

Direkte Analyse von Chlorophyllkataboliten

Vorwissenschaftliche Arbeit verfasst von

Florian Kluibenschedl

Klasse 8a



Betreuer: Mag. Mathias Scherl

BRG Telfs
Weißenbachgasse 37
6410 Telfs

Telfs, Februar 2018

Diese Arbeit wurde mit GNU Emacs geschrieben, in Palatino mit Hilfe von pdfLATEXe und Biber gesetzt.

Die LATEX Vorlage von Karl Voit basiert auf KOMA script und steht im Internet zum Download bereit: <https://github.com/novoid/LaTeX-KOMA-template>

Abstract

This is a placeholder for the abstract. It summarizes the whole thesis to give a very short overview. Usually, this the abstract is written when the whole thesis text is finished.

Vorwort und Danksagung

This is a placeholder for the abstract. It summarizes the whole thesis to give a very short overview. Usually, this the abstract is written when the whole thesis text is finished.

Inhaltsverzeichnis

Abstract

Vorwort und Danksagung

Allgemeiner Teil	1
1 Themenstellung	2
2 Das Chlorophyll und sein Abbauprozess	3
2.1 Der Abbauprozess und seine Bedeutung	3
2.2 Nummerierung von Phyllobilinen	4
3 Methoden	5
3.1 HPLC	5
3.2 Massenspektrometrie	6
3.2.1 LC-MS	7
3.2.2 MS Leafspray	7
Experimenteller Teil	9
4 Allgemeine Arbeits- und Analysemethoden	10
4.1 Herstellung von Lösungen für eine Analyse mit HPLC	10
4.2 Chemikalien und Material	10
4.3 Probenmaterial	10
4.4 Reaktion mit Essigsäureanhydrid	10
4.5 Erstellen von Fragmentierungsdiagrammen	11
5 Experimente MS-Leafspray	12
5.1 Gerätebeschreibung Massenspektrometer	12
5.2 Versuchsaufbau	12
5.3 Versuchsdurchführung	14

Inhaltsverzeichnis

5.4	Chl-Kataboliten des Brokkoliblattes mithilfe von MS-Leafspray identifiziert	15
5.4.1	Bo-NCC-1	15
5.4.2	Bo-NCC-3	17
5.4.3	Bo-DNCC	20
5.5	Identifikation der Reaktionsprodukte	22
5.5.1	Reaktionsprodukt von Bo-DNCC	22
5.5.2	Reaktionsprodukt von Bo-NCC-3	26
5.5.3	Reaktionsprodukt von Bo-NCC-1	28
6	Experimente LC-MS	31
6.1	HPLC-Gradient sowie Gerätebeschreibung	31
6.2	Aufarbeitung der Probe	31
6.3	Theoretische Auswertung der Online-UV/Vis Spektren	32
6.4	Theoretische Auswertung der MS Spektren	32
6.5	Chl-Kataboliten des Brokkoliblattes mithilfe von LC-MS identifiziert	33
6.6	Identifikation der Reaktionsprodukte	39
7	Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS	45
7.1	Beschreibung der Methode	45
7.2	Identifizierte Chl-Kataboliten	45
7.2.1	Bo-DYCC	45
7.2.2	Bo-DNCC	48
7.2.3	Bo-YCC	50
7.2.4	Bo-NCC-3	51
7.2.5	Bo-NCC-1	53
7.3	Reaktionsprodukte der Chl-Kataboliten	54
7.3.1	Reaktionsprodukte von Bo-DYCC	54
7.3.2	Reaktionsprodukt von Bo-DNCC	56
7.3.3	Reaktionsprodukt von Bo-YCC	57
7.3.4	Reaktionsprodukt von Bo-NCC-1	57
7.3.5	Reaktionsprodukt von Bo-NCC-3	58
Ergebnisse und Diskussion		59
Verweise		60
Literaturverzeichnis		61

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	63
Abkürzungsverzeichnis	66
Anhang	67

Allgemeiner Teil

1 Themenstellung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit besteht darin, die Chlorophyll Kataboliten (Chl-Katabolit) von Brokkoliblättern einer direkten massenspektrometrischen Analyse zu unterziehen und sie anhand unterschiedlicher Merkmale zu untersuchen.

Es sollte dabei untersucht werden, inwieweit eine direkte Analyse mit der noch relativ neuen Methode des MS Leafspray eine strukturelle Aufklärung von Chl-Kataboliten ermöglicht, sowie, ob das Stattfinden einer Reaktion von Essigsäureanhydrid mit den Chl-Kataboliten festgestellt werden kann.

Die Reaktion selbst sollte Aufschluss über die Reaktivitäten unterschiedlicher Carbonsäuren der Chl-Kataboliten und deren struktureller Besonderheiten geben.

Mithilfe von im Collision induced Dissociation (CID) Modus erstellten Fragmentierungsdiagrammen wird versucht, eventuelle charakteristische Eigenschaften der Chl-Kataboliten ausfindig zu machen. Diese Eigenschaften können sich zum Beispiel (z.B.) im Vergleich der aufgenommenen Diagramme zwischen den Chl-Kataboliten ergeben aber auch im intramolekularen Bereich.

Es soll somit das Potential von Fragmentierungsdiagrammen in Hinblick auf zukünftige Strukturaufklärung mithilfe eines Massenspektrometers analysiert werden.

Um die Ergebnisse von MS Leafspray zu überprüfen wurde die Methode der High performance liquid chromatography (HPLC) sowie ein hochauflösendes Massenspektrometer verwendet. Mit den im hochauflösenden Massenspektrometer erhaltenen Fragmentierungen wird versucht, diese mit den von MS Leafspray erhaltenen zu vergleichen, um einen Vergleich der beiden Methoden abgeben zu können.

Eine Analyse mit diesen Methoden setzt die Herstellung eines Blattextraktes voraus und verdient deswegen nicht mehr die Bezeichnung der direkten Analyse.

2 Das Chlorophyll und sein Abbauprozess

2.1 Der Abbauprozess und seine Bedeutung

Jedes Jahr gehen weltweit schätzungsweise 10^9 Tonnen an Chlorophyll scheinbar verloren. Der Abbauprozess des Chlorophylls ist damit ob der markanten Farbveränderungen einer der visuell am meisten wahrgenommenen biochemischen Vorgänge und kann sogar aus dem All beobachtet werden. [1] Die schönen, bunten Farben des Laubs werden dabei jedoch nicht durch die Abbauprodukte des Chlorophylls (im Folgenden Chlorophyllkataboliten) hervorgerufen [2], da die Endprodukte des Chlorophyllabbaus farblos sind [1]. Im Folgenden ist immer die Rede vom Abbauprozess in höheren Pflanzen, da gezeigt wurde, dass z.B. marine Lebensformen das Chlorophyll auf einem anderen Wege abbauen und auch dementsprechend andere Endprodukte vorzufinden sind. [1], [3], [4] Die Abbauprodukte fallen in die Klasse der Phyllobiline (bilinartige, heterocyclische Pyrrole) und sind Anzeichen für Reifung, Seneszenz und den Zelltod. Der Abbauprozess wird im Rahmen eines Entgiftungsprozesses begangen. [5]

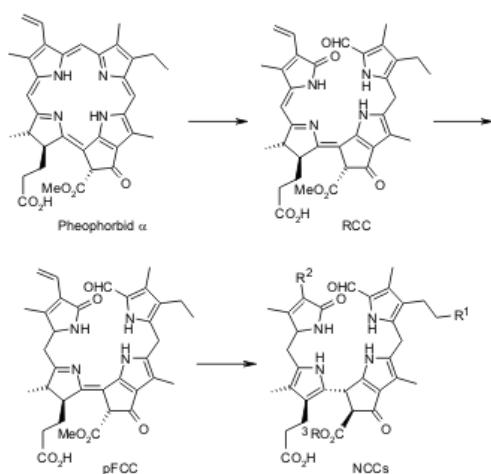


Abbildung 2.1: Der Abbauprozess des Chlorophylls in seneszenten Blättern

2 Das Chlorophyll und sein Abbauprozess

Die Struktur eines Chlorophyllkataboliten konnte erstmalig im Jahre 1991 aufgeklärt werden. Es handelte sich hierbei um einen Hv-Non floorescent Chlorophylllic Catabolite (NCC) der Gerste (*Hordeum vulgare*) [3], das Endprodukt eines mehrstufigen Abbauprozesses.

In den folgenden Jahren fand man heraus, dass das Chlorophyll zuerst in das Pheophorbid a umgewandelt wird. Im nächsten Schritt wird der Makrozyklus oxygenolytisch (an der Reaktion beteiligtes Enzym: Pheo α Mono-oxygenase [6]) in der nördlichen *meso* Position geöffnet, woraufhin ein *Red Chlorophyll Catabolite* (RCC) entsteht. Über einen *primary "floorescent" Chlorophyll Catabolite* (pFCC) entsteht durch eine nichtenzymatische Isomerisierung ein NCC. Thermodynamische Triebkraft dieser Reaktion ist die Rearomatisierung von Ring D. [7], [8] Die unterschiedlichen Arten von NCCs ergeben sich durch Anlagerung der entsprechenden funktionellen Gruppen (z.B. Zuckerring, Hydroxylgruppen, ...) an den pFCC. [8] In Abbildung 2.2 sind die Positionen, an denen diese strukturellen Unterschiede auftreten können gekennzeichnet durch R¹, R², R³.

2.2 Nummerierung von Phyllobilinen

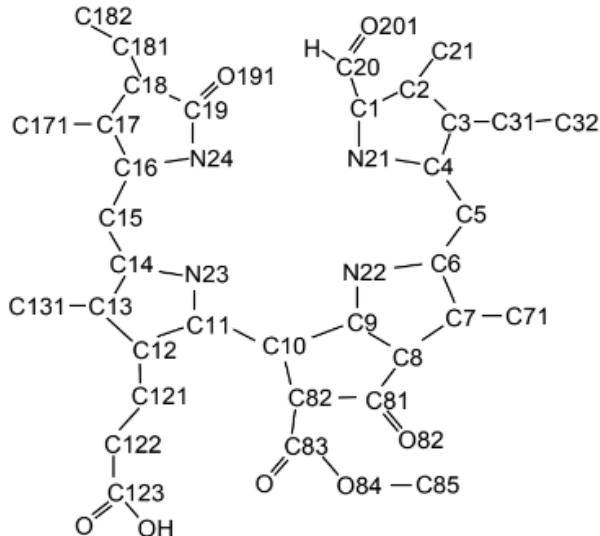


Abbildung 2.2: Die Positionsangaben und Bezeichnung der Ringe, die in der restlichen Arbeit für Ausführungen sowie Erklärungen verwendet werden.

3 Methoden

Es folgen theoretische Erklärungen der Methoden, derer ich mich im Rahmen meiner praktischen Arbeit bediente.

3.1 HPLC

Die HPLC ist eine chromatographische Methode, um lösliche Stoffe präparativ zu trennen. Es sind dabei quantitative als auch qualitative Analysen möglich. [9, S. 165]

Das Trennen der Stoffe basiert auf ihren unterschiedlichen chemischen Eigenschaften. Die Stoffe werden gelöst und bilden zusammen mit dem Lösungsmittel (LM) die mobile Phase, die an einer, sich in der Trennsäule befindenden stationären Phase vorbeiströmt, wobei es dabei zu Wechselwirkungen zwischen den gelösten Stoffen mit der stationären Phase kommt. Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Eigenschaften und den daraus resultierenden unterschiedlichen Wechselwirkungen hält sich jeder Stoff verschieden lange in der stationären Phase auf. Die Verweildauer eines Stoffes in der Trennsäule wird als Retentionszeit bezeichnet. [9, S. 31-32] Die Retentionszeit wird über Detektoren bestimmt, die die Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase feststellen und das Ergebnis in einem Chromatogramm darstellen. [9, S. 46]

Für die Experimente wurde die Methode der Reversed-phase (RP) Chromatographie angewandt. Dabei ist die mobile Phase polar und die stationäre Phase unpolär (als unpolare Phase dienen beispielsweise Silane mit langen Kohlenwasserstoffketten). [9, S. 189]

Im Rahmen meiner Arbeit wurde die HPLC verwendet, um die Stoffe im Blatt zu trennen und entsprechende Chlorophyllkataboliten zu isolieren. Die Identifikation der Chl-Katabolit erfolgte dabei durch einen UV/VIS Detektor (operierte im Wellenlängenbereich von 200nm - 800nm) sowie durch ein dazu geschaltetes Massenspektrometer (=Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)).

3 Methoden

Um die Chl-Kataboliten mit einem hochauflösenden Massenspektrometer zu fragmentieren, wurden die Verbindungen zu jenen Zeiten, zu denen sie in der HPLC jeweils eluierten in Eppendorf Reaktionsgefäß (EPPI) gesammelt.

Die Herstellung eines Blattextraktes für die Analyse mit der HPLC wird in Kapitel 6.2 beschrieben. Aufgrund dieser speziellen Aufarbeitung des Blattes zählt die Methode der HPLC nicht mehr zur direkten Analyse. Sie wurde in Kombination mit einem hochauflösenden Massenspektrometer deswegen verwendet, um die Ergebnisse von MS Leafspray zu verifizieren.

3.2 Massenspektrometrie

Mithilfe eines Massenspektrometers kann die Masse eines Moleküls bestimmt werden. Aufgrund der Einfachheit der Methode und der sehr geringen benötigten Probenmenge ist das Massenspektrometer für eine Vielzahl an Anwendungen geeignet (z.B. in der Forensik, Lebensmittelprüfung, Medikamentenprüfung, Analyse von Meteoriten, ...). [10, S. 1] Der jetzige Entwicklungsstand in der Massenspektrometrie ist vor allem den Entwicklungen in den letzten vier Jahrzehnten auf diesem Gebiet zu verdanken. [10, S. 6-9]

Um die Molekulmasse der Stoffe zu bestimmen, werden sie zuerst in Gasphasen-Ionen überführt. [10, S. 15] Dabei gibt es unterschiedliche Methoden, diesen Zustand herbeizuführen, wie z.B. Electron Ionization (EI), Chemical Ionization (CI) und Field Ionization (FI). [10, S. 15-30] Nach der Ionisation werden sie im Massenanalysator nach ihrem Masse pro Ladung (m/z) Verhältnis getrennt und im Detektor der Ionenstrom gemessen. Das Ergebnis wird in einem Massenspektrum festgehalten, in dem auf der Ordinate die relative Intensität der einzelnen Peaks und auf der Abszisse das Verhältnis m/z aufgetragen werden.

In den Experimenten dieser Arbeit wurde zur Ionisation die Electrosprayionisation (ESI) Methode verwendet, die erstmalig das Messen von Proteinen mithilfe eines Massenspektrometers erlaubte und aufgrund ihrer hohen Empfindlichkeit gegenüber kleinen, polaren Molekülen mit einer HPLC kombiniert werden kann. Bei der ESI Methode wird durch Anlegen einer Spannung von 3-6kV zwischen der Kapillare, aus der die Flüssigkeit kommt und der Gegenelektrode ein elektrisches Feld mit einer Stärke in der Größenordnung von 10^6 Vm^{-1} angelegt. Die erhaltenen geladenen Tröpfchen passieren dann ein Inertgas (in den

3 Methoden

meisten Fällen Stickstoff (N₂)) beziehungsweise (bzw.) eine erhitzte Kapillare, um das LM zu entfernen. [10, S. 43-44]

Um die Chlorophyllkataboliten im Massenspektrometer zu analysieren wurde sowohl die Methode der LC-MS als auch die Methode des MS-Leafspray verwendet.

3.2.1 LC-MS

Bei der Methode der LC-MS wird eine HPLC vor ein Massenspektrometer geschaltet. Dabei trennt die HPLC die Stoffe zuvor auf und eluiert sie anschließend in das Massenspektrometer. [10, S. 217-218] Um die Flussrate bei atmosphärischem Druck zu verringern, wird nur ein Teil des direkt aus der HPLC kommenden Fluxes zum Massenspektrometer hin abgezweigt. Ansonsten wäre die Flussrate zu hoch, was eine Ionisierung der Probe mithilfe einer ESI - Quelle unmöglich machen würde. [10, S. 221]

Das Resultat ist je ein Chromatogramm der HPLC und des Massenspektrometers. Es wird somit zu jedem Zeitpunkt eines HPLC-Laufes ein UV/VIS Spektrum sowie ein Massenspektrum erzeugt. Aus dem UV/VIS Spektrum lässt sich schließen, ob es sich bei einem Chl-Katalyten um einen NCC, Decarboxylated-Non fluorescent Chlorophylllic Catabolite (DNCC) oder einen Fluorescent Chlorophylllic Catabolite (YCC) handelt. Aus dem Massenspektrum kann die Molekülmasse (in Da) mit allgegenwärtigen Fragmentierungen abgelesen werden. Unter Verwendung eines hochauflösenden Massenspektrometers wird außerdem die atomare Zusammensetzung in Form einer Summenformel ersichtlich.

3.2.2 MS Leafspray

Ambient Ionization [11] ermöglicht es, Proben ohne vorherige präparative Trennung durch chromatographische Trennverfahren direkt in ihrer *natürlichen* Umgebung mithilfe eines Massenspektrometers zu untersuchen. Eine Methode, die auf dem Prinzip der *Ambient Ionization* basiert ist *Paper Spray* [12]. Dabei kommt es zu einer Kombination der ESI sowie der *Ambient Ionisationsmethode*. [12]

3 Methoden

Die Ionisation der Probe erfolgt ausgehend von einem feuchten, porösen Material (z.B. Papier), das in einer Kupferklemme eingeklemmt wird. Zwischen der Kapillaröffnung des Massenspektrometers und der Kupferklemme liegt eine Spannung im Bereich von 3-6kV an, woraufhin kleine Tröpfchen, die Ionen der Probe enthalten von der Spitze des porösen Materials ausgesendet werden und Ionen der Probe in das Massenspektrometer befördern. [13] Durch Anlegen von Kalibrationskurven mit externen Standards wird außerdem ermöglicht, eine quantitative Bestimmung der Menge des Analyten durchzuführen. [14]

Leaf Spray ist eine Form von Paper Spray, bei der die zu analysierende Pflanze selbst als poröses Material dient und wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Identifikation von Chl-Katabolit verwendet. Der Vorteil einer Analyse von Chl-Katabolit mit MS Leafspray ist, dass weniger Zeit für die Vorbereitung benötigt wird, was wiederum Grundlage für eine schnellere und effizientere Analyse ist. Genauere Ausführungen finden sich in Kapitel 5.

Experimenteller Teil

4 Allgemeine Arbeits- und Analysemethoden

4.1 Herstellung von Lösungen für eine Analyse mit HPLC

- Herstellung eines 3.2 mM NH₄Ac Puffers:
Es wurden 0.1542 g Ammoniumacetat abgewogen und in 0.5 L Wasser gelöst.

4.2 Chemikalien und Material

4.3 Probenmaterial

Als Probe dienten Brokkoliblätter der Brokkoliflanze aus dem Garten meiner Oma (Grundfeld Telfs, Austria). Die Brokkoliblätter wurden im Zeitraum von 03.08.2017 bis zum 13.09.2017 (die letzten Brokkoliblätter wurden am 11.09.2017 gesammelt) jeweils in der früh zwischen 07:20 und 07:30 gesammelt. Der Zeitraum, in dem die Brokkoliblätter für Analysen verwendet wurden beträgt maximal drei Tage (danach wurden neue Brokkoliblätter gesammelt).

4.4 Reaktion mit Essigsäureanhydrid

Im Rahmen der direkten Analyse der Chl-Kataboliten wurden diese einer Reaktion mit Essigsäureanhydrid unterzogen. Die Reaktion wurde dabei direkt am Blatt durchgeführt. Dazu wurden in einem Exikator getrocknete Blätter auf eine Fläche von circa (ca.) 2cm² (entspricht einer ungefähren Blattmasse

4 Allgemeine Arbeits- und Analysemethoden

von 0.01g) mit einer Rasierklinge zugeschnitten und anschließend mit 300µL Essigsäureanhydrid beidseitig benetzt. Die 300µL ergaben sich, da das Blatt nicht in der Reagenz schwimmen sollte, da sonst Teile des Blattes aus diesem herausgelöst werden, was zu einer Verringerung der Intensitäten in HPLC und MS Leafspray führt.

Die Reaktion wurde durch eine Vakuumpumpe mit zwischengeschalteter Kühlfalla gestoppt (Verweildauer in der Vakuumpumpe betrug ca. 5min). Dabei wurde die verbleibende Reagenz abgesaugt. Das Blatt wurde dann entsprechend der folgenden Analysenmethode entsprechend aufgearbeitet.

Es wurden Reaktionszeiten zwischen 7min. und 6h ausprobiert. Für die Präsentation und Diskussion der MS Leafspray Versuche wurden die Reaktionsprodukte nach 22min. Reaktionsdauer verwendet, wohingegen für die Präsentation der HPLC Versuche die Reaktionsprodukte nach 3h Reaktionsdauer.

4.5 Erstellen von Fragmentierungsdiagrammen

Zu den Chl-Kataboliten wurden Fragmentierungsdiagramme erstellt. Dazu werden die Intensitäten der einzelnen beobachteten Fragmentierungen im Massenspektrometer (aufgenommen wurde im CID Modus) zur jeweiligen aufgewendeten, normalisierten Kollisionsenergie (in %) (NKE) aufgenommen.

Auf der Abszisse des erhaltenen Diagramms befindet sich die NKE (von 0 bis 100 NKE, gemessen wurde in 5er Schritten) und auf der Ordinate die Intensität der jeweiligen Fragmentierung bezogen auf den höchsten Peak, der während der Aufnahme beobachtet wurde (ebenfalls in Prozent).

Die erhaltenen Kurven wurden mit einem Savitzky-Golay Filter [15] geglättet (Programmcode Anhang) und werden im folgenden als Fragmentierungsdiagramme bezeichnet. Ein Nachteil bei der Behandlung mit diesem Filter ist, dass in manchen Fällen die Intensitäten der Fragmentierungen bei einer NKE von null nicht gleich null sind. Es wird im folgenden angenommen, dass dies dennoch so ist.

Mit den Fragmentierungsdiagrammen wird versucht, herauszufinden, ob bestimmte Abspaltungen der Kataboliten charakteristische Muster aufweisen. Dieses Wissen könnte für eine zukünftige Strukturaufklärung sowie für die wünschenswerte Schnellidentifikation von Chl-Katalyse mittels MS Leafspray von Relevanz sein. Ebenso wird eine Verbesserung von MS Leafspray erhofft.

5 Experimente MS-Leafspray

5.1 Gerätebeschreibung Massenspektrometer

(Beschreibung Massenspektrometer)

5.2 Versuchsaufbau

Abbildung 5.1 beschreibt schematisch den Versuchsaufbau.

