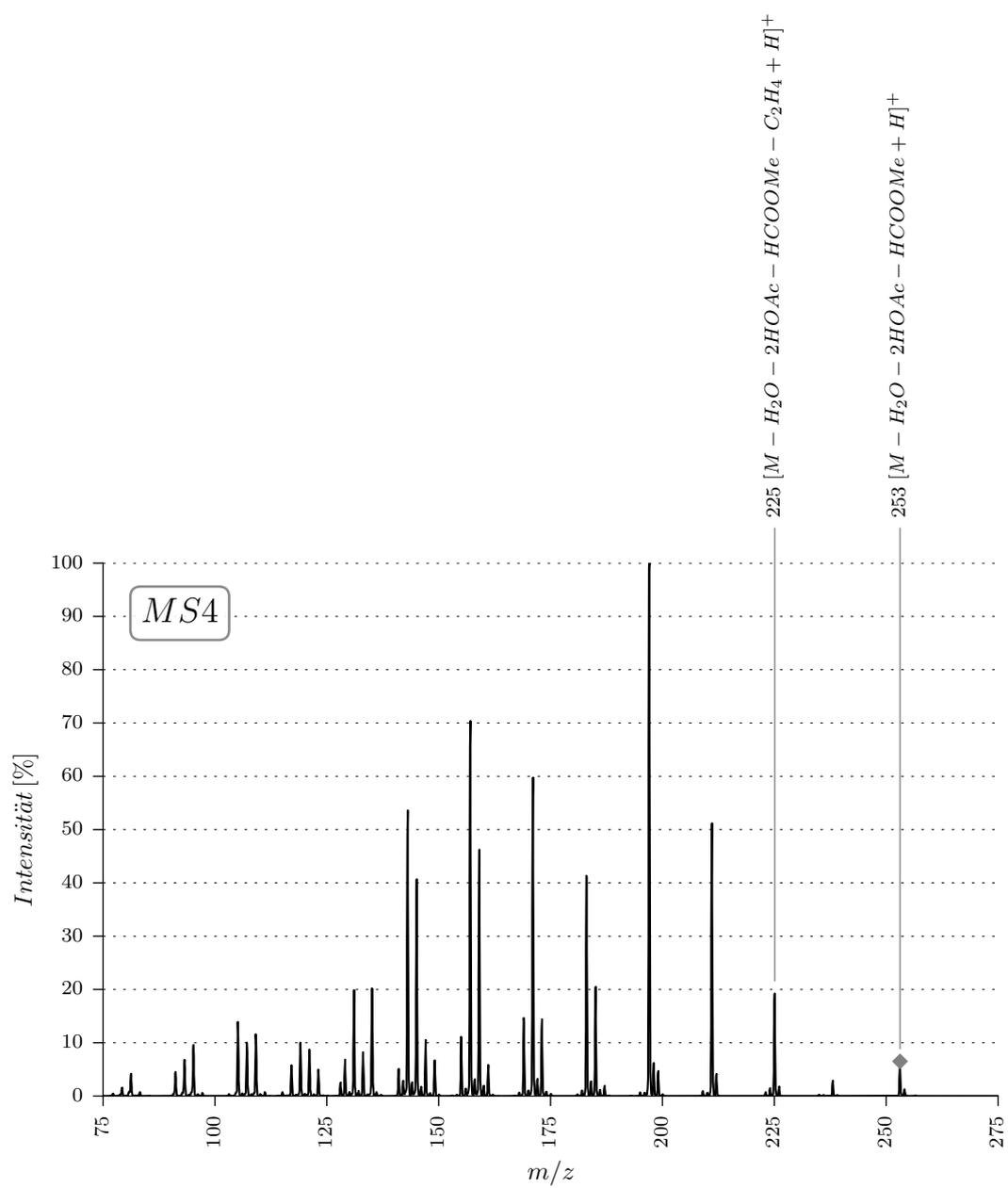
CAS-Nummer: 115267-64-6

Molekulargewicht: 450





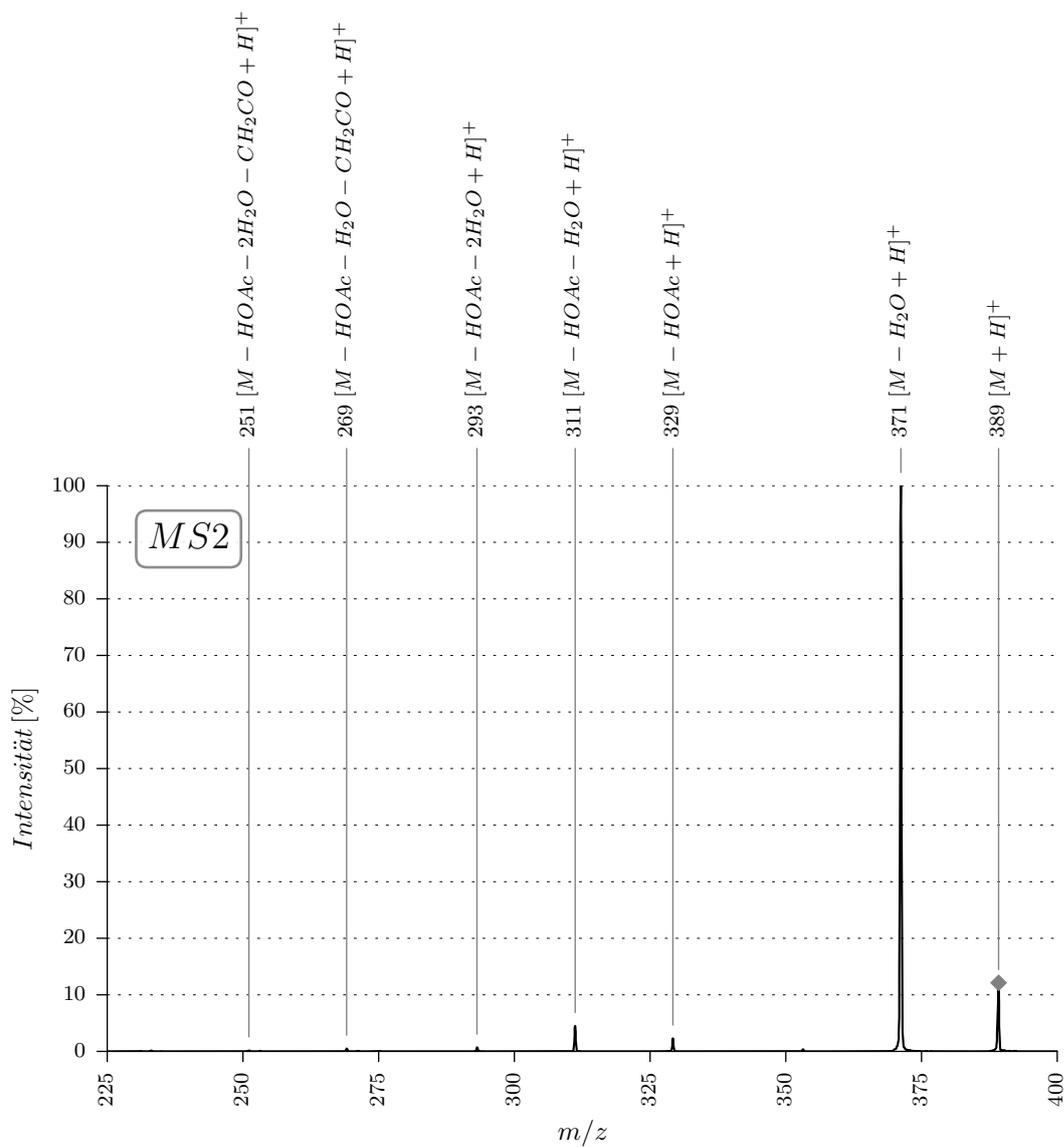


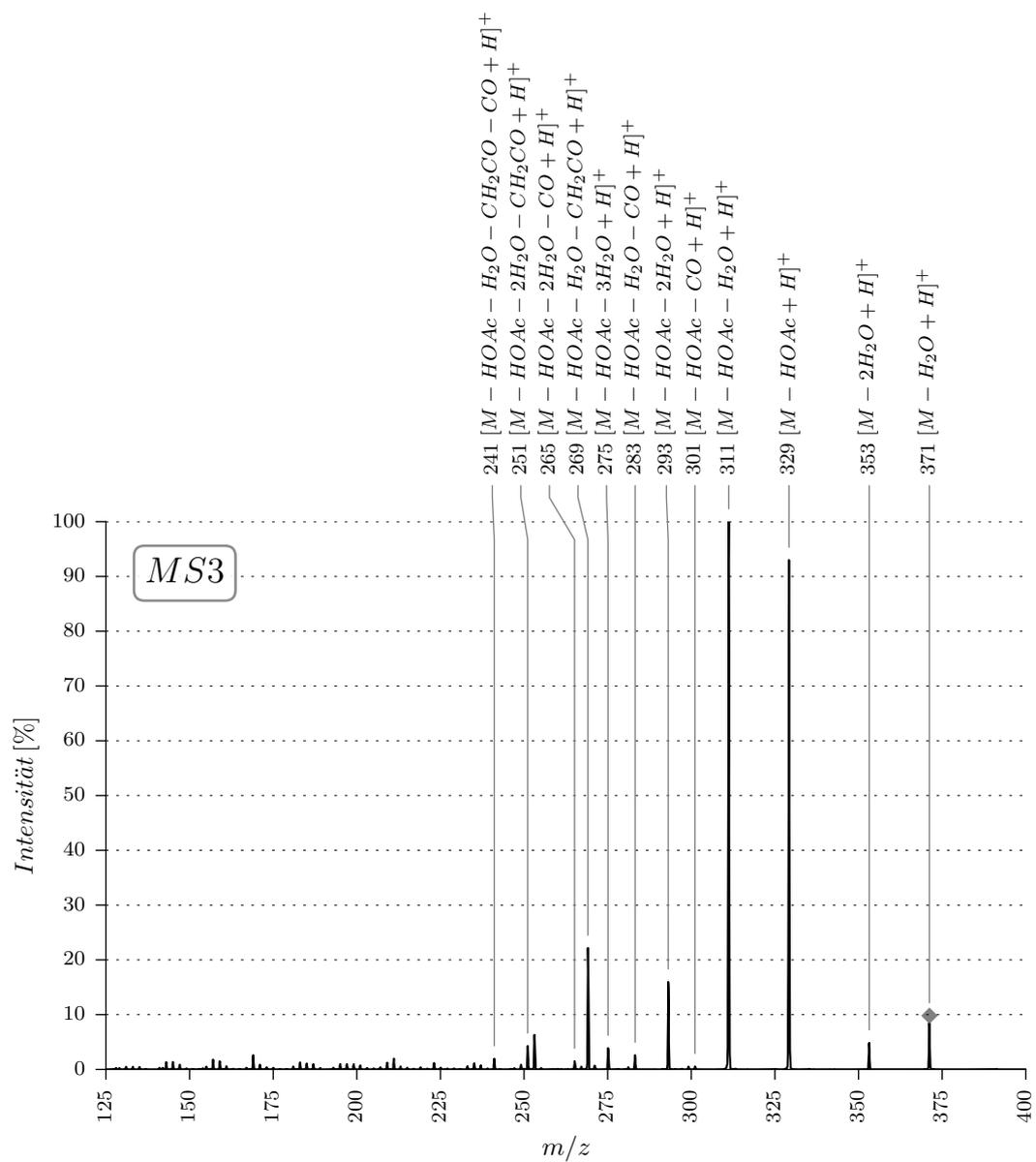


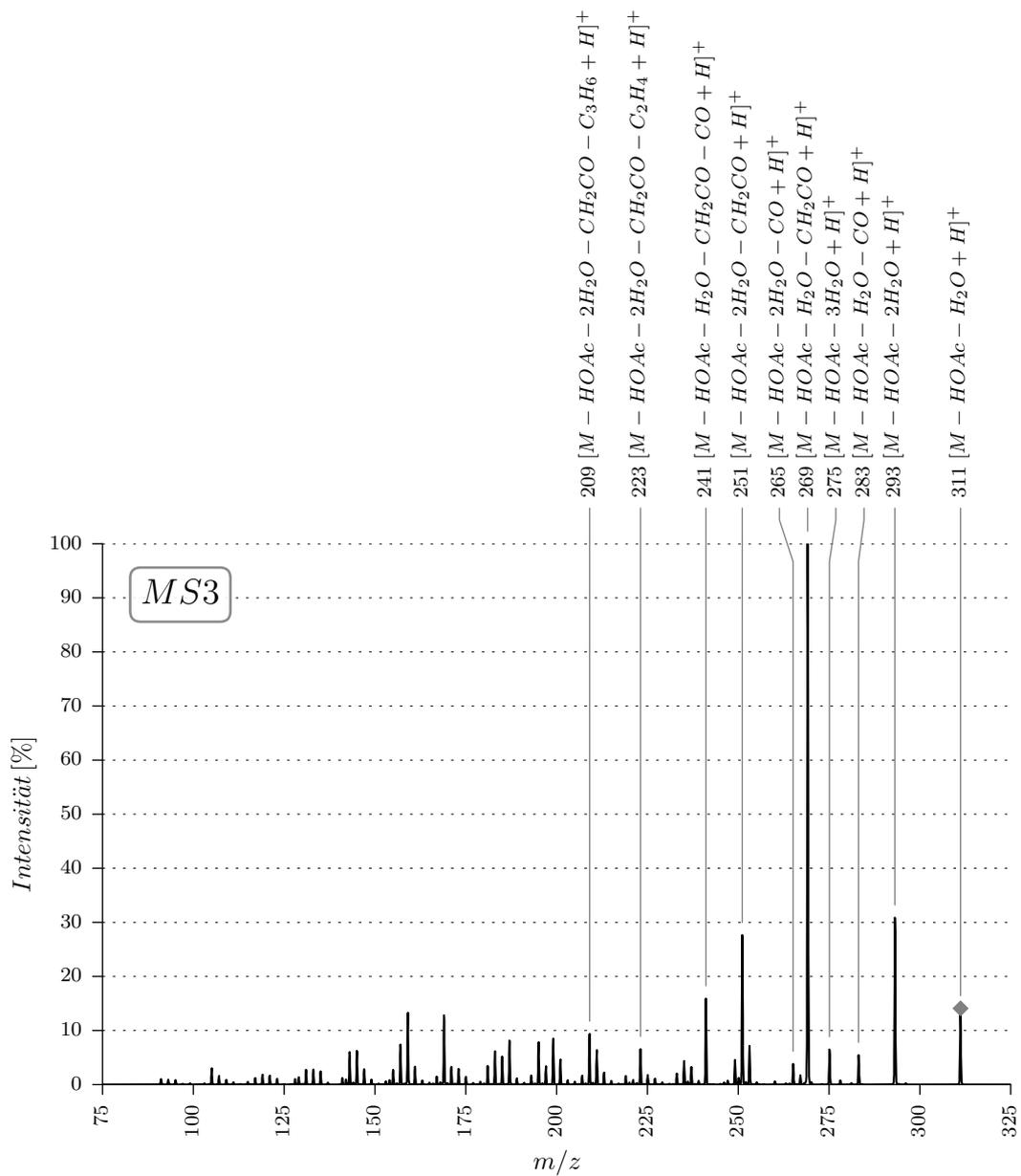
B.53. 51D

Summenformel: $C_{23}H_{32}O_5$ Chem. Bezeichnung: (5 β ,14 β ,15 β ,17 α)-21-Acetyloxy-14,15-epoxy-pregnane-3,20-dione

Molekulargewicht: 388







B.54. 52I

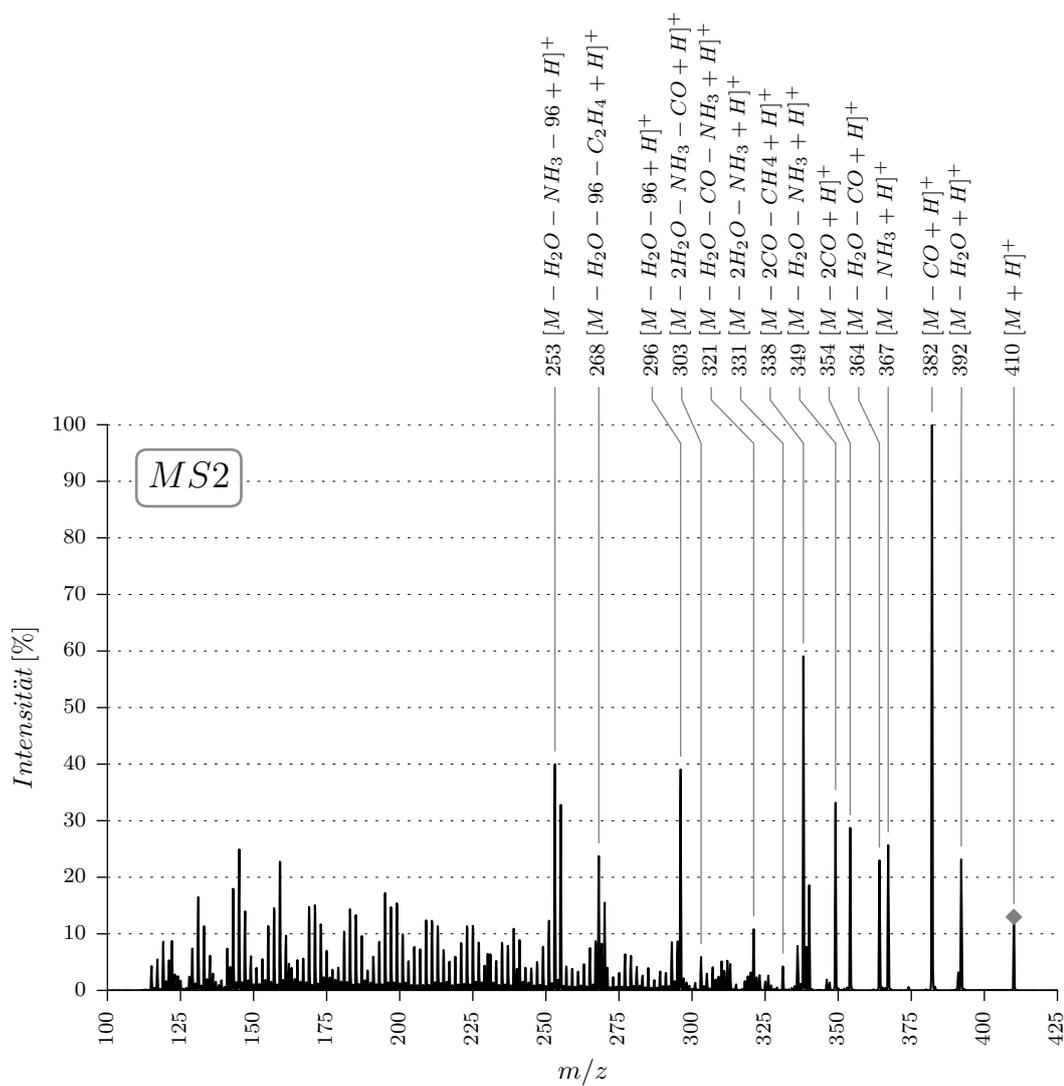
Trivialname: 3 β Azido Resibufagin

Summenformel: $C_{24}H_{31}N_3O_3$

Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,15 β)-3-Azido-14,15-epoxy-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 36121-81-0

