

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

Chlorophyllkataboliten sind die Endprodukte des Abbauprozesses von Chlorophyll. In dieser Arbeit wurden die Chl-Kataboliten frischer Brokkoliblätter einer direkten Analyse mit MS Leafspray unterzogen.

MS Leafspray stellt dabei eine neue Methode der Massenspektrometrie dar, die es ermöglicht, Probenmaterial in natürlicher Umgebung zu analysieren. Nach einer Erstidentifikation über MS Leafspray wurde das Ergebnis mit LC-MS verifiziert. Die mit beiden Methoden gefundenen Chl-Kataboliten lauten wie folgt: Bo-NCC-1, Bo-NCC-3, Bo-DNCC, Bo-DNCC-2, Bo-DYCC und Bo-YCC. Im Vergleich zum Brokkoliblatt konnten 4 weitere Chl-Kataboliten gefunden werden, was neue Fragen in Bezug auf das Verständnis des Abbauprozesses aufwirft. Für jeden der genannten Chl-Kataboliten konnten Strukturvorschläge gemacht werden, die noch mit ^1H -NMR überprüft werden müssten.

Außerdem wurde eine Reaktion am Blatt der Chl-Kataboliten mit Essigsäureanhydrid durchgeführt. Die Reaktionsprodukte (Anhydride) konnten mit MS Leafspray durch die Beobachtung einer Massenzunahme nachgewiesen werden. Auf Basis diverser Fragmentierungen wird vorgeschlagen, dass die Reaktion nur an einer der beiden freien Carbonsäuren der Chl-Kataboliten erfolgt.

Im Rahmen der massenspektrometrischen Analysen wurden Fragmentierungsdiagramme erstellt, von denen angesichts der Ergebnisse vermutet wird, dass sie charakteristisch für bestimmte Chl-Kataboliten sind. Eine Interpretationsmöglichkeit der Diagramme konnte vorgeschlagen werden.

Es wurde somit ein wesentlicher Beitrag zur Weiterentwicklung der direkten Analyse mit MS Leafspray geleistet. Zudem wurde ein Grundstein für die weitere Erforschung von Fragmentierungsdiagrammen und ihrer Aussagekraft gelegt. Zu guter Letzt konnte einiges zum Verständnis der Durchführung einer Reaktion mit Essigsäureanhydrid beigetragen werden.

Vorwort und Danksagung

„Als ich vierzehn war, war mein Vater so unwissend. Ich konnte den alten Mann kaum in meiner Nähe ertragen. Aber mit einundzwanzig war ich verblüfft, wieviel er in sieben Jahren dazugelernt hatte.“ - Mark Twain

Im Rückblick auf meine VWA bin ich froh, dieses Forschungsthema gewählt zu haben. Der Wissensgewinn, den ich dabei erleben konnte ist ungefähr so groß, wie der im Zitat beschriebene¹. Zugegeben, die Beschäftigung mit diesem Thema war nicht immer leicht, es war teils harte Arbeit. Über ein Thema zu schreiben, von dem man im Grunde null Ahnung zu Beginn hat, bringt seine Herausforderungen und teils auch Verwirrung mit sich.

Die eingehendere Beschäftigung mit diesem Thema ermöglichte ein Praktikum im Rahmen des *Sparkling Science* Projektes am Institut für Organische Chemie Innsbruck, das ich im August 2017 absolvieren durfte. Betreut wurde ich dabei von Herrn Dr. Thomas Müller, dem ich an dieser Stelle einen großen Dank für seine Geduld und die vielen Ratschläge aussprechen möchte. Er führte mich in die praktischen Arbeiten ein und zeigte mir, wie ein Massenspektrometer bedient wird. In der zweiten Woche konnte ich bereits fast selbstständig operieren und die Experimente (fast) ganz nach meinen Wünschen durchführen. Die Besprechung und Diskussion der Ergebnisse war selbstverständlich ebenso ein Teil der alltäglichen Praxis. Ich denke, ich werde mich an diese Zeit noch lange erinnern können, da ich dabei viel in puncto Zeitmanagement und dem Forschungsalltag an sich erfahren konnte. Mein Wunsch, eines Tages nach einem erfolgreich absolviertem Studium der Naturwissenschaften in der Forschung tätig zu sein, wurde bestärkt.

Mein weiterer Dank ist an meinen Betreuungslehrer Mag. Mathias Scherl gerichtet. Er ist unter Umständen hauptverantwortlich für mein Interesse an der Chemie, das seit der 5ten Klasse ohne Abbruch anhält. Durch ihn wurde ich erst auf die Möglichkeit des Praktikums hingewiesen und mein Interesse an der Erforschung des Abbauprozesses von Chlorophyll geweckt. Auch steht er immer für chemiespezifische Fragen bereit, was ich sehr schätze und wodurch ich viel gelernt habe.

¹ich bin zwar nicht einundzwanzig, aber trotzdem

Ansonsten möchte ich mich bei allen weiteren beteiligten Personen bedanken, die in irgendeinster Weise bei der Verfassung dieser Arbeit von Hilfe waren².

Zu guter Letzt möchte ich bei den Brokkoliblättern aus dem Garten meiner Oma bedanken. Ohne dieses wahrhaftig erstklassige Forschungsobjekt wäre ich unter Umständen zu gar keinem Ergebnis gekommen. Ihr wart ein wahrer Glückssgriff - DANKE!

²eine Auflistung aller Personen, die ich bisher getroffen habe, wäre sinnlos, weswegen ich mich hierbei auf die wesentlichen beziehe - Familie und Co.

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	
8.	Ergebnisse	60
8.1.	Liste aller identifizierten Chl-Kataboliten und deren Reaktionsprodukten	60

Inhaltsverzeichnis

9. Diskussion	62
9.1. zur direkten Analyse, MS Leafspray und der Reaktion mit Essigsäureanhydrid	62
9.2. zu den Fragmentierungsdiagrammen und Strukturaufklärung	63
9.3. zum Vergleich direkte Analyse - klassischer Ansatz	64
9.4. zum Vergleich Brokkoliblatt - Brokkolifruucht	66
9.5. Rück- und Ausblick	66
Verweise	68
Literaturverzeichnis	69
Abbildungsverzeichnis	71
Tabellenverzeichnis	73
Abkürzungsverzeichnis	75
Anhang	76
A. Fragmentierungsdiagramme und MS-Spektren der MS-Leafspray Experimente	77
A.1. Reaktionsprodukt von Bo-DYCC	77
A.2. Reaktionsprodukt von Bo-DNCC	78
A.3. Reaktionsprodukt von Chl-Katabolit mit m/z = 667 Da [M+K] ⁺	79
B. Fragmentierungsdiagramme der ESI-MS Experimente	80
B.1. Bo-DYCC	81
B.2. Bo-DNCC	82
B.3. Bo-NCC-1	83
B.4. Bo-NCC-3	84
B.5. Reaktionsprodukt von Bo-DYCC	84
B.6. Reaktionsprodukt von Bo-DNCC	85
B.7. Reaktionsprodukt von Bo-NCC-3	86
C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken	87
C.1. Programm zur Erstellung von Fragmentierungsdiagrammen	87
C.2. Programm zur Erstellung von Chromatogrammen für LC-ESI-MS	89
C.3. Programm zur Erstellung von MS-Spektren	99

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]

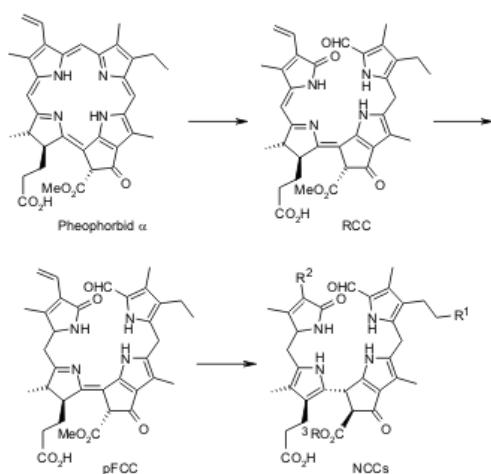


Abbildung 2.1.: Der Abbauprozess des Chlorophylls in seneszenten Blättern

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

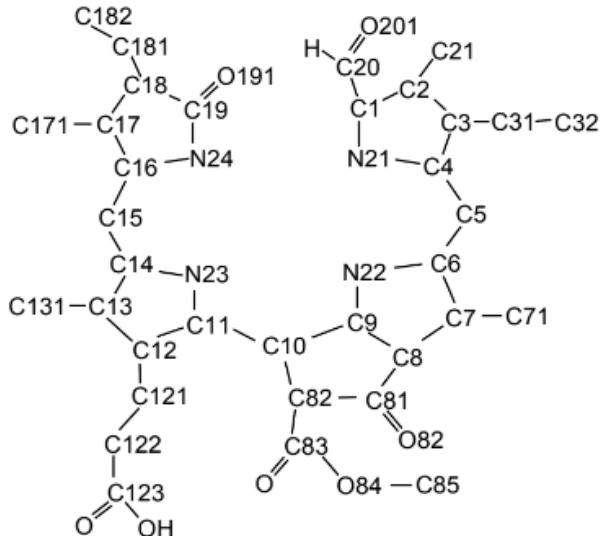


Abbildung 2.2.: Die Positionsangaben und Bezeichnung der Ringe, die in der restlichen Arbeit für Ausführungen sowie Erklärungen verwendet werden.

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.

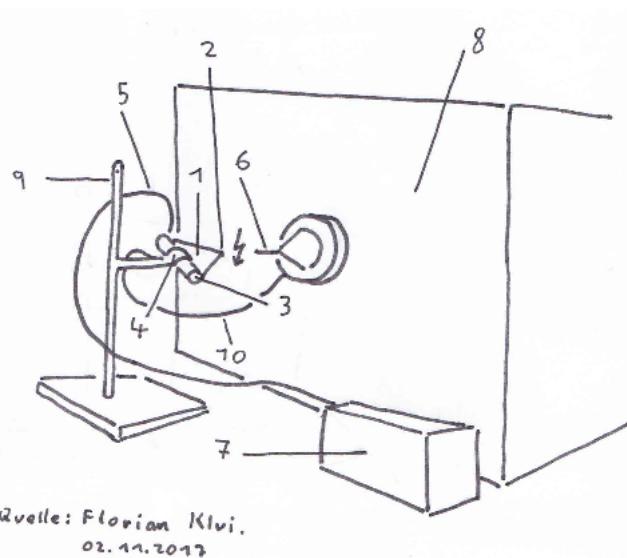


Abbildung 5.1.: Leafspray Versuchsaufbau: 1) Filterpapierdreick, 2) Spitze des Dreiecks, 3) Blattmaterial, von Filterpapier umschlossen, 4) Kupferklemme, 5) Kapillare für LM, 6) Einlass des Massenspektrometers (mit der markanten Spitze zwecks Verdeutlichung etwas übertrieben dargestellt), 7) Syringe 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. Experimente MS-Leafspray

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.

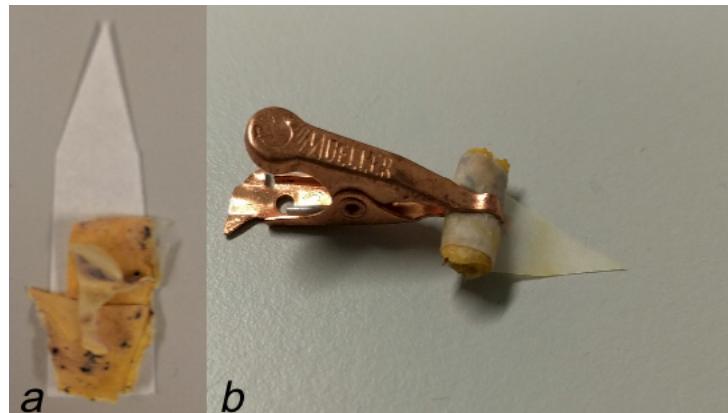


Abbildung 5.3.: MS Leafspray Blattvorbereitung: (a) zugeschnittenes Filterpapierdreieck, mit frischen, seneszenten Brokkoliblättern, (b) eingerolltes *Päckchen*, in Kupferklemme eingespannt

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.