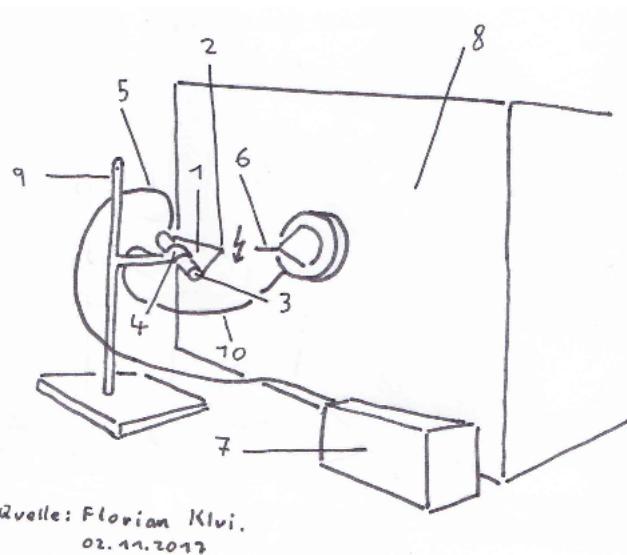


Abbildung 5.1: Leafspray Versuchsaufbau: 1) Filterpapierdreick, 2) Spitze des Dreiecks, 3) Blattmaterial, von Filterpapier umschlossen, 4) Kupferklemme, 5) Kapillare für LM, 6) Einlass des Massenspektrometers (mit der markanten Spitze zwecks Verdeutlichung etwas übertrieben dargestellt), 7) Syringe Pump - kontrolliert den LM-Fluss durch 5), 8) DESI Massenspektrometer, 9) Stativ, 10) Kabel, mit 4) verbunden - zwischen 4) und 6) liegt eine Spannung an (3-6kV - durch Blitz zwischen 2) und 6) symbolisiert)

5 Experimente MS-Leafspray

Das zu analysierende Blatt wurde zugeschnitten und in Filterpapier eingerollt. Das Filterpapierdreieck wurde in einer Kupferklemme eingespannt (Kapitel 5.3). Die Kupferklemme wurde mit einem Kabel (10), das an einem DESI-Massenspektrometer (8) angeschlossen war, verbunden. Zwischen der Kupferklemme (4) und dem Massenspektrometer wurde eine Spannung von 3-6kV angelegt. Da das Filterpapier mit LM benetzt ist und eine Verbindung der Flüssigkeit zur Kupferklemme besteht, kommt es zu einer durch die Spannung ausgelösten Bewegung der im LM gelösten Ionen, die nun in das Massenspektrometer hineinfliegen. Der Abstand zwischen Filterpapier (2) und Einlass des Massenspektrometers (6) betrug ungefähr 0.5cm und ist damit der Flugstrecke der Ionen in natürlicher Umgebung gleichzusetzen.



Abbildung 5.2: (a) Einlass des Massenspektrometers mit Kapillare (5), Kupferklemme (4) und Filterpapier mit Blattmaterial (1) und (3), (b) Detailansicht

In Abbildung 5.2 wird gezeigt, wie diese Anordnung umgesetzt wurde. Zu sehen sind die Kupferklemme mit dem eingespannten Filterpapier und dem darin enthaltenen Blatt, die LM-Kapillare, die Einlassöffnung des Massenspektrometers und der Abstand von Filterpapierdreicksspitze zum Massenspektrometer. Es gilt zu beachten, dass das Filterpapier in einem gewissen Winkel eingespannt wurde (Abbildung 5.2b), um zu verhindern, dass das LM nicht abfließt, was bei einer waagrechten Anordnung in Form einer *Sackbildung* des LM auftreten kann.

5.3 Versuchsdurchführung

Frische, senescente Brokkoliblätter und Filterpapier wurden mit Rasierklinge und Schere wie in Abbildung 5.3a ersichtlich zugeschnitten. Anschließend wurde das Brokkoliblatt auf das Filterpapier gelegt und dieses bis zur Basis des Dreiecks eingerollt.

Diese Art der Vorbereitung zeigte sich als besonders effektiv, da mit ihr höhere Intensitäten der Signale im Massenspektrometer erreicht werden konnten, wie wenn nur das Blatt zu einem Dreieck zugeschnitten und in dieser Form vor das Massenspektrometer gehalten wird. Grund dafür ist vermutlich, dass das LM mehr Zeit hat, die Chlorophyllkataboliten aus dem Blatt heraus zu lösen und dass mehr Blattmaterial vorhanden ist. Außerdem behält das Filterpapier länger seine Steifigkeit wie ein Brokkoliblatt, weswegen längere Analysen mit konstanterem Signal möglich sind.

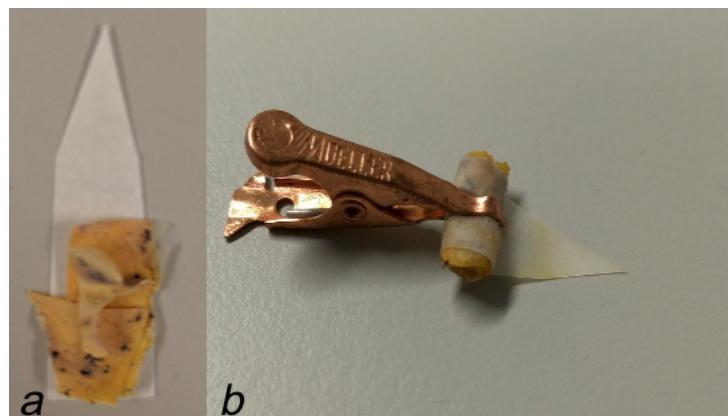


Abbildung 5.3: MS Leaf spray Blattvorbereitung: (a) zugeschnittenes Filterpapierdreieck, mit frischen, seneszenten Brokkoliblättern, (b) eingerolltes *Päckchen*, in Kuperklemme eingespannt

Das erhaltene *Päckchen* wurde durch eine Kupferklemme (Abbildung 5.3b) ca. 0.5cm vor die Kapillare des Massenspektrometers gehalten (Abbildung 5.2b). Um ein konstantes Signal zu erhalten versorgte eine Kapillare, die wie in Abbildung 5.2a befestigt war, das *Päckchen* mit einem konstanten LM-Fluss (als LM wurden Methanol (MeOH) sowie Acetonitril verwendet). Die Flussrate des LM betrug zu Beginn $12\mu\text{L min}^{-1}$, um das Blatt schneller zu befeuchten und wurde ab dem Erhalt des ersten Signals auf $5\mu\text{L min}^{-1}$ zurückgefahren. Es zeigte sich, dass bei dieser Flussrate das Signal bei annähernd gleichbleibend hoher Intensität am längsten bleibt. Der Spraystrom betrug zwischen xx und xx μA . Diese Geräteeinstellungen sowie Aufarbeitungsmethoden ermöglichen das Messen

5 Experimente MS-Leafspray

der Fragmentierungsdiagramme, da hierfür eine längere Analysezeit vonnöten ist. Das erste Signal konnte nach ca. einer Minute nach dem Einschalten der Spannung gemessen werden und erlaubte sinnvolle Messungen bis zu 25min.

(Platz für Beschreibung der Einstellungen des Gerätes)

Aufgenommen wurden die Massenspektren im Bereich von 300 m/z bis 1000 m/z, um Massenspektren zu bekommen, die nicht so stark von anderen Ionenarten gestört werden. Gemessen wurde im positiven Ionenmodus, wobei zwischendurch in den negativen Ionenmodus geschaltet wurde, wenn die Intensität des Signals im positiven Ionenmodus abnahm. Das Wechseln des Modus konnte die gewünschte Intensität wieder erhöhen. Es wurde somit ein ähnliches Verhalten der Intensitäten im Zeitverlauf beobachtet wie in [13] bereits beschrieben, wobei hier das Umschalten in den negativen Ionenmodus nicht explizit erwähnt wird, um das Problem der abnehmenden Intensitäten im positiven Ionenmodus zu beheben.

5.4 Chl-Kataboliten des Brokkoliblattes mithilfe von MS-Leafspray identifiziert

Im Folgenden werden die Chlorophyllkataboliten beschrieben, die sich durch MS-Leafspray identifizieren ließen. Die Strukturvorschläge wurden durch ein hochauflösende Massenspektrometer überprüft (Kapitel 6.5 und 7). Sie beruhen auf den exakten Molekülmassen und den daraus errechneten möglichen Summenformeln. Eine exakte Strukturaufklärung müsste mit ¹H-NMR durchgeführt werden.

Fragmentierungsdiagramme wurden wie in Kapitel 4.5 beschrieben erstellt.

5.4.1 Bo-NCC-1

Bei diesem Kataboliten handelt es sich vermutlich um denselben, wie er auch in der Brokkolifrucht gefunden wurde, weswegen er die Bezeichnung Bo-NCC-1 erhält. [16] Gefunden wurde die protonierte Verbindung bei m/z = 793 [M+H]⁺ und das Kaliumsalz bei m/z = 831 [M+K]⁺ (Abbildung 5.4). Aufgrund der geringen Intensitäten der protonierten Verbindung war es nicht möglich, ein

5 Experimente MS-Leafspray

verwertbares Massenspektrum dieser aufzunehmen.

Der Katabolit bei $m/z = 831 [M+K]^+$ zeigte Abspaltungen von H_2O bei $m/z = 813 [M - H_2O + K]^+$, von CO_2 bei $m/z = 787 [M - CO_2 + K]^+$ und eine Folge von Abspaltungen bei $m/z = 311 [M - (Ring A, Zucker, Ring D, CO_2) + K]^+$, bei der Ring A mit einem Zucker, Ring D sowie CO_2 abgespalten wird (siehe Kapitel, Katabolit 619, hochauflösende Massenspektrometrie). Die Abspaltungen bei $m/z = 798 [M - (noch Aufklärungsbedarf (nAb.) + K]^+$, $m/z = 586 [M - (nAb.) + K]^+$ und $m/z = 551 [M - (nAb.) + K]^+$ können nicht eindeutig zugeordnet werden, da hierzu weitere experimentelle Daten und vor allem die exakten Molekülmassen vonnöten sind.

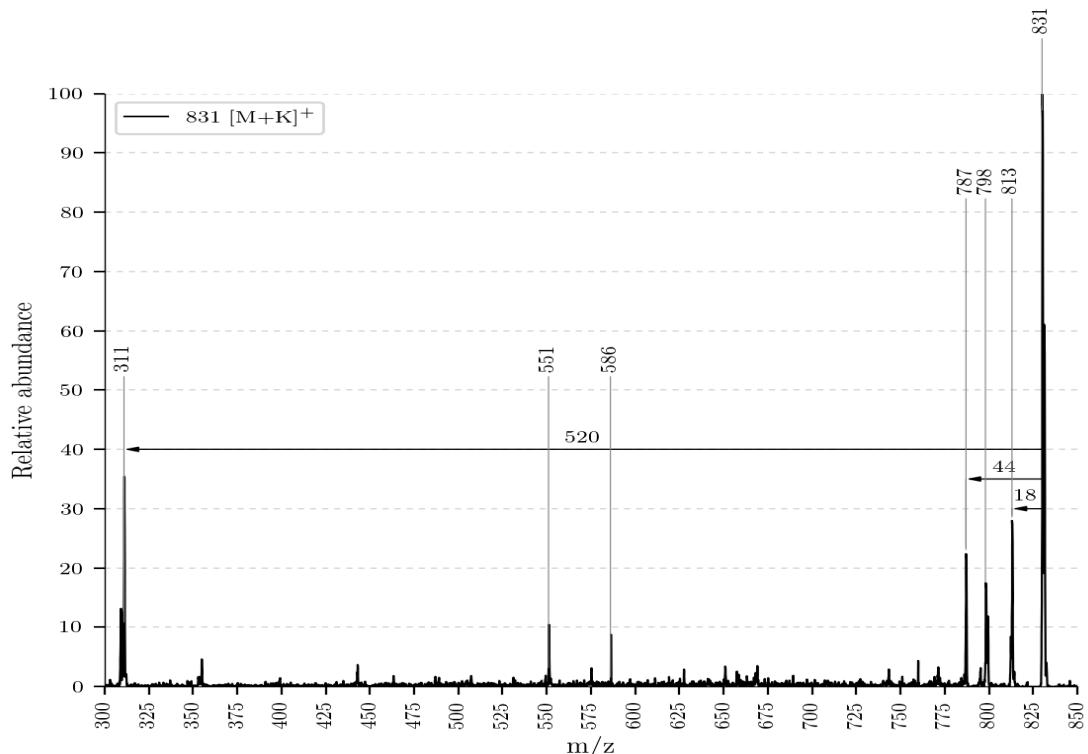


Abbildung 5.4: ESI-MS von Bo-NCC-1 mit $m/z = 831 [M+K]^+$

Das Fragment bei $m/z = 798 [M - (MeOH?) + K]^+$ ist insofern interessant, da es sich hierbei um eine Abspaltung von MeOH (-32 Da) handeln könnte (es wird angenommen, dass die Abweichung um eins durch Ungenauigkeiten des Massenspektrometers zustandekommt), was aber nicht mit der Struktur des Bo-NCC-1 (siehe Abbildung 5.5a) vereinbar wäre. Aufgrund ihrer Fragwürdigkeit

5 Experimente MS-Leafspray

wird auf diese Abspaltung in den weiteren Ausführungen nicht näher eingegangen.

Wie aus dem Fragmentierungsdiagramm (Abbildung 5.5b) ersichtlich, erfolgt die Abspaltung von H_2O bei einer niedrigeren NKE wie jene von CO_2 und verschwindet bei höheren Energien, wohingegen die Abspaltung von CO_2 erhalten bleibt. Die Abspaltung von H_2O erreicht ein lokales Maximum bei einer NKE von 10. Die Abspaltung von CO_2 erreicht ein lokales Maximum bei 30 NKE.

Aufgrund der CO_2 Abspaltung wird an Position 8² eine Carbonsäuregruppe vermutet (wie in [17] gezeigt), die über einen Mechanismus wie unter anderem (u.a.) in Abbildung 7.5a vorgeschlagen, abgespalten wird. Die relativ große Molekülmasse weist zudem auf einen Zucker an Position 32 hin. Die Summenformel des Bo-NCC-1 konnte über die exakte Molekülmasse mit einem hochauflösenden Massenspektrometer bestimmt werden (Kapitel 7.2.5).

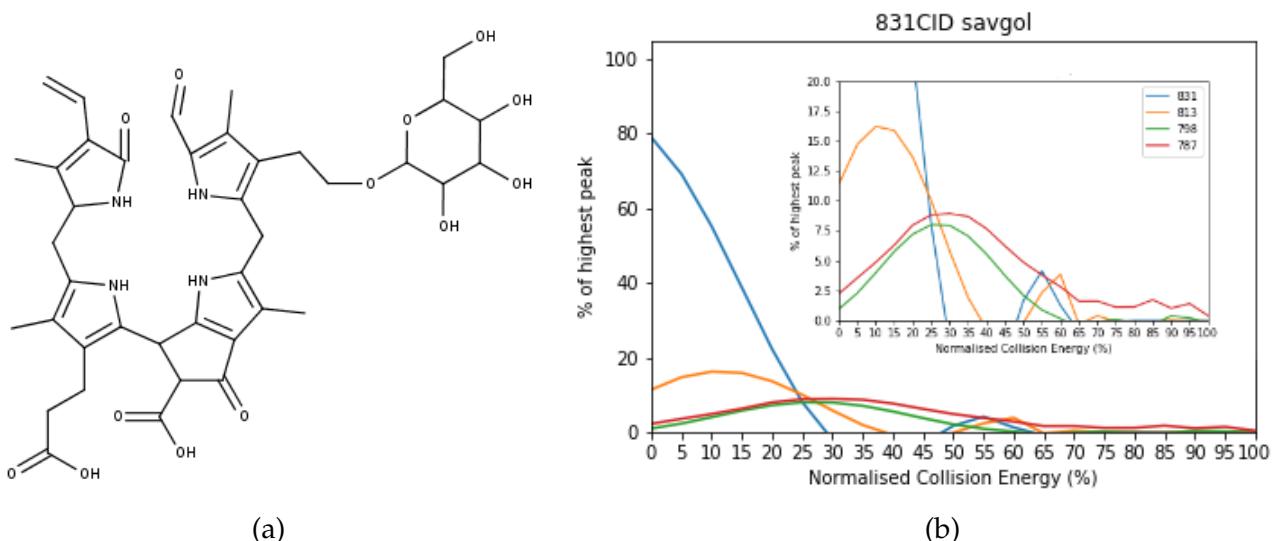


Abbildung 5.5: (a) Strukturvorschlag des Bo-NCC-1 mit Summenformel $\text{C}_{40}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_{13}$, (b) Fragmentierungsdiagramm von Bo-NCC-1 (blau = 831 [$\text{M}+\text{K}^+$], orange = 813 [$\text{M}-\text{H}_2\text{O} + \text{K}^+$], grün = 798 [$\text{M} - (\text{MeOH} - \text{nAb.}) + \text{K}^+$], rot = 787 [$\text{M} - \text{CO}_2 + \text{K}^+$])

5.4.2 Bo-NCC-3

Beim Bo-NCC-3 handelt es sich um einen Chl-Katabolit, der bisher nicht in der Brokkolifrukt identifiziert wurde, weswegen er als dritter [16], in der

5 Experimente MS-Leafspray

Brokkolipflanze gefundener Katabolit den Index 3 erhält. Analysiert wurde das Kaliumsalz mit $m/z = 685 [M+K]^+$.

Es wurden zwei charakteristische Abspaltungen von H_2O bei $m/z = 667 [M - H_2O + K]^+$ sowie von CO_2 bei $m/z = 641 [M - CO_2 + K]^+$ beobachtet. Bei den Abspaltungen bei $m/z = 429 [M - (nAb.) + K]^+$, $m/z = 561 [M - (nAb.) + K]^+$, $m/z = 605 [M - (nAb.) + K]^+$ und $m/z = 652 [M - (nAb.) + K]^+$ ist nicht eindeutig geklärt, welche Fragmente hierbei entstanden sind. Für das Fragment bei $m/z = 652 [M - (MeOH?) + K]^+$ gilt dasselbe wie bei der Abspaltung von $m/z = 798 [M - (MeOH?) + K]^+$ von Bo-NCC-1 (Kapitel 5.4.1). Um diese Fragmente aufzuklären müssten weitere Experimente des Kaliumsalzes mit einem hochauflösenden Massenspektrometer durchgeführt werden. Fragmentierungen der protonierten Verbindung konnten mit einem hochauflösenden Massenspektrometer gemessen werden (Kapitel 7.2.4).

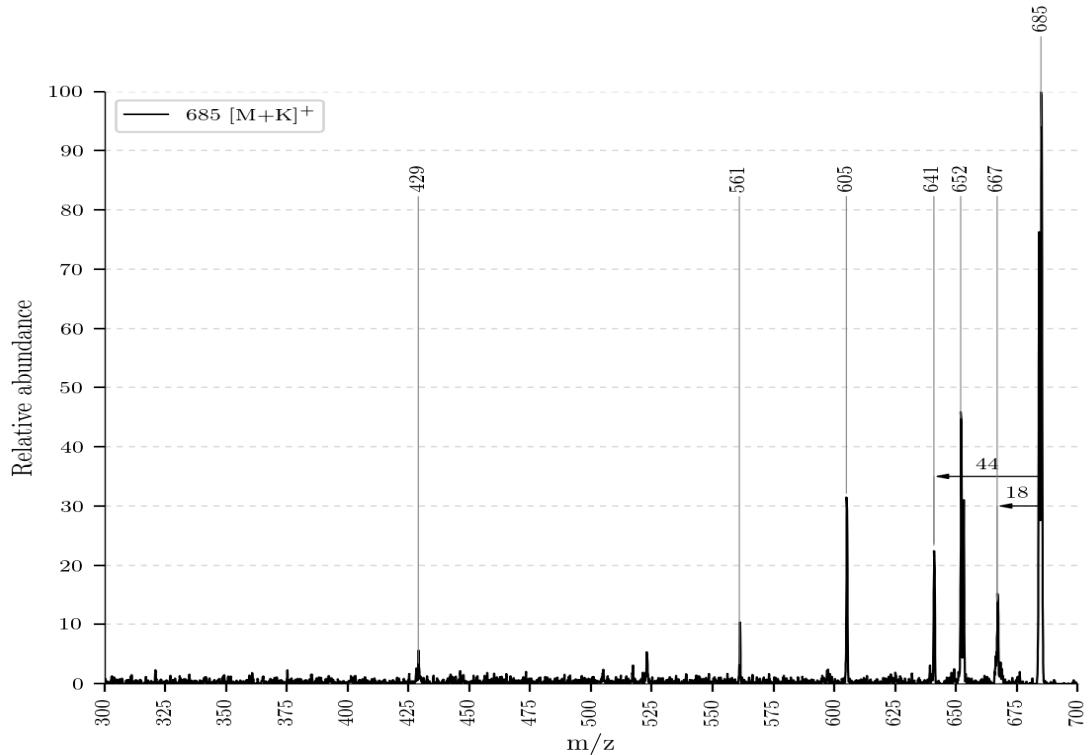


Abbildung 5.6: ESI-MS von Bo-NCC-3 mit $m/z = 685 [M+K]^+$

Das Fragmentierungsdiagramm zeigt, dass die Abspaltung von H_2O bei einer niedrigeren NKE erfolgt, wie jene von CO_2 , da sie ihre höchste Intensität zuvor

5 Experimente MS-Leafspray

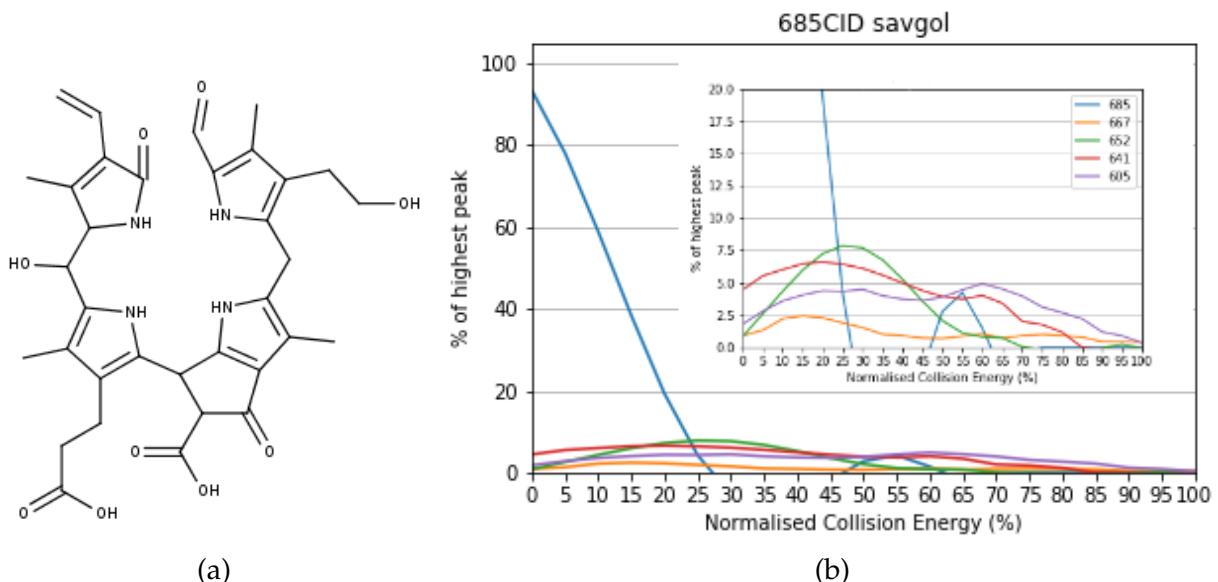


Abbildung 5.7: (a) Strukturvorschlag von Bo-NCC-3 mit Summenformel $C_{34}H_{38}N_4O_9$, (b) Fragmentierungsdiagramm von Bo-NCC-3 (blau = $685 [M+K]^+$, orange = $667 [M - H_2O + K]^+$, grün = $652 [M - (\text{MeOH?}) + K]^+$, rot = $641 [M - CO_2 + K]^+$, violett = $605 [M - (\text{nAb.}) + K]^+$)

erreicht (bei einer NKE von 15 - H₂O im Vergleich zu 20 - CO₂).

Im Vergleich zum Bo-NCC-1 zeigt der Graph ein lokales Maximum der H₂O Abspaltung bei höheren Energien (beim Bo-NCC-3 bei 15 NKE wohingegen beim Bo-NCC-1 bereits bei 10 NKE). Das lokale Maximum der CO₂ Abspaltung verschiebt sich von 30 NKE beim Bo-NCC-1 auf 20 NKE beim Bo-NCC-3. Das lokale Maximum der potentiellen Abspaltung von MeOH würde sich von 25 NKE beim Bo-NCC-1 auf 30 NKE beim Bo-NCC-3 verschieben (Abbildungen 5.5b und 5.7b).