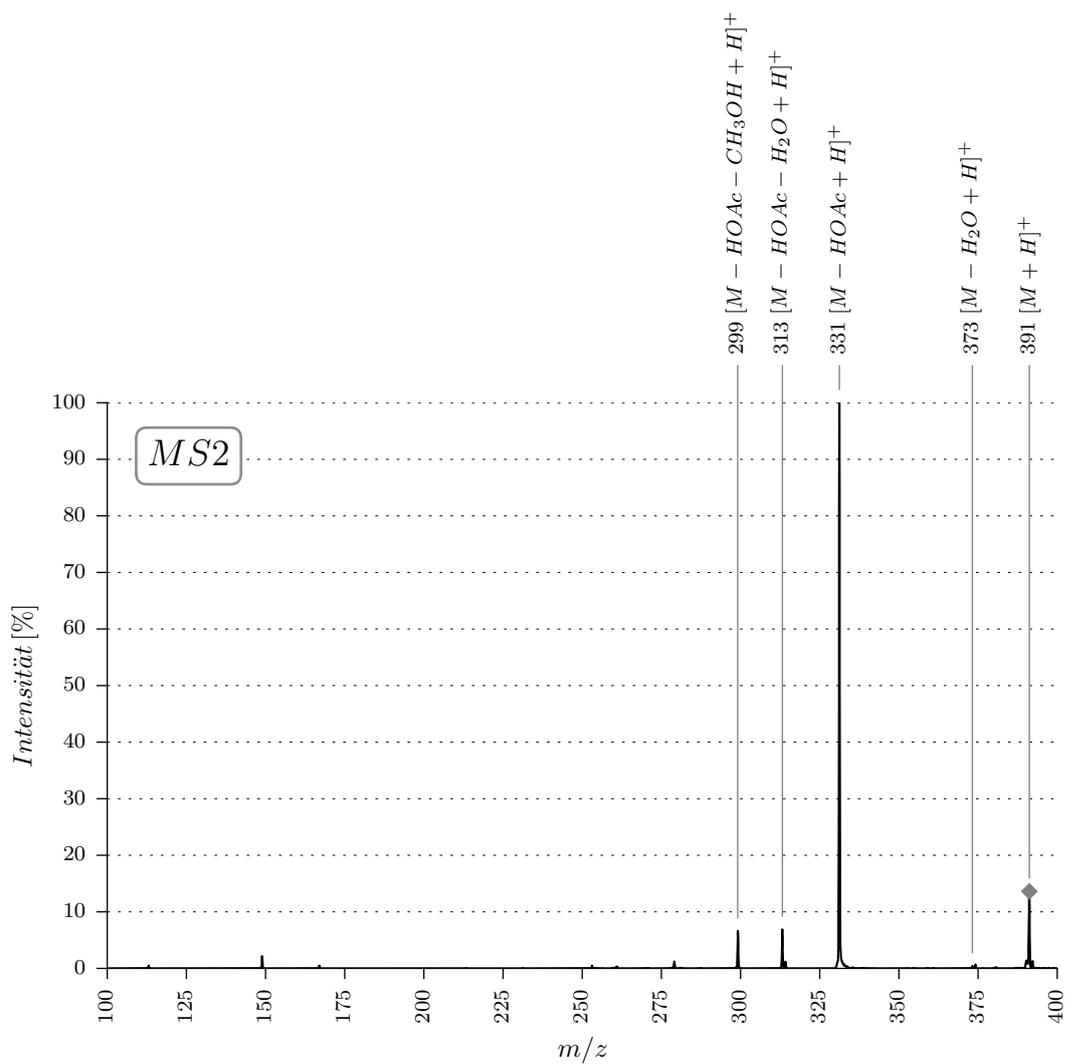
Molekulargewicht: 409

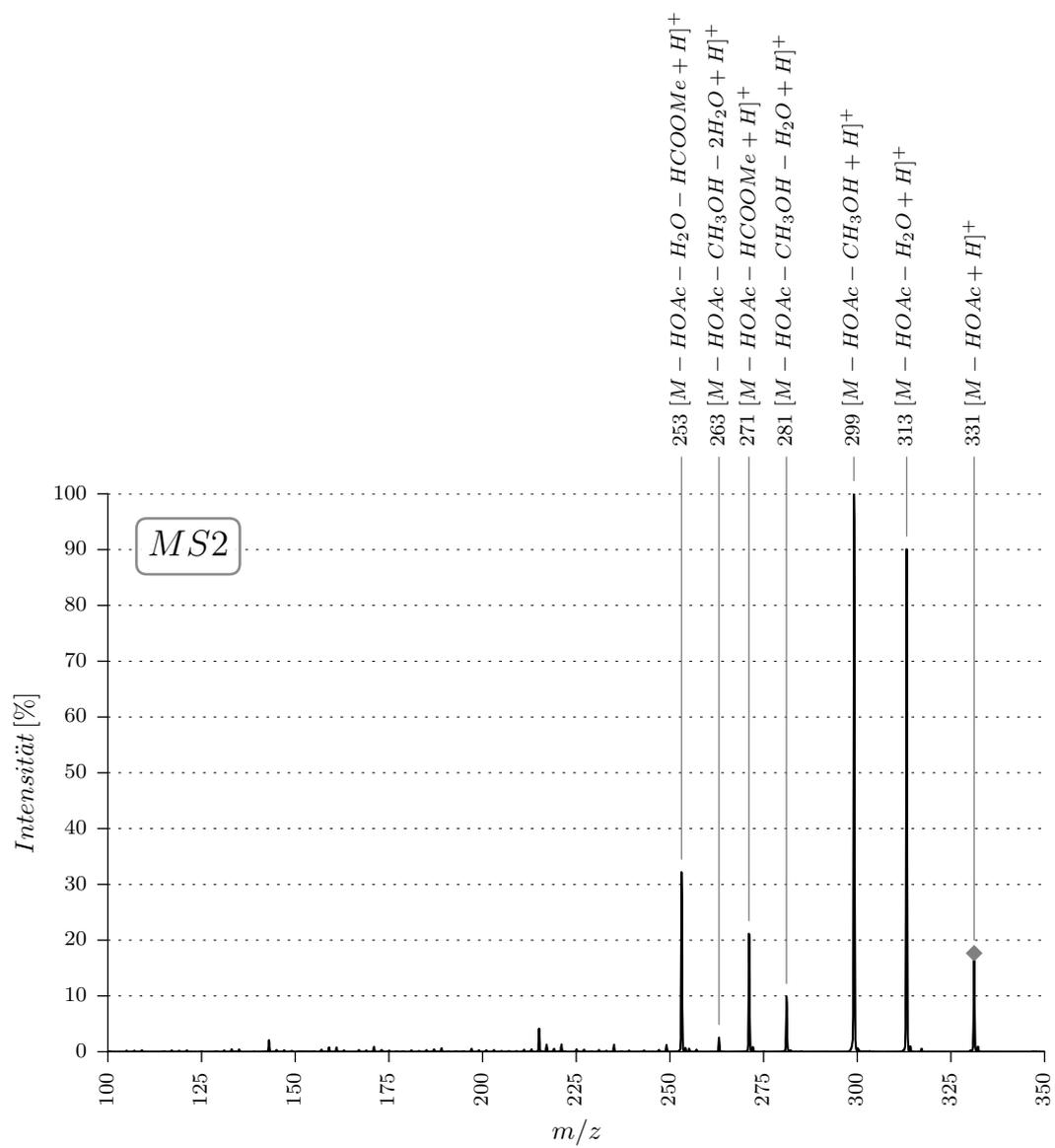


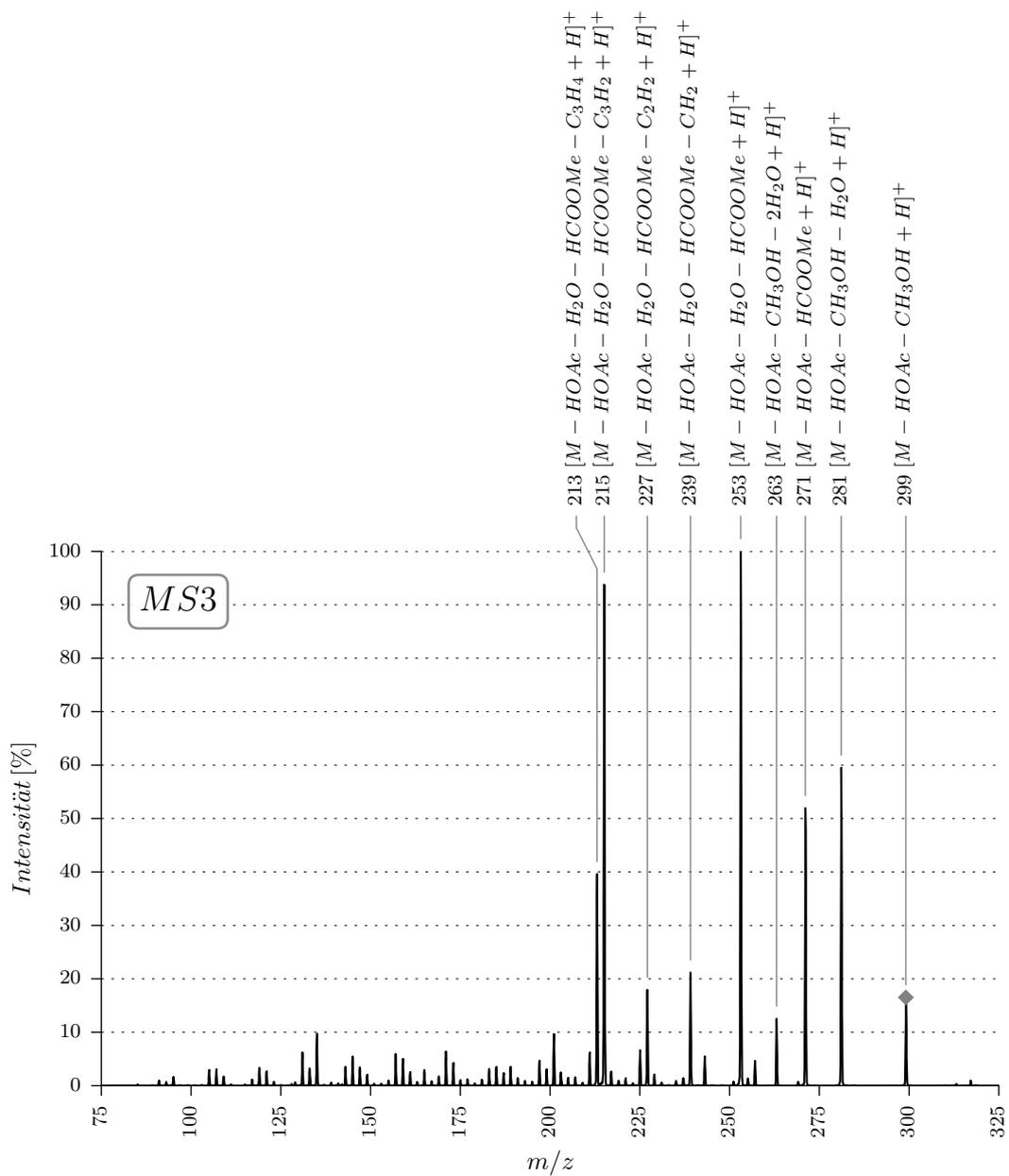
B.55. 54E

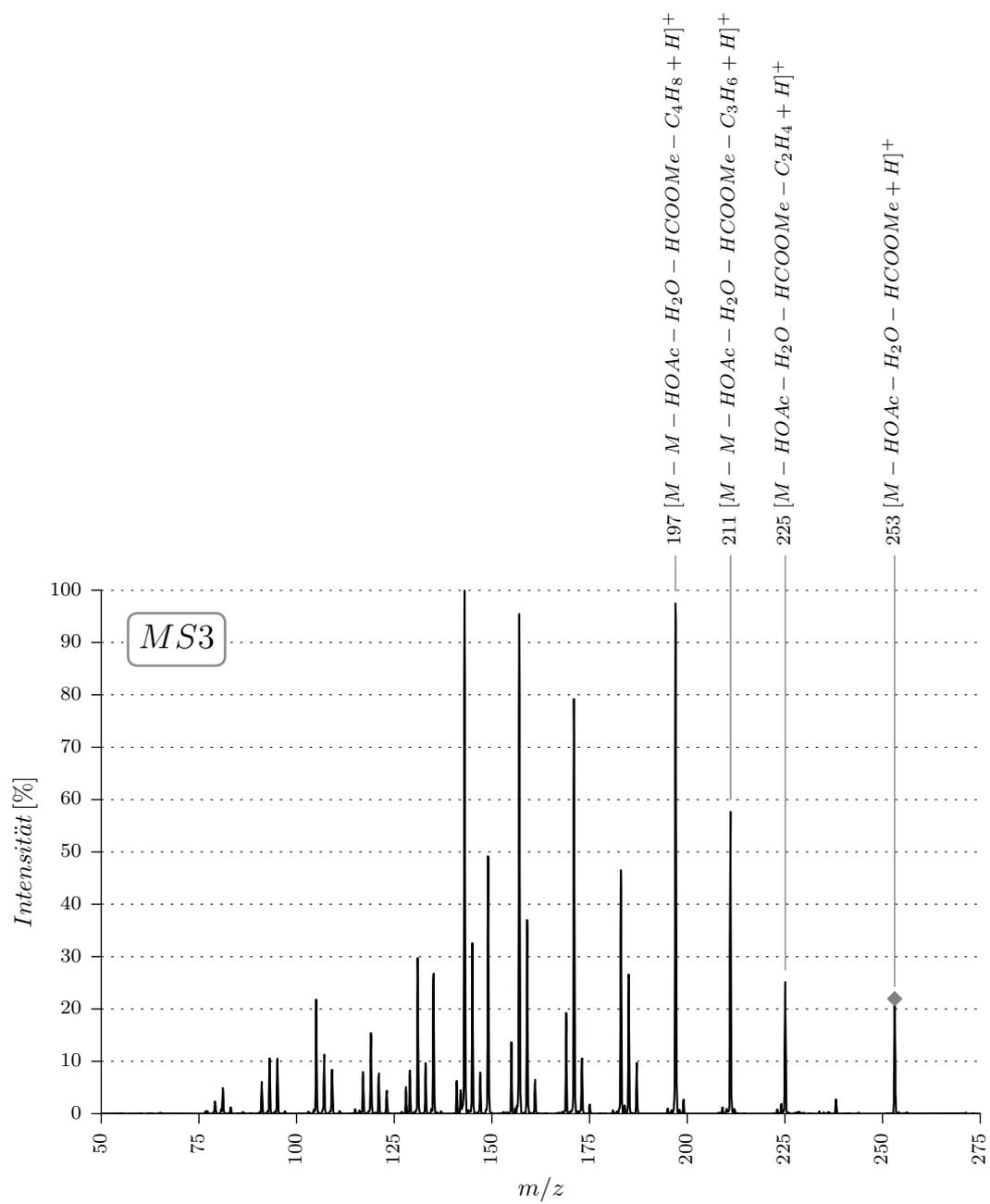
Summenformel: $C_{23}H_{34}O_5$ Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,14 β ,15 β ,17a)-3-(Acetyloxy)-14,15-epoxy-16-hydroxy-androstane-17-carboxylic acid methyl ester