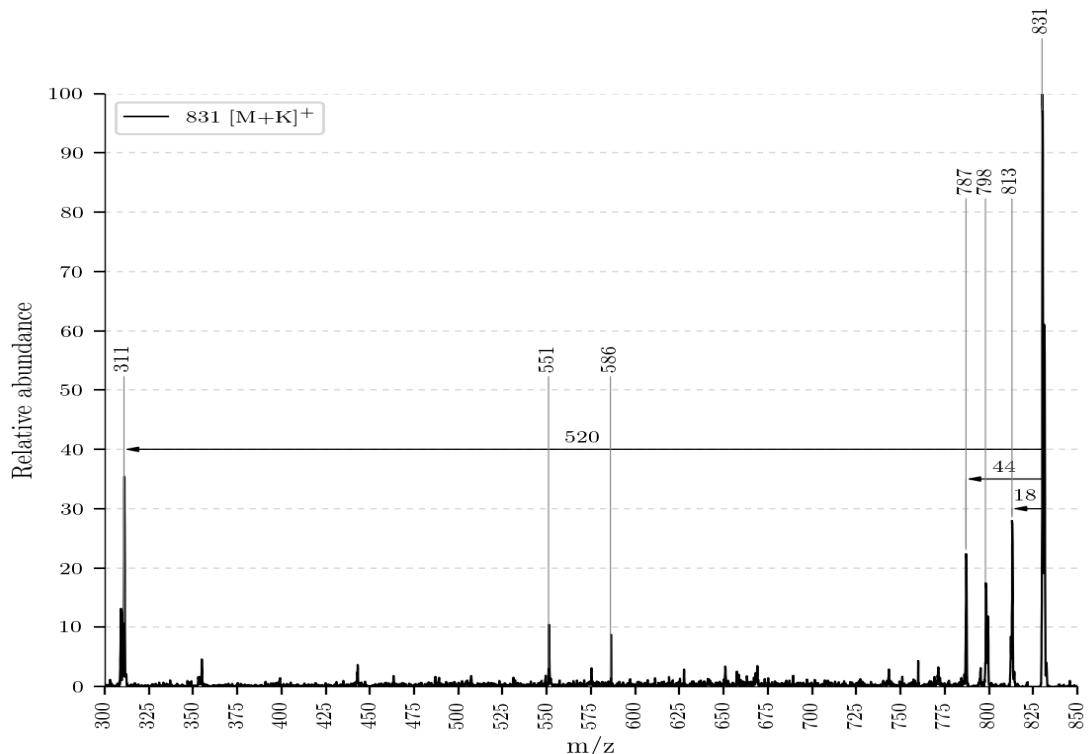


Abbildung 5.4.: ESI-MS von Bo-NCC-1 mit $m/z = 831 [M+K]^+$

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).

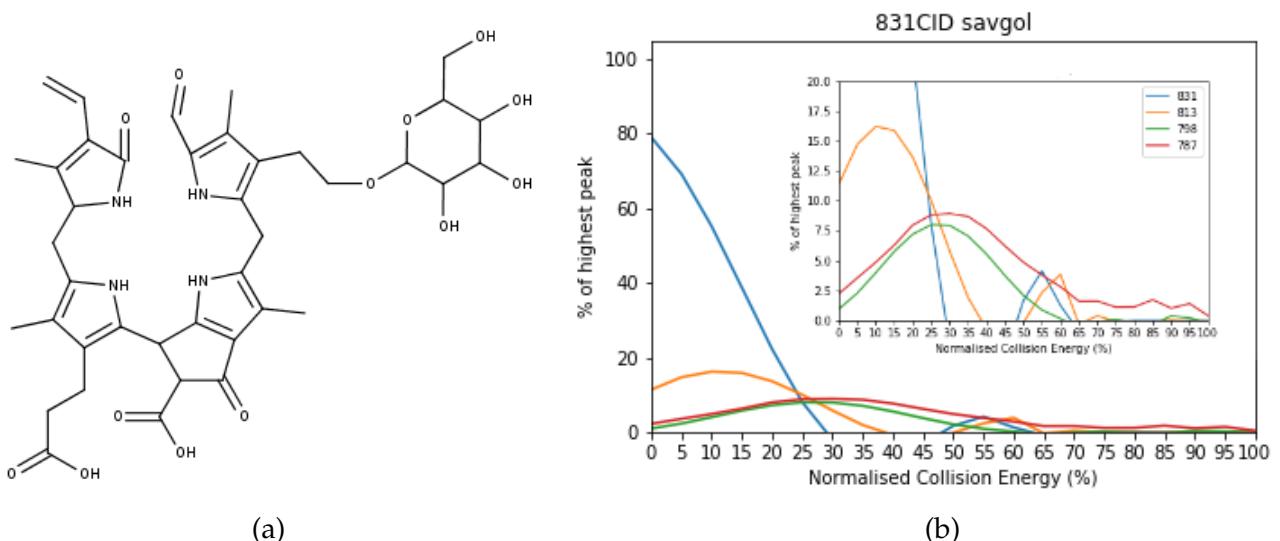


Abbildung 5.5.: (a) Strukturvorschlag des Bo-NCC-1 mit Summenformel $\text{C}_{40}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_{13}$, (b) Fragmentierungsdiagramm von Bo-NCC-1 (blau = 831 [$\text{M}+\text{K}^+$], orange = 813 [$\text{M}-\text{H}_2\text{O} + \text{K}^+$], grün = 798 [$\text{M} - (\text{MeOH} - \text{nAb.})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

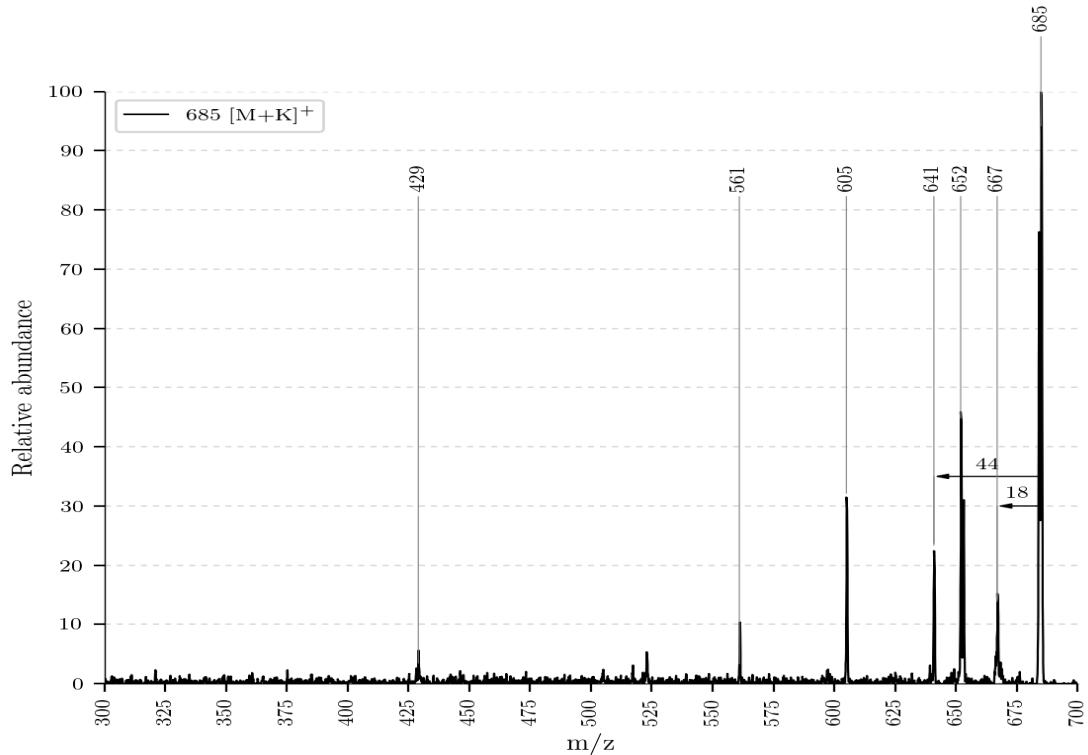


Abbildung 5.6.: ESI-MS von Bo-NCC-3 mit $m/z = 685 [M+K]^+$

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

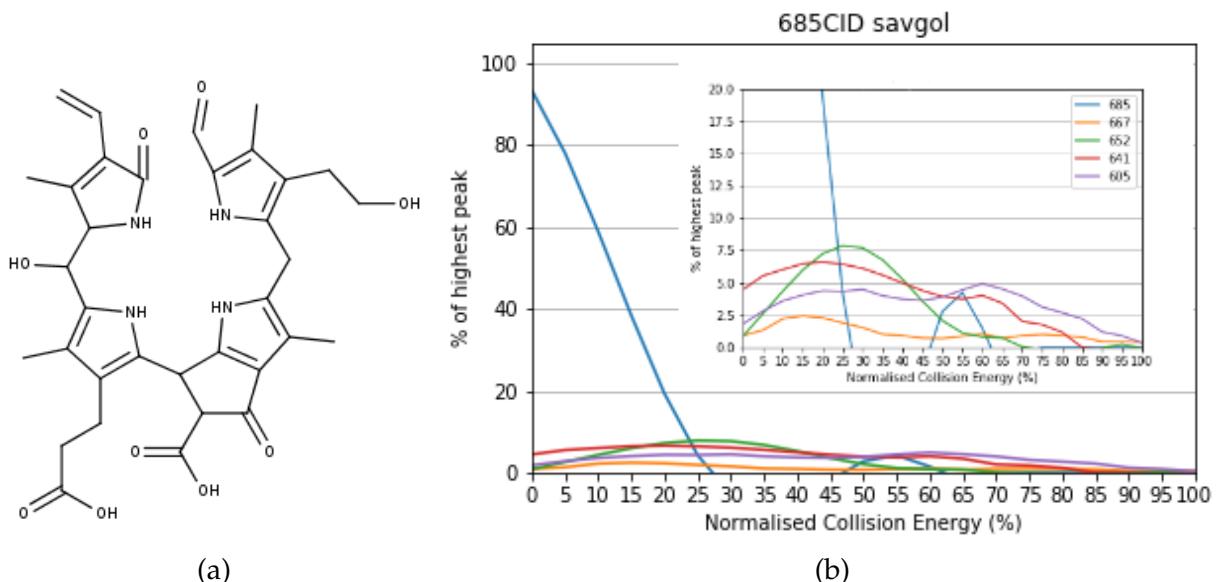


Abbildung 5.7.: (a) Strukturvorschlag von Bo-NCC-3 mit Summenformel $C_{34}H_{38}N_4O_9$, (b) Fragmentierungsdiagramm von Bo-NCC-3 (blau = $685 [M+K]^+$, orange = $667 [M - H_2O + K]^+$, grün = $652 [M - (MeOH?)] + K^+$, rot = $641 [M - CO_2 + K]^+$, violett = $605 [M - (nAb.) + K]^+$)

erreicht (bei einer NKE von 15 - H_2O im Vergleich zu 20 - CO_2).

Im Vergleich zum Bo-NCC-1 zeigt der Graph ein lokales Maximum der H_2O Abspaltung bei höheren Energien (beim Bo-NCC-3 bei 15 NKE wohingegen beim Bo-NCC-1 bereits bei 10 NKE). Das lokale Maximum der CO_2 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 CO_2 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. Experimente MS-Leafspray

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).