Wie beim Bo-NCC-1 weist die CO₂ Abspaltung auf eine freie Carbonsäure an Position 8² hin. Aufgrund der durch die Summenformel erhaltene Sauerstoffanzahl wird angenommen, dass sich an Position 15 eine Hydroxygruppe befindet (Abbildung 5.7a). Es wird vermutet, dass es sich dabei um eine Vorstufe zu einem YCC handelt. [Referenz]

5.4.3 Bo-DNCC

Es wird vermutet, dass der Bo-DNCC des Brokkoliblattes ident ist mit dem Bo-DNCC der Brokkolifrukt. [16] Beobachtet wurden zwei Pseudo-Molekulare Ionen. Eines mit $m/z = 619 [M+H]^+$ (Abbildung 5.8) und mit $m/z = 657 [M+K]^+$ (Abbildung 5.9).

Der Katabolit bei $m/z = 619 [M+H]^+$ zeigte Abspaltungen von H_2O bei $m/z = 601 [M - H_2O + H]^+$, von CO_2 bei $m/z = 575 [M - H_2O + H]^+$, von Ring D (zusammen mit einer Abspaltung von CO_2) bei $m/z = 452 [M - (Ring D, CO_2) + H]^+$ und von Ring A, Ring D und CO_2 bei $m/z = 311 [M - (Ring A, Ring D, CO_2) + H]^+$ (Abbildung 5.8 - Zuordnung Kapitel 7.2.2).

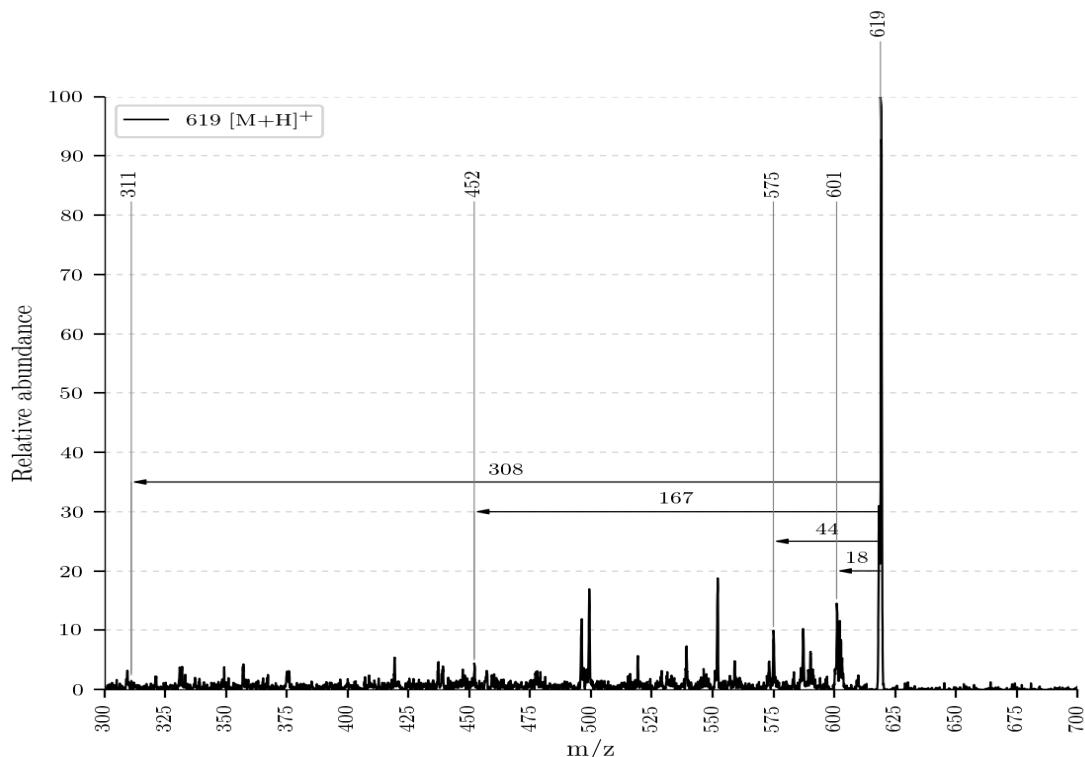


Abbildung 5.8: ESI-MS von Bo-DNCC bei $m/z = 619 [M+H]^+$

Das Kaliumsalz des Bo-DNCC mit $m/z = 657 [M+K]^+$ zeigte eindeutige Abspaltungen von H_2O bei $m/z = 639 [M - H_2O + K]^+$ und von CO_2 bei $m/z = 613 [M - CO_2 + K]^+$ (Abbildung 5.9). Die Abspaltungen bei $m/z = 375 [M - (nAb.) + K]^+$ und $m/z = 577 [M - (nAb.) + K]^+$ können nicht eindeutig zugeordnet werden.

5 Experimente MS-Leafspray

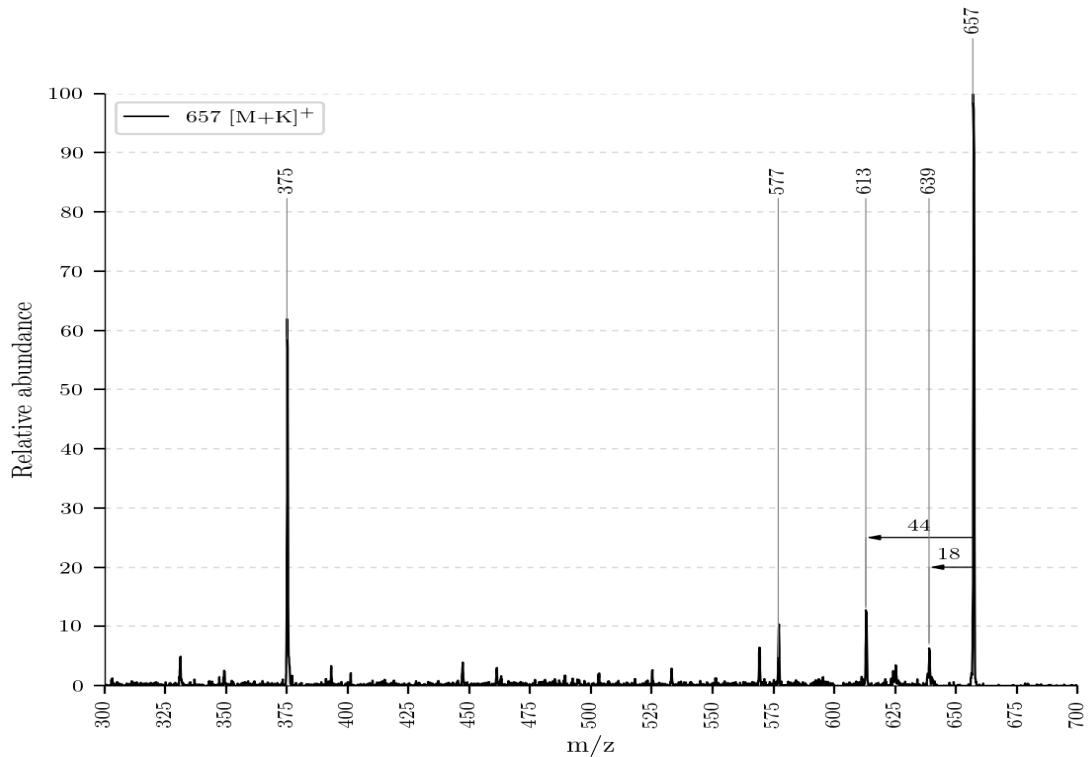


Abbildung 5.9: ESI-MS von Bo-DNCC bei $m/z = 657$ $[M+K]^+$

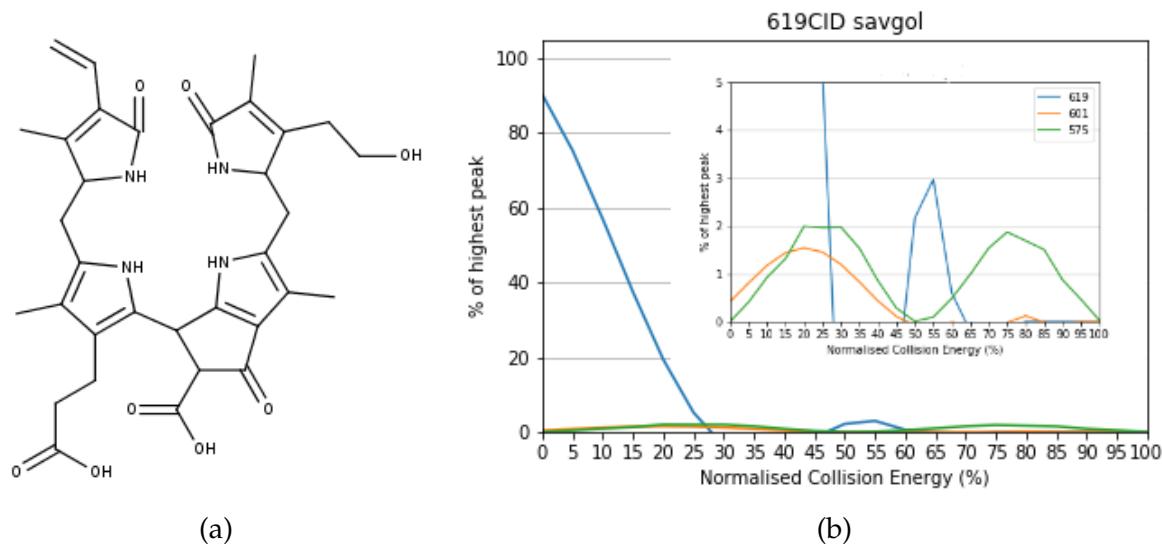


Abbildung 5.10: (a) Strukturvorschlag von Bo-DNCC mit Summenformel $C_{33}H_{38}N_4O_8$, (b) Fragmentierungsdiagramm von Bo-DNCC (blau = 619 $[M+H]^+$, orange = 601 $[M - H_2O + H]^+$, grün = 575 $[M - H_2O + H]^+$)

5 Experimente MS-Leafspray

Die H_2O Abspaltung beim Bo-DNCC erreicht ein lokales Maximum bei 20 NKE und erfolgt damit im Vergleich zum Bo-NCC-1 und Bo-NCC-3 bei der höchsten NKE. Die Abspaltung von CO_2 weist beim Bo-DNCC zwei lokale Maxima, bei 25 NKE und 75 NKE auf. Das lokale Maximum an der Stelle 75 NKE ist dabei etwas weniger intensiv ausgeprägt wie jenes an der Stelle 25 NKE. Das erste lokale Maximum befindet sich damit an der gleichen Stelle wie bei Bo-NCC-1 und Bo-NCC-3 (Abbildungen 5.5b und 5.7b). Das zweite Maximum kann noch nicht geklärt werden, da es bei den anderen bisher analysierten Kataboliten nicht beobachtet wurde.

5.5 Identifikation der Reaktionsprodukte

Für den Nachweis des Stattfindens der Reaktion der Chl-Kataboliten mit Essigsäureanhydrid, wurde der gleiche Versuchsaufbau wie in Kapitel 5.2 beschrieben, verwendet. Das Anhydrid als Reaktionsprodukt konnte durch Verwendung von Acetonitril als LM isoliert werden. Um eine bessere Identifikation der Reaktionsprodukte zu erreichen, wurden Fragmentierungsdiagramme erstellt.

5.5.1 Reaktionsprodukt von Bo-DNCC

Das Reaktionsprodukt von Bo-DNCC konnte mit $m/z = 699 [\text{M}+\text{K}]^+$ bestimmt werden (Strukturvorschlag - Abbildung 5.11). Identifiziert wurde es über die charakteristische Abspaltung von Essigsäure ($M = 60 \text{ Da}$) bei $m/z = 639 [\text{M} - \text{CH}_3\text{COOH} + \text{K}]^+$. Ein Mechanismus für die Abspaltung wird in Abbildung 5.14a vorgeschlagen. Dieser Mechanismus ähnelt dem Mechanismus der Abspaltung von MeOH (z.B. beobachtbar bei einem Cj-NCC), wie in [17] publiziert.

Es wurden Abspaltungen von H_2O bei $m/z = 681 [\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{K}]^+$, von CH_3COOH bei $m/z = 639 [\text{M} - \text{CH}_3\text{COOH} + \text{K}]^+$ und von Ring A und Ring D mit CO_2 bei $m/z = 311 [\text{M} - (\text{Ring A, Ring D, CO}_2) + \text{K}]^+$ beobachtet.

Zur Identifikation der Reaktionsprodukte wurde die CH_3COOH Abspaltung aufgrund ihrer Dominanz und Eindeutigkeit herangezogen (u.a. Abbildung 5.13b). Das Fragment bei $m/z = 599 [\text{M} - (\text{nAb.}) + \text{K}]^+$ ist interessant, da eine Abspaltung von 100 Da bei anderen Kataboliten ebenfalls beobachtet wurde. Die anderen Fragmentierungen in Abbildung 5.12 konnten nicht zugeordnet werden.

5 Experimente MS-Leafspray

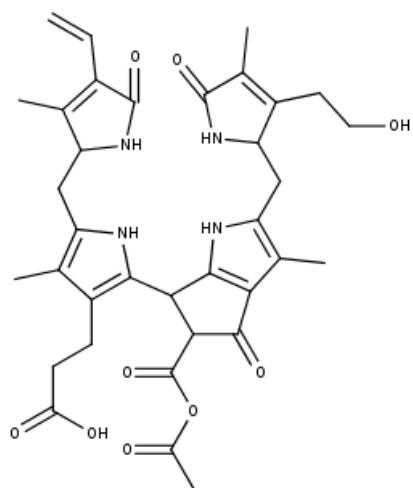


Abbildung 5.11: Strukturvorschlag des Reaktionsproduktes mit Summenformel $C_{33}H_{40}N_4O_9$

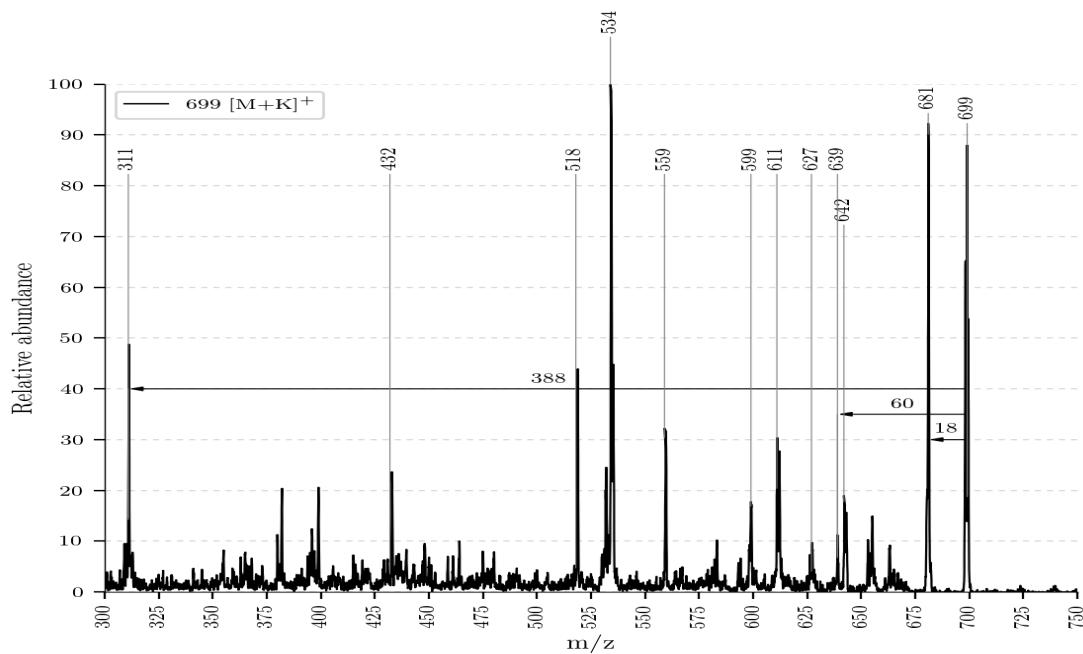


Abbildung 5.12: ESI-MS Spektrum des Reaktionsproduktes mit $m/z = 699$ $[M+K]^+$

5 Experimente MS-Leafspray

Diskussion der Abspaltung bei $m/z = 599$ [$M - (nAb.) + K^+$]: Die Abspaltung von 100 Da bei $m/z = 599$ [$M - (nAb.) + K^+$] erreicht im Fragmentierungsdiagramm lokale Maxima bei 15 NKE und 30 NKE. Lokale Minima befinden sich bei 17 NKE und 40 NKE, an jenen Stellen, an der die Abspaltung von CH_3COOH lokale Maxima aufweist (Abbildung 5.13b). Daraus könnte man Informationen über den Mechanismus der Abspaltung ableiten. Man könnte sagen, dass die Abspaltung von 100 Da einhergeht mit jener von CH_3COOH und dass sie mechanistisch miteinander verknüpft sind, also, dass bevor einer Abspaltung des Fragments mit 100 Da CH_3COOH abgespalten werden muss. Es ließe sich damit erklären, warum bei einem Maximum der einen Abspaltung die andere Abspaltung ein Minimum aufweist.

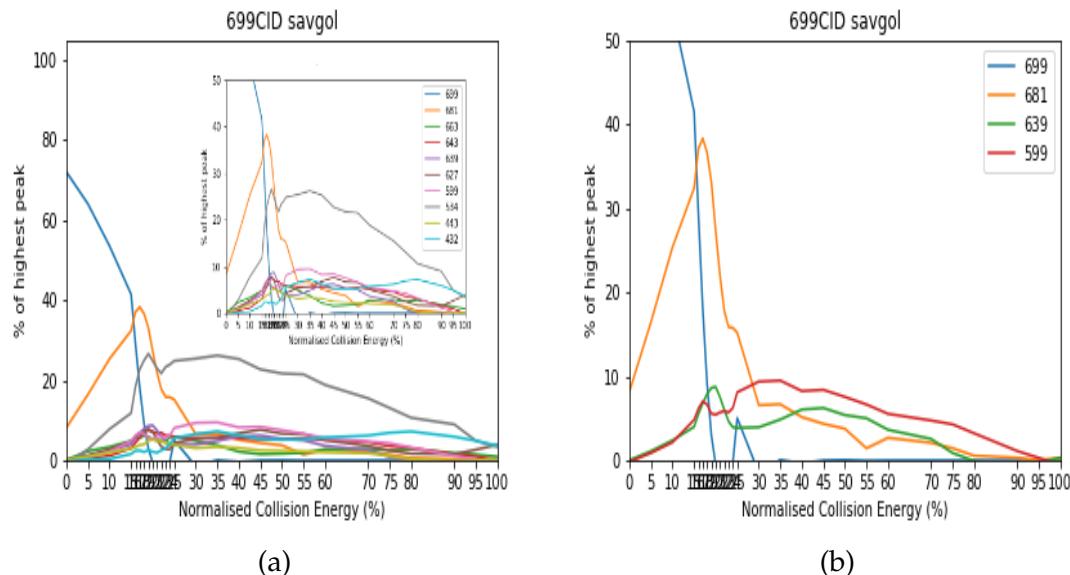


Abbildung 5.13: (a) Fragmentierungsdiagramm des Bo-NCC-3 mit allen beobachteten Abspaltungen (blau = 699 [$M+\text{K}^+$], orange = 681 [$M - \text{H}_2\text{O} + \text{K}^+$], grün = 663 [$M - (2\text{xH}_2\text{O}) + \text{K}^+$], rot = 643 [$M - (\text{nAb.}) + \text{K}^+$], violett = 639 [$M - \text{CH}_3\text{COOH} + \text{K}^+$], braun = 627 [$M - (\text{nAb.}) + \text{K}^+$], pink = 599 [$M - (\text{nAb.}) + \text{K}^+$], grau = 534 [$M - (\text{nAb.}) + \text{K}^+$], hellgrün = 443 [$M - (\text{nAb.}) + \text{K}^+$], türkis = 432 [$M - (\text{nAb.}) + \text{K}^+$]), (b) Fragmentierungsdiagramm mit ausgewählten Abspaltungen (blau = 699 [$M+\text{K}^+$], orange = 681 [$M - \text{H}_2\text{O} + \text{K} - \text{H}_2\text{O}$], grün = 639 [$M - \text{CH}_3\text{COOH} + \text{K}$], rot = 599 [$M - (\text{nAb.}) + \text{K}^+$])

Im Fragmentierungsdiagramm erreicht die H_2O Abspaltung ein lokales Maximum bei 17 NKE. Die Abspaltung nimmt bis zu 30 NKE stark ab und bleibt bis zu 90 NKE erhalten. Im Vergleich zum Fragmentierungsdiagramm des nicht reagierten Bo-DNCC erfolgt die H_2O Abspaltung bei einer niedrigeren NKE

5 Experimente MS-Leafspray

und ist länger beobachtbar (vergleiche Abbildungen 5.10b und 5.13b). Es gilt zu bedenken, dass beim nicht reagierten Bo-DNCC das $[M+H]^+$ -Ion aufgenommen wurde, wohingegen man beim reagierten Bo-DNCC das $[M+K]^+$ -Ion analysierte. Der Unterschied im Verlauf der Kurven könnte somit auch durch diesen Umstand hervorgerufen werden.

Die Abspaltung von CH_3COOH besitzt lokale Maxima bei 20 NKE und 45 NKE. Das Maximum bei 45 NKE ist weniger intensiv. Die Intensität der Abspaltung nimmt dabei kontinuierlich bis zu einer von 80 NKE ab (Abbildung 5.13b). Ein lokales Minimum der Abspaltung befindet sich zwischen 23 NKE und 30 NKE.

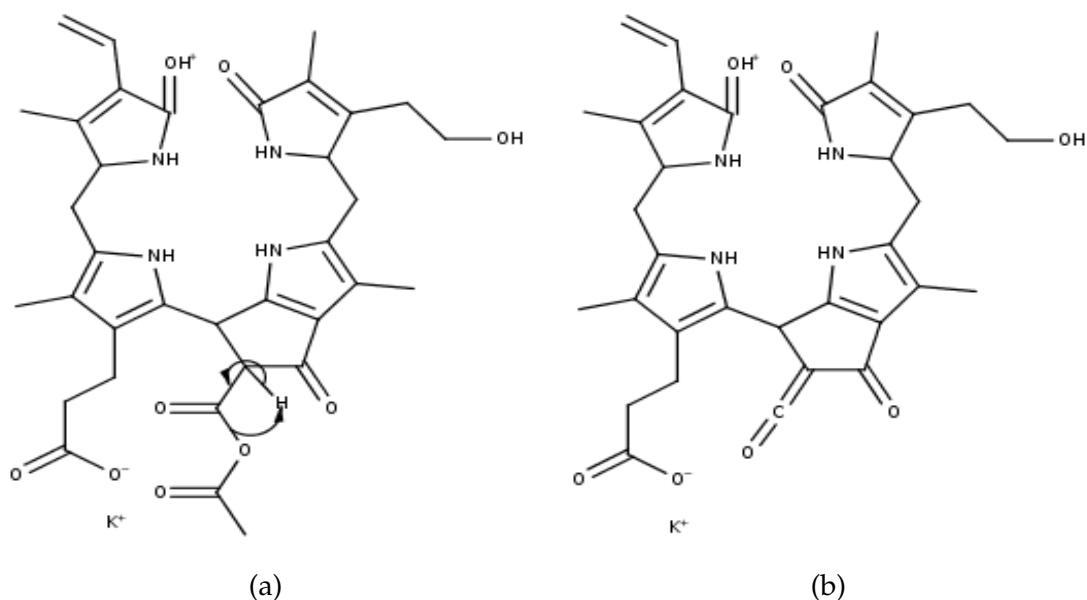


Abbildung 5.14: (a) vorgeschlagener Mechanismus der Essigsäureabspaltung und (b) das Produkt, wobei CH_3COOH als stabiles Neutralteilchen abgespalten wird

5.5.2 Reaktionsprodukt von Bo-NCC-3

Die Molekülmasse des Reaktionsproduktes von Bo-NCC-3 konnte mit $m/z = 727 [M+K]^+$ bestimmt werden. Eine Abspaltung von Essigsäure wurde bei $m/z = 667 [M+K]^+$ beobachtet. Weiters wurde eine Abspaltung von H_2O bei $m/z = 709 [M - H_2O + K]^+$ beobachtet. Bei der Abspaltung bei $m/z = 627 [M - (nAb.) + K]^+$ könnte es sich um die gleiche Abspaltung wie beim Reaktionsprodukt des Bo-DNCC handeln, da auch ein Fragment mit $M = 100$ Da abgespalten wird. Die anderen Abspaltungen (Abbildung 5.15) konnten nicht eindeutig zugeordnet werden.