Molekulargewicht: 390









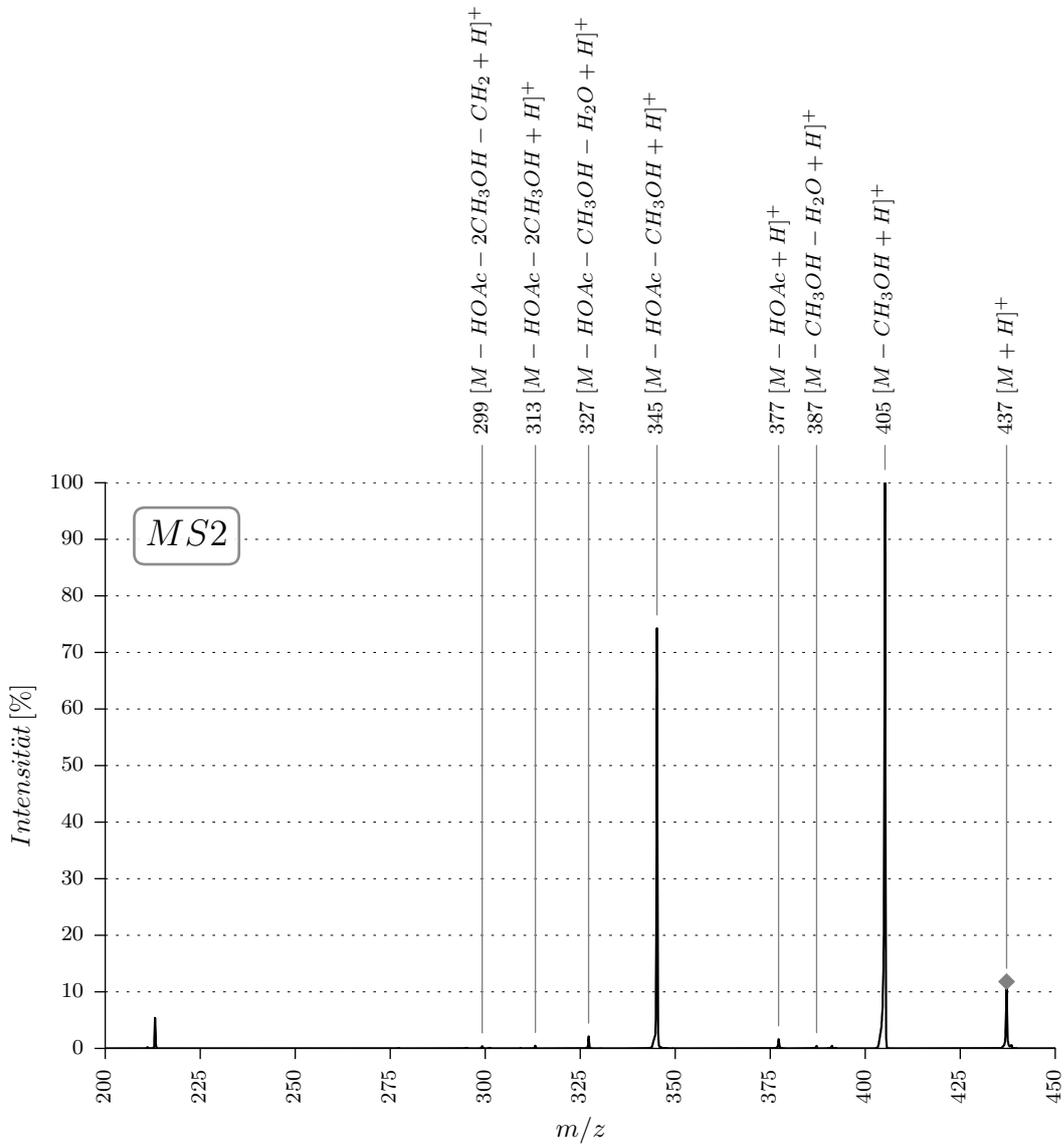
B.56. 54Ee

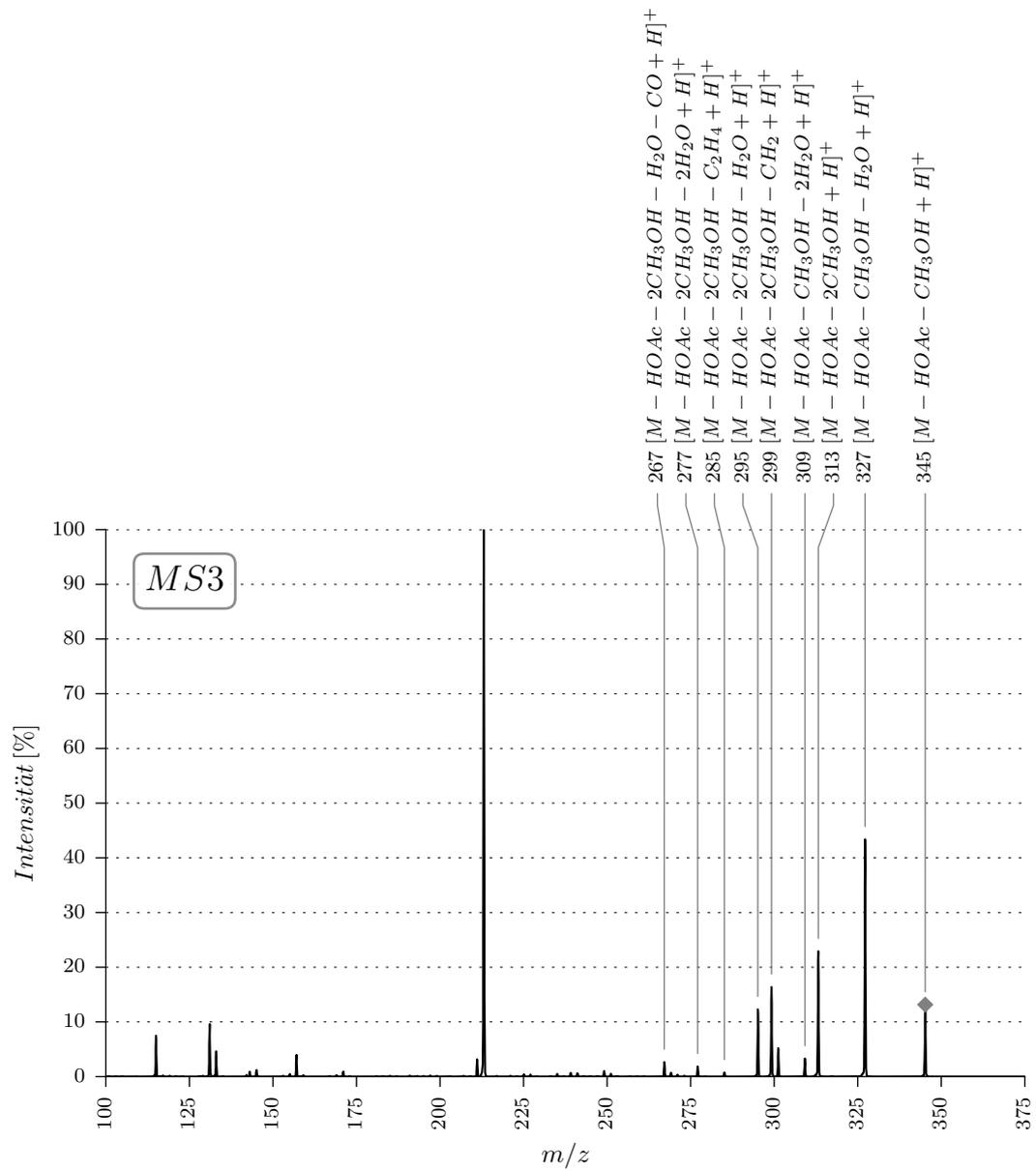
Summenformel: $C_{24}H_{36}O_7$

Chem. Bezeichnung: 2-[7-(Acetyloxy)tetradecahydro-2,4b-dimethyl-1-oxo-2-phenanthrenyl]-succinic acid dimethyl ester

CAS-Nummer: 119926-37-3

Molekulargewicht: 436





B.57. 54v

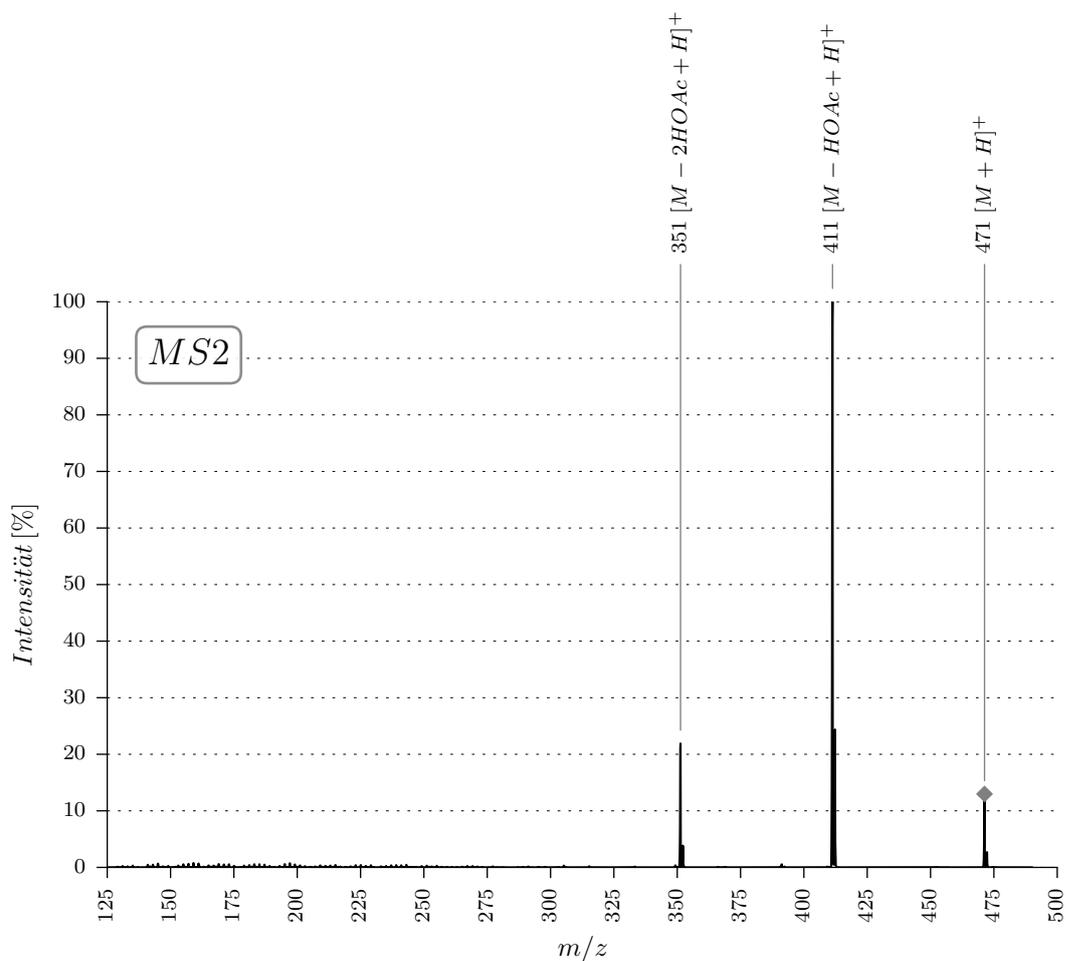
Trivialname: (n y) Diacetyloxybufadienolide