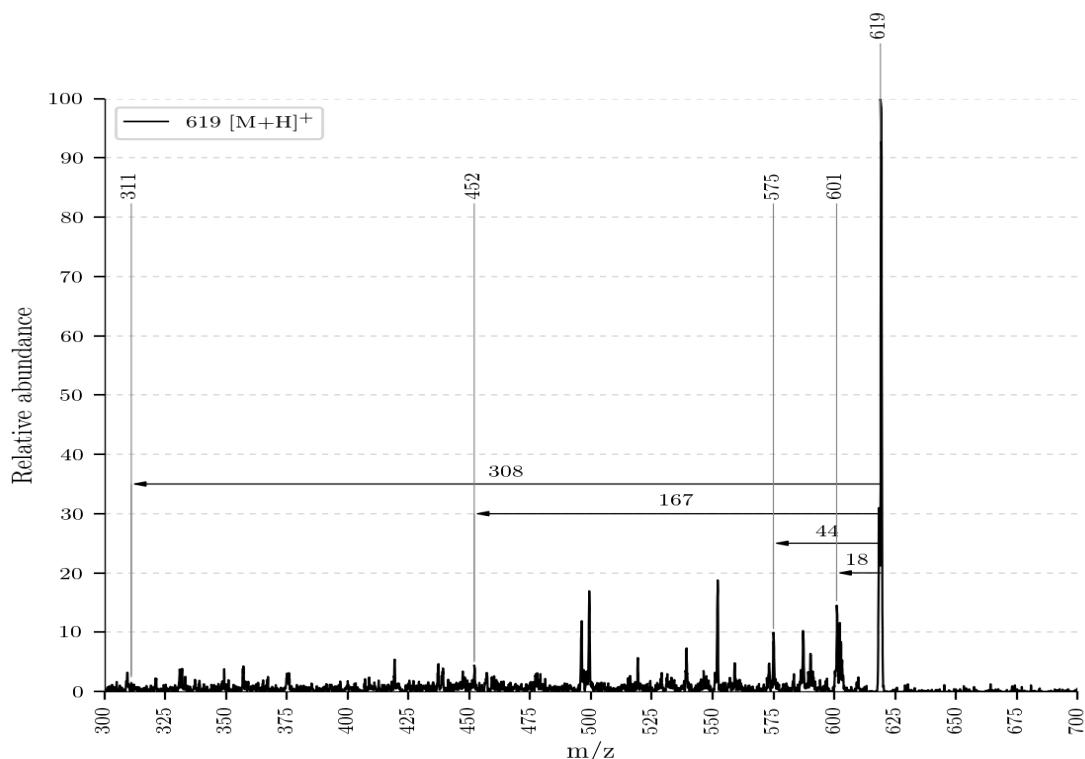


Abbildung 5.8.: ESI-MS von Bo-DNCC bei $m/z = 619 [M+H]^+$

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

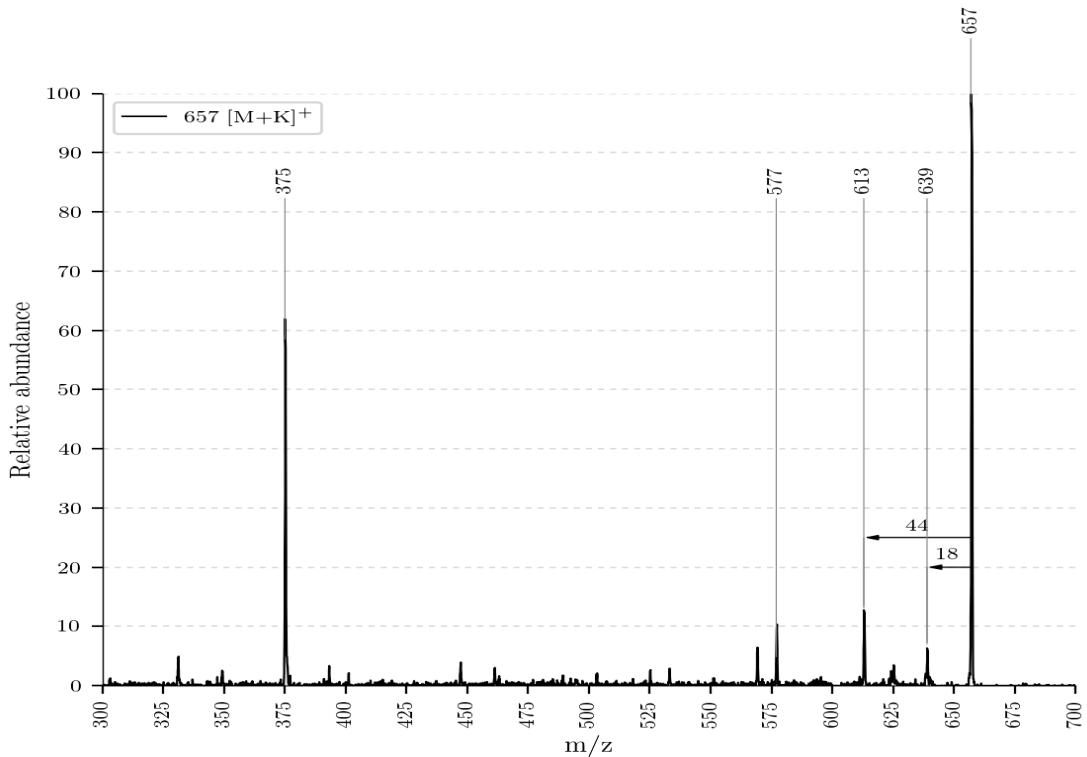


Abbildung 5.9.: ESI-MS von Bo-DNCC bei $m/z = 657$ $[M+K]^+$

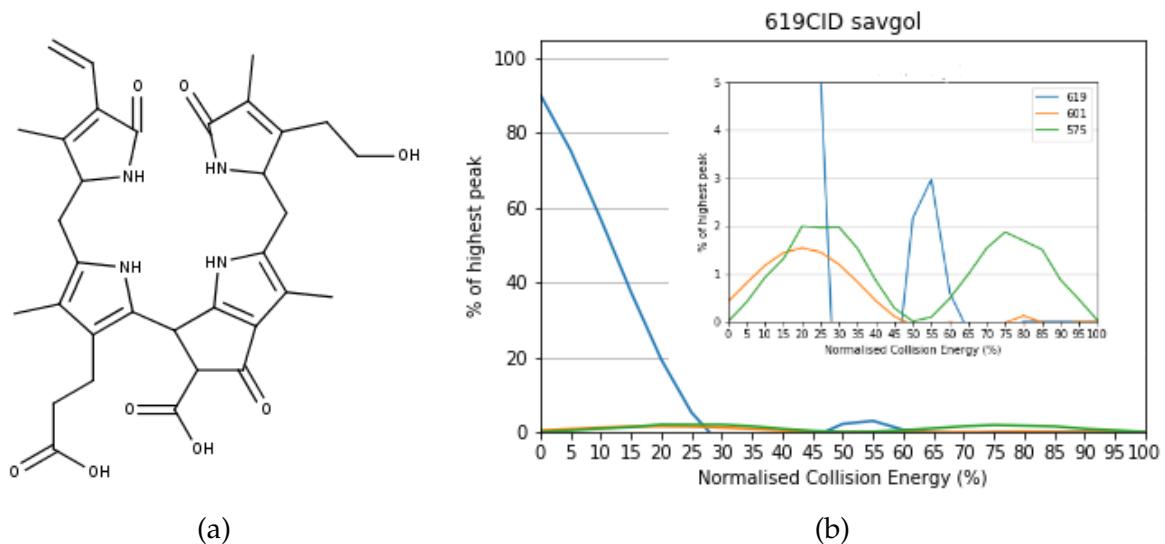


Abbildung 5.10.: (a) Strukturvorschlag von Bo-DNCC mit Summenformel $C_{33}H_{38}N_4O_8$, (b) Fragmentierungsdiagramm von Bo-DNCC (blau = 619 $[M+H]^+$, orange = 601 $[M - H_2O + H]^+$, grün = 575 $[M - H_2O + H]^+$)

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

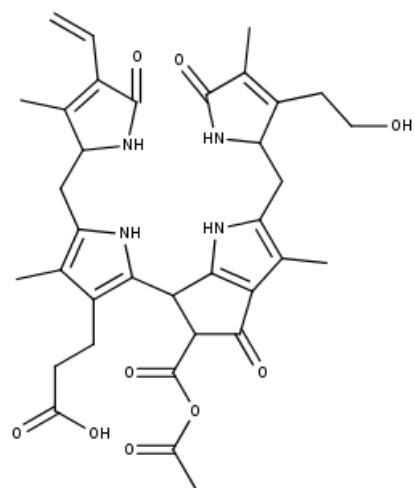


Abbildung 5.11.: Strukturvorschlag des Reaktionsproduktes mit Summenformel C₃₅H₄₁N₄O₉

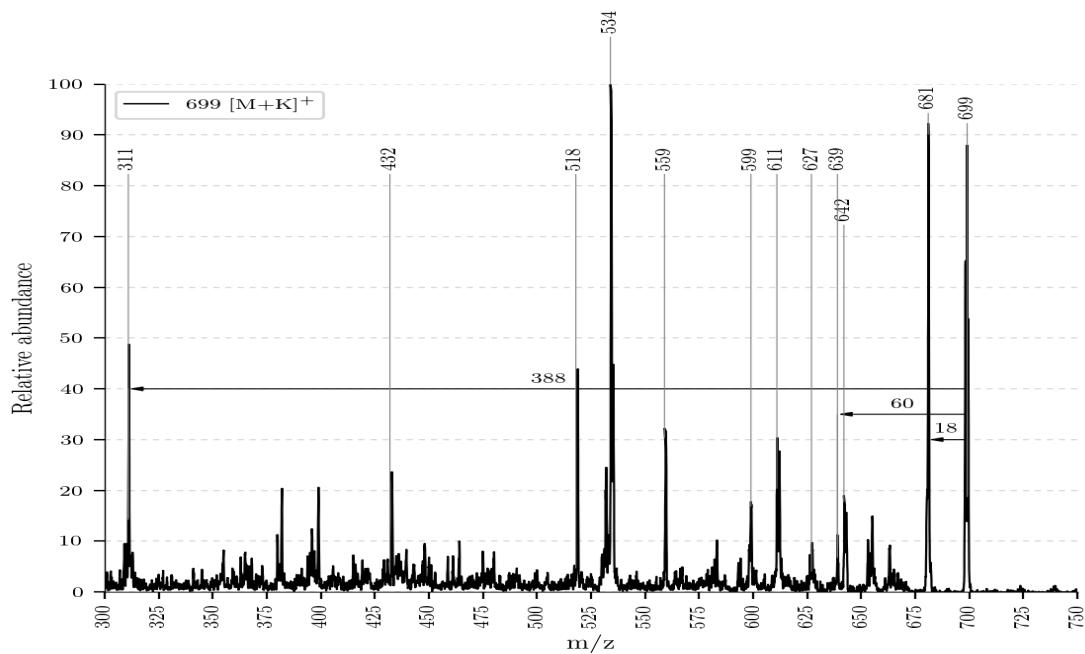


Abbildung 5.12.: ESI-MS Spektrum des Reaktionsproduktes mit m/z = 699 [M+K]⁺

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.

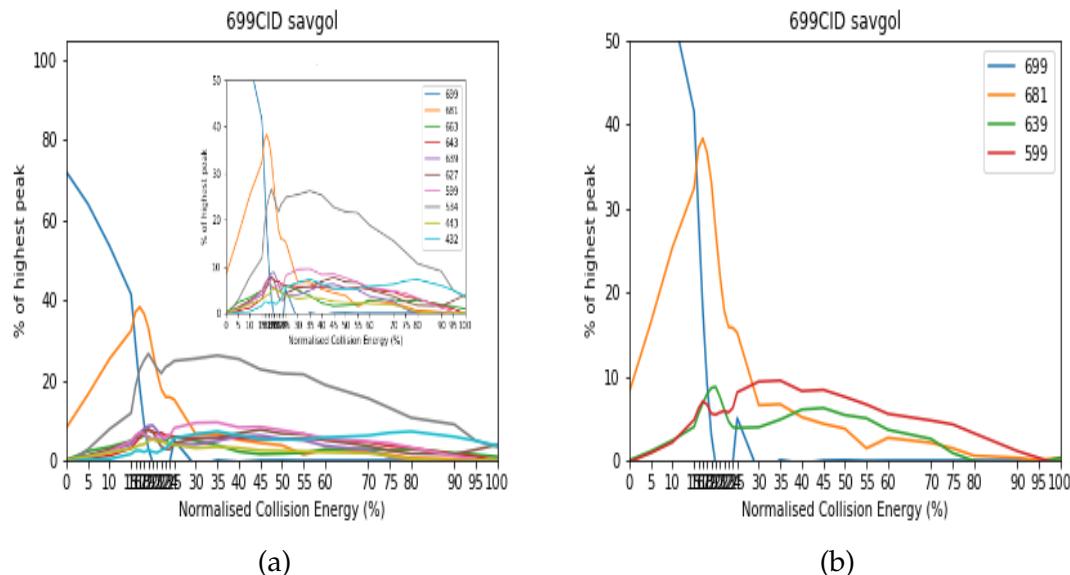


Abbildung 5.13.: (a) Fragmentierungsdiagramm des Bo-NCC-3 mit allen beobachteten Abspaltungen (blau = $699 [\text{M}+\text{K}]^+$, orange = $681 [\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{K}]^+$, grün = $663 [\text{M} - (2\text{xH}_2\text{O}) + \text{K}]^+$, rot = $643 [\text{M} - (\text{nAb.}) + \text{K}]^+$,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

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.