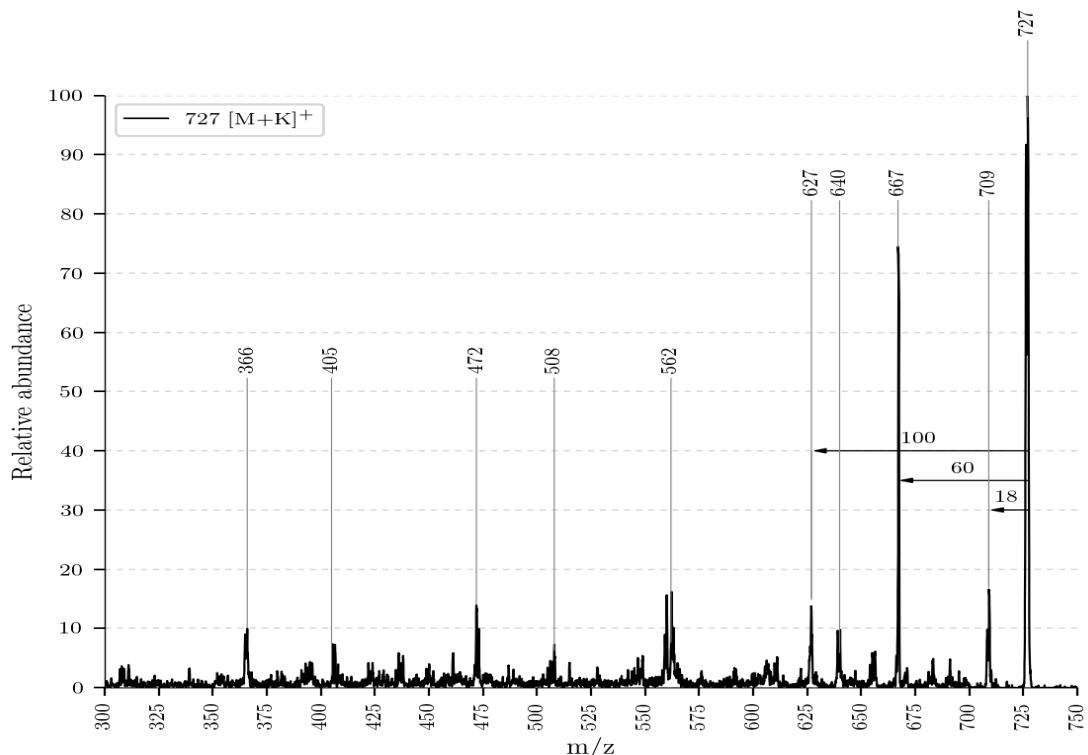


Abbildung 5.15: ESI-MS Spektrum des Reaktionsproduktes bei $m/z = 727 [M+K]^+$

Es wurde beobachtet, dass die Abspaltung von H_2O bei niedrigeren Energien erfolgt wie jene von CH_3COOH . Im Vergleich zum Fragmentierungsdiagramm des Reaktionsproduktes des Bo-DNCC (Abbildung 5.13a) kann als Charakteristikum der CH_3COOH Abspaltung ein lokales Maximum bei 45 NKE gedeutet werden (Abbildung 5.13b und Abbildung 5.17). Die Abspaltung von H_2O weist bei beiden Kataboliten ein lokales Maximum bei 15 NKE auf und besitzt einen ähnlichen Kurvenverlauf (Abbildung 5.13b und Abbildung 5.17). Dies lässt

5 Experimente MS-Leafspray

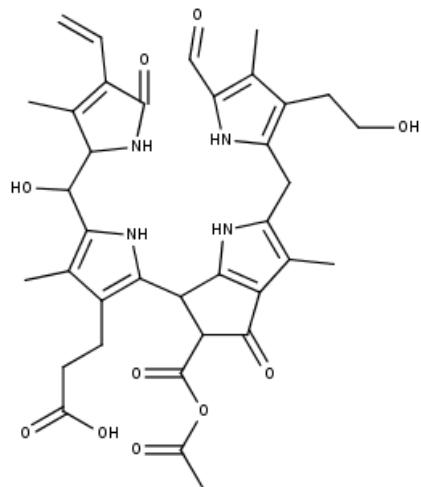


Abbildung 5.16: Strukturvorschlag des Reaktionsproduktes mit Summenformel $C_{36}H_{40}N_4O_{10}$

darauf schließen, dass es sich bei dieser H_2O -Abspaltung um eine Abspaltung auf ein und derselben Position handelt. Als Position der Abspaltung wird die Hydroxygruppe an Position 32 des Chl-Kataboliten vorgeschlagen.

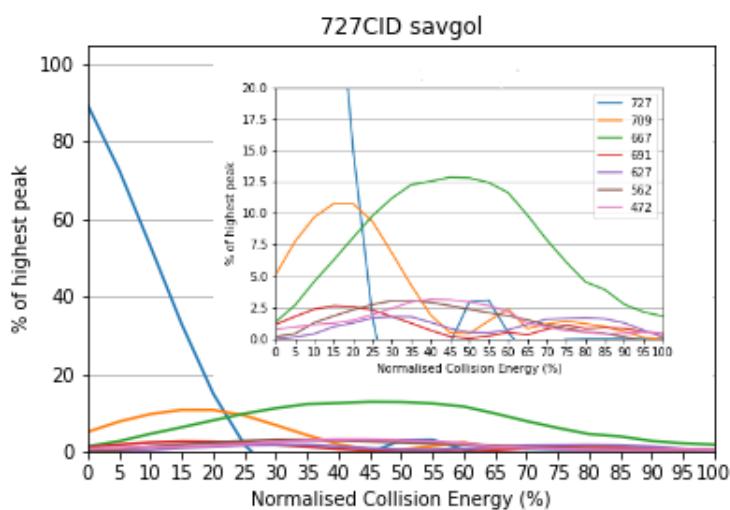


Abbildung 5.17: Fragmentierungsdiagramm des Reaktionsproduktes (blau = 727 [$M+K$]⁺, orange = 709 [$M - H_2O + K$]⁺, grün = 667 [$M - CH_3COOH + K$]⁺, rot = 691 [$M - ? + K$]⁺, violett = 627 [$M - ? + K$]⁺, braun = 562 [$M - ? + K$]⁺, pink = 472 [$M - ? + K$]⁺)

5.5.3 Reaktionsprodukt von Bo-NCC-1

Erwartungsgemäß konnte das Reaktionsprodukt des Bo-NCC-1 bei $m/z = 873 [M+K]^+$ gefunden werden. Es zeigt Abspaltungen von H_2O bei $m/z = 855 [M - H_2O + K]^+$, von Essigsäure bei $m/z = 813 [M - CH_3COOH + K]^+$ und von CH_3COOH , Ring A, Ring D, zweimal MeOH und CO bei $m/z = 309 [M - (Ring A, Ring D, 2mal MeOH, CO) + K]^+$ (diesselbe Abspaltung wurde beim Reaktionsprodukt $m/z = 661 [M+H]^+$ beobachtet - Kapitel 7.3.5). Beim Fragment $m/z = 441 [M - (Ring D, 2mal MeOH, H_2O) + K]^+$ könnte es sich um eine Abspaltung von Ring D, zweimal MeOH und H_2O handeln.

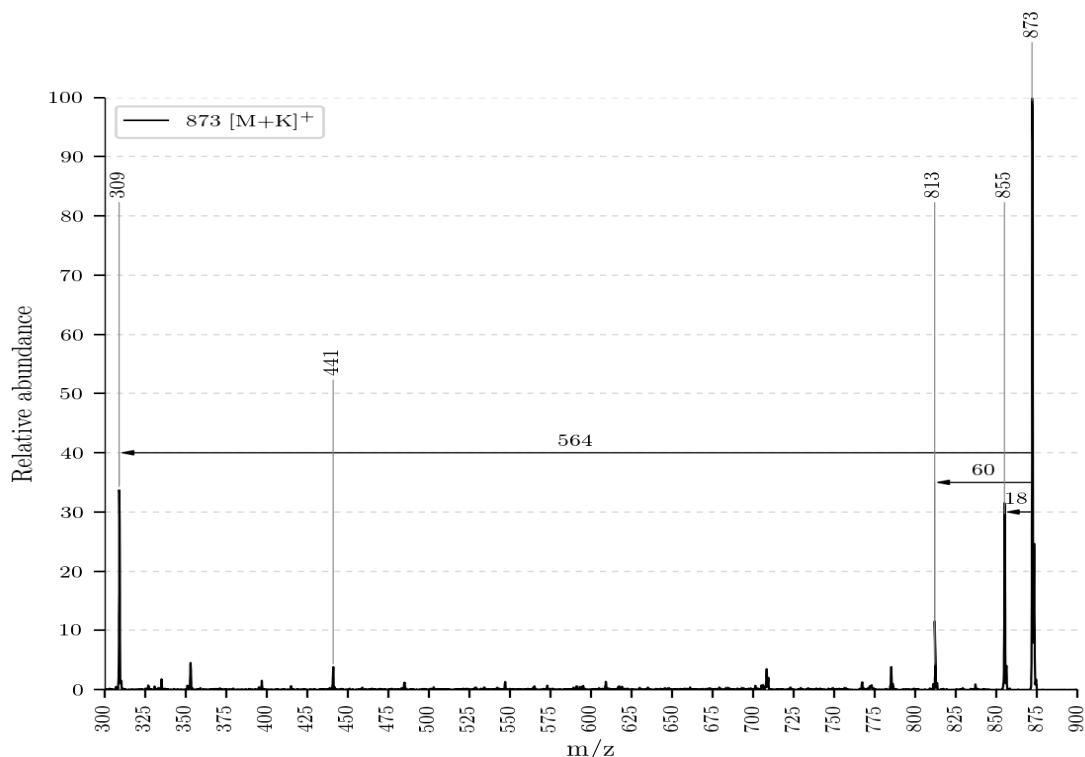


Abbildung 5.18: ESI-MS des Reaktionsproduktes bei $m/z = 873 [M+K]^+$

Im Fragmentierungsdiagramm sieht man, dass sich das lokale Maximum der Essigsäureabspaltung hin zu niedrigeren Energien verschoben hat. Es befindet sich nun bei 35 NKE. Auch die H_2O Abspaltung verschiebt sich zu niedrigeren Energien und besitzt ein lokales Maximum bei 10 NKE. Im Vergleich zum Bo-DNCC und Bo-NCC-3 nahmen diese Werte um 10 bzw. 5 Einheiten an NKE ab. Dieser Zusammenhang wurde in zwei voneinander unabhängigen Experimenten beobachtet (Abbildung 5.20a und Abbildung 5.20b). Die Ursache

5 Experimente MS-Leafspray

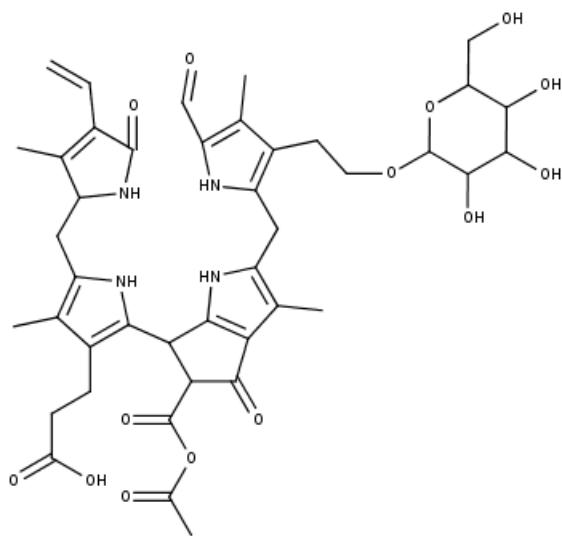


Abbildung 5.19: Strukturvorschlag des Reaktionsproduktes mit Summenformel $C_{42}H_{50}N_4O_{14}$

könnte beim Zuckerring liegen, der die Elektronenverteilung vermutlich so beeinflusst, dass die Abspaltungen bereits bei niedrigeren Energien erfolgen.
(Einfügen von 3D Bildern, die die sterischen Zusammenhänge vorschlagen).

5 Experimente MS-Leafspray

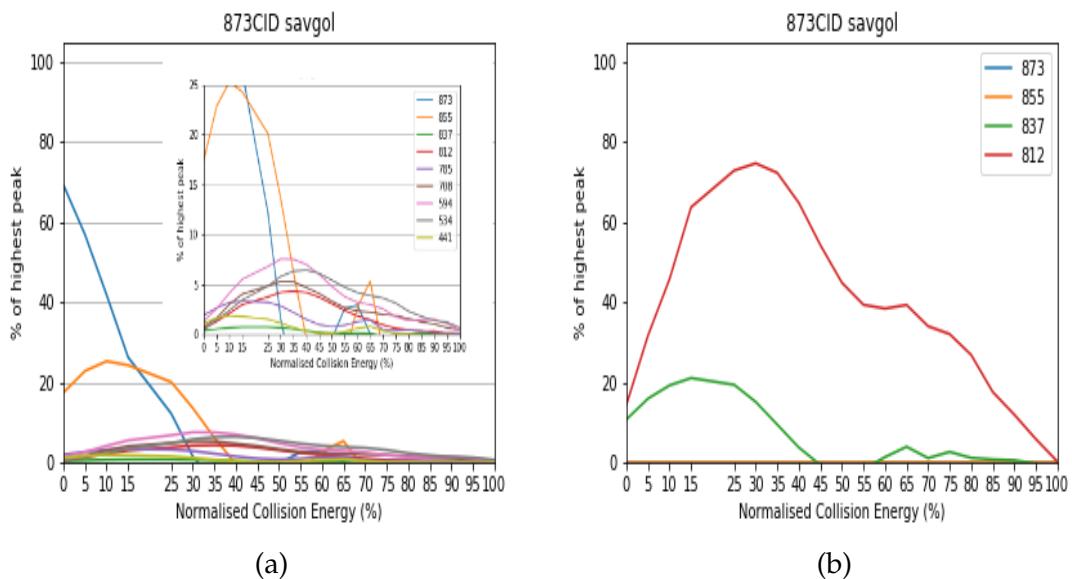


Abbildung 5.20: Fragmentierungsdiagramm des Reaktionsproduktes: (a) Experiment am 13.09.2017 (11:00) - (blau = 873, orange = 855, grün = 837, rot = 812, violett = 765, braun = 708, pink = 594, grau = 534, hellgrün = 441), (b) Experiment am 13.09.2017 (09:45) - schlechter gelungen, weswegen die Abspaltungen nicht so schön wie in Experiment (a) zu sehen sind (blau = 873, orange = 855, grün = 837, rot = 812)

6 Experimente LC-MS

Die Analyse mit LC-MS diente dazu, die Ergebnisse von MS Leafspray zu überprüfen. In Kombination mit einem hochauflösenden Massenspektrometer wurde zudem die Ermittlung der Strukturen der Chl-Kataboliten erleichtert. Weiters konnten mit MS Leafspray nicht gefundene Chl-Kataboliten identifiziert werden.

6.1 HPLC-Gradient sowie Gerätebeschreibung

6.2 Aufarbeitung der Probe

Um ein Blattextrakt zu erhalten wurde ein Brokkoliblatt auf eine Größe von ca. 2 cm² mit einer Rasierklinge zugeschnitten und mithilfe von Mörser und Pistill aufgerieben und mit 2-5 mL MeOH vermischt (Anm.: um möglichst hohe Intensitäten in der HPLC zu erhalten wurde versucht, eine möglichst hohe Konzentration des Blattextraktes zu erreichen). Die Lösung wurde für 2min. bei 3000 rpm abzentrifugiert und anschließend mit Wasser im Verhältnis 20:80 verdünnt und nach kurzem Homogenisieren für 7min. (3000 rpm) abzentrifugiert. Von der erhaltenen Lösung wurden 50 µL in die 20 µL Schleife der HPLC eingespritzt.

Beim Einspritzen wurde versucht, die ungelösten Bestandteile im Blattextrakt nicht mitzunehmen, da diese die HPLC mit der Zeit verunreinigen könnten. Eine Filterung des Blattextraktes erwies sich als Intensitätsverringern.

Bevor die Blätter wie oben beschrieben aufgerieben wurden, wurden sie in einem Exikator getrocknet (ca. einen halben bis ganzen Tag). Die Blätter, an denen die Reaktion (Kapitel 4.4) stattgefunden hatte, wurden nach dem Stoppen der Reaktion der gleichen Aufarbeitungsmethode unterzogen.

6.3 Theoretische Auswertung der Online-UV/Vis Spektren

Mithilfe einer HPLC kann bestimmt werden, ob es sich bei einem bestimmten Chl-Katabolit um einen NCC, DNCC oder YCC handelt. Man erhält zu jedem Peak im HPLC Chromatogramm ein Online-UV/Vis Spektren, das von einem an die HPLC angeschlossenen UV/Vis Detektor gemessen wurde (Kapitel 6.2).

Ein NCC kann über eine charakteristische Bande bei 315 nm eindeutig bestimmt werden. Die Bande geht dabei auf das konjugierte System von Ring A zurück. Ein DNCC besitzt aufgrund seiner decarboxylierten Carbonylgruppe dieses konjugierte System nicht mehr, weswegen die Bande bei 315 nm verschwindet, der sonstige für einen NCC typische Kurvenverlauf jedoch erhalten bleibt. Bei einem YCC führt die Reduktion der Verbindung zwischen Ring C und D (Einführung einer Doppelbindung zwischen Position 15 und 16) zu einer Erweiterung des konjugierten Systems (nun bestehend aus Ring C und D) und damit zu einer Bande bei 415 nm.

Alle folgenden UV/Vis Spektren und HPLC Chromatogramme wurden bei 254 nm detektiert.

6.4 Theoretische Auswertung der MS Spektren

Über das an die HPLC gekoppelte Massenspektrometer wird zu jedem Zeitpunkt des HPLC Chromatogramms ein Massenspektrum aufgenommen und ein dementsprechendes Chromatogramm erzeugt. Die hervorgehobenen Peaks in den folgenden Chromatogrammen zeigen an, zu welchem Zeitpunkt welcher Katabolit in Bezug auf seine Molekülmasse gefunden wurde. Da das Massenspektrometer erst nach 10min. an die HPLC gekoppelt wurde, muss man, um die entsprechende Retentionszeit im HPLC Chromatogramm zu erhalten, zu jedem Zeitpunkt im Chromatogramm des Massenspektrometers ca. 11min. dazuzählen (1min. steht für den Weg von HPLC zu MS).

Man kann somit den über Online-UV/Vis Spektren identifizierten Chl-Kataboliten (Kapitel 6.3) eine Molekülmasse zuordnen. Im Rahmen meiner Vorwissenschaftlichen Arbeit erwies es sich jedoch als schwierig, die Resultate der HPLC mit

6 Experimente LC-MS

denen des Massenspektrometers im Rahmen eines LC-MS Versuches in Einklang zu bringen (die Retentionszeiten der über HPLC identifizierten Chl-Kataboliten stimmten mit jenen des Massenspektrometers oft nicht überein). Da die Verwendung von Daten aus der HPLC zur Analyse der Chl-Kataboliten nicht das primäre Ziel meiner Arbeit war, spielt dies auch keine wesentliche Rolle. Aus Gründen der wissenschaftlichen Vollständigkeit, werden die Daten der HPLC trotzdem präsentiert. Ebenso wird versucht, die Probleme, die sich aus den Daten ergeben, darzustellen.

Der Typ des Chl-Kataboliten wurde somit, sofern möglich durch ein Online-UV/Vis Spektrum bestimmt und mit der vom Massenspektrometer erhaltenen Summenformel und den sich daraus ergebenden strukturellen Möglichkeiten überprüft. War die Zuordnung anhand UV/Vis Spektren aufgrund von Unklarheiten nicht möglich, wurde zur Strukturbestimmung auf die Daten des Massenspektrometers zurückgegriffen.

6.5 Chl-Kataboliten des Brokkoliblattes mithilfe von LC-MS identifiziert

Das HPLC Chromatogramm in Abbildung 6.1 zeigt, welche der Kataboliten mithilfe ihrer UV/Vis Spektren eindeutig identifiziert werden konnten. Es dürfte sich dabei ob ihrer etwas höheren Intensitäten um die Hauptkataboliten des Brokkoliblattes handeln. Dies müsste jedoch in gezielten quantitativen Messungen weiter und genauer untersucht werden.

Mit dem Massenspektrometer wurden die in Tabelle 6.1 aufgelisteten Phyllo-biline identifiziert. In dieser Tabelle werden neben den Summenformeln auch die exakten Molekülmassen (in Da), die Art des Chl-Katalolit (NCC, DNCC, YCC, DYCC) und die Retentionszeit in der HPLC (soweit eindeutig feststellbar) angegeben.

Eine so große Anzahl an Chl-Kataboliten wie in Tabelle 6.1 vorzufinden wäre ungewöhnlich. Bei einer Betrachtung der Summenformeln und exakten Molekülmassen fällt jedoch auf, dass sich einige Chl-Katalolit um genau ein C-Atom und zwei H-Atome unterscheiden (entspricht einem Massenunterschied von 14 Da).