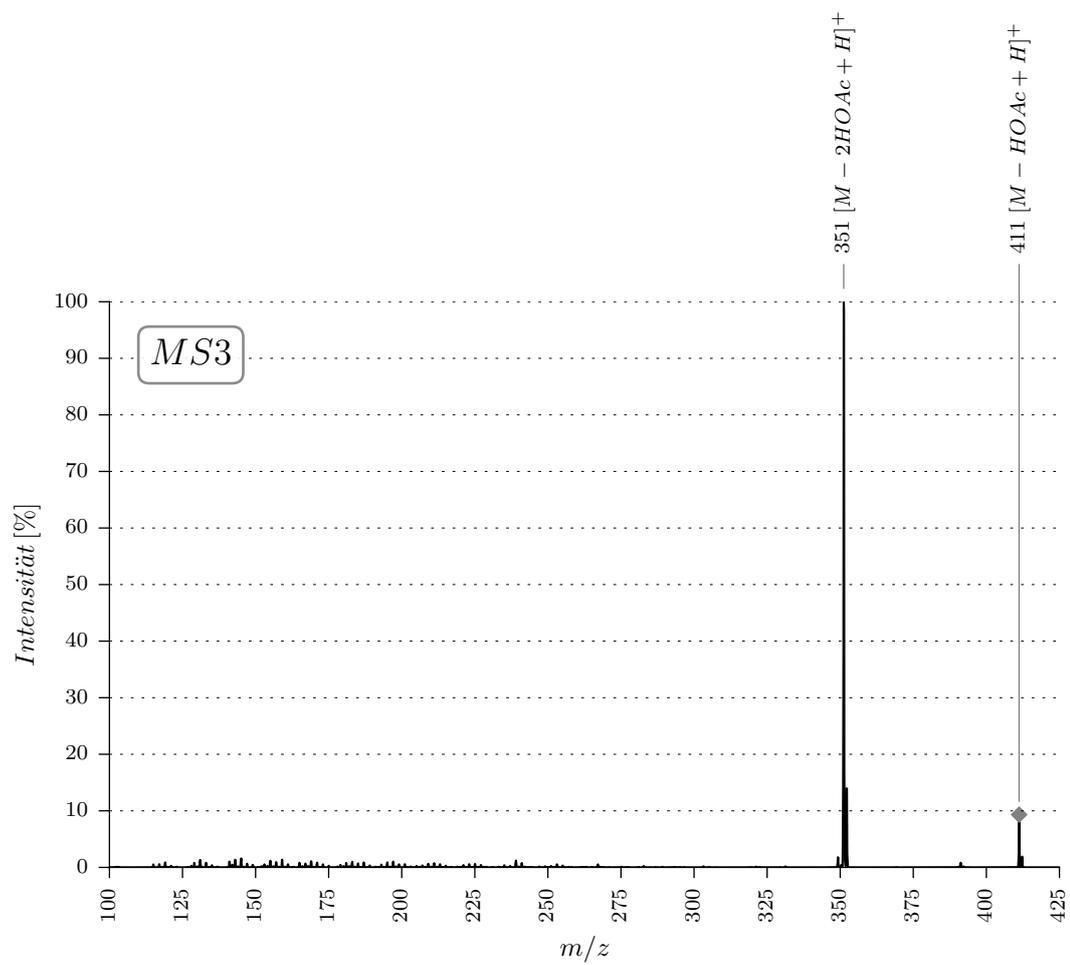
Summenformel: $C_{28}H_{38}O_6$

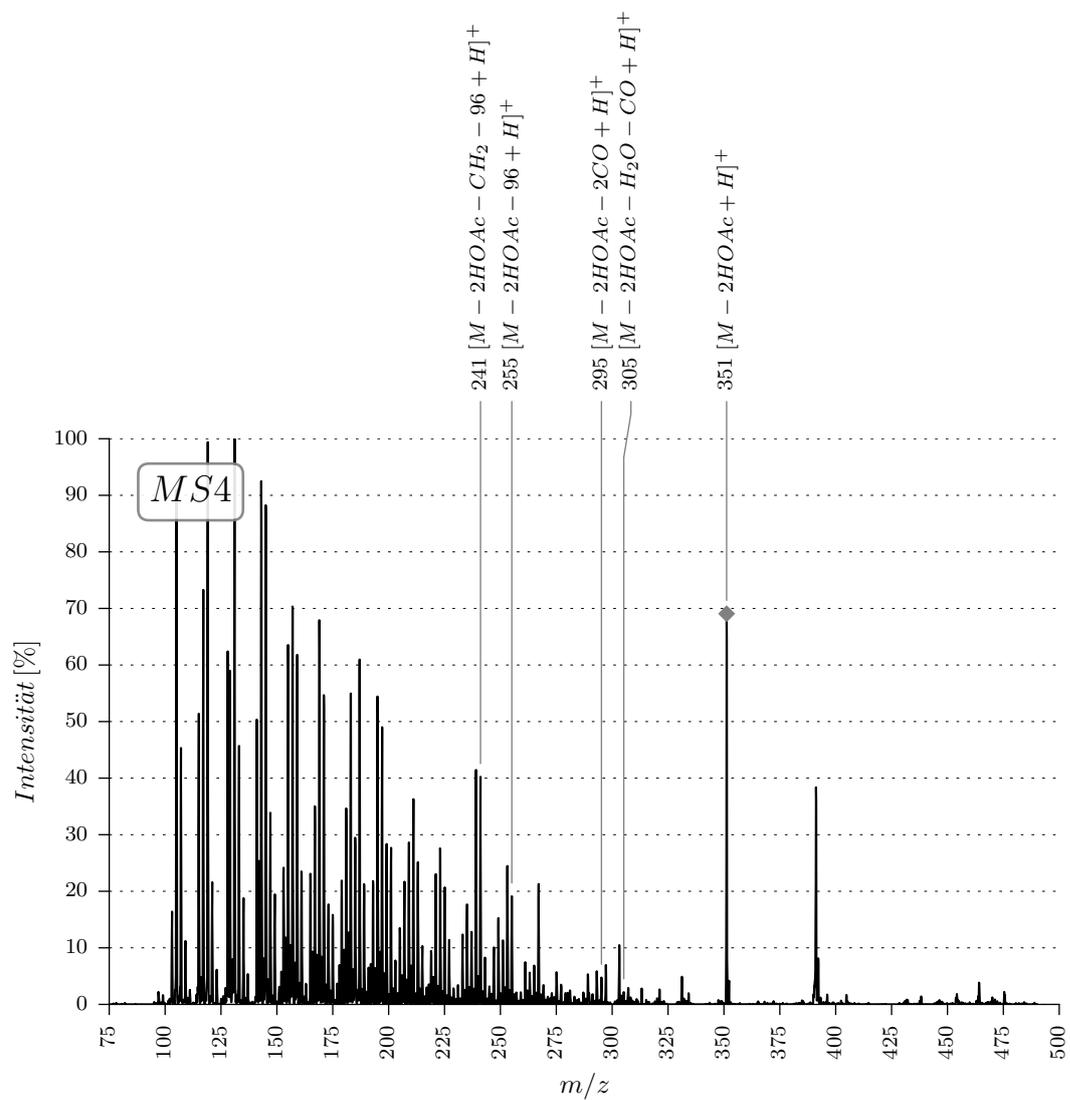
Chem. Bezeichnung: (3 β ,5 β ,14 α ,15 β)-3,15-bis(Acetyloxy)-bufa-20,22-dienolide