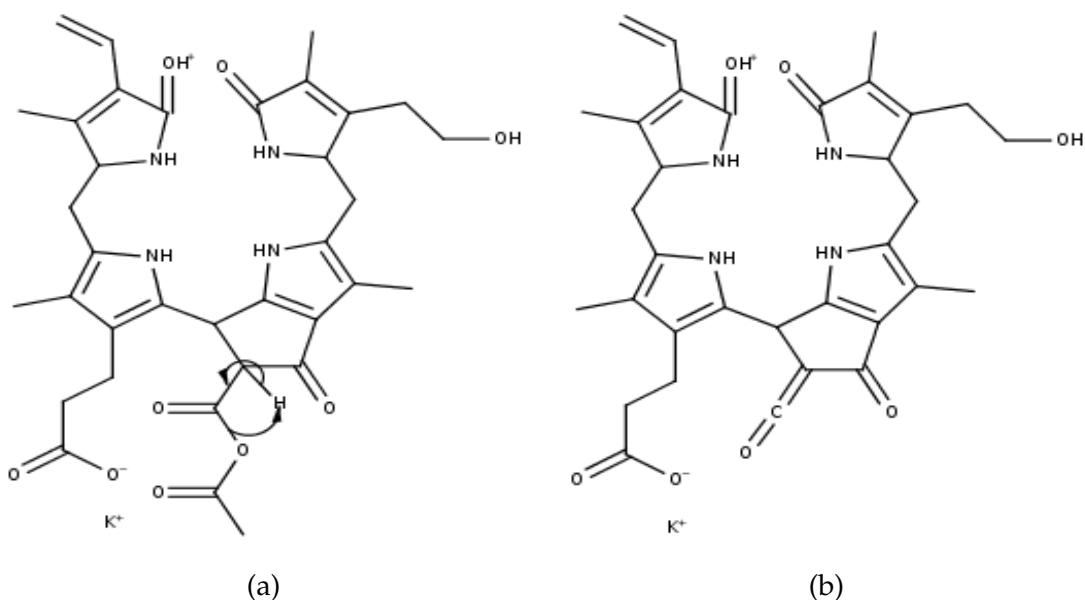


Abbildung 5.14.: (a) vorgeschlagener Mechanismus der Essigsäureabspaltung und (b) das Produkt, wobei CH_3COOH als stabiles Neutralteilchen abgespalten wird

5. Experimente MS-Leafspray

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.

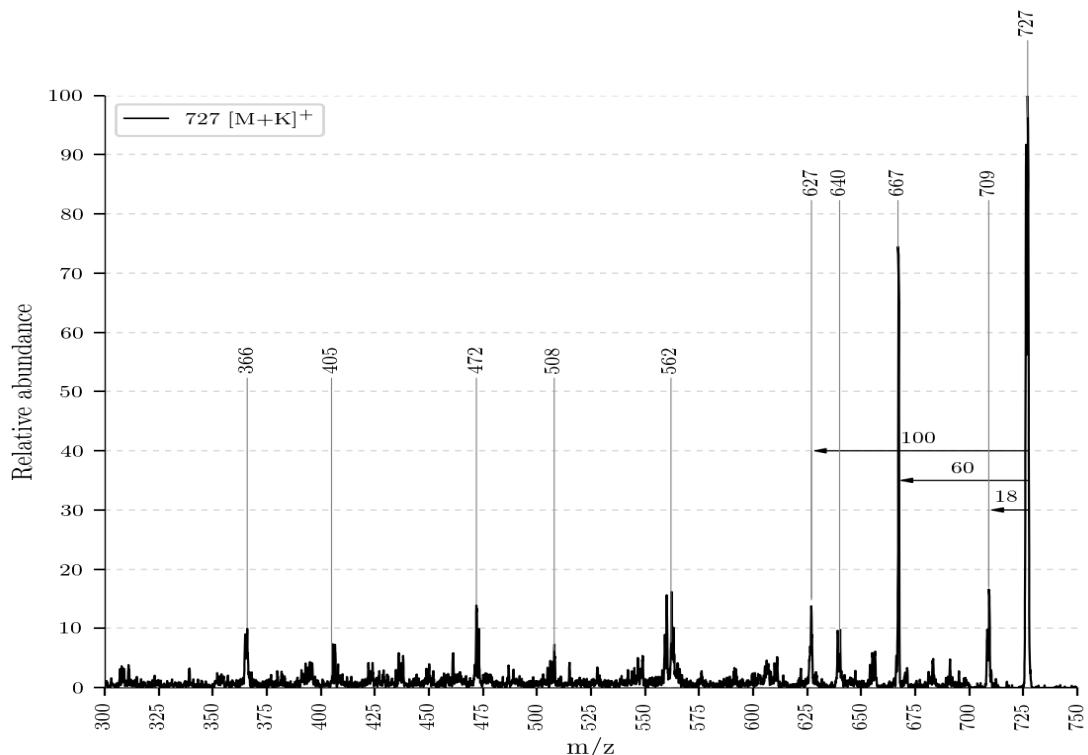


Abbildung 5.15.: ESI-MS Spektrum des Reaktionsproduktes bei $m/z = 727 [M+K]^+$

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

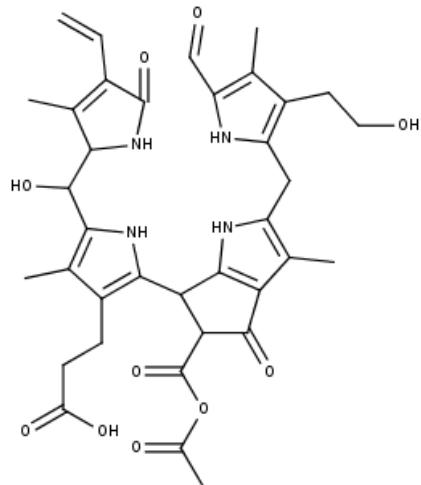


Abbildung 5.16.: Strukturvorschlag des Reaktionsproduktes mit Summenformel C₃₆H₄₀N₄O₁₀

darauf schließen, dass es sich bei dieser H₂O-Abspaltung um eine Abspaltung auf ein und derselben Position handelt. Als Position der Abspaltung wird die Hydroxygruppe an Position 32 des Chl-Kataboliten vorgeschlagen.

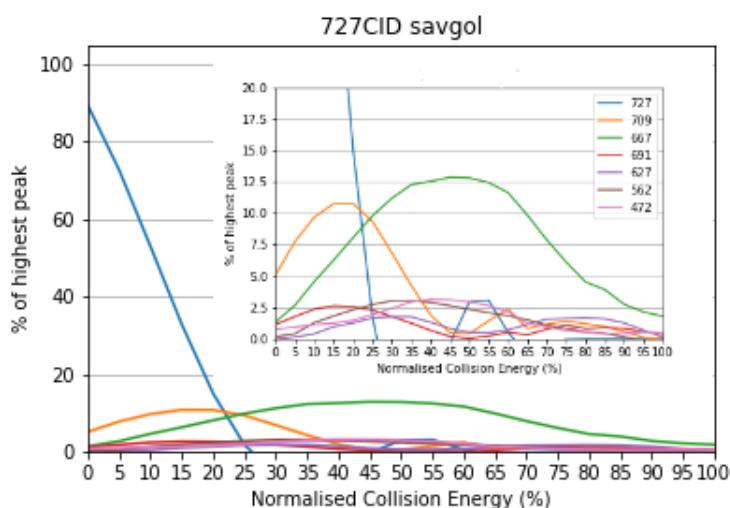


Abbildung 5.17.: Fragmentierungsdiagramm des Reaktionsproduktes (lbau = 727 [M+K]⁺, orange = 709 [M - H₂O + K]⁺, grün = 667 [M - CH₃COOH + K]⁺, rot = 691 [M - ? + K]⁺, violett = 627 [M - ? + K]⁺, braun = 562 [M - ? + K]⁺, pink = 472 [M - ? + K]⁺)

5. Experimente MS-Leafspray

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.

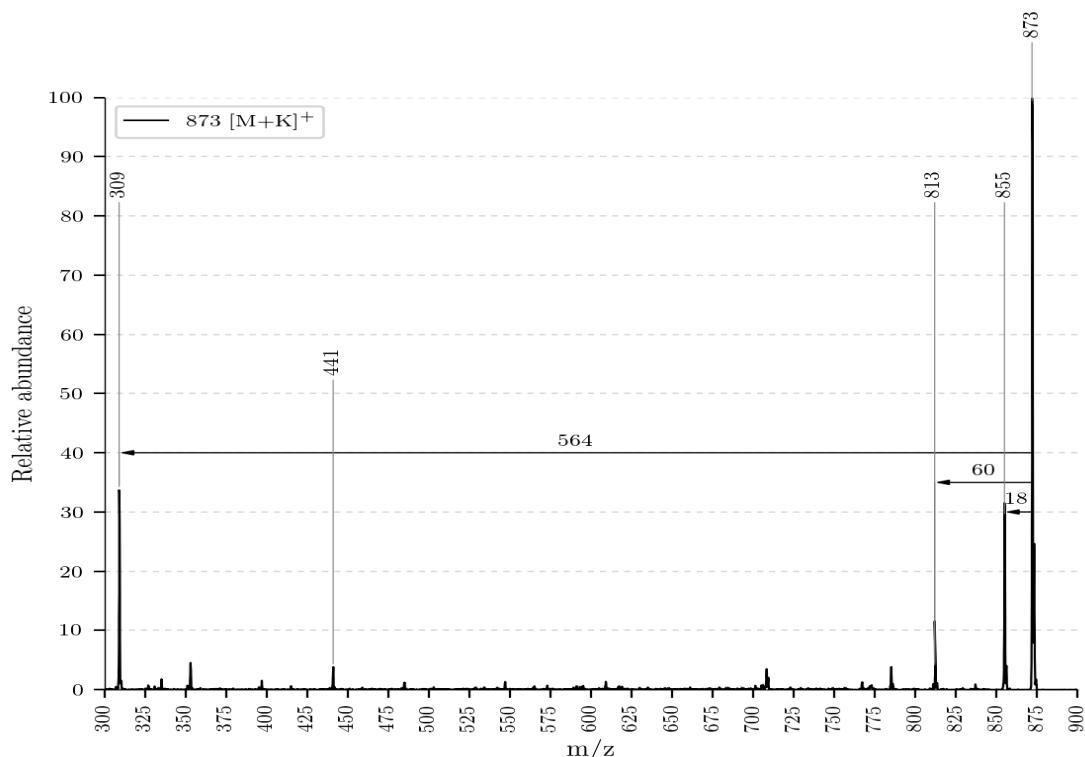


Abbildung 5.18.: ESI-MS des Reaktionsproduktes bei $m/z = 873 [M+K]^+$

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

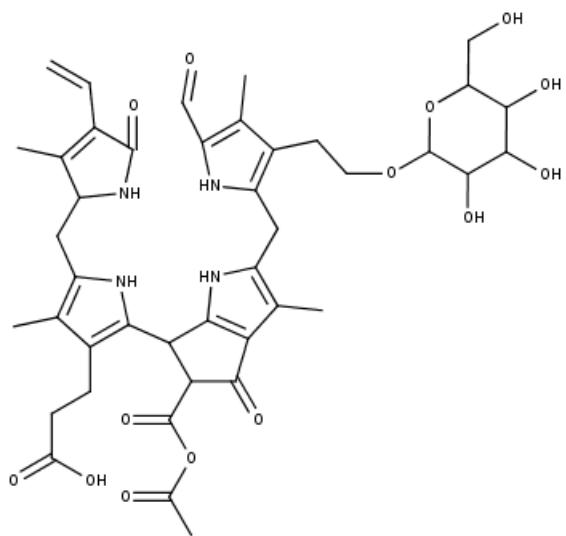


Abbildung 5.19.: Strukturvorschlag des Reaktionsproduktes mit Summenformel $C_{42}H_{50}N_4O_{14}$