6 Experimente LC-MS

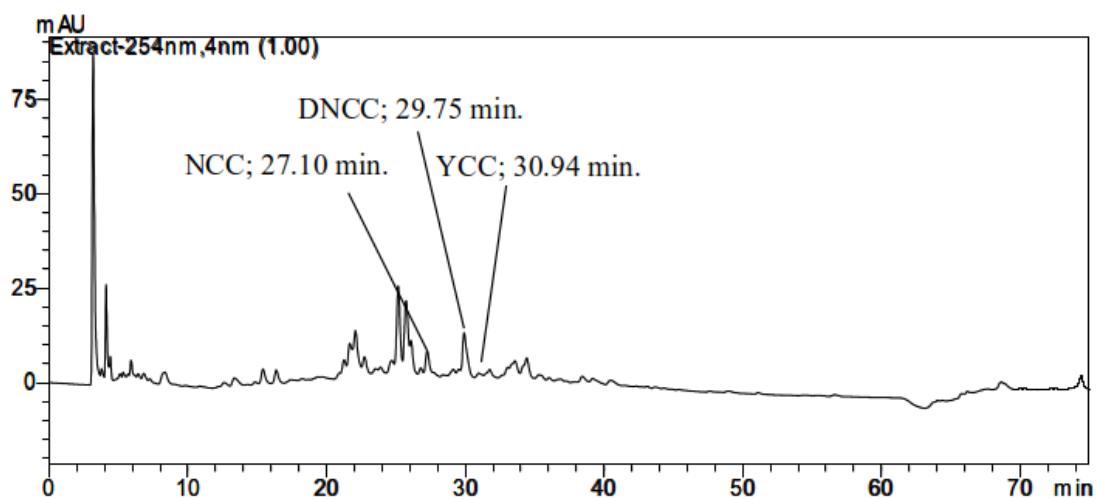


Abbildung 6.1: HPLC Chromatogramm - die hervorgehobenen Peaks entsprechen den Retentionszeiten und der Art der Chl-Kataboliten, die über ein Online-UV/Vis Spektrum bestimmt wurden; gefunden wurden ein NCC bei 27.10min. (Abbildung 7.10a), ein DNCC bei 29.75min. (Abbildung 7.10b) und ein YCC bei 30.94min. (Abbildung 6.4c)

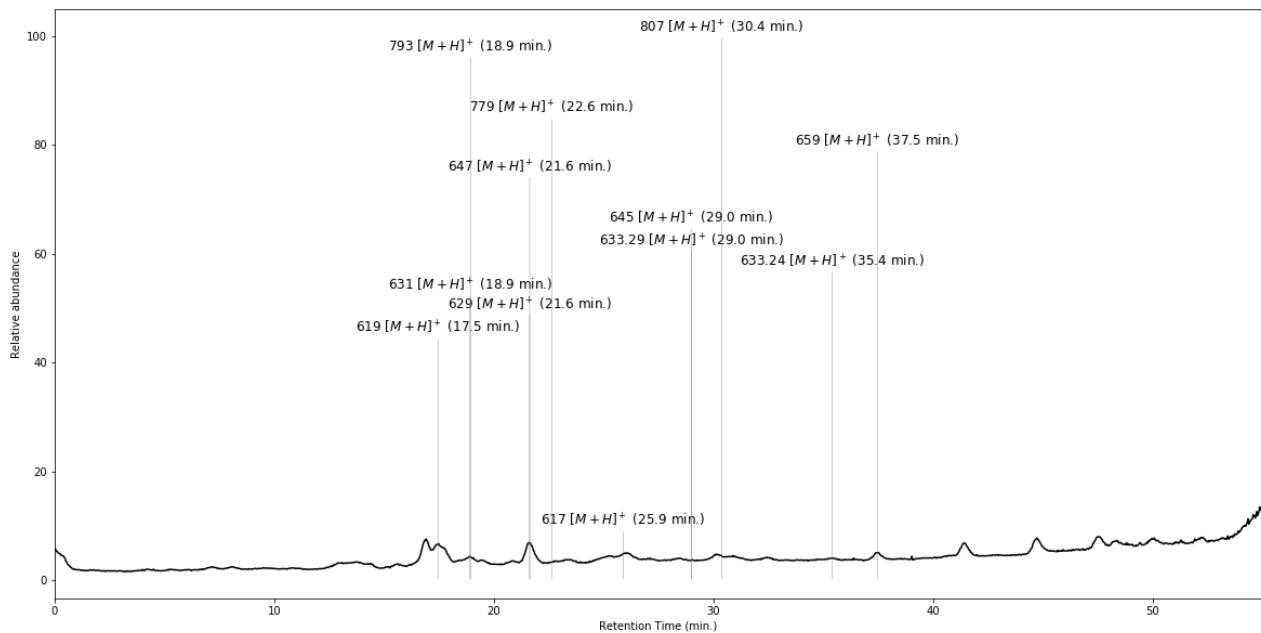


Abbildung 6.2: LC-MS Chromatogramm

6 Experimente LC-MS

Bezeichnung	Summenformel	M (in Da)	Typ	RT _{HPLC} (in min.)	H.
Bo-DYCC	C ₃₃ H ₃₇ O ₈ N ₄	617.2635	DYCC	30.94?	-
Bo-DNCC	C ₃₃ H ₃₉ O ₈ N ₄	619.2793	DNCC	26.72	-
•	C ₃₄ H ₃₇ O ₈ N ₄	629.2639	•	-	-
-	C ₃₄ H ₃₉ O ₈ N ₄	631.2795	DYCC	29.91, 30.94	Bo-DYCC
-	C ₃₄ H ₄₁ O ₈ N ₄	633.2955	DNCC	-	Bo-DNCC
•	C ₃₆ H ₃₃ O ₇ N ₄	633.2339	•	•	-
Bo-YCC	C ₃₄ H ₃₇ O ₉ N ₄	645.2593	YCC	-	-
Bo-NCC-3	C ₃₄ H ₃₉ O ₉ N ₄	647.2748	NCC	33.04	-
-	C ₃₅ H ₃₉ O ₉ N ₄	659.2741	YCC	-	Bo-YCC
Bo-DNCC-2	C ₃₉ H ₄₇ O ₁₃ N ₄	779.3181	DNCC	•	-
Bo-NCC-1	C ₄₀ H ₄₉ O ₁₃ N ₄	793.3336	NCC	29.91	-
-	C ₄₁ H ₅₁ O ₁₃ N ₄	807.3491	NCC	-	Bo-NCC-1

Tabelle 6.1: Übersicht über die gefundenen Chl-Kataboliten des Brokkoliblattes und ihren Methylestern, die sich aus der Reaktion der freien Carbonsäure mit MeOH ergeben (die Summenformeln und die exakten Molekülmassen beziehen sich auf die [M+H]⁺ Ionen)

Da alle identifizierten Chl-Katabolit eine freie Carbonsäuregruppe an Position 8² besitzen, wird angenommen, dass diese bei der Aufarbeitung der Probe mit MeOH (Kapitel 6.2) mit diesem reagieren und einen Methylester ausbilden. In der Spalte Herkunft (abgekürzt mit H.) der Tabelle 6.1 wird demnach festgehalten, von welchem Chl-Kataboliten die jeweilige Verbindung stammt. Es handelt sich dabei also um keine Chl-Kataboliten, sondern nur um deren Reaktionsprodukte mit MeOH. In der HPLC konnten sie jedoch nicht identifiziert werden.

Bei einer Retentionszeit von 27.10min. konnte über Online-UV/Vis ein NCC (Abbildung 7.10a) identifiziert werden, da er bei einer Wellenlänge von 315nm eine charakteristische Bande aufweist. Der von den Retentionszeiten dazugehörige Chl-Katabolit im Massenspektrum wäre der Bo-DNCC (mit einer Retentionszeit von 17.5min im Massenspektrometer - Abbildung 6.2). Bei diesem handelt es sich jedoch um einen DNCC. Es wurde versucht, das unlogische Ergebnis durch Überlagerungen mehrerer Chl-Katabolit zu erklären, was aber nicht möglich war (Abbildung 6.3). Es bleibt somit das Zustandekommen dieses UV/Vis Spektrums ungeklärt.

6 Experimente LC-MS

Bei einer Retentionszeit von 29.75min. konnte ein UV/Vis Spektrum eines DNCCs (Abbildung 7.10b) aufgenommen werden. Nach den Retentionszeiten im Massenspektrometer (Abbildung 6.2) kann diesem UV/Vis Spektrum der Chl-Katabolit Bo-NCC-1 zugeordnet werden. Auch der Methylester des Bo-YDNCC ist zu dieser Retentionszeit im Massenspektrometer vorzufinden und trägt damit vermutlich zur Entstehung des Signals bei, was die Verzerrungen bewirken könnte (Abbildung 6.3).

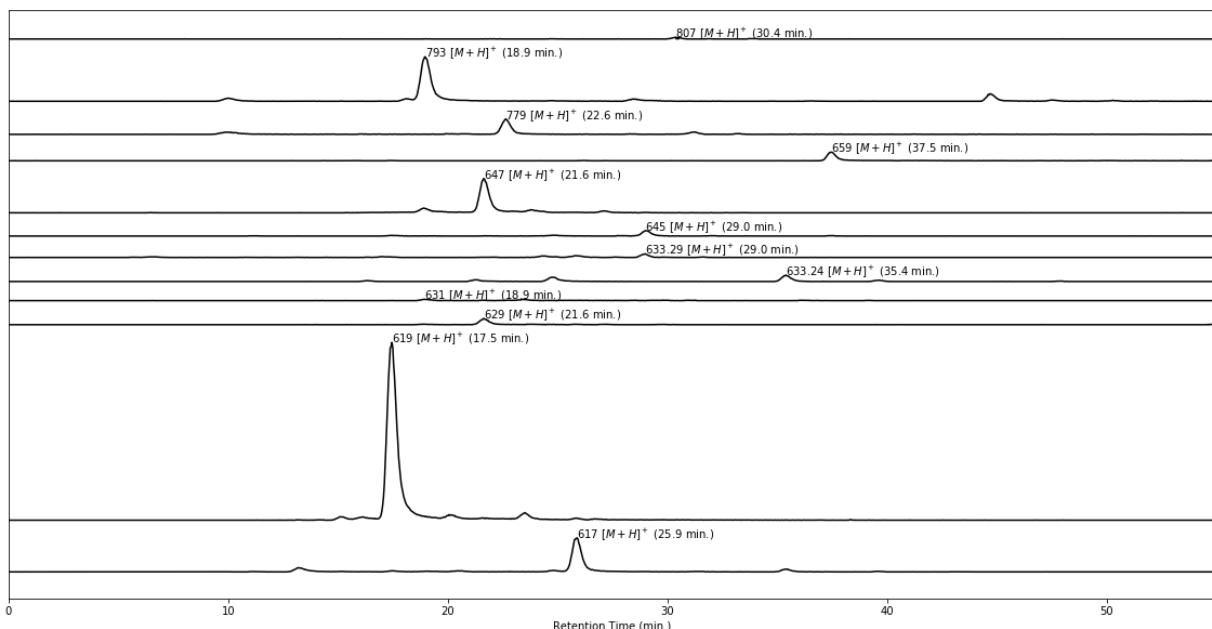


Abbildung 6.3: LC-MS Chromatogramm zur besseren Darstellung von Überlagerungen von Chlorophyllkataboliten, um diverse unlogische Schlüsse besser verstehen zu können

Bei einer Retentionszeit von 30.94min. ist das UV/Vis Spektrum charakteristisch für einen YCC (Abbildung 7.10b). Im Massenspektrometer wurde zu dieser Retentionszeit der Methylester des Bo-YDNCC gefunden (bei einer Retentionszeit von 18.9min). Auch hier lässt sich keine Verbindung finden, bei der die Retentionszeiten von HPLC und Massenspektrometer exakt zusammenpassen. Es könnte auch hier wieder zu einer Überlagerung kommen (vielleicht mit dem Bo-YDNCC). Diese Überlagerungen könnten durch Isomere der einzelnen Chl-Kataboliten bedingt sein.

6 Experimente LC-MS

Um das Zustandekommen der nicht identifizierbaren UV/Vis Spektren zu erklären wurden Diagramme wie in Abbildung 6.3 erstellt. Es handelt sich dabei um ein Chromatogramm jedes einzelnen im Massenspektrometer während eines LC-MS Laufes identifizierten Chl-Kataboliten. Die Intensitäten wurden auf den höchsten im Zeitraum vorkommenden Peak skaliert. Bei den gekennzeichneten Peaks handelt es sich um jene, bei denen die jeweilige Verbindung die höchste Intensität im Chromatogramm zeigte. Peaks etwaiger Stereoisomere werden nicht beachtet. Mithilfe dieser Abbildung sollten etwaige Überlagerungen ersichtlich werden.

6 Experimente LC-MS

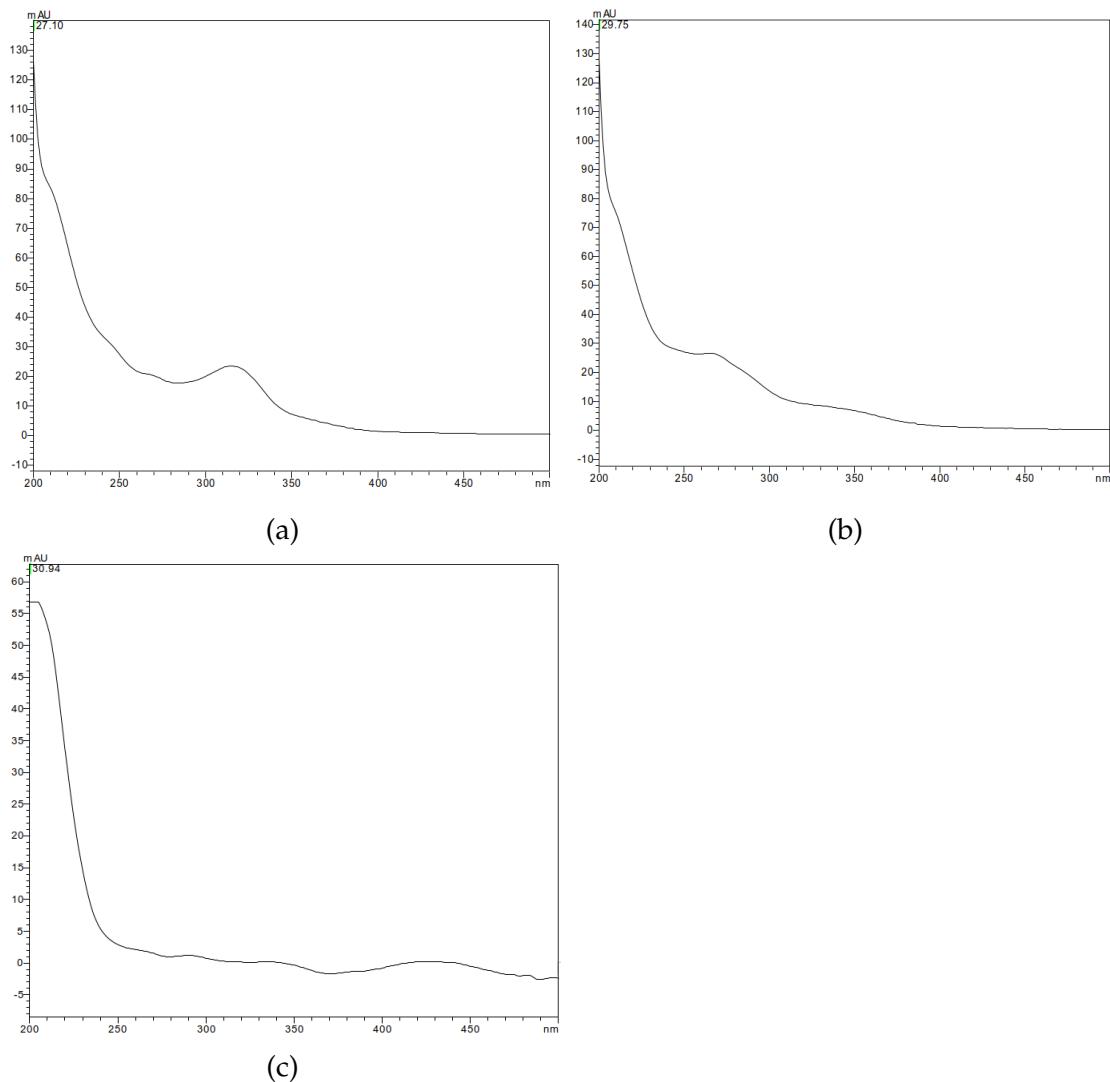


Abbildung 6.4: Online-UV/Vis Spektren: (a) charakteristisch für einen NCC - RT = 27.25min.,
(b) charakteristisch für einen DNCC - RT = 29.91min., (c) charakteristisch für
einen YCC - RT = 30.94min.

6.6 Identifikation der Reaktionsprodukte

Die Produkte der Reaktion mit Essigsäureanhydrid konnten ebenfalls mithilfe von LC-MS identifiziert werden. In Abbildung 6.5 sind die Reaktionsprodukte, die mittels Online-UV/Vis Spektren identifiziert wurden, dargestellt. Die dazugehörigen UV/Vis Spektren werden in Abbildungen 6.8a-e dargestellt. Es handelt sich dabei um die Hauptreaktionsprodukte, die in der HPLC dadurch charakterisiert sind, dass sich ihre Retentionszeiten nach hinten verschieben. Sie dürften somit apolarere Eigenschaften besitzen wie die Chl-Kataboliten, was vermutlich durch den Methylester bedingt ist. Über die Verschiebung der Peaks im HPLC Chromatogramm wird das Stattfinden der Reaktion auf einen Blick ersichtlich (vergleiche Abbildung 6.1 und Abbildung 6.5). Zudem konnten im Vergleich zu den HPLC Läufen ohne Reaktion mehr Verbindungen über Online-UV/Vis Spektren beobachtet und identifiziert werden, da es zu einer größeren Auftrennung kommt.

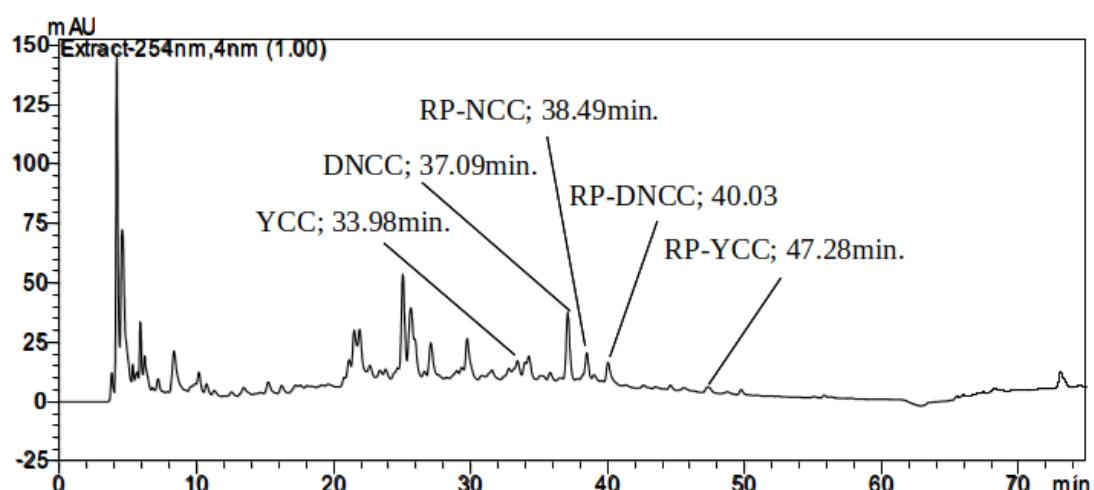


Abbildung 6.5: HPLC Chromatogramm, gefunden wurden Reaktionsprodukte mit den Eigenschaften eines NCCs (RT = 38.49min.), eines DNCCs (RT = 40.03min.), eines YCCs (RT = 47.28min.) und eines weiteren DNCCs (37.09min.); beim YCC bei RT = 33.98min. könnte es sich um einen weiteren Chl-Kataboliten handeln

Das Chromatogramm des Massenspektrometers des LC-MS Laufes (Abbildung 6.6) zeigt die Massen aller Chl-Kataboliten und die Zeitpunkte, zu denen sie jeweils eluieren. Durch die stattgefunden Reaktion sind dementsprechend mehr Signale vorhanden. Zu beachten ist, dass aufgrund der Aufarbeitung mit MeOH nicht ein Essigsäureanhydrid beobachtet wird, sondern der Methylester, der sich offensichtlich aufgrund der vermeintlich guten Abgangsgruppe CH_3COOH

6 Experimente LC-MS

schnell bildet (auch Kapitel 6.5 und 5.5).

Auffallend ist, dass manche Verbindungen in ihren Retentionszeiten verschoben worden sind. So eluiert Verbindung mit $m/z = 631 [M+H]^+$ nun bei 39.0min. im Vergleich zu 18.9min., Verbindung mit $m/z = 629 [M+H]^+$ bei 31.8min. im Vergleich zu 21.6min. und Verbindung mit $m/z = 645 [M+H]^+$ bei 34.5min. im Vergleich zu 29.0min. (vergleiche Abbildungen 6.6 und 6.2). Gründe für diese Verschiebungen müssten weiter untersucht werden bzw. müsste überprüft werden, ob es bei den Versuchen, aus denen einer zu Abbildung 6.2 führte, nicht einen Messfehler gab. Eine Überprüfung und erneute Durchführung der Messung im Rahmen meiner Vorwissenschaftlichen Arbeit führte zum selben Ergebnis (siehe Anhang).

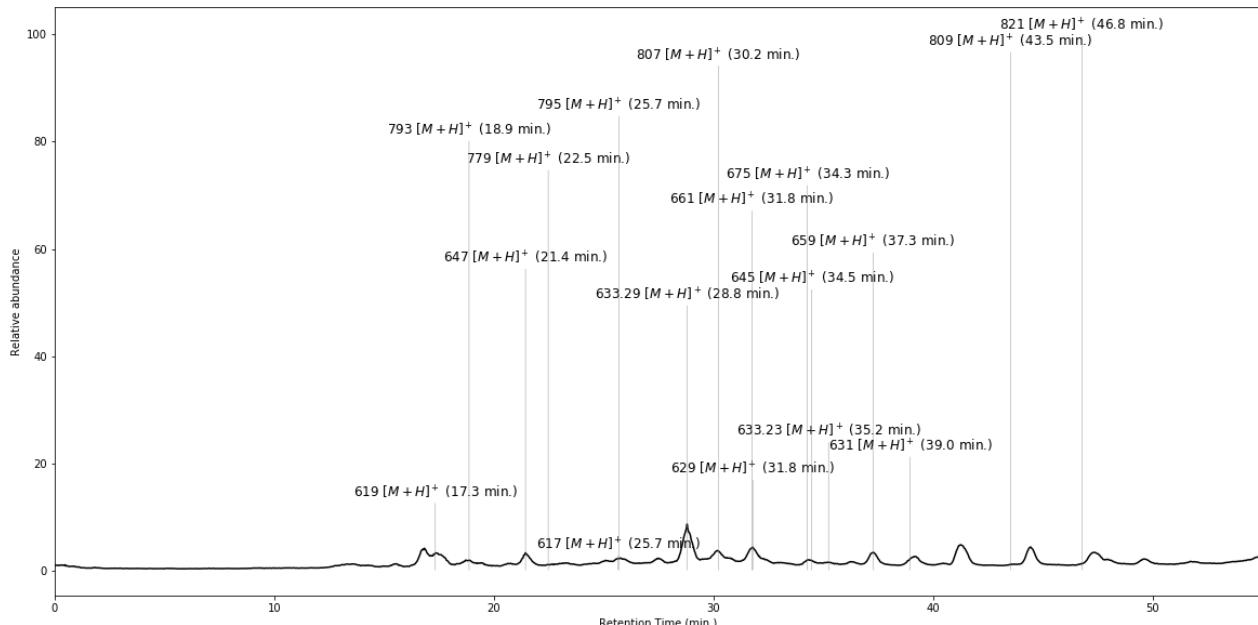


Abbildung 6.6: LC-MS Chromatogramm

In Tabelle 6.2 werden die Chl-Kataboliten dargestellt, die nach der Reaktion gefunden wurden. Dabei wurde neben dem erwarteten Reaktionsprodukt bei $m/z = 659.2741 [M+H]^+$ eine weitere Verbindung bei $m/z = 659.2348 [M+H?]^+$ entdeckt, jedoch mit einer anderen Summenformel. Wie dieses Signal zustandekommt bleibt ungeklärt. Da bei $m/z = 633 [M+H]^+$ ebenfalls zwei

6 Experimente LC-MS

Molekülmassen beobachtet wurden ($m/z = 633.2955$ und $m/z = 633.2339$), könnte es sich um ähnliche Charakteristiken handeln, die jedoch weiter untersucht werden müssten. Von einer anderen Verbindungsklasse ist aufgrund der passenden Summenformel mit entsprechender Doppelbindungsäquivalenz und dem Massendefekt nicht auszugehen!

In Abbildung 6.7 wird nur unter Verwendung von Massenspektrometerdaten ersichtlich, dass die Reaktion stattgefunden hat. Es wird angenommen, dass die Peakhöhen in direkt proportionaler Abhängigkeit mit der quantitativen Anzahl der jeweiligen Ionen steht.

Man sieht, dass die Intensität des Bo-DNCC zurückgegangen ist, wohingegen jene von $m/z = 633 [M+H]^+$, dem Reaktionsprodukt viel größer ist. Ähnliche Verschiebungen sind von Bo-NCC-1 auf $m/z = 807 [M+H]^+$ und $821 [M+H]^+$ sowie von Bo-NCC-3 auf $m/z = 661 [M+H]^+$ und $675 [M+H]^+$ sichtbar. Die anderen Intensitätsverschiebungen sind nicht so groß, dass sie in diesem Kontext interpretierbar wären. Sie sind aber trotzdem vorhanden.