CAS-Nummer: 107204-41-1

Molekulargewicht: 470



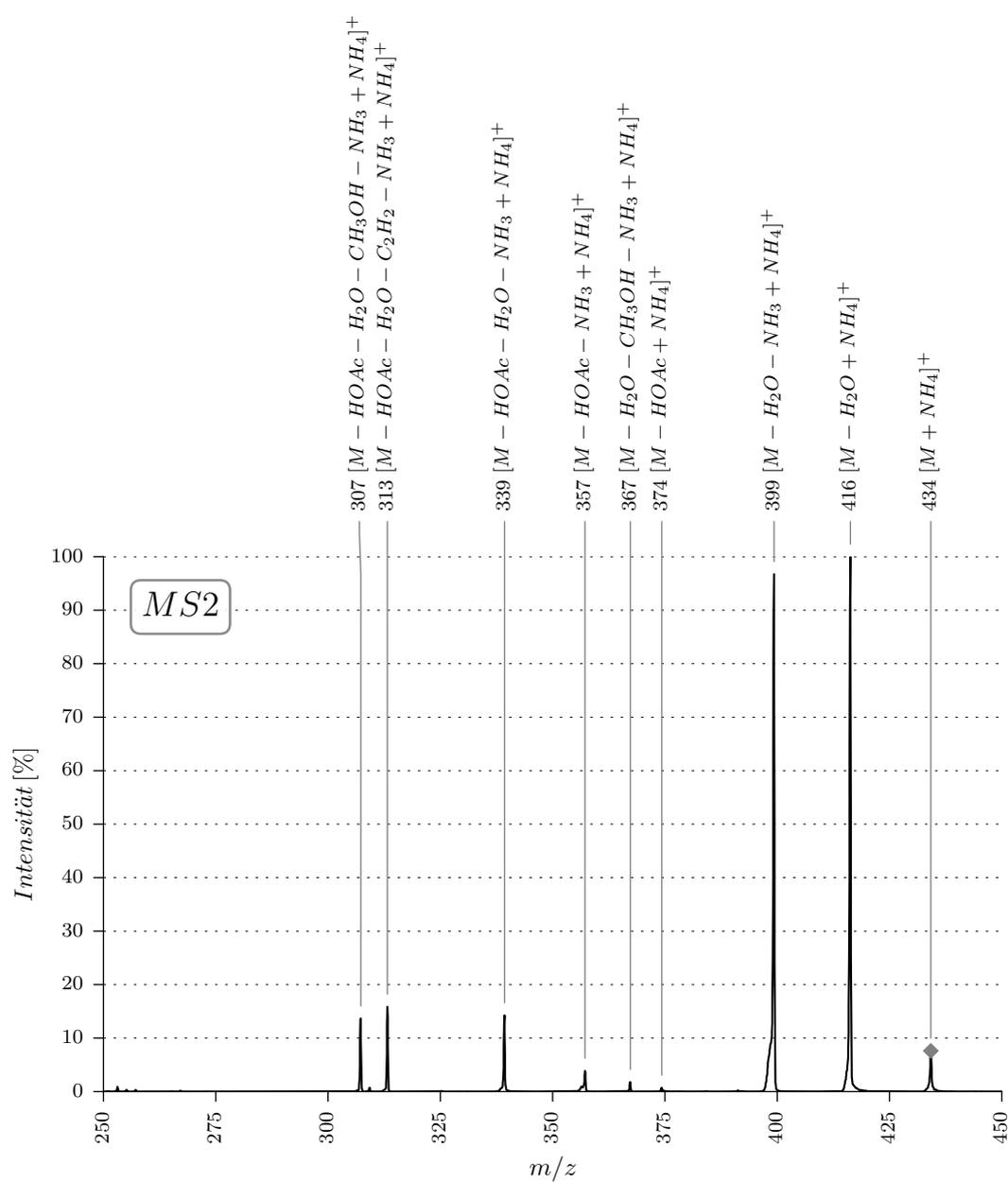


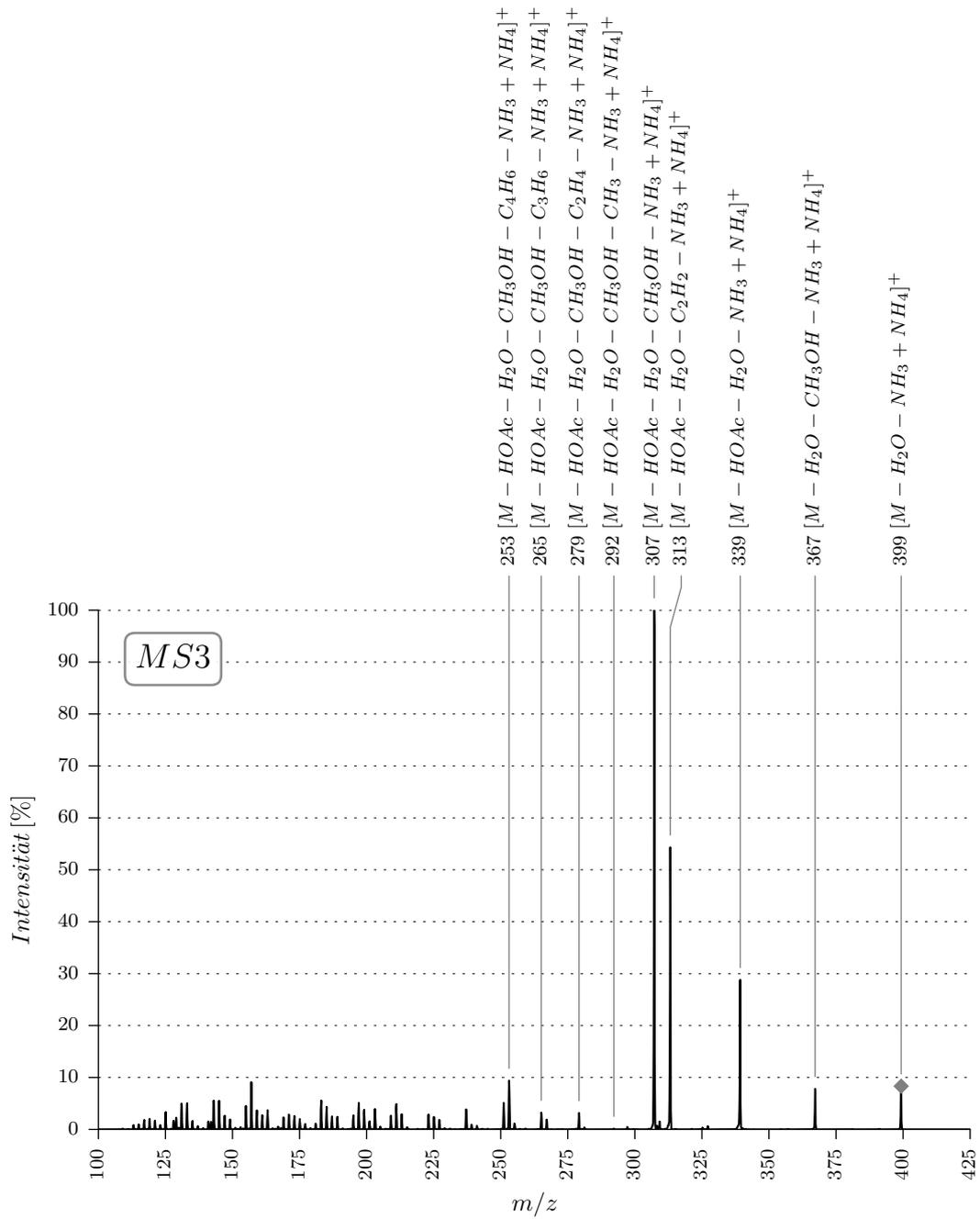


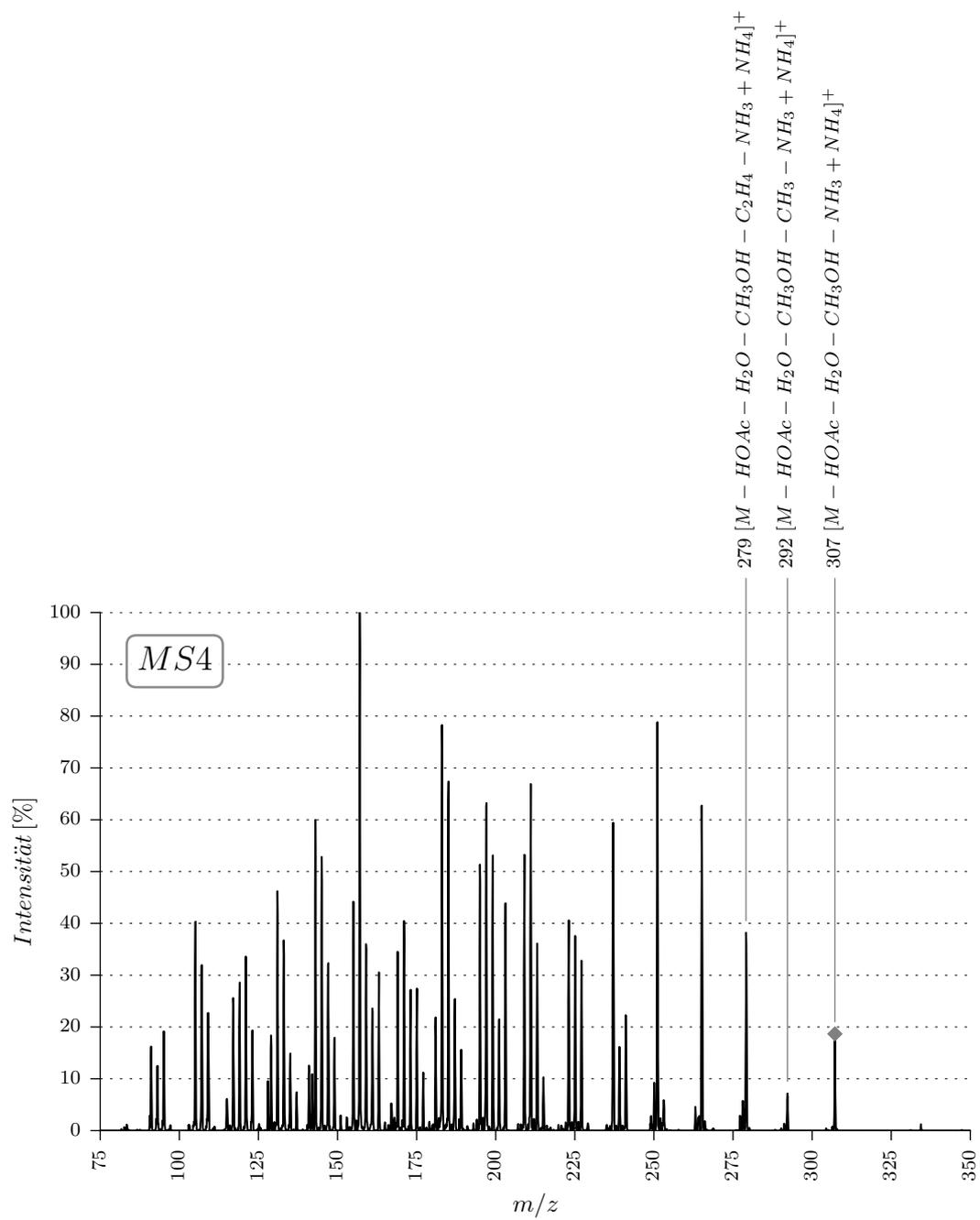
B.58. 62A

Summenformel: $C_{26}H_{40}O_4$ Chem. Bezeichnung: (3 β)-3-Acetyloxy-20-ethenyl-20-hydroxy-21-methoxy-pregn-5-en