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

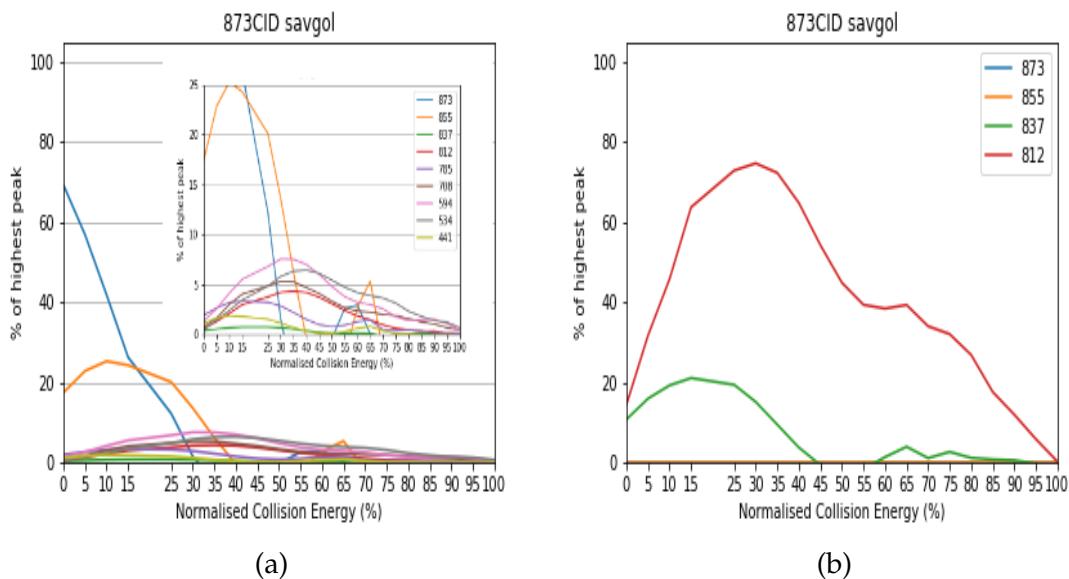


Abbildung 5.20.: Fragmentierungsdiagramm des Reaktionsproduktes: (a) Experiment am 13.09.2017 (11:00) - (blau = 873, orange = 855, grün = 837, rot = 812, violett = 765, braun = 708, pink = 594, grau = 534, hellgrün = 441), (b) Experiment am 13.09.2017 (09:45) - schlechter gelungen, weswegen die Abspaltungen 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. Experimente LC-MS

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

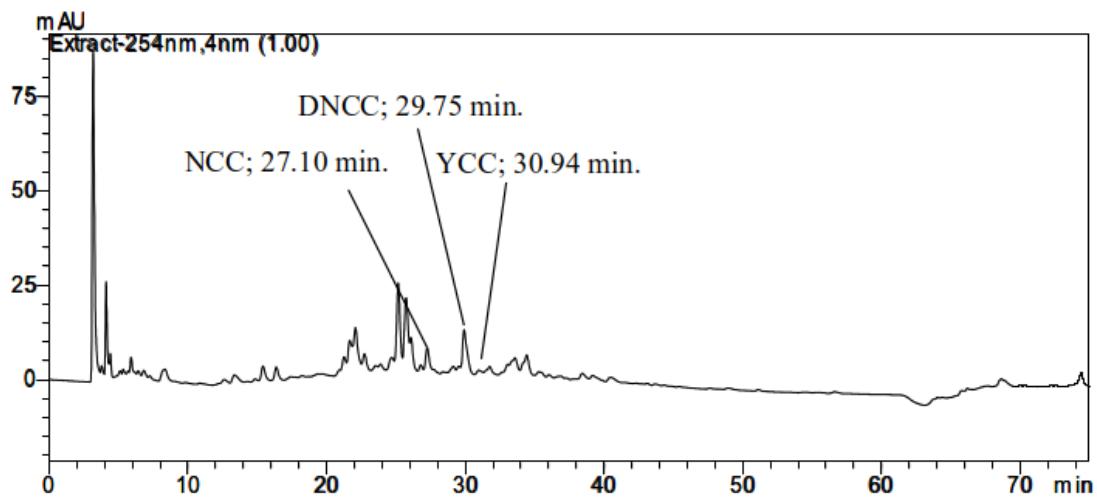


Abbildung 6.1.: HPLC Chromatogramm - die hervorgehobenen Peaks entsprechen den Retentionszeiten und der Art der Chl-Kataboliten, die über ein Online-UV/Vis Spektrum bestimmt wurden; gefunden wurden ein NCC bei 27.10min. (Abbildung 7.10a), ein DNCC bei 29.75min. (Abbildung 7.10b) und ein YCC bei 30.94min.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

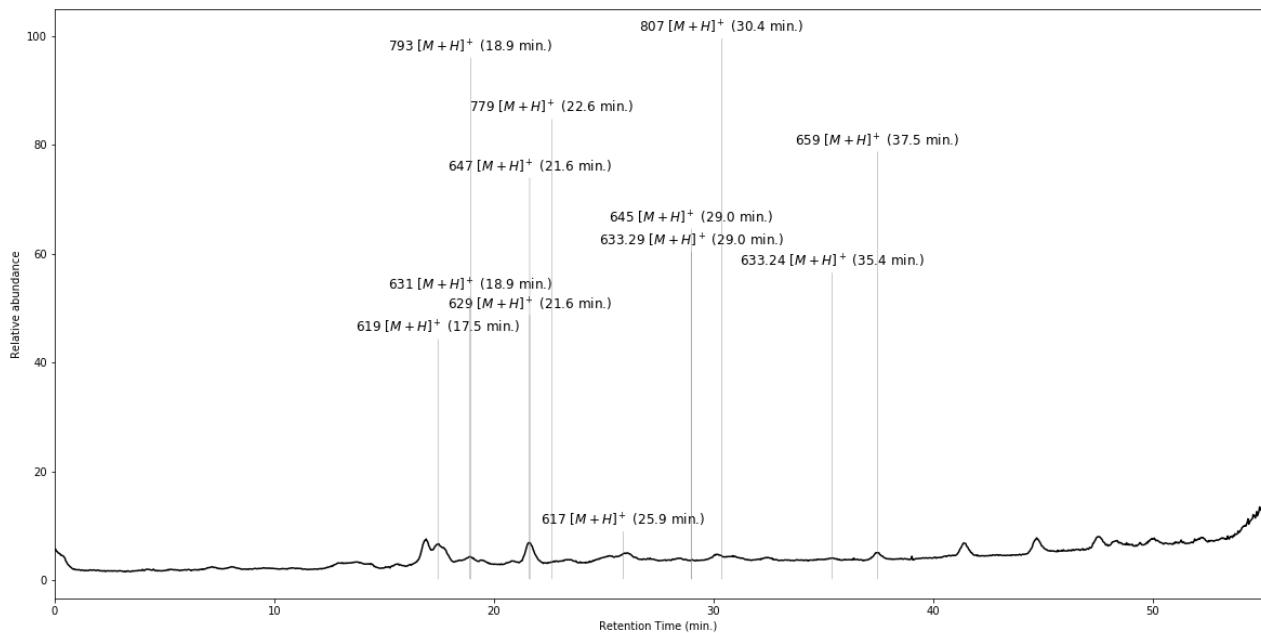


Abbildung 6.2.: LC-MS Chromatogramm

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).

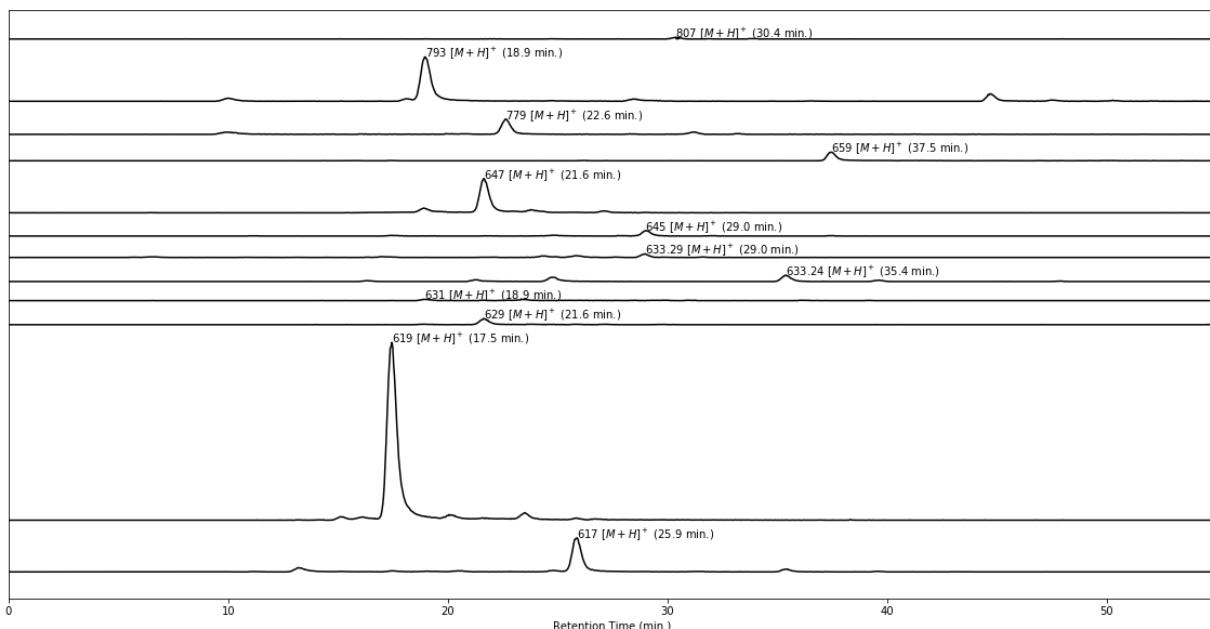


Abbildung 6.3.: LC-MS Chromatogramm zur besseren Darstellung von Überlagerungen von Chlorophyllkataboliten, um diverse unlogische Schlüsse besser verstehen zu können

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

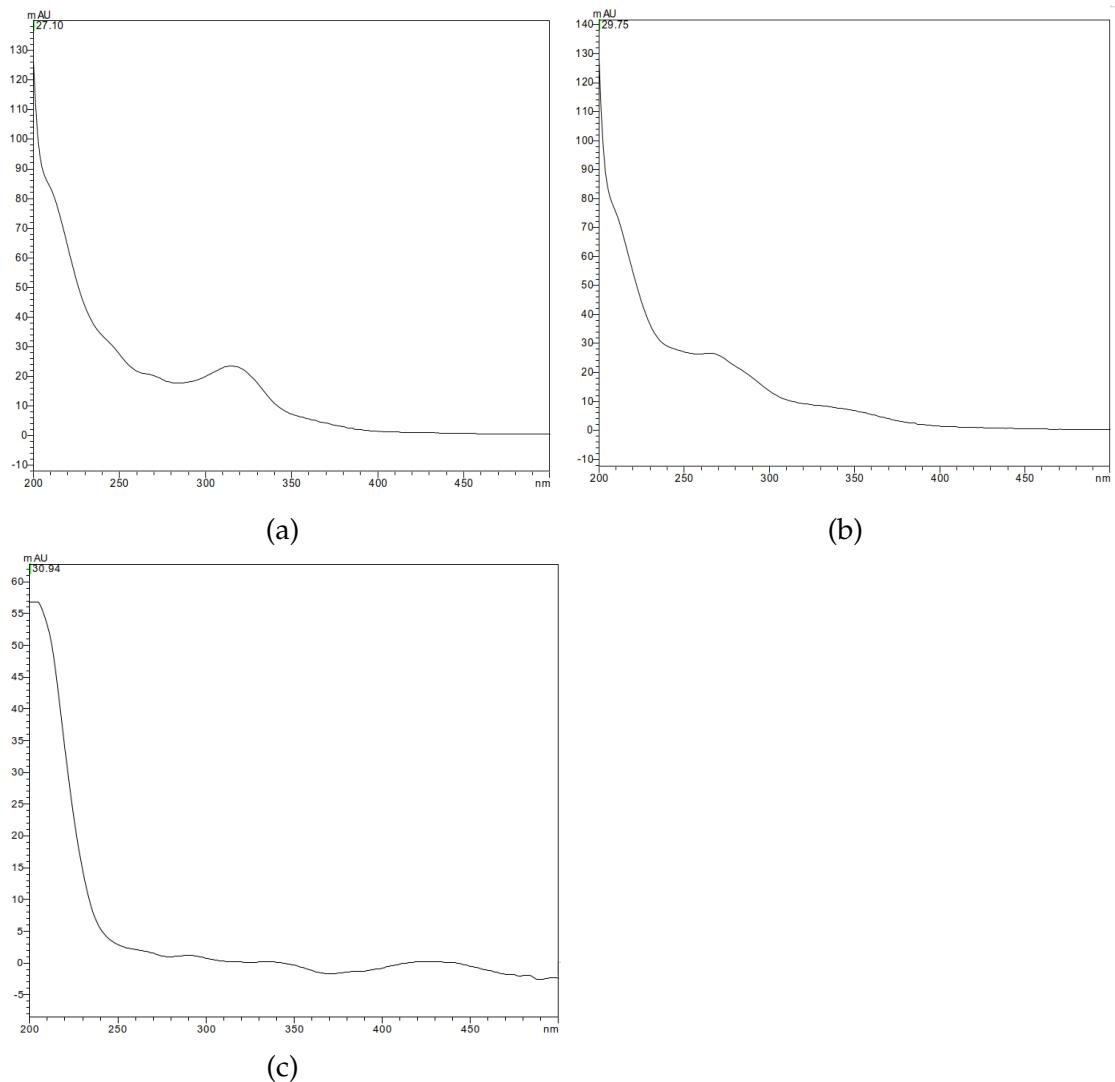


Abbildung 6.4.: Online-UV/Vis Spektren: (a) charakteristisch für einen NCC - RT = 27.25min.,
(b) charakteristisch für einen DNCC - RT = 29.91min., (c) charakteristisch für
einen YCC - RT = 30.94min.