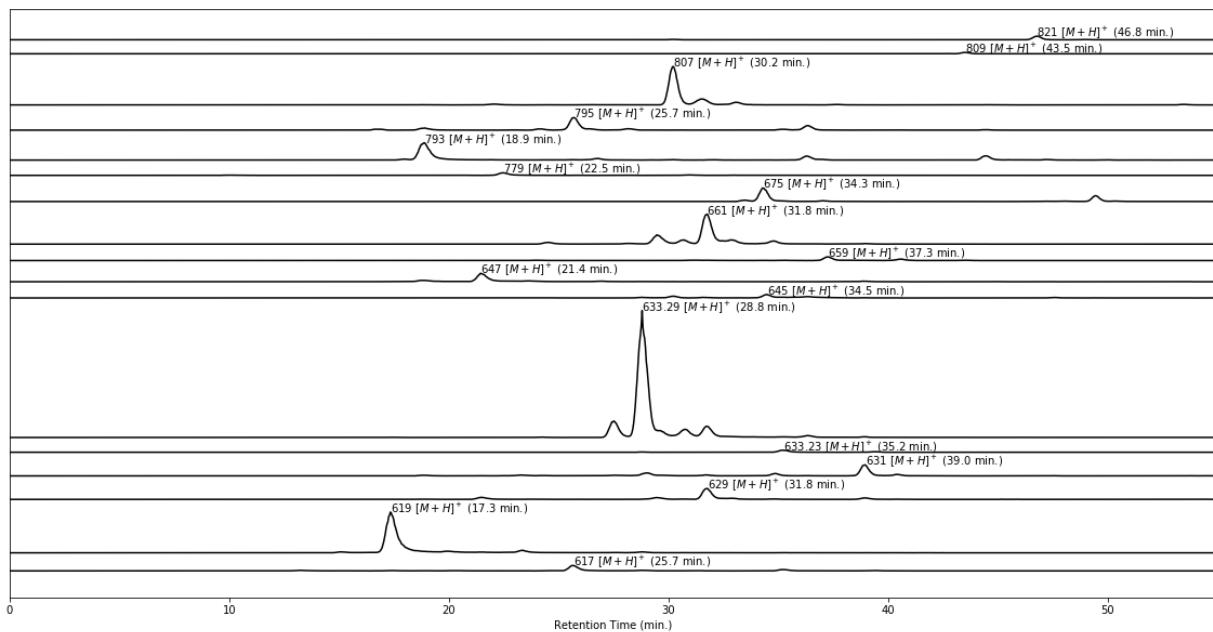


Abbildung 6.7: LC-MS Chromatogramm

6 Experimente LC-MS

Um das Stattfinden der Reaktion zu sehen, vergleiche mit Abbildung 6.3.

Bezeichnung	Summenformel	M (in Da)	Typ	RT _{HPLC} (in min.)	H.
Bo-DYCC	C ₃₃ H ₃₇ O ₈ N ₄	617.2599	DYCC	30.94?	-
Bo-DNCC	C ₃₃ H ₃₉ O ₈ N ₄	619.2798	DNCC	26.72	-
•	C ₃₄ H ₃₇ O ₈ N ₄	629.2641	•	-	-
-	C ₃₄ H ₃₉ O ₈ N ₄	631.2795	DYCC	29.91, 30.94	Bo-DYCC
-	C ₃₄ H ₄₁ O ₈ N ₄	633.2955	DNCC	28.8	Bo-DNCC
•	C ₃₆ H ₃₃ O ₇ N ₄	633.2339	•	-	-
Bo-YCC	C ₃₄ H ₃₇ O ₉ N ₄	645.2593	YCC	-	-
-	C ₃₅ H ₄₁ O ₈ N ₄	645.2953	DYCC	-	Bo-DYCC
Bo-NCC-3	C ₃₄ H ₃₉ O ₉ N ₄	647.2748	NCC	33.04	-
•	C ₃₄ H ₃₅ O ₁₀ N ₄	659.2348	•	-	-
-	C ₃₅ H ₃₉ O ₉ N ₄	659.2741	YCC	37.09	Bo-YCC
-	C ₃₅ H ₄₁ O ₉ N ₄	661.2902	-	-	Bo-NCC-3
-	C ₃₆ H ₄₃ O ₉ N ₄	675.306	-	-	Bo-NCC-3
Bo-DNCC-2	C ₃₉ H ₄₇ O ₁₃ N ₄	779.3181	DNCC	-	-
Bo-NCC-1	C ₄₀ H ₄₉ O ₁₃ N ₄	793.3336	NCC	29.91	-
-	C ₄₀ H ₅₁ O ₁₃ N ₄	795.3491	-	-	-
-	C ₄₁ H ₅₁ O ₁₃ N ₄	807.3491	NCC	40.03	Bo-NCC-1
-	C ₄₁ H ₅₃ O ₁₃ N ₄	809.3649	-	-	795
-	C ₄₂ H ₅₃ O ₁₃ N ₄	821.3652	NCC	47.28	Bo-NCC-1

Tabelle 6.2: Übersicht über die gefundenen Chl-Kataboliten des Brokkoliblattes und ihren Methylestern, die sich aus der Reaktion der freien Carbonsäure mit Essigsäureanhydrid und der anschließenden Aufarbeitung mit MeOH ergeben. Durch die Aktivierung der Reaktion durch Essigsäureanhydrid sind mehr Produkte zu sehen und diese sind in größeren Intensitäten vorhanden. (die Summenformeln und die exakten Molekülmassen beziehen sich auf die [M+H]⁺ Ionen)

6 Experimente LC-MS

Mithilfe von UV/Vis Spektren konnten ein YCC (RT = 33.98min.), ein DNCC (RT = 37.09min.), ein NCC (RT = 38.94min.), ein weiterer DNCC (RT = 40.03min.) und ein YCC (RT = 47.28min.) identifiziert werden (Abbildungen 6.8a-e).

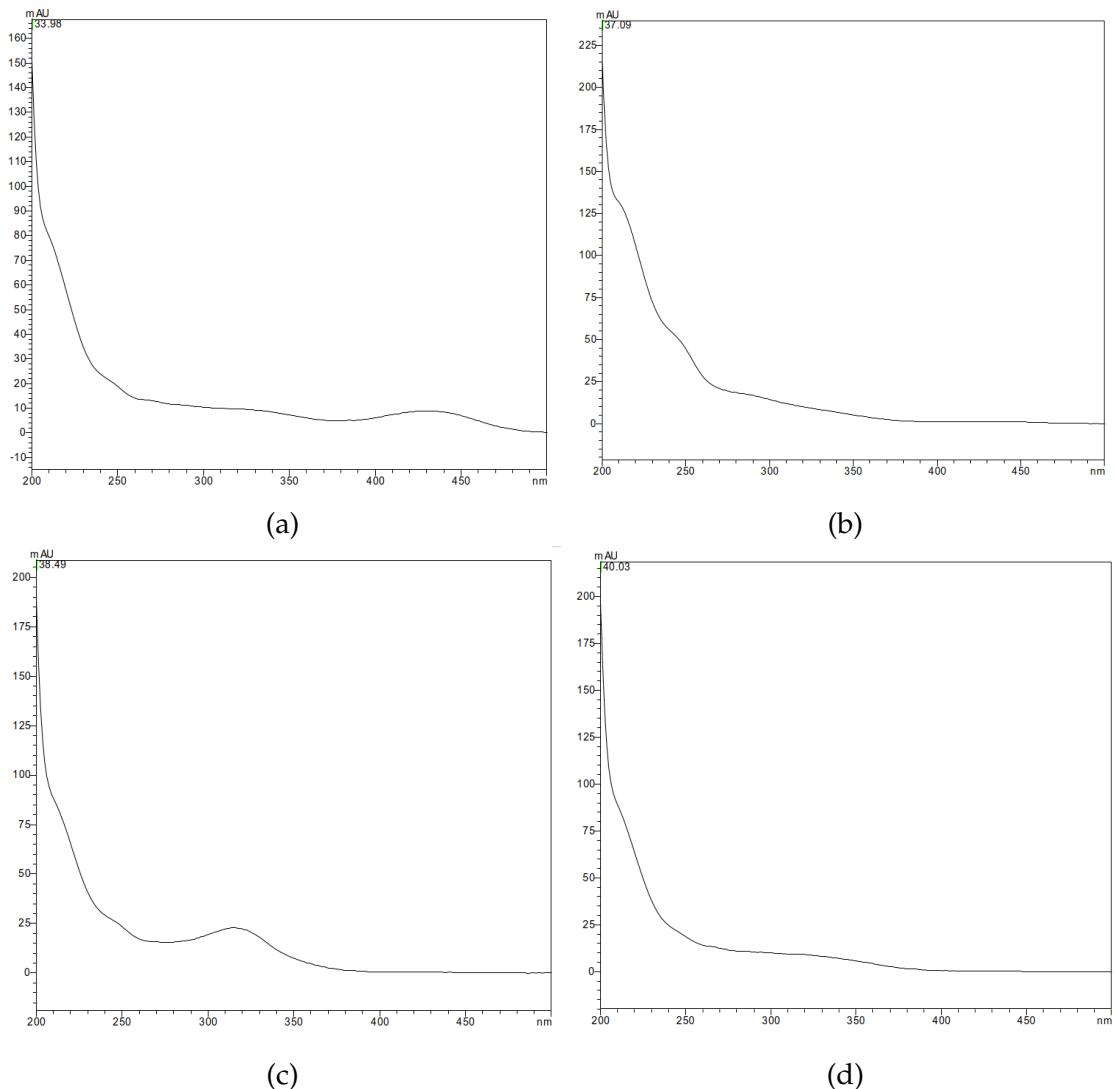


Abbildung 6.8: Online-UV/Vis Spektren: charakteristisch für (a) YCC - RT = 33.98min., (b) DNCC - RT = 37.09min., (c) NCC - RT = 38.94min., (d) DNCC - RT = 40.03min., (e) YCC - RT = 47.28min.

6 Experimente LC-MS

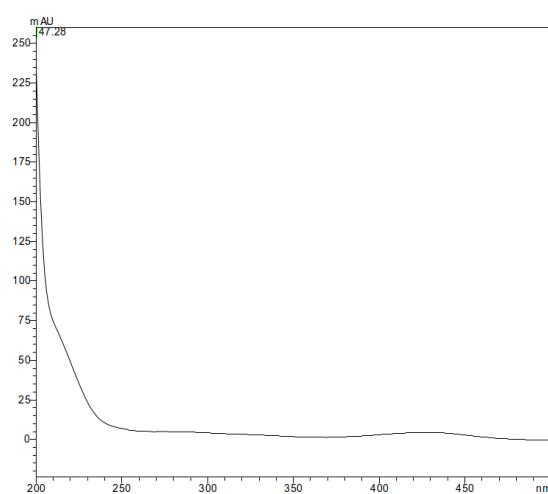


Abbildung 6.9

Abbildung 6.10: Online-UV/Vis Spektrum charakteristisch für einen YCC - RT = 47.28min.

7 Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

7.1 Beschreibung der Methode

Mit dem Wissen über die ungefähren Retentionszeiten der Chl-Kataboliten in der HPLC konnten diese in EPPIs gesammelt werden. Dabei wurde die aus der HPLC eluierte Flüssigkeit im Zeitrahmen des Peaks aufgenommen, in dem das Auftreten des jeweiligen Chl-Kataboliten vermutet wird (ca. 0.5min.). Die erhaltene Lösung wurde in das Massenspektrometer eingespritzt und analysiert, wobei besonderes Augenmerk auf die Fragmentierung und insbesondere der Erstellung von Fragmentierungsdiagrammen gelegt wurde.

Die Fragmentierungsdiagramme werden hier nicht diskutiert, da dies den Umfang der Arbeit deutlich sprengen würde.

7.2 Identifizierte Chl-Kataboliten

Im Folgenden finden sich jene Chl-Kataboliten, die über diese Methode genauer charakterisiert werden konnten (dies umfasst nicht alle mit LC-MS beobachteten - siehe Tabelle 6.2).

7.2.1 Bo-DYCC

Dieser Chl-Katabolit konnte mit der Methode von MS Leafspray nicht gefunden werden. Mit einem hochauflösenden Massenspektrometer wurde er mit $m/z = 617 [M+H]^+$ identifiziert. Es wurden Abspaltungen von H_2O bei $m/z = 599 [M - (H_2O) + H]^+$, von CO_2 bei $m/z = 573 [M - (CO_2) + H]^+$, von Ring A bei $m/z = 432 [M - (Ring A) + H]^+$ und von Ring C und D bei $m/z = 331 [M - (Ring C, Ring D) + H]^+$ (Abbildung 7.1) beobachtet.

7 Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

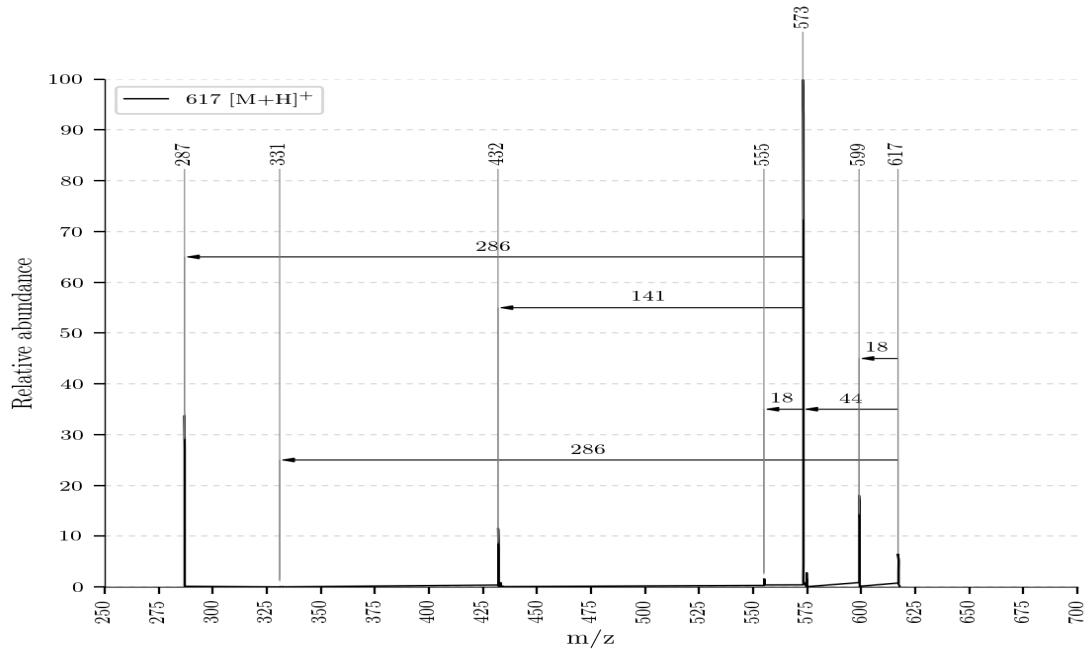


Abbildung 7.1: ESI-MS Spektrum von Bo-DYCC mit $m/z = 617 [M+H]^+$

Die Struktur des Bo-DYCC wird wie in Abbildung 7.2 vorgeschlagen. Aufgrund der CO₂ Abspaltung wird eine freie Carbonsäure an Position 8² angenommen. Die zwei fehlenden H-Atome im Vergleich zum Bo-DNCC und die sinnvollen Zuordnungen der anderen Fragmentierungen weisen auf eine Doppelbindung an Position 16 hin.

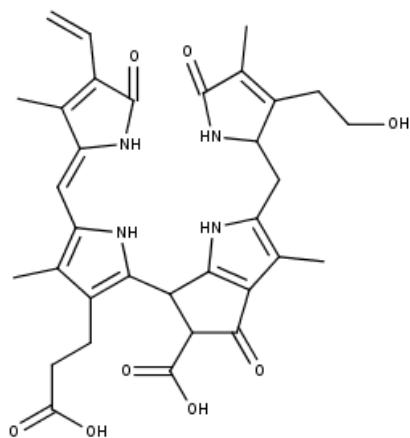


Abbildung 7.2: Strukturvorschlag von Bo-DYCC mit Summenformel C₃₃H₃₆N₄O₈

7 Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

Der Mechanismus der Abspaltung von Ring C zusammen mit Ring D wird wie in den Abbildungen 7.3a und 7.3b dargestellt angenommen.

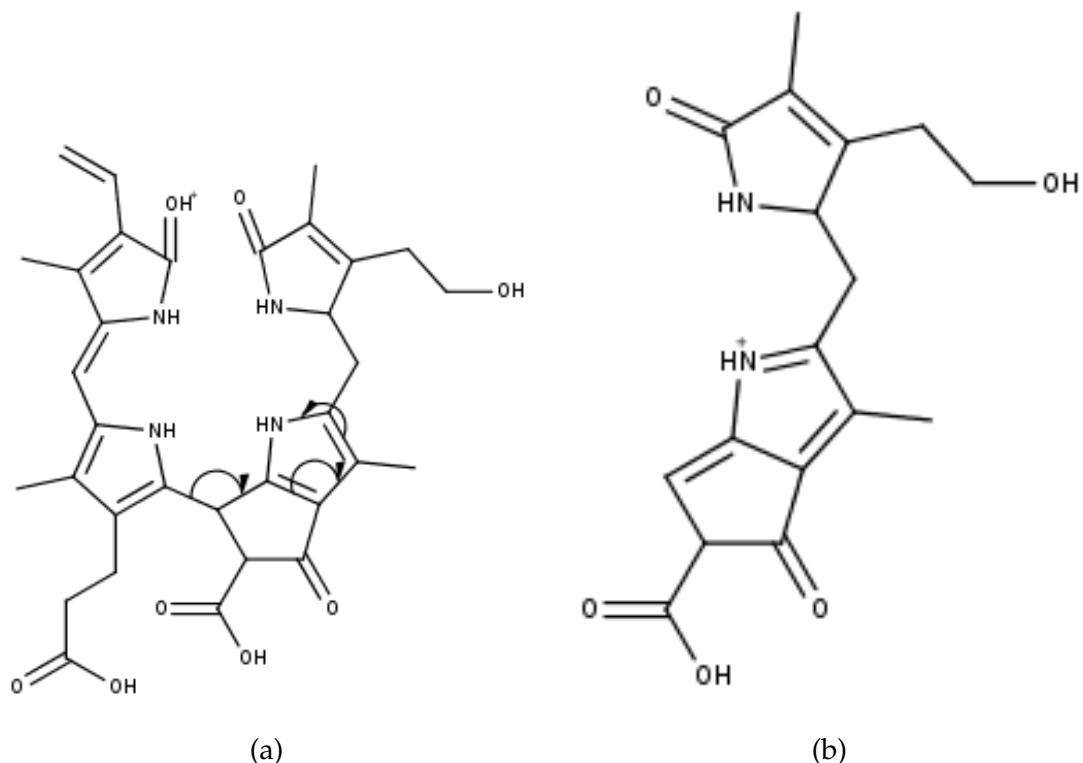


Abbildung 7.3: mechanistischer Vorschlag für die Abspaltung von Ring C und Ring D: (a) vorgeschlagene Bewegung der Elektronen, (b) Resultat der Abspaltung bei $m/z = 331 [M - (\text{Ring C, Ring D}) + \text{H}]^+$ und Summenformel $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{N}_2$

7 Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

7.2.2 Bo-DNCC

Vom Bo-DNCC wurde die protonierte Verbindung bei $m/z = 619 [M+H]^+$ aufgenommen. Sie zeigt Abspaltungen von H_2O bei $m/z = 601 [M - (H_2O) + H]^+$, von CO_2 bei $m/z = 575 [M - (CO_2) + H]^+$, von Ring D bei $m/z = 452 [M - (Ring D) + H]^+$ und eine gemeinsame Abspaltung von Ring D und Ring A bei $m/z = 311 [M - (Ring D, Ring A) + H]^+$ (Abbildung 7.4).

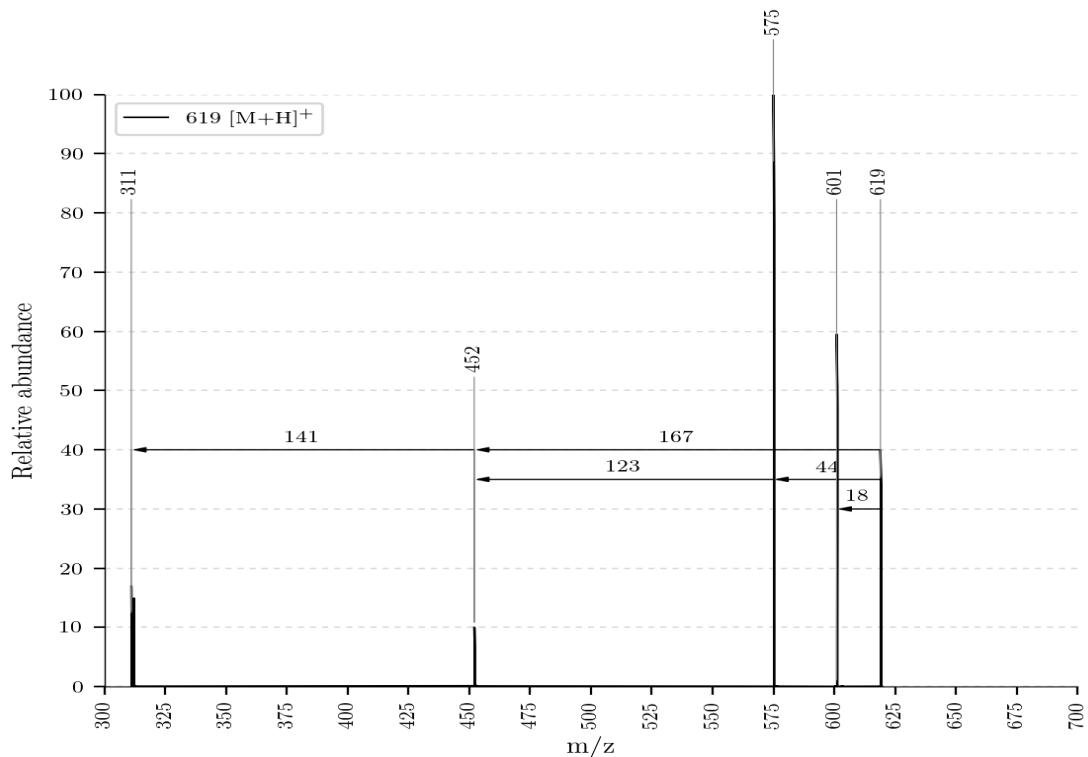


Abbildung 7.4: ESI-MS Spektrum von Bo-DNCC bei $m/z = 619 [M+H]^+$

Da für die Abspaltung von Ring A und Ring D jeweils ein Mechanismus in [17] vorgeschlagen wird, gibt es unterschiedliche Möglichkeiten für das Abspaltungsprodukt, wenn, wie hier beobachtet, beide Ringe gleichzeitig abgespalten werden (Abbildung 7.5a). In den Abbildungen 7.5b, 7.6a-b werden die einzelnen Mesomere vorgeschlagen, die sich aus den Betrachtungen ergeben.

Als stabiler werden die Mesomere bei 7.6a-b aufgrund eines stabilen konjugierten Systems erachtet.