Molekulargewicht: 416



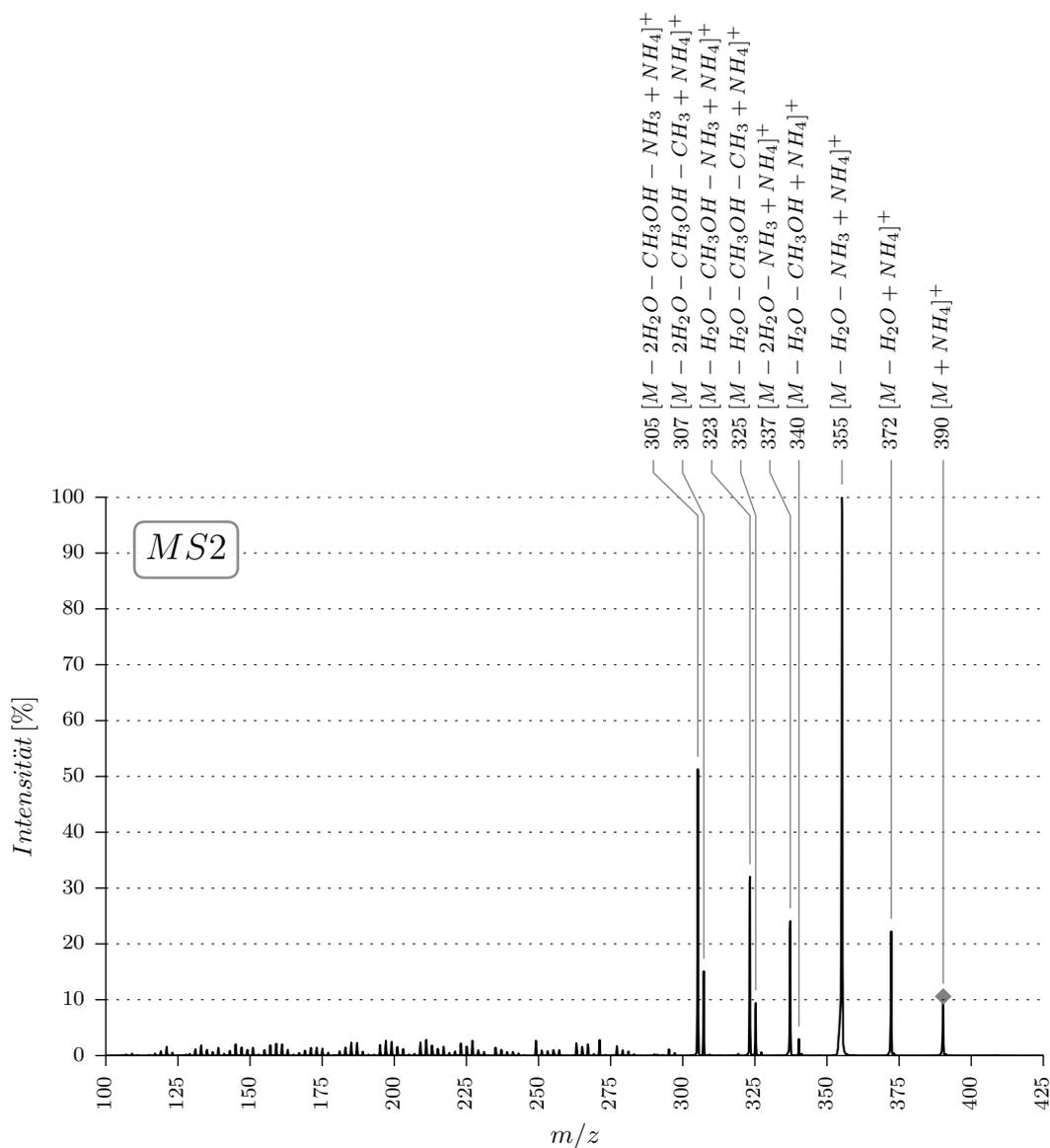


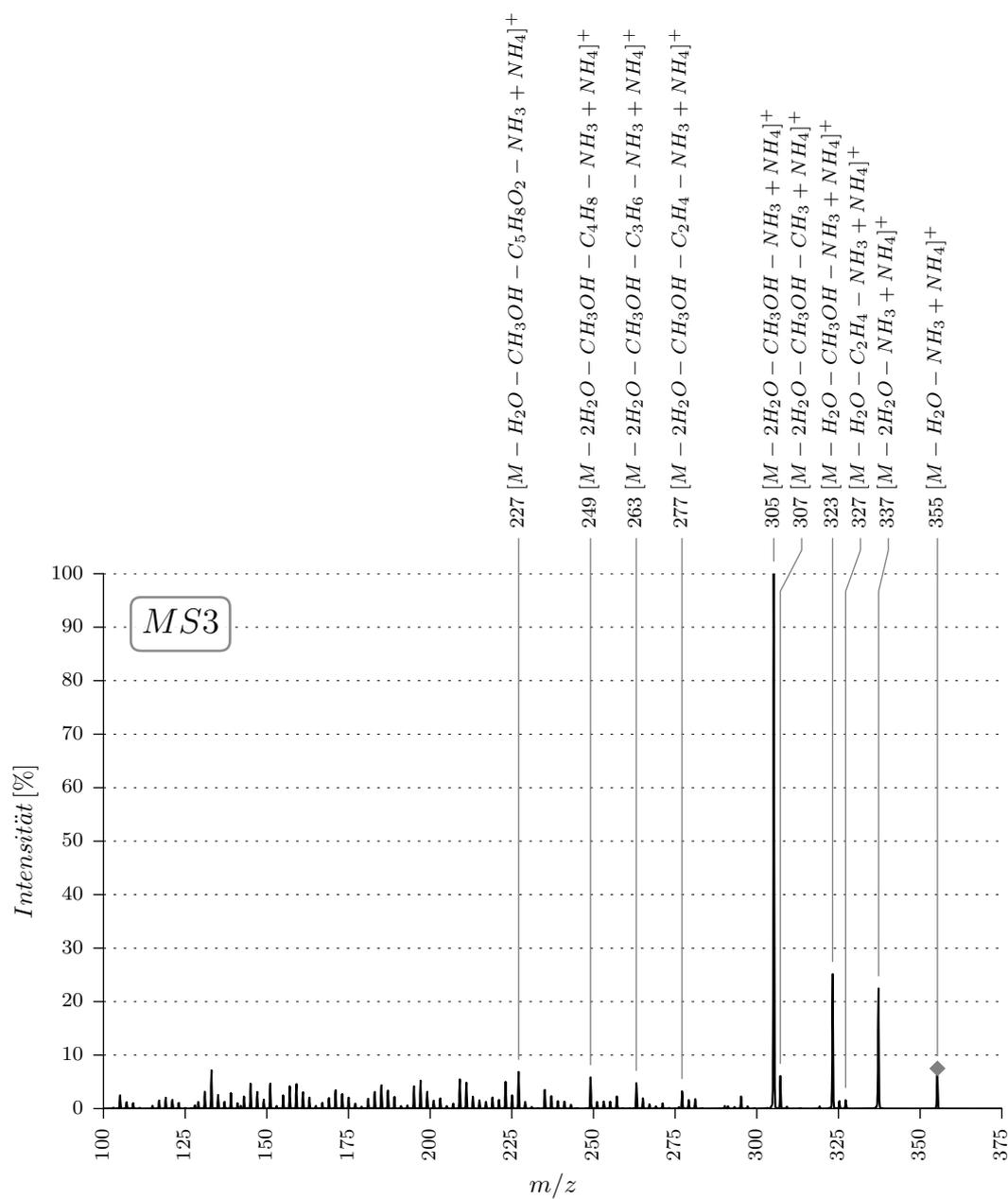


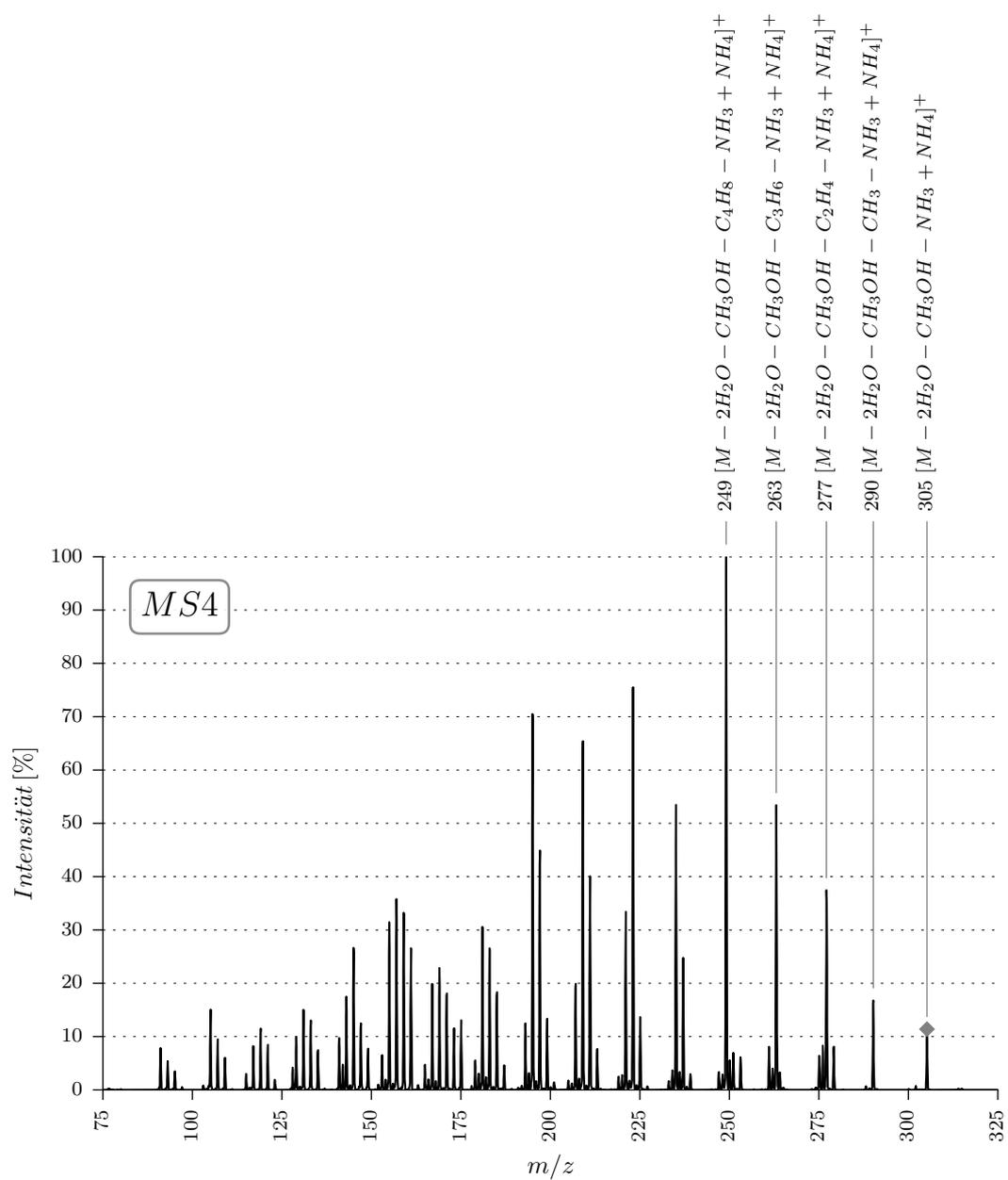
B.59. 62F

Summenformel: $C_{24}H_{36}O_3$ Chem. Bezeichnung: (3 β)-20-Ethinyl-3,20-dihydroxy-21-methoxy-pregn-5-en