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.

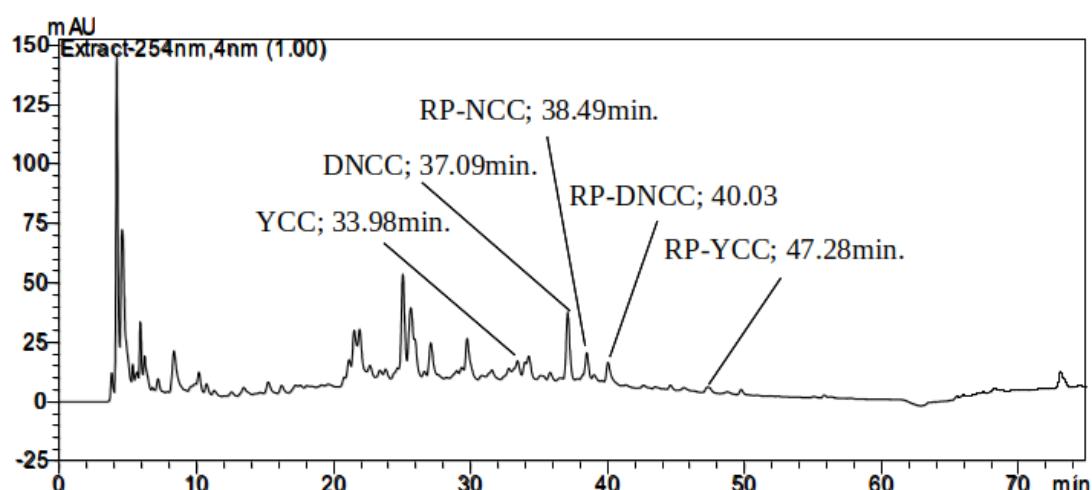


Abbildung 6.5.: HPLC Chromatogramm, gefunden wurden Reaktionsprodukte mit den Eigen-schaften eines NCCs (RT = 38.49min.), eines DNCCs (RT = 40.03min.), eines YCCs (RT = 47.28min.) und eines weiteren DNCCs (37.09min.); beim YCC bei RT = 33.98min. könnte es sich um einen weiteren Chl-Kataboliten handeln

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).

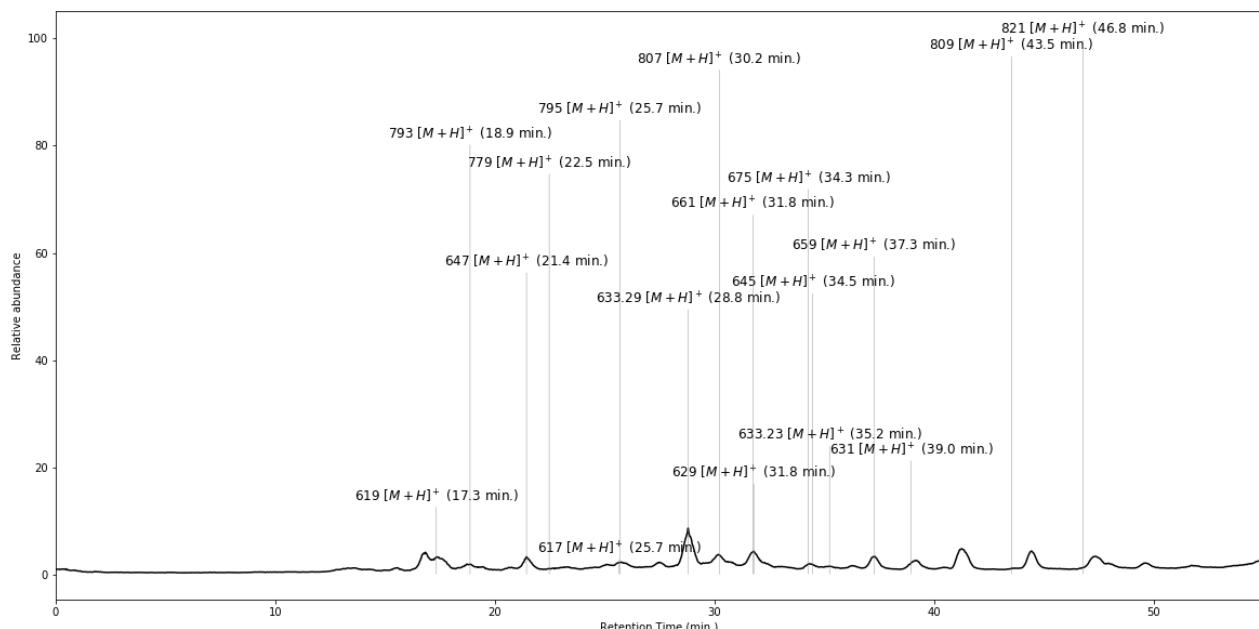


Abbildung 6.6.: LC-MS Chromatogramm

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.

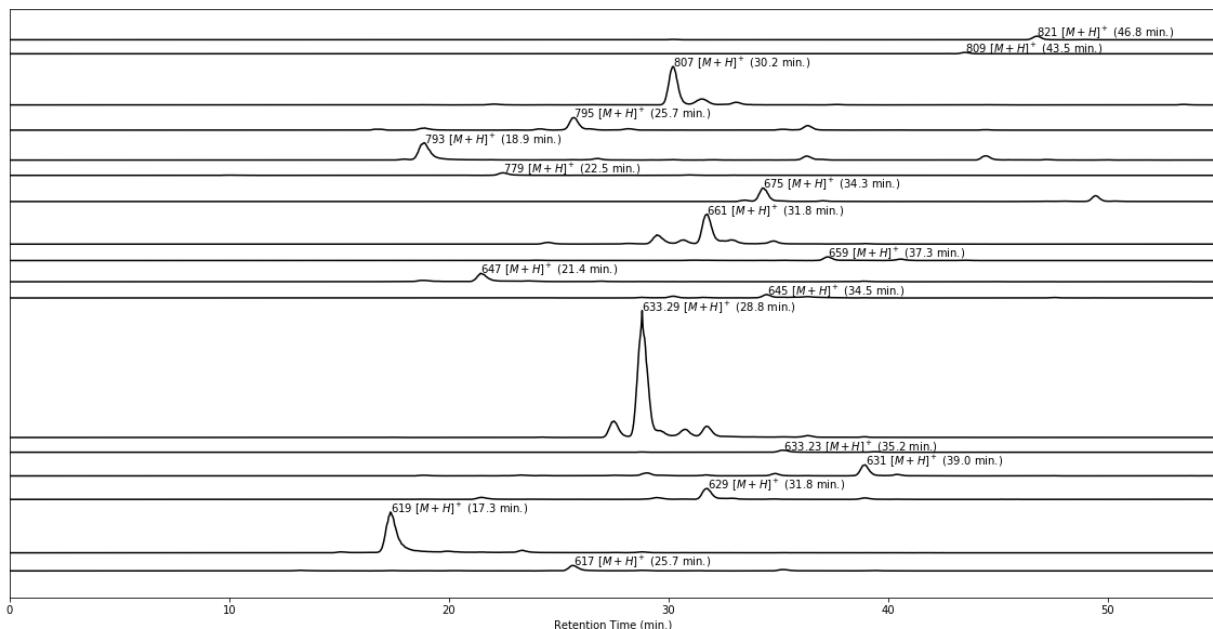


Abbildung 6.7.: LC-MS Chromatogramm

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).

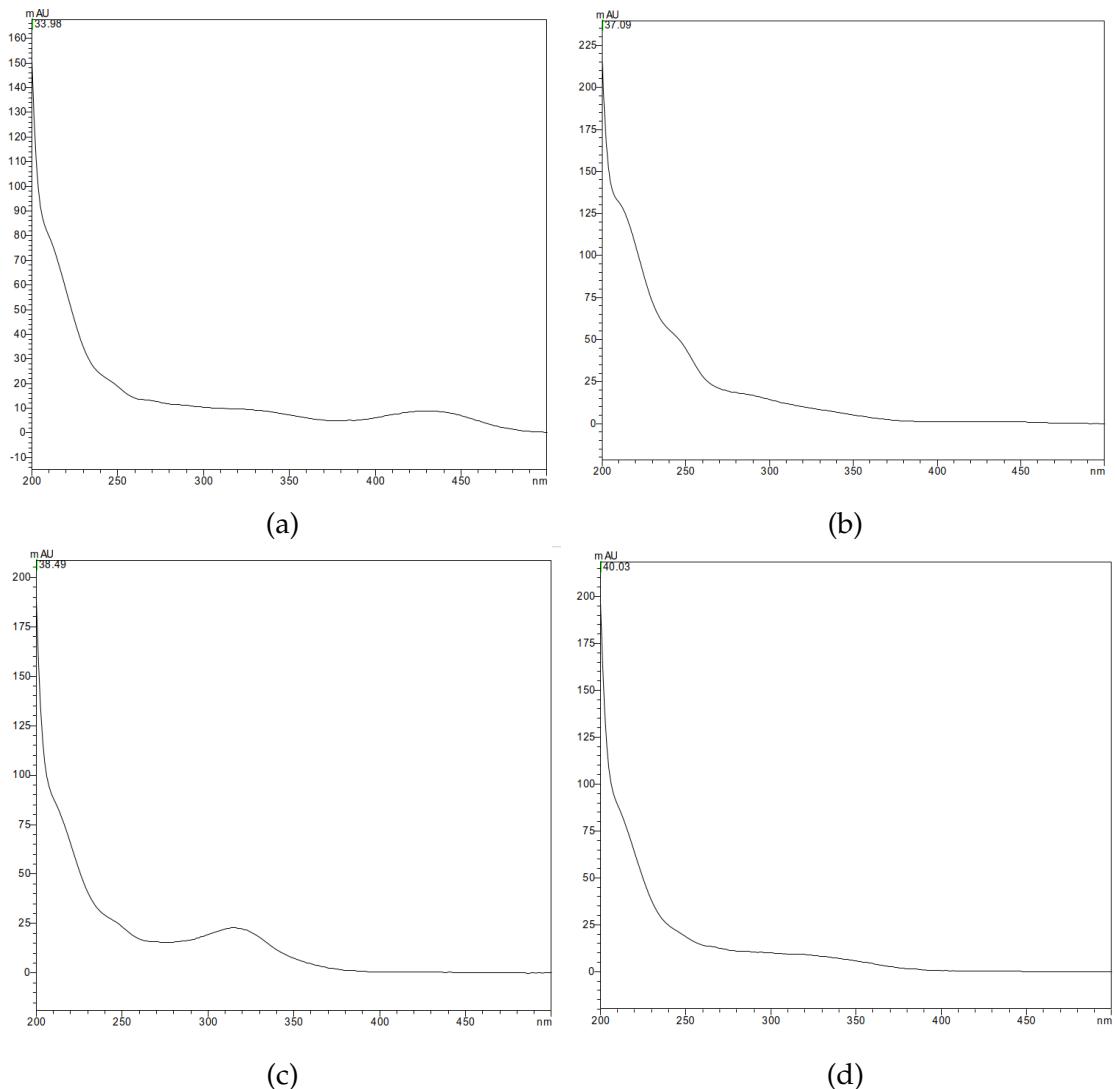


Abbildung 6.8.: Online-UV/Vis Spektren: charakteristisch für (a) YCC - RT = 33.98min., (b) DNCC - RT = 37.09min., (c) NCC - RT = 38.94min., (d) DNCC - RT = 40.03min., (e) YCC - RT = 47.28min.