7 Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

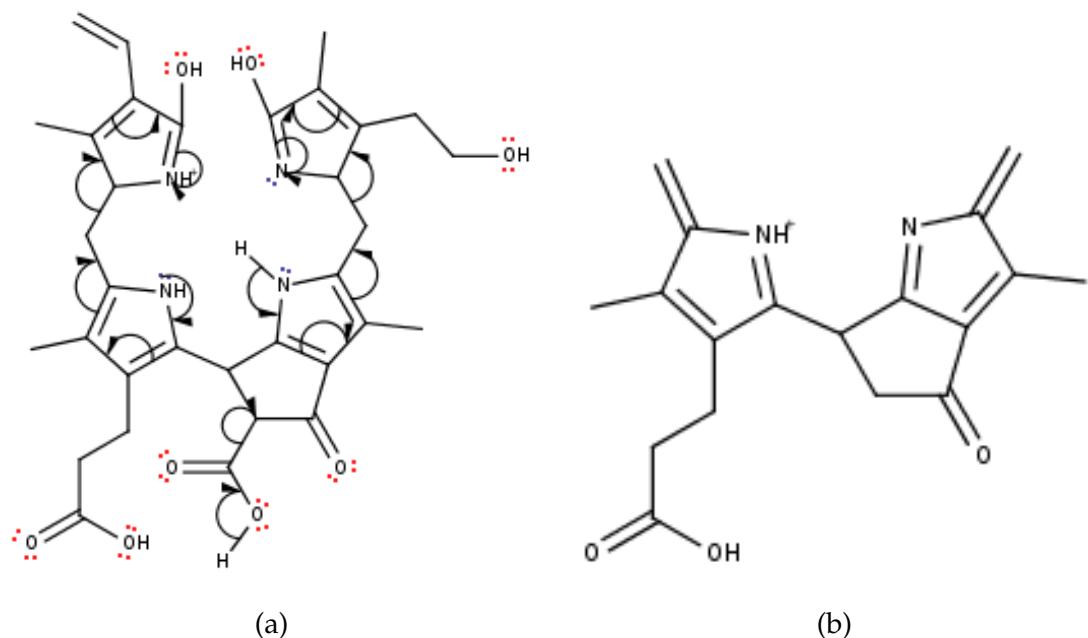


Abbildung 7.5: vorgeschlagener Abspaltungsmechanismus von Ring D und Ring A: (a) vorgeschlagene Elektronenbewegung, (b) Mesomer 1 der Abspaltung mit $m/z = 311$ $[M - (\text{Ring D, Ring A}) + H]^+$ und Summenformel $C_{18}H_{19}O_3N_2$

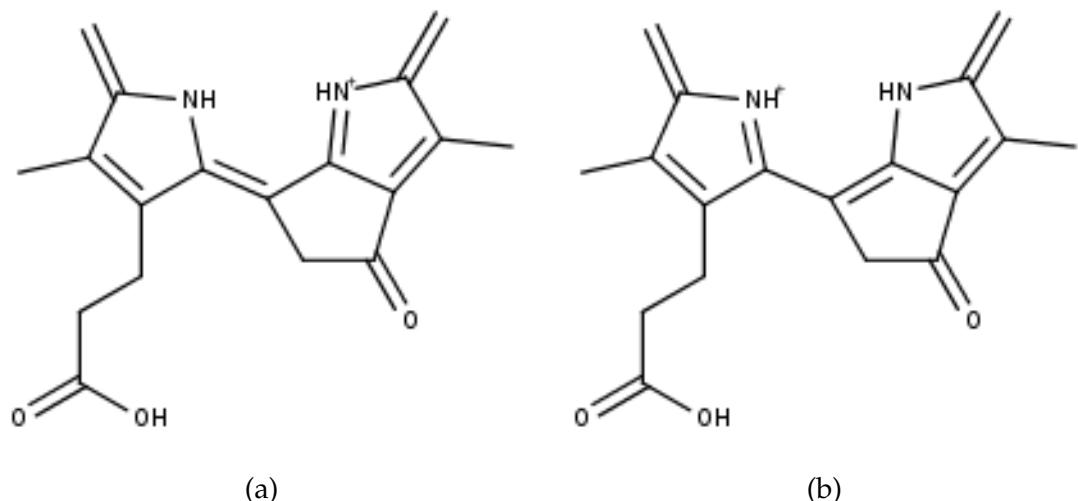


Abbildung 7.6: Mesomere des Abspaltungsproduktes: (a) Mesomer 2, (b) Mesomer 3

7 Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

7.2.3 Bo-YCC

Der Bo-YCC konnte, so wie der Bo-DYCC nicht mit MS Leafspray aufgenommen werden, dafür jedoch im Rahmen der hier verwendeten Methode. Er wurde mit $m/z = 645 [M+H]^+$ identifiziert und zeigt Abspaltungen von H_2O bei $m/z = 627 [M - (H_2O) + H]^+$ und von CO_2 bei $m/z = 601 [M - (CO_2) + H]^+$ (Abbildung 7.13).

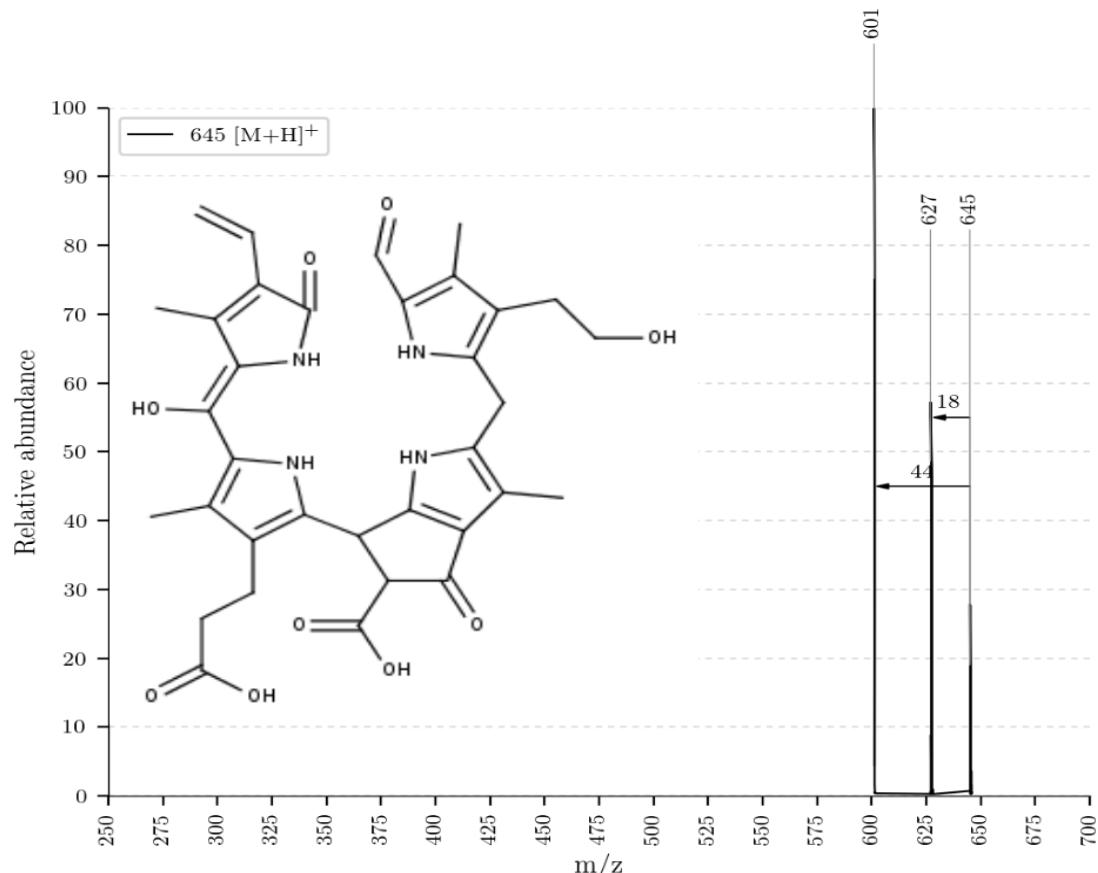


Abbildung 7.7: ESI-MS Spektrum von Bo-YCC mit $m/z = 645 [M+H]^+$ und Strukturvorschlag mit Summenformel $C_{34}H_{36}O_9N_4$

Die Abspaltung von CO_2 hilft, ihn vom Dimethylierungsprodukt des Bo-DYCC zu unterscheiden. Es wird deswegen an Position 8^2 eine freie Carbonsäure und an Position 16 eine Doppelbindung mit einer Hydroxygruppe angenommen (Abbildung 7.13).

7 Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

7.2.4 Bo-NCC-3

Der Bo-NCC-3 wurde ebenfalls wie mit MS Leafspray gefunden. Die Masse des Chl-Kataboliten konnte bei $m/z = 647 [M+H]^+$ bestimmt werden. Abspaltungen von H_2O bei $m/z = 629 [M - (H_2O) + H]^+$, von CO_2 bei $m/z = 603 [M - (CO_2 + H)]^+$ und von Ring D mit CO_2 bei $m/z = 480 [M - (Ring D-CO_2) + H]^+$ wurden beobachtet.

Aufgrund der vorgeschlagenen Hydroxygruppe an Position 16 wird angenommen, dass das Abspaltungsprodukt in einem Keto-/Enolgleichgewicht steht, wie in Abbildung 7.9b vorgeschlagen. Mithilfe von Fragmentierungsdiagrammen könnte man argumentieren, dass diese mögliche Tautomerie aufgrund ihrer Stabilität als Triebkraft für die Abspaltung gesehen werden kann.

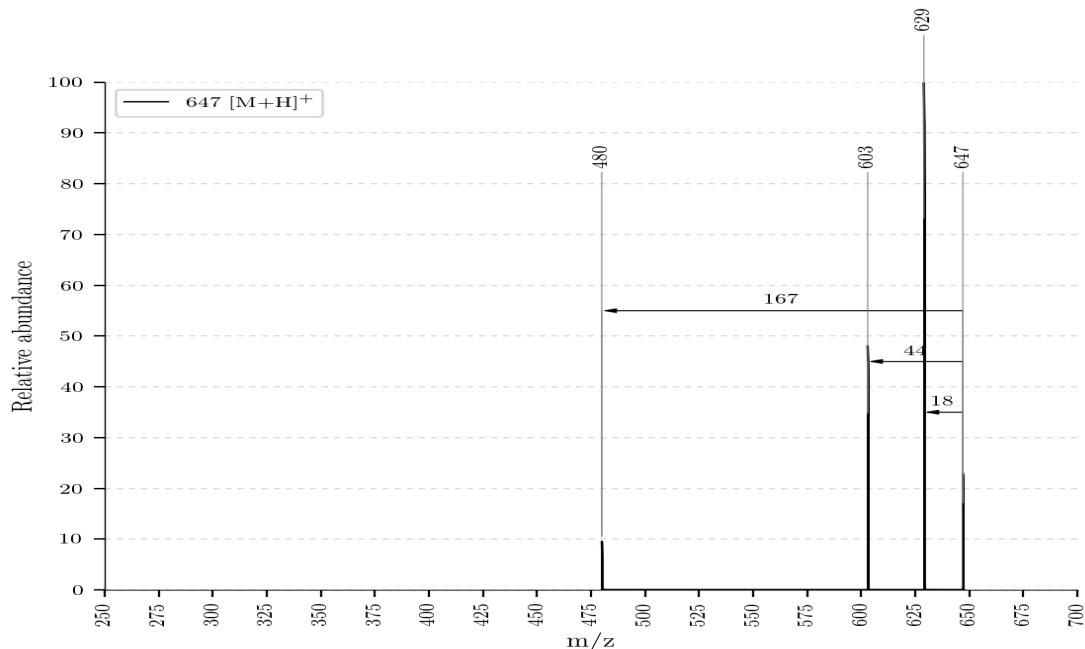


Abbildung 7.8: ESI-MS Spektrum von Bo-NCC-3 mit $m/z = 647 [M+H]^+$

7 Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

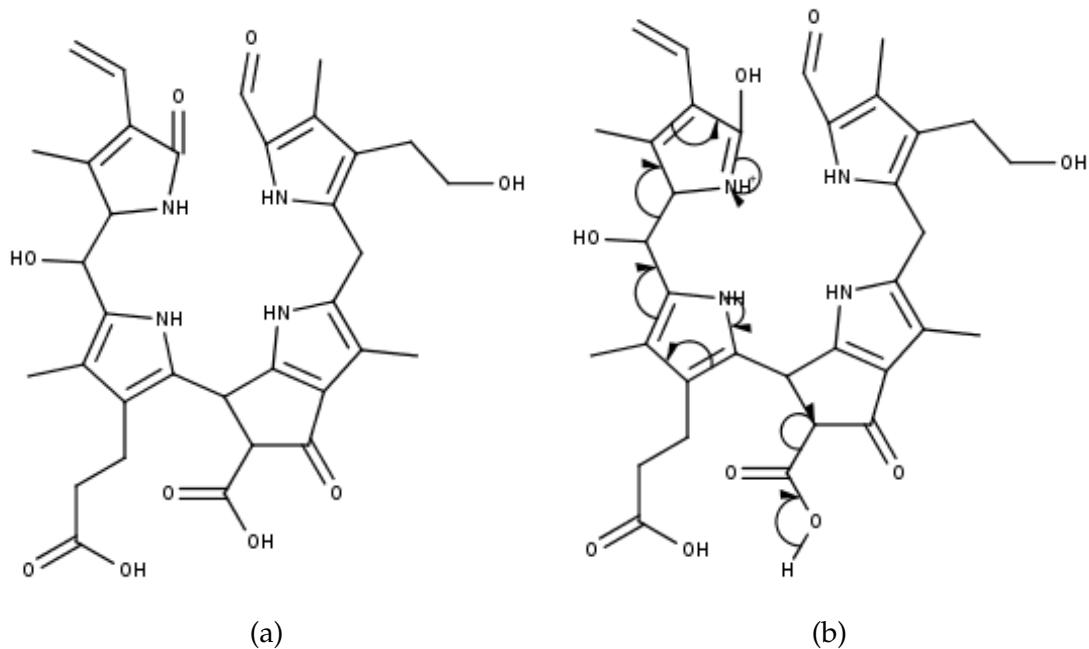


Abbildung 7.9: (a) Strukturvorschlag von Bo-NCC-3 mit Summenformel C₃₄H₃₉O₉N₄, (b) vorgeschlagener Mechanismus für die Abspaltung von Ring D mit CO₂

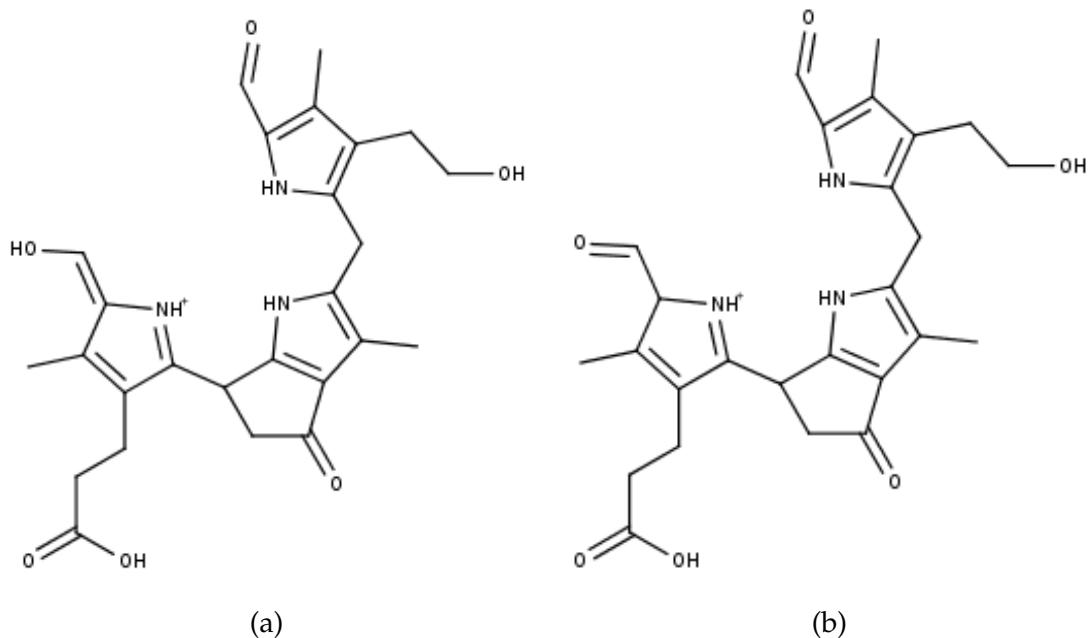


Abbildung 7.10: vorgeschlagene Keto-/Enoltautomerie beim Abspaltungsprodukt von Ring D mit Summenformel C₂₆H₃₀O₆N₃; (a) Enolform, (b) Aldehyd (vermutlich stabiler)

7 Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

7.2.5 Bo-NCC-1

Der Bo-NCC-1 konnte bei $m/z = 793 [M+H]^+$ aufgenommen werden. Er zeigte im Vergleich zu MS Leafspray mehr Abspaltungen, nämlich von H_2O bei $m/z = 775 [M - (H_2O) + H]^+$, von CO_2 bei $m/z = 749 [M - (CO_2) + H]^+$, von Zucker bei $m/z = 631 [M - (Zucker) + H]^+$, von Zucker zusammen mit H_2O bei $m/z = 613 [M - (H_2O) + H]^+$ und von Zucker zusammen mit CO_2 bei $m/z = 587 [M - (CO_2) + H]^+$.

Die Struktur wird wie in Abbildung 5.5a vorgeschlagen.

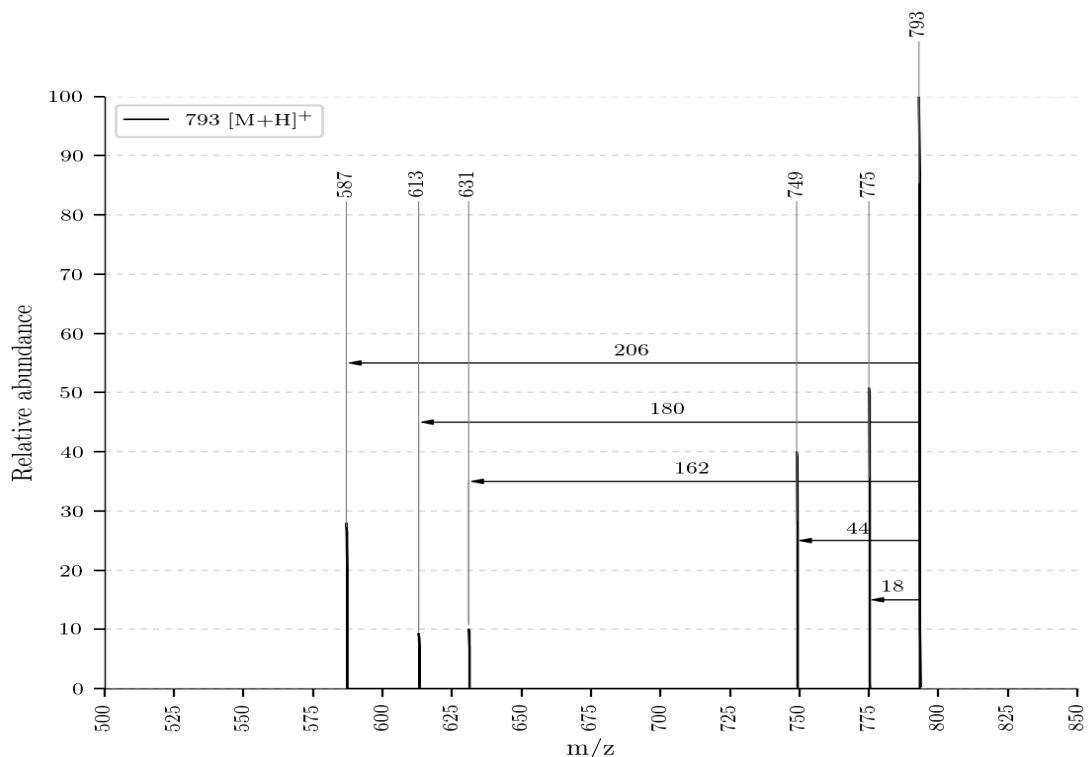


Abbildung 7.11: ESI-MS Spektrum von Bo-NCC-1 mit $m/z = 793 [M+H]^+$

7.3 Reaktionsprodukte der Chl-Kataboliten

7.3.1 Reaktionsprodukte von Bo-DYCC

Vom Bo-DYCC konnten zwei Reaktionsprodukte gefunden werden, eines bei $m/z = 631 [M+H]^+$ und eines bei $m/z = 645 [M+H]^+$. Beim ersten handelt es sich um einen Methylester. Dieser wird an Position 12^3 vermutet, da das Ion eine Abspaltung von CO_2 bei $m/z = 587 [M - (\text{CO}_2) + \text{H}]^+$ zeigt (Abbildung 7.12).

Beim Reaktionsprodukt bei $m/z = 645 [M+H]^+$ handelt es sich um einen Dimethylester, an den Positionen 8^2 und 12^3 . Dies zeigt die Abspaltung von MeOH bei $m/z = 613 [M - (\text{MeOH}) + \text{H}]^+$ (Abbildung 7.13).

Dies ist überraschend, da bei den meisten anderen untersuchten Chl-Kataboliten die Bildung eines Monomethylesters an Position 8^2 beobachtet wurde, welche durch das häufige natürliche Vorhandensein von Methylestern als günstiger angesehen werden kann.

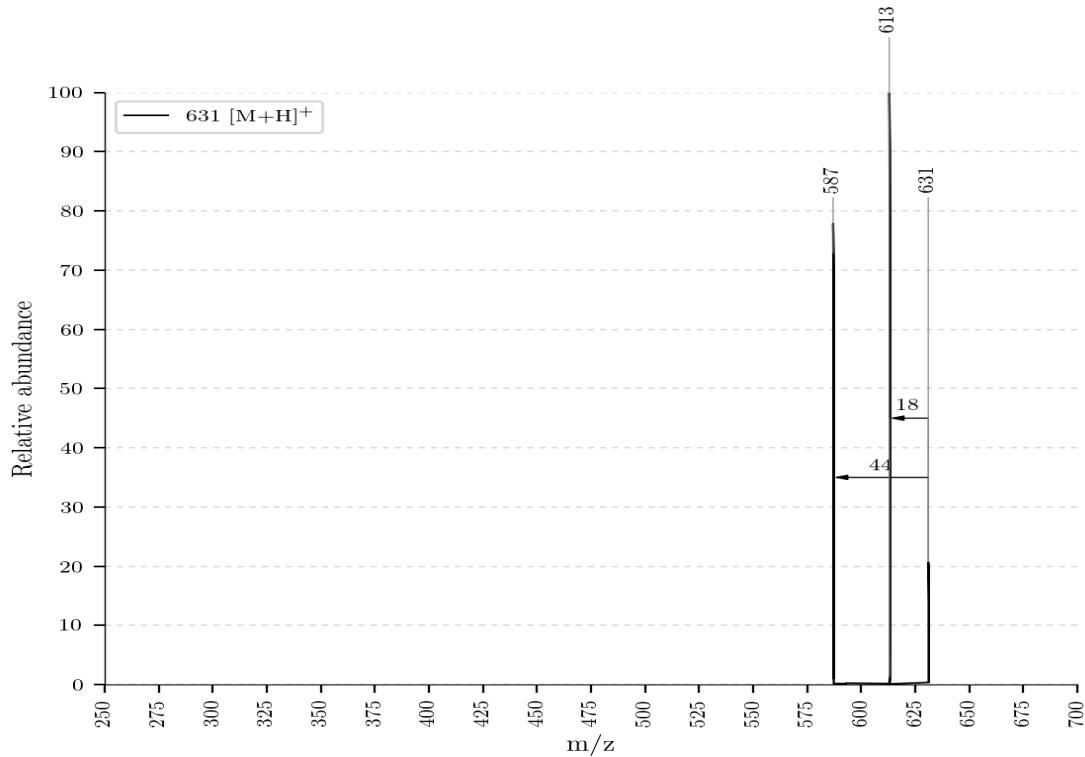


Abbildung 7.12: ESI-MS Spektrum des Monomethylesters von Bo-DYCC bei $m/z = 631 [M+H]^+$

7 Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

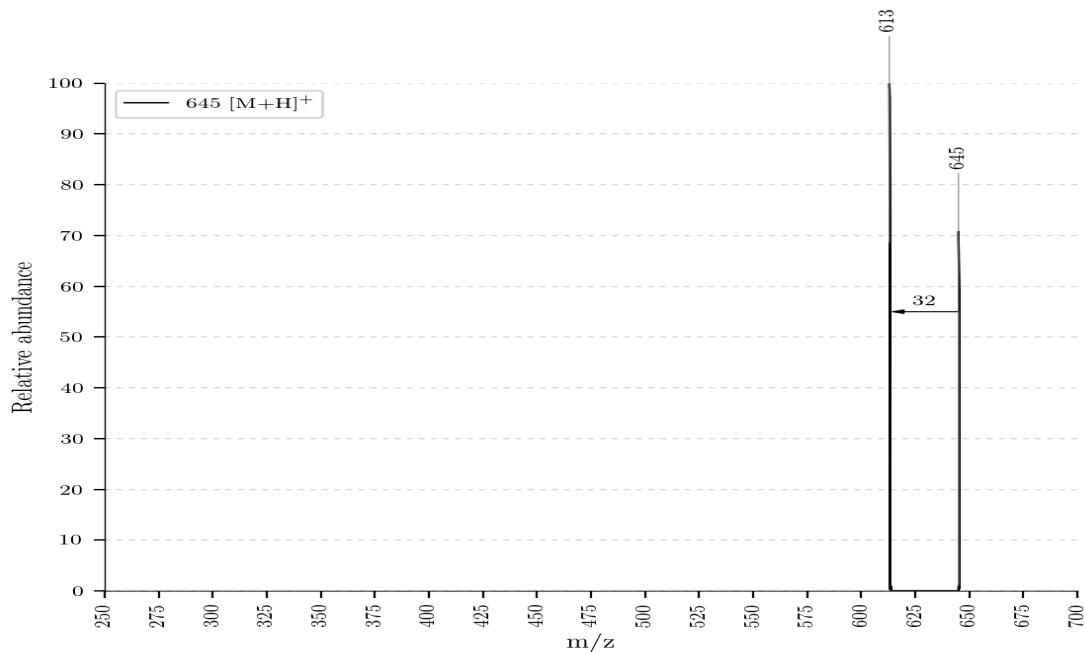


Abbildung 7.13: ESI-MS Spektrum des Dimethylesters von Bo-DYCC bei $m/z = 645$ $[M+H]^+$