Molekulargewicht: 372



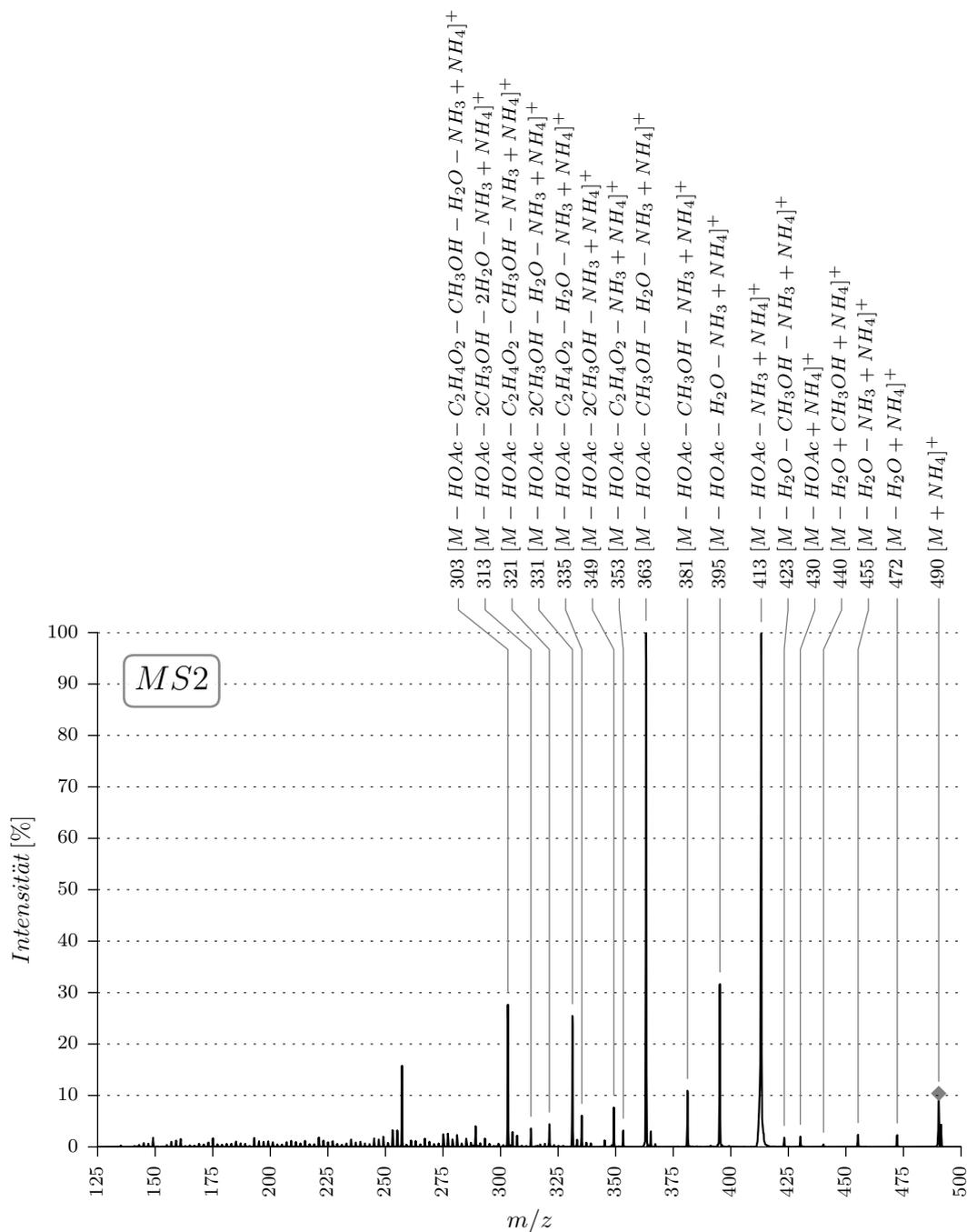


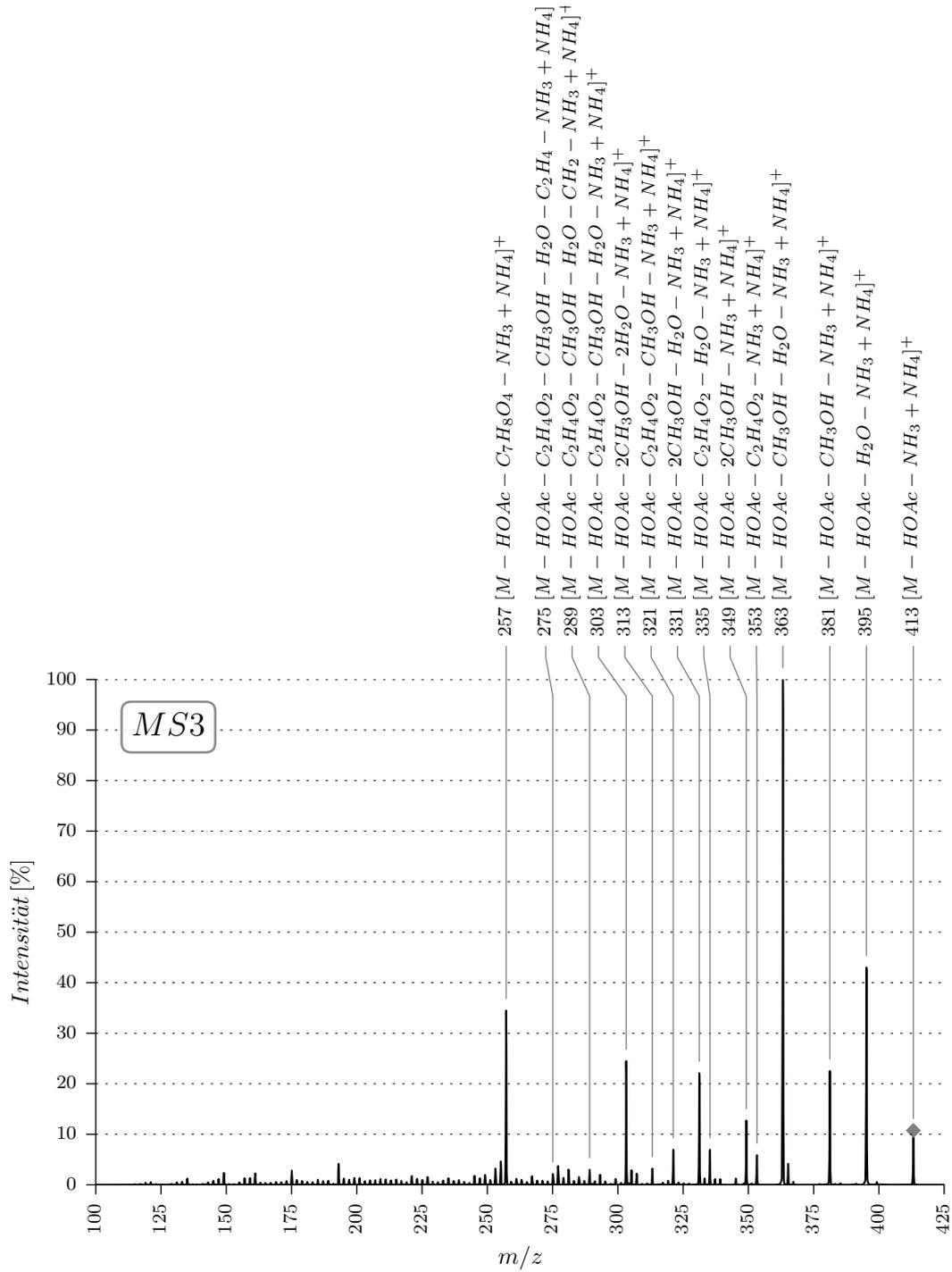


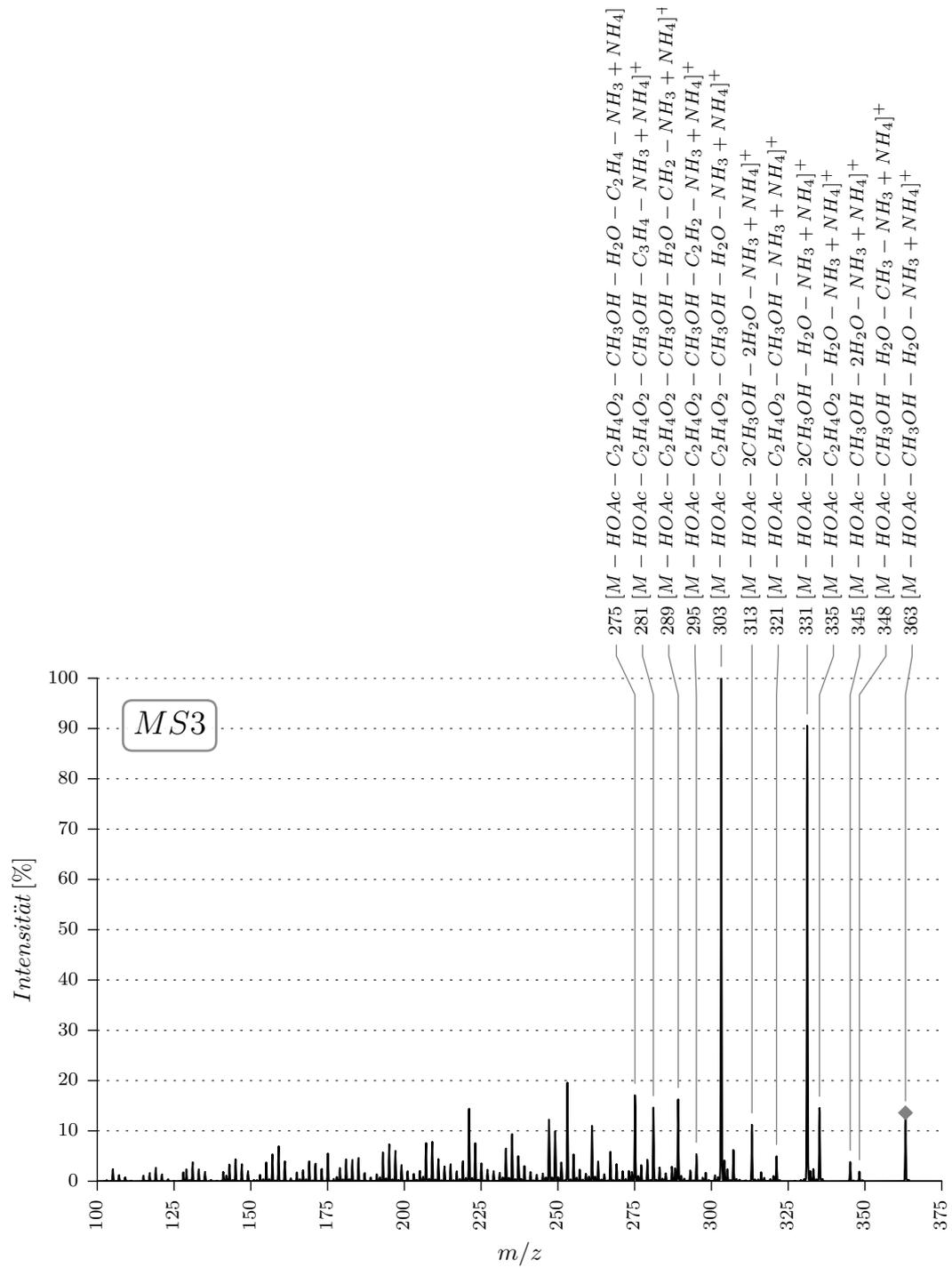
B.60. 62I

Summenformel: $C_{28}H_{40}O_6$ Chem. Bezeichnung: (3 β)-3-Acetyloxy-20-hydroxy-21-methoxy-chol-5-en-22-yn-24-oic acid methylester