6. Experimente LC-MS

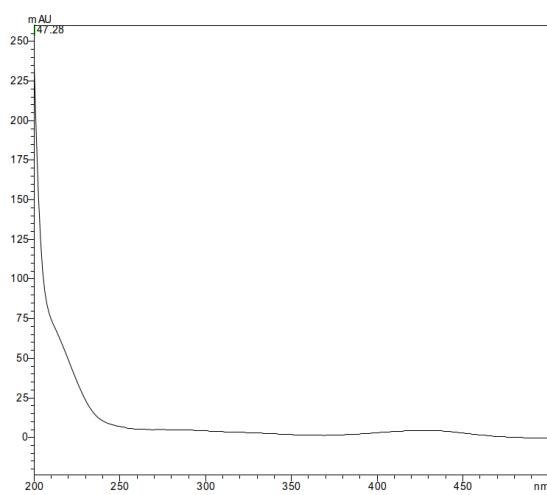


Abbildung 6.9.

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

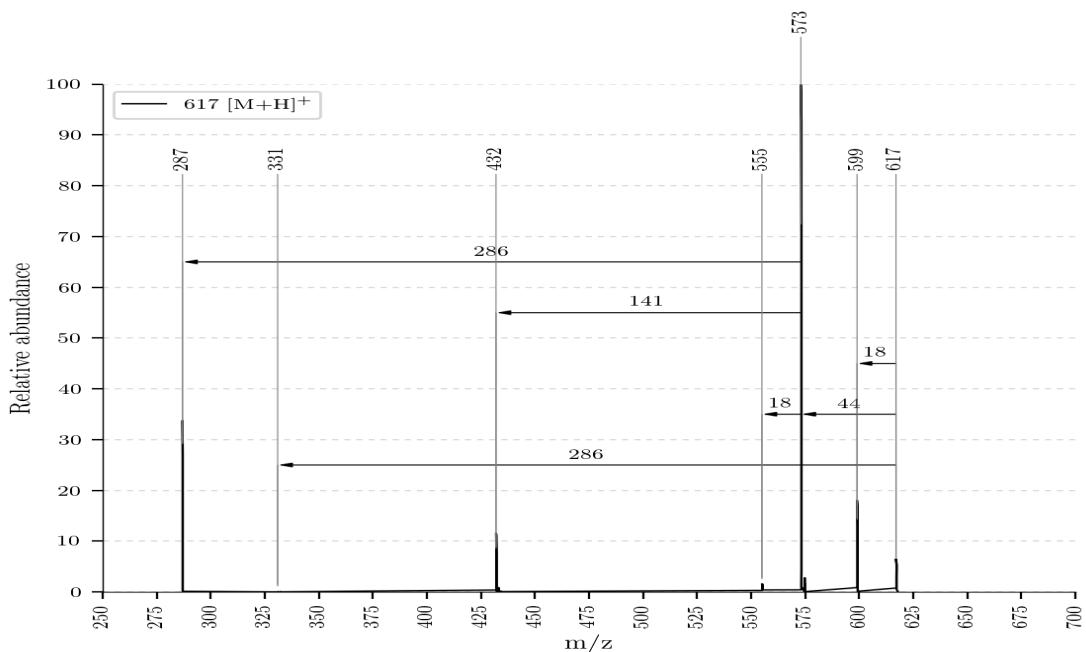


Abbildung 7.1.: ESI-MS Spektrum von Bo-DYCC mit $m/z = 617$ $[M+H]^+$

Die Struktur des Bo-DYCC wird wie in Abbildung 7.2 vorgeschlagen. Aufgrund der CO_2 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.

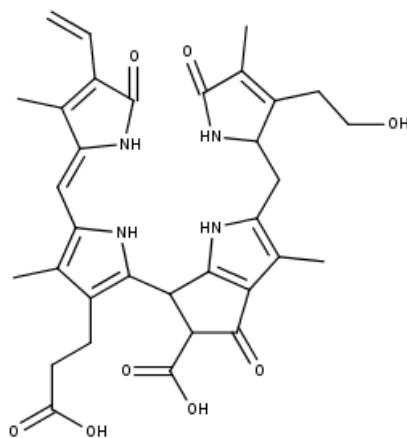


Abbildung 7.2.: Strukturvorschlag von Bo-DYCC mit Summenformel $C_{33}\text{H}_{36}\text{N}_4\text{O}_8$

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.

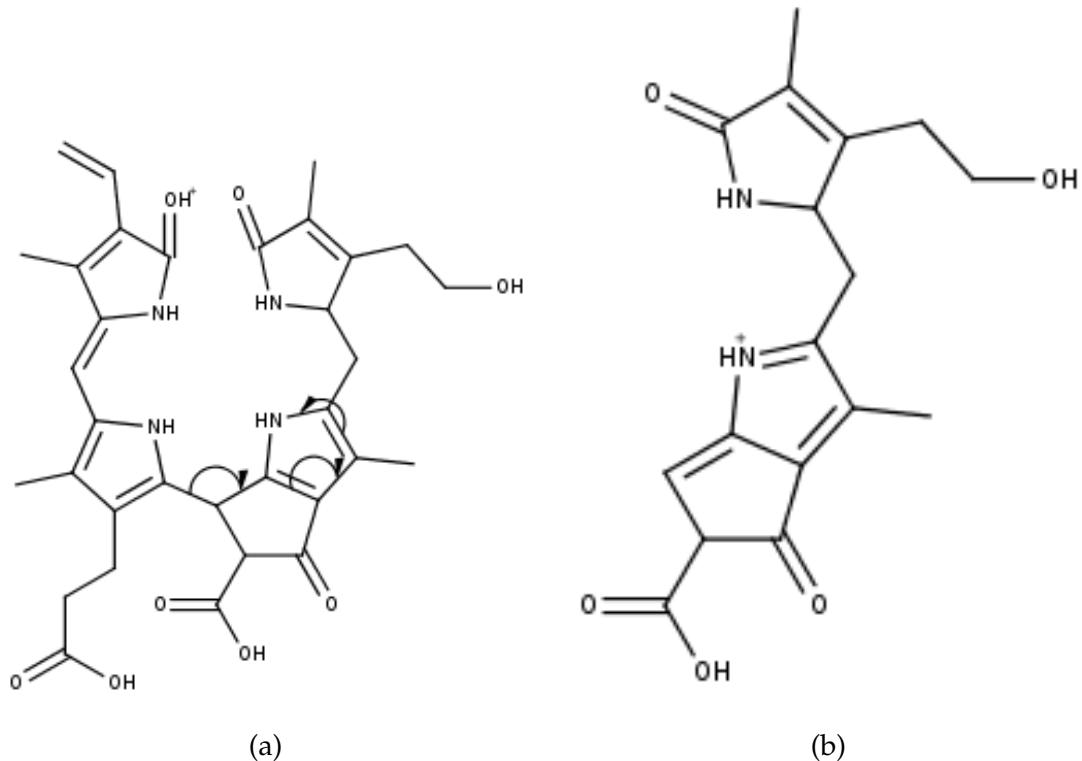


Abbildung 7.3.: mechanistischer Vorschlag für die Abspaltung von Ring C und Ring D: (a) vorgeschlagene Bewegung der Elektronen, (b) Resultat der Abspaltung bei $m/z = 331 [M - (\text{Ring C, Ring D}) + H]^+$ und Summenformel $C_{17}H_{19}O_5N_2$

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).

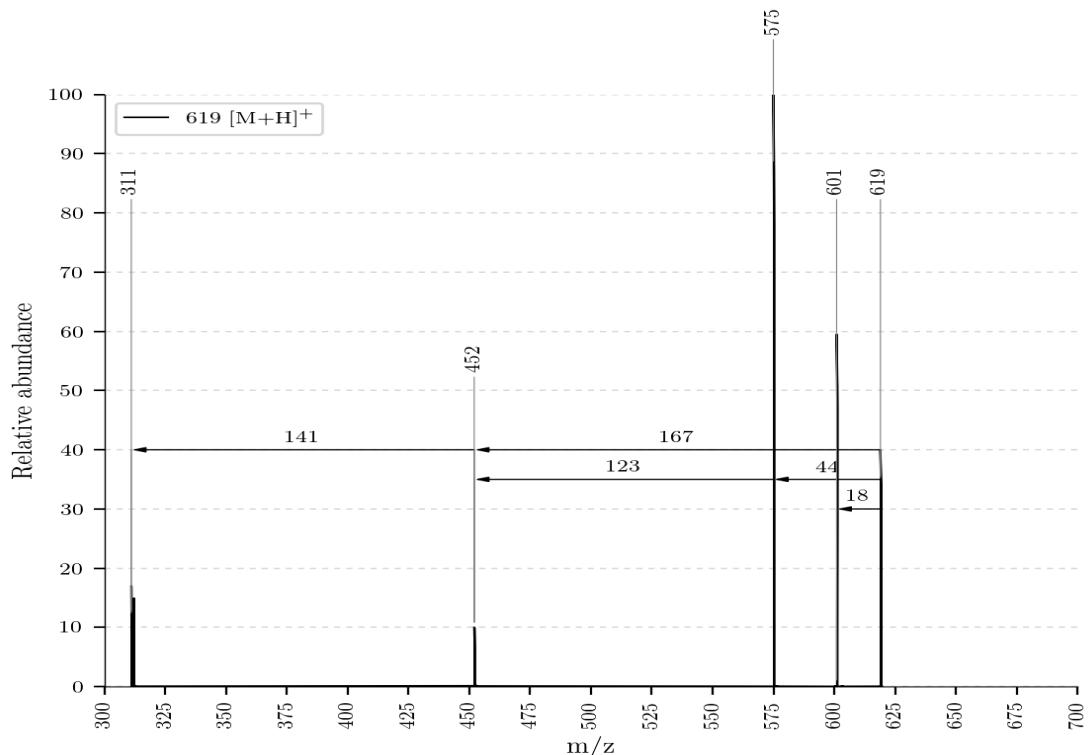


Abbildung 7.4.: ESI-MS Spektrum von Bo-DNCC bei $m/z = 619 [M+H]^+$

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

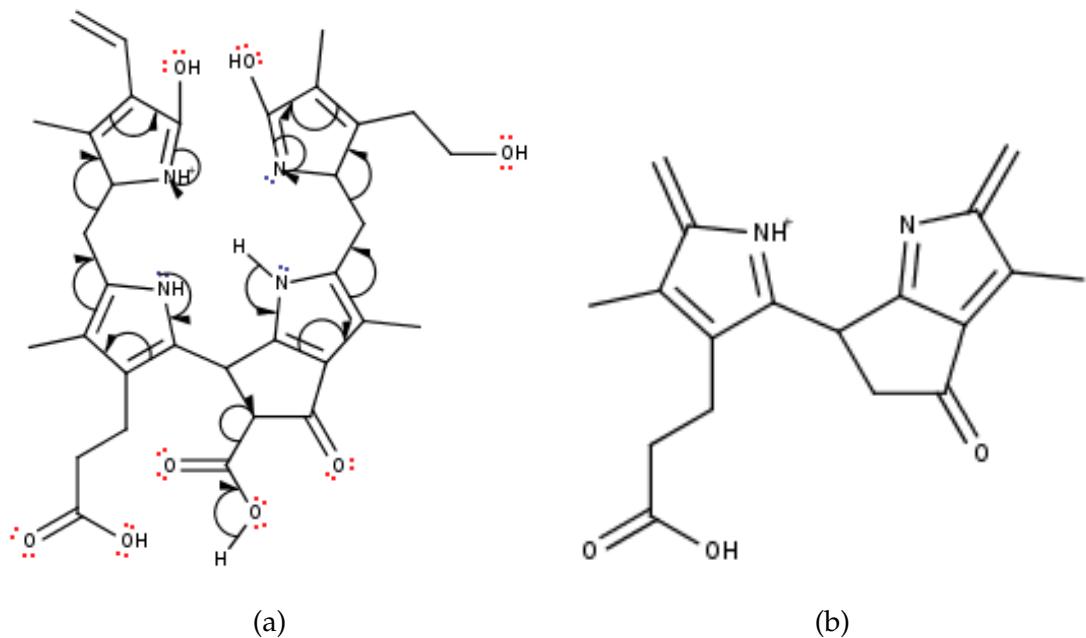
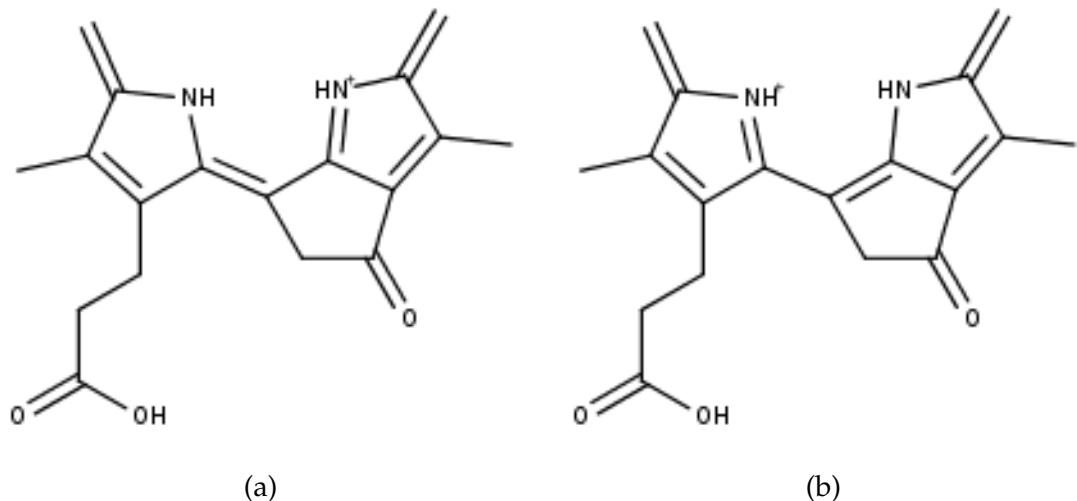


Abbildung 7.5.: vorgeschlagener Abspaltungsmechanismus von Ring D und Ring A: (a) vorgeschlagene Elektronenbewegung, (b) Mesomer 1 der Abspaltung mit $m/z = 311$ $[M - (\text{Ring D, Ring A}) + \text{H}]^+$ und Summenformel $C_{18}\text{H}_{19}\text{O}_3\text{N}_2$



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).