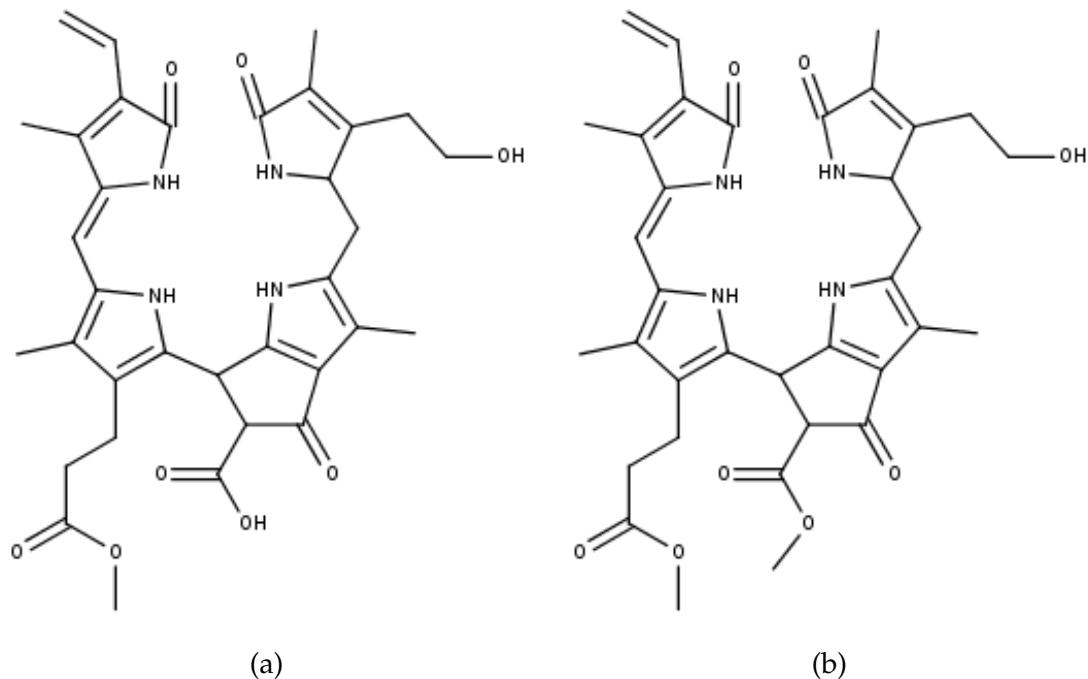


Abbildung 7.14: Strukturvorschläge: (a) Monomethylierungsprodukt mit Summenformel $C_{34}H_{38}O_8N_4$, (b) Dimethylierungsprodukt mit Summenformel $C_{35}H_{41}O_8N_4$

7 Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

7.3.2 Reaktionsprodukt von Bo-DNCC

Das Reaktionsprodukt des Bo-DNCC wurde bei $m/z = 633 [M+H]^+$ gefunden. Aufgrund der Abspaltung von meoh wird angenommen, dass sich der Methylester an Position 8^2 ausbildet. Auf eine Diskussion aller in Abbildung 7.15 ersichtlichen Fragmentierungen wird ob der Menge verzichtet.

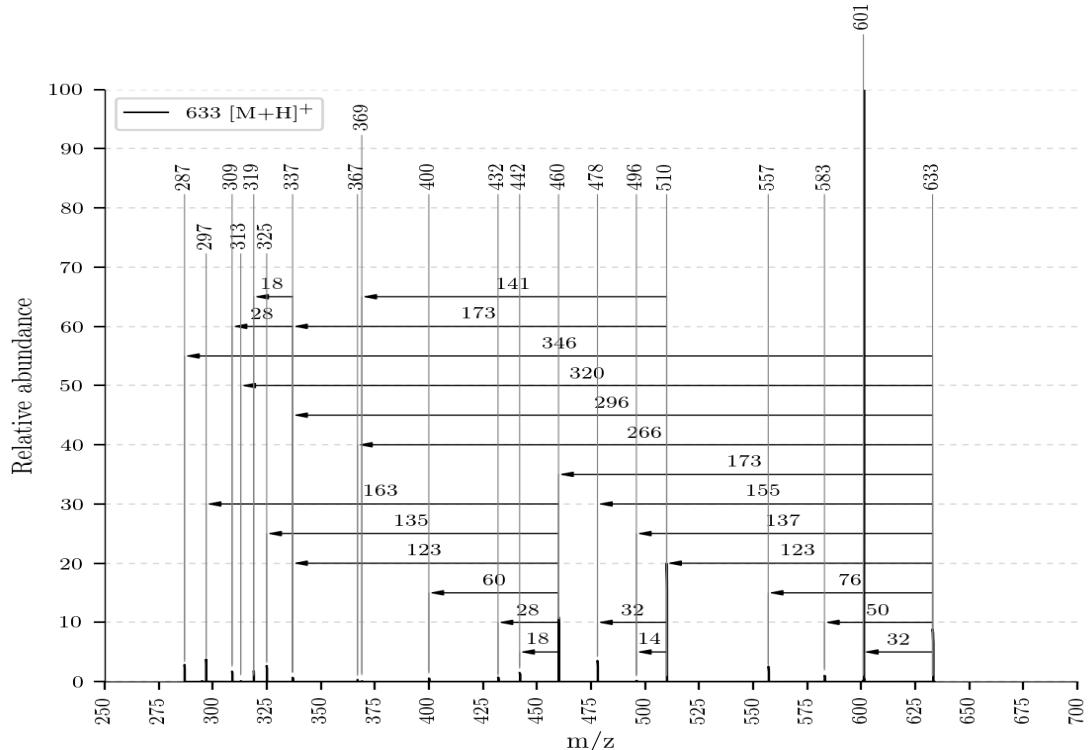


Abbildung 7.15: ESI-MS Spektrum des Reaktionsproduktes des Bo-DNCC mit $m/z = 633 [M+H]^+$

7 Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

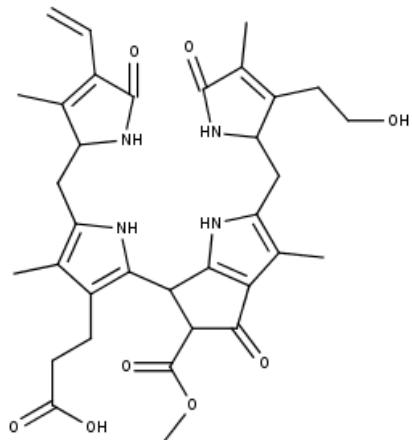


Abbildung 7.16: Strukturvorschlag für das Reaktionsprodukt von Bo-DNCC mit Summenformel $C_{34}H_{41}O_8N_4$

7.3.3 Reaktionsprodukt von Bo-YCC

Das Reaktionsprodukt des Bo-DYCC konnte nicht gesammelt werden, weshalb keine weiteren strukturellen Informationen vorhanden sind. Es wurde lediglich im LC-MS Lauf identifiziert (Tabelle 6.2).

7.3.4 Reaktionsprodukt von Bo-NCC-1

Das Reaktionsprodukt des Bo-NCC-1 konnte ebenfalls nicht gesammelt und näher identifiziert werden. Es wurde aber im LC-MS identifiziert (Tabelle 6.2).

7 Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

7.3.5 Reaktionsprodukt von Bo-NCC-3

Das Reaktionsprodukt des Bo-NCC-3 konnte bei $m/z = 661 [M+H]^+$ identifiziert werden und zeigte, so wie das Reaktionsprodukt von Bo-DNCC eine große Anzahl an Fragmentierungen (Abbildung 7.17).

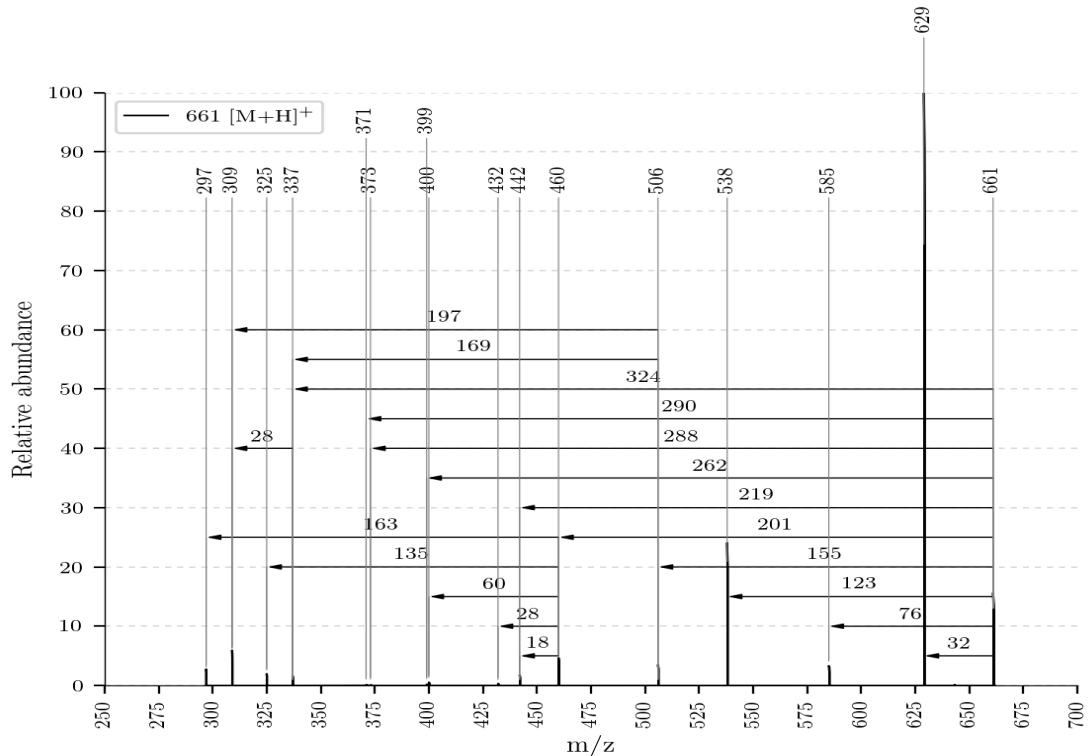


Abbildung 7.17: ESI-MS des Reaktionsproduktes von Bo-NCC-3 bei $m/z = 661 [M+H]^+$

Ergebnisse und Diskussion

Verweise

Literaturverzeichnis

- [1] Bernhard Kräutler und Philippe Matile. „Solving the Riddle of Chlorophyll Breakdown“. In: *Accounts of Chemical Research* 32 (1 1999), S. 35–43. doi: 10.1021/ar970225n (siehe S. 3).
- [2] George A. F. Hendry, Jennifer D. Houghton und Stanley B. Brown. „The Degradation of Chlorophyll-a biological enigma“. In: *New Phytologist* 107 (2 1987), S. 255–302. doi: 10.1111/j.1469-8137.1987.tb00181.x (siehe S. 3).
- [3] Dr. Bernhard Kräutler, Dr. Bernhard Jaun, Karlheinz Bortlik, Maja Schellenberg und Philippe Matile. „Zum Rätsel des Chlorophyllabbaus: Die Konstitution eines secoporphinoiden Kataboliten“. In: *Angewandte Chemie* 103 (10 1991), S. 1354–1357. doi: 10.1002/ange.19911031020 (siehe S. 3, 4).
- [4] Simone Moser, Thomas Müller, Michael Oberhuber und Bernhard Kräutler. „Chlorophyll Catabolites – Chemical and Structural Footprints of a Fascinating Biological Phenomenon“. In: *European Journal of Organic Chemistry* 2009 (1 2009), S. 21–31. doi: 10.1002/ejoc.200890104 (siehe S. 3).
- [5] Bernhard Kräutler. „Der Chlorophyllabbau in höheren Pflanzen – Phyllobilin als weitverbreitete, aber kaum sichtbare Zeichen von Reifung, Seneszenz und Zelltod“. In: *Angewandte Chemie* 128 (16 2016), S. 4964–4990. doi: 10.1002/ange.201508928 (siehe S. 3).
- [6] Bernhard Kräutler und Stefan Hörtensteiner. „Chlorophyll Catabolites and the Biochemistry of Chlorophyll Breakdown“. In: *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications* 25 (2007), S. 237–260. doi: 10.1007/1-4020-4516-6_17 (siehe S. 4).
- [7] Univ.-Doz. Dr. Karl-Hans Ongania Walter Mühlecker, Prof. Dr. Bernhard Kräutler, Prof. Dr. Philippe Matile und Dr. Stefan Hörtensteiner. „Dem Chlorophyllabbau in Pflanzen auf der Spur – Konstitutionsaufklärung eines „fluoreszierenden“ Chlorophyllkataboliten“. In: *Angewandte Chemie* 109 (4 1997), S. 401–404. doi: 10.1002/ange.19971090424 (siehe S. 4).

Literaturverzeichnis

- [8] Simone Moser, Thomas Müller, Michael Oberhuber und Bernhard Kräutler. „Chlorophyll Catabolites – Chemical and Structural Footprints of a Fascinating Biological Phenomenon“. In: *European Journal of Organic Chemistry* 2009 (1 2008), S. 21–31. doi: 10.1002/ejoc.200800804 (siehe S. 4).
- [9] Jürgen Böcker. *Chromatographie*. 1. Auflage. Würzburg: Vogel, 1997. ISBN: 3-8023-1582-0 (siehe S. 5).
- [10] Edmond de Hoffmann und Vincent Stroobant. *Mass Spectrometry*. 3. Auflage. West Sussex: John Wiley und Sons, Ltd., 2007 (siehe S. 6, 7).
- [11] R. Graham Cooks, Zheng Ouyang, Zoltan Takats und Justin M. Wiseman. „Ambient Mass Spectrometry“. In: *Science* 311 (5767 2006), S. 1566–1570 (siehe S. 7).
- [12] He Wang, Jiangjiang Liu, R. Graham Cooks, Zheng Ouyang und Zoltan. „Paper Spray for Direct Analysis of Complex Mixtures Using Mass Spectrometry“. In: *Angewandte Chemie* 49 (5 2010), S. 877–880. doi: 10.1002/anie.200906314 (siehe S. 7).
- [13] Thomas Müller und R. Graham Cooks. „Differential Rapid Screening of Phytochemicals by Leaf Spray Mass Spectrometry“. In: *Analytische Methoden* 35 (3 2014), S. 919–924 (siehe S. 8, 15).
- [14] Naim Malaj, Zhen Ouyang, Giovanni Sindona und R. Graham Cooks. „Analysis of pesticide residues by leaf spray mass spectrometry“. In: *Analytische Methoden* 4 (7 2012), S. 1913–1919 (siehe S. 8).
- [15] Warren Weckesser. *savitzkygolay.py*. Version v0.17.1. scipy. Dez. 2017. URL: https://github.com/scipy/scipy/blob/v0.17.1/scipy/signal/_savitzky_golay.py#L228-L349 (siehe S. 11).
- [16] Matthias H. Roiser, Thomas Müller und Bernhard Kräutler. „Colorless Chlorophyll Catabolites in Senescent Florets of Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*)“. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63 (2015), S. 1385–1392. doi: 10.1021/jf5055326 (siehe S. 15, 17, 20).
- [17] Thomas Müller, Stefan Vergeiner und Bernhard Kräutler. „Structure elucidation of chlorophyll catabolites (phyllobilins) by ESI-mass spectrometry - Pseudo-molecular ions and fragmentation analysis of a nonfluorescent chlorophyll catabolite (NCC)“. In: *International Journal of Mass Spectrometry* 365-366 (2014), S. 48–55. doi: 10.1016/j.ijms.2013.12.028 (siehe S. 17, 22, 48).

Abbildungsverzeichnis

2.1	Abbauprozess des Chlorophylls, Quelle: http://www.organische-chemie.ch/chemie/2007nov/antioxidantien.shtml (Zugegriffen am: 05.11.2017)	3
2.2	Nummerierung von Phyllobilinen, Quelle: Mathias Scherl	4
5.1	MS Leafspray Versuchsaufbau, Quelle: Autor	12
5.2	MS Leafspray Versuchsaufbau Detailfotos, Quelle: Autor	13
5.3	MS Leafspray Blattvorbereitung, Quelle: Autor	14
5.4	ESI-MS Spektrum von Bo-NCC-1, Quelle: Autor	16
5.5	Strukturvorschlag von Bo-NCC-1 und Fragmentierungsdiagramm, Quelle: Autor	17
5.6	ESI-MS von Bo-NCC-3, Quelle: Autor	18
5.7	Strukturvorschlag von Bo-NCC-3 und Fragmentierungsdiagramm, Quelle: Autor	19
5.8	ESI-MS von Bo-DNCC, Quelle: Autor	20
5.9	ESI-MS von Bo-DNCC, Quelle: Autor	21
5.10	Strukturvorschlag von Bo-DNCC mit Fragmentierungsdiagramm, Quelle: Autor	21
5.11	Strukturvorschlag des Reaktionsproduktes von Bo-DNCC, Quelle: Autor	23
5.12	ESI-MS Spektrum des Reaktionsproduktes von Bo-DNCC, Quelle: Autor	23
5.13	Fragmentierungsdiagramme des Reaktionsproduktes von Bo-DNCC, Quelle: Autor	24
5.14	Vorschlag des Mechanismus der CH ₃ COOH Abspaltung, Quelle: Autor	25
5.15	ESI-MS des Reaktionsproduktes von Bo-NCC-3, Quelle: Autor . .	26
5.16	Strukturvorschlag des Reaktionsproduktes von Bo-NCC-3, Quelle: Autor	27
5.17	Fragmentierungsdiagramm des Reaktionsproduktes von Bo-DNCC, Quelle: Autor	27
5.18	ESI-MS des Reaktionsproduktes von Bo-NCC-1, Quelle: Autor . .	28

Abbildungsverzeichnis

5.19	Strukturvorschlag des Reaktionsproduktes von Bo-NCC-1, Quelle: Autor	29
5.20	Fragmentierungsdiagramm des Reaktionsproduktes von Bo-NCC-1, Quelle: Autor	30
6.1	HPLC Chromatogramm vor der Reaktion, Quelle: Autor	34
6.2	LC-MS Chromatogramm vor der Reaktion, Quelle: Autor	34
6.3	LC-MS Chromatogramm vor der Reaktion - Aufspaltung der Signale, Quelle: Autor	36
6.4	Online-UV/Vis Spektren mit der Charakteristik eines NCC bei 27.10min., eines DNCC bei 29.75min. sowie eines YCC bei 30.94min., Quelle: Autor	38
6.5	HPLC Chromatogramm nach 3h Reaktionsdauer, Quelle: Autor	39
6.6	LC-MS Chromatogramm nach 3h Reaktionsdauer, Quelle: Autor	40
6.7	LC-MS Chromatogramm nach 3h Reaktionsdauer - Aufspaltung, Quelle: Autor	41
6.8	Online-UV/Vis Spektren mit der Charakteristik eines YCC bei 33.98min., eines DNCC bei 37.09min. eines NCC bei 38.94min. sowie eines DNCC bei 40.03min., Quelle: Autor	43
6.9	44
6.10	Online-UV/Vis Spektren mit der Charakteristik eines YCC bei 47.28min., Quelle: Autor	44
7.1	ESI-MS Spektrum von Bo-DYCC, Quelle: Autor	46
7.2	Strukturvorschlag von Bo-DYCC, Quelle: Autor	46
7.3	Abspaltungsmechanismus von Ring C und Ring D bei Bo-DYCC, Quelle: Autor	47
7.4	ESI-MS Spektrum von Bo-DNCC, Quelle: Autor	48
7.5	Abspaltungsmechanismus von Ring D und Ring A und Mesomer 1, Quelle: Autor	49
7.6	2 Mesomere für potentielle Abspaltungsprodukte von Bo-DNCC, Quelle: Autor	49
7.7	ESI-MS Spektrum von Bo-YCC, Quelle: Autor	50
7.8	ESI-MS Spektrum von Bo-NCC-3, Quelle: Autor	51
7.9	Strukturvorschlag von Bo-NCC-3 und Vorschlag für Mechanismus der Abspaltung von Ring D, Quelle: Autor	52
7.10	vorgeschlagene Keto-/Enoltautomerie der Ring D Abspaltung von Bo-NCC-3, Quelle: Autor	52
7.11	ESI-MS Spektrum von Bo-NCC-1, Quelle: Autor	53
7.12	ESI-MS Spektrum des Monomethylesters von Bo-DYCC, Quelle: Autor	54

Abbildungsverzeichnis

7.13 ESI-MS Spektrum des Diethylesters von Bo-DYCC, Quelle: Author	55
7.14 Strukturvorschläge für das Mono- und Dimethylierungsprodukt des Bo-DYCC, Quelle: Autor	55
7.15 ESI-MS Spektrum des Reaktionsproduktes von Bo-DNCC, Quelle: Autor	56
7.16 Strukturvorschlag für das Reaktionsprodukt von Bo-DNCC, Quel- le: Autor	57
7.17 ESI-MS des Reaktionsproduktes von Bo-NCC-3, Quelle: Author .	58

Abkürzungsverzeichnis

bzw. beziehungsweise. 7

ca. circa. 10, 11, 31

Chl-Katabolit Chlorophyll Kataboliten. 2, 5–8, 10, 11, 17, 22, 31–37, 39, 40, 45, 51, 54

CI Chemical Ionization. 6

CID Collision induced Dissociation. 2

DNCC Decarboxylated-Non flourescent Chlorophyllic Catabolite. 7, 32, 35, 36, 38, 43

EI Electron Ionization. 6

EPPI Eppendorf Reaktionsgefäß. 6

ESI Electrosprayionisation. 6, 7

FI Field Ionization. 6

HPLC High performance liquid chromatography. 2, 5–7, 11, 31–36, 39, 45

LC-MS Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. 5, 7, 31, 33, 34, 36, 37, 39–41, 45, 57

LM Lösungsmittel. 5, 7, 12–14, 22

m/z Masse pro Ladung. 6, 15

MeOH Methanol. 14, 16, 18, 19, 22, 28, 31, 35, 39, 42, 54

N2 Stickstoff. 7

nAb. noch Aufklärungsbedarf. 16–20, 22, 24, 26

NCC Non flourescent Chlorophyllic Catabolite. 4, 7, 32, 34, 35, 38, 43

NKE normalisierten Kollisionsenergie (in %). 11, 17–19, 22, 24–26, 28

RP Reversed-phase. 5

u.a. unter anderem. 17, 22

YCC Flourescent Chlorophyllic Catabolite. 7, 19, 32, 36, 38, 43, 44

z.B. zum Beispiel. 2–4, 6, 8, 22

Anhang

Eidesstattliche Erklärung

Ich, Florian Klubenschedl, erkläre hiermit eidesstattlich, dass ich diese vorwissenschaftliche Arbeit selbstständig und ohne Hilfe Dritter verfasst habe. Insbesondere versichere ich, dass ich alle wörtlichen und sinngemäßen Übernahmen aus anderen Werken als Zitate kenntlich gemacht und alle verwendeten Quellen angegeben habe.

Telfs, am

Datum

Unterschrift