Molekulargewicht: 472



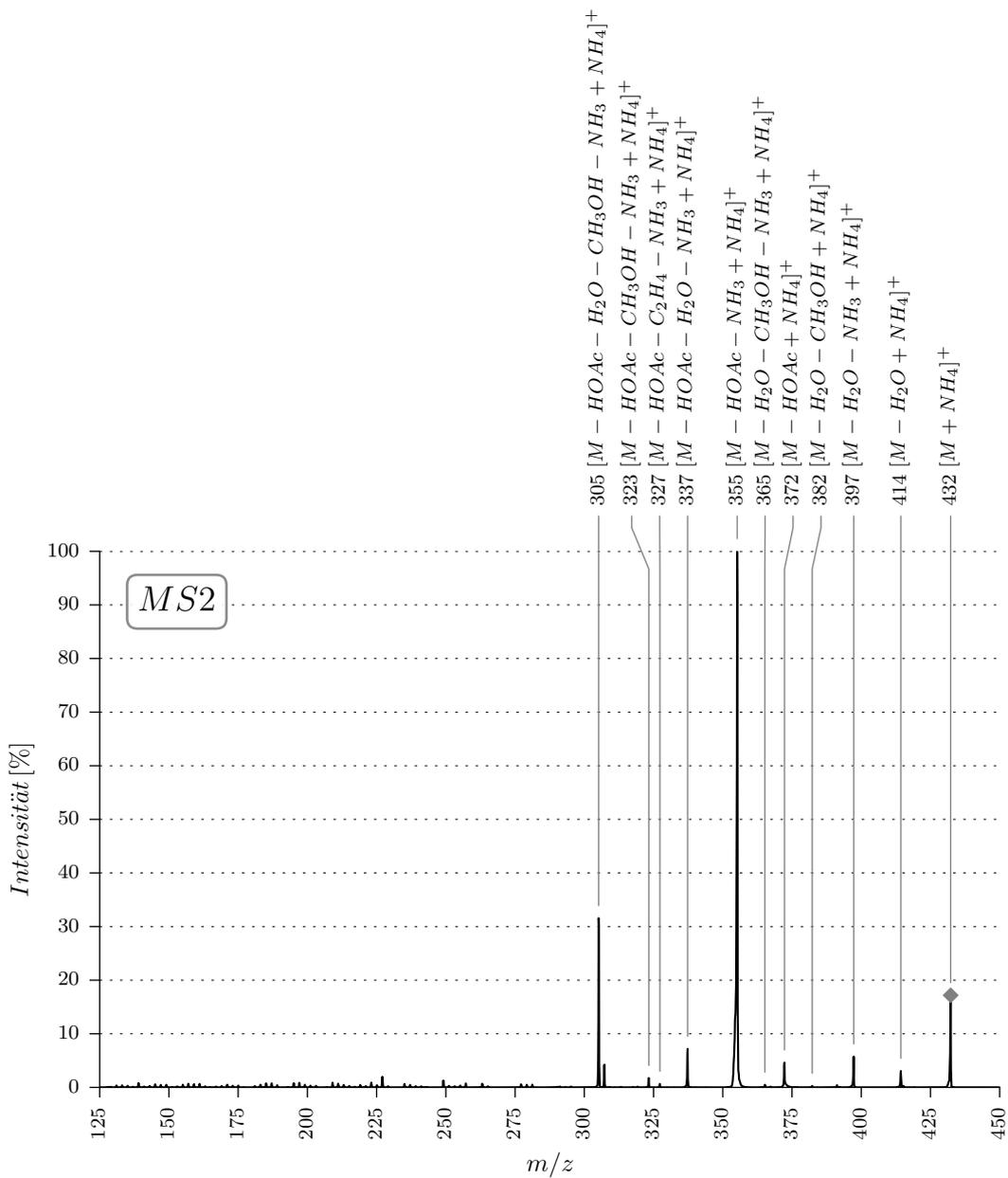


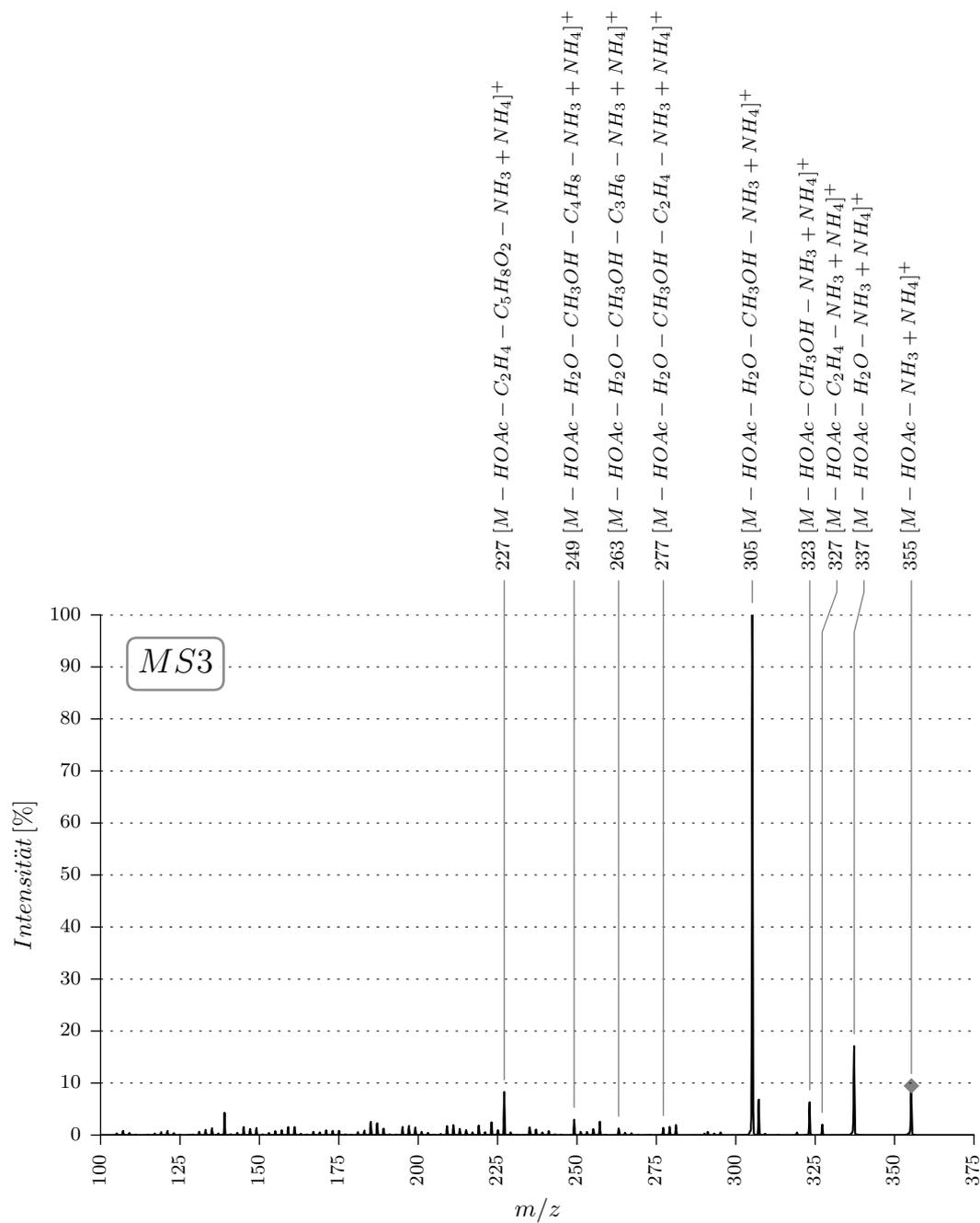


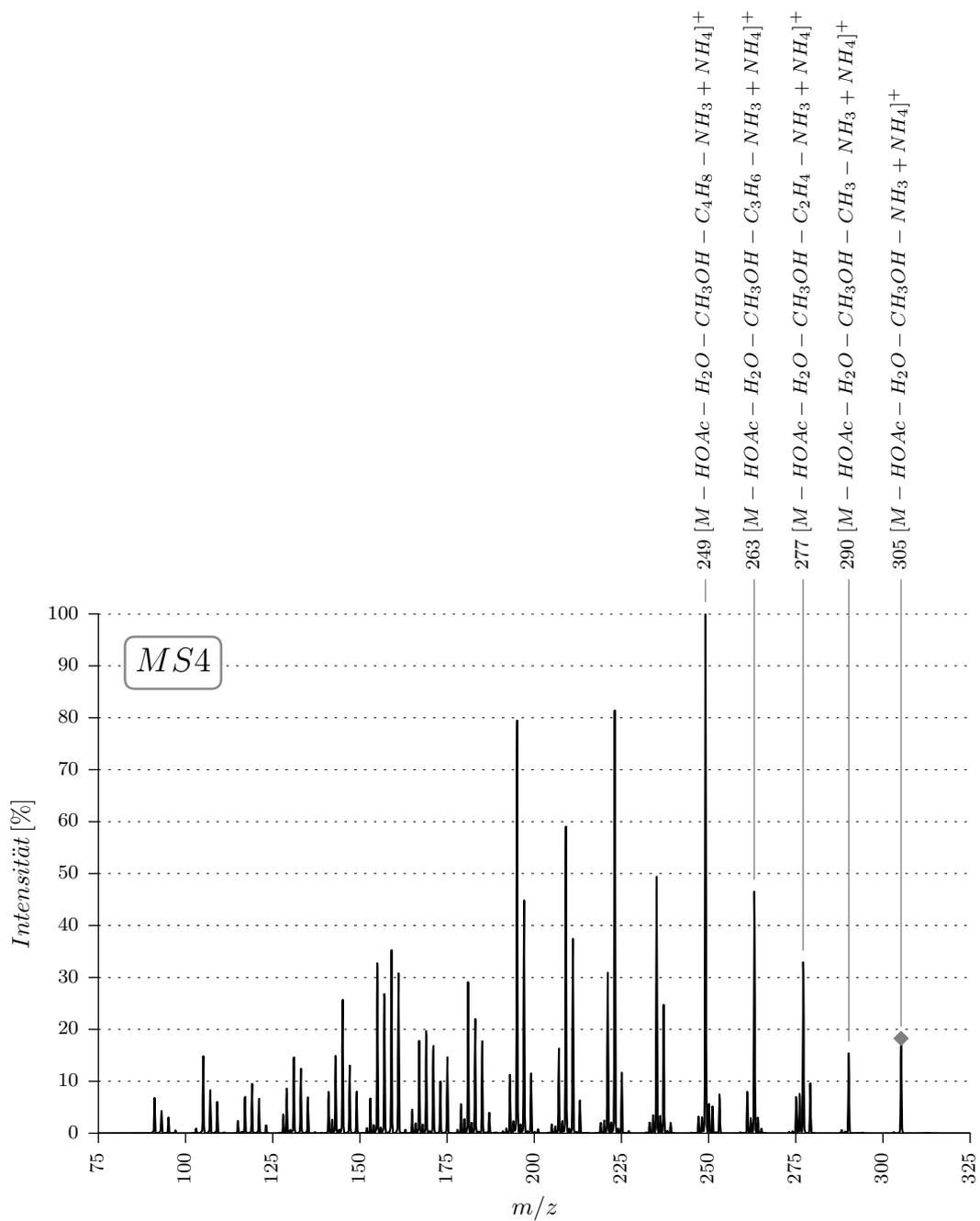
B.61. 62J

Summenformel: $C_{26}H_{38}O_4$ Chem. Bezeichnung: (3 β)-3-Acetyloxy-20-ethinyl-20-hydroxy-21-methoxy-pregn-5-en

Molekulargewicht: 414







Curriculum Vitæ

Persönliche Daten

Name Regina Friedl

Geburtsdatum 24.8.1988

Geburtsort Leoben

Staatsangehörigkeit Österreich

Ausbildung

10/2007 – 02/2015 Studium der Pharmazie an der Universität Wien

10/2002 – 06/2007 HAK Judenburg