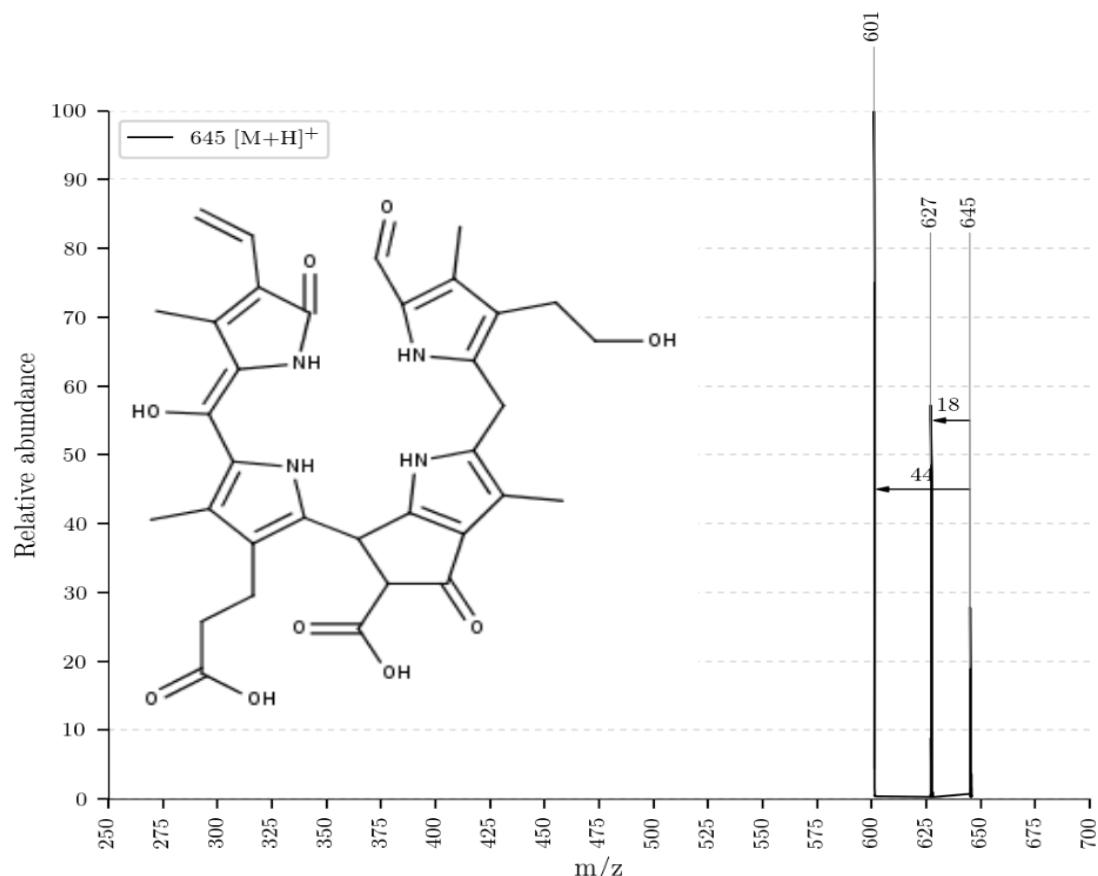


Abbildung 7.7.: ESI-MS Spektrum von Bo-YCC mit $m/z = 645 [M+H]^+$ und Strukturvorschlag mit Summenformel $C_{34}H_{36}O_9N_4$

Die Abspaltung von CO_2 hilft, ihn vom Dimethylierungsprodukt des Bo-DYCC zu unterscheiden. Es wird deswegen an Position 8² 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.

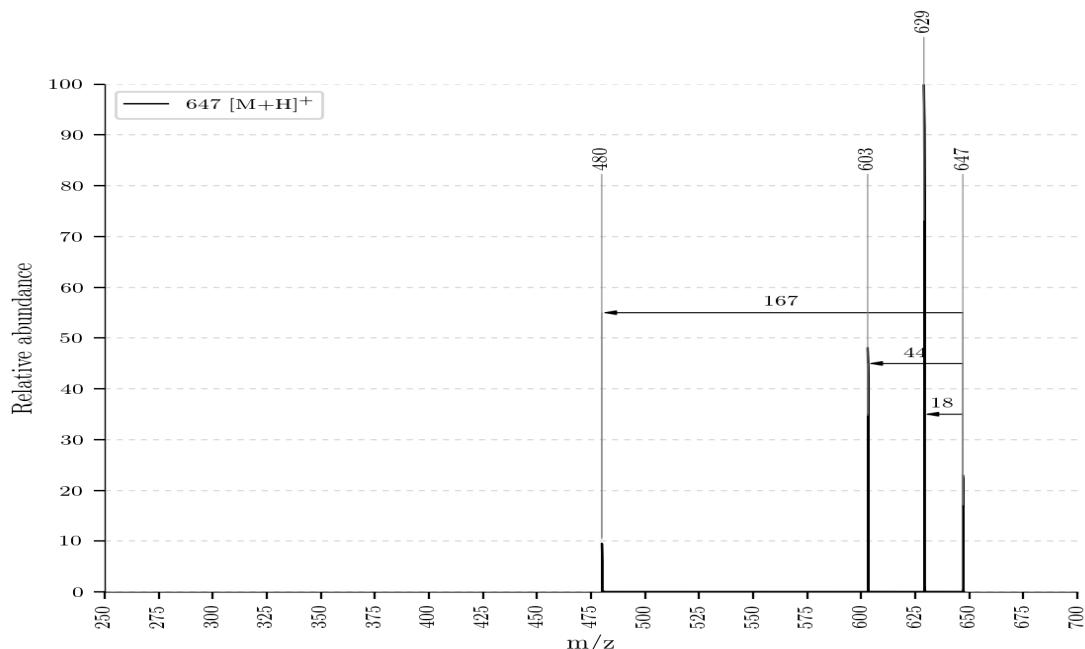


Abbildung 7.8.: ESI-MS Spektrum von Bo-NCC-3 mit $m/z = 647 [M+H]^+$

7. Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

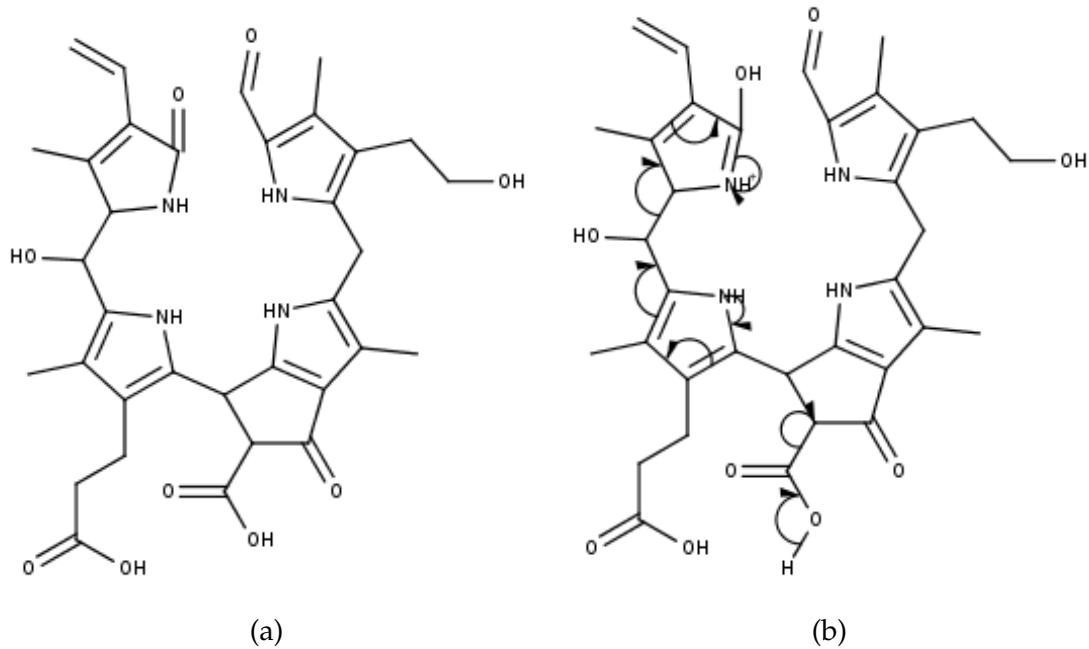


Abbildung 7.9.: (a) Strukturvorschlag von Bo-NCC-3 mit Summenformel C₃₄H₃₉O₉N₄, (b) vorgeschlagener Mechanismus für die Abspaltung von Ring D mit CO₂

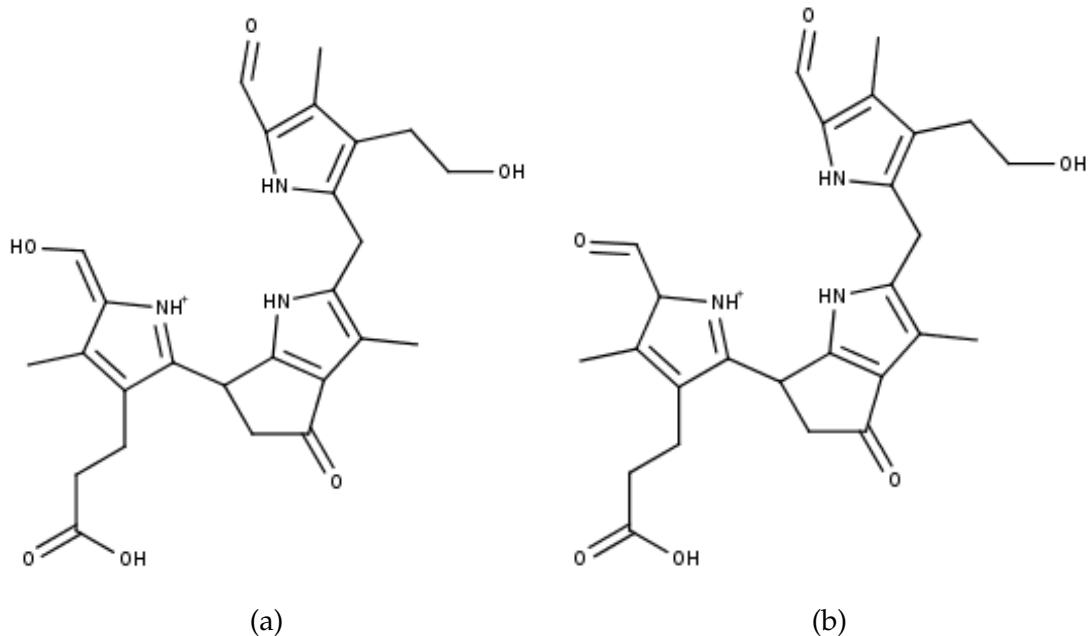


Abbildung 7.10.: vorgeschlagene Keto-/Enoltautomerie beim Abspaltungsprodukt von Ring D mit Summenformel C₂₆H₃₀O₆N₃; (a) Enolform, (b) Aldehyd (vermutlich stabiler)

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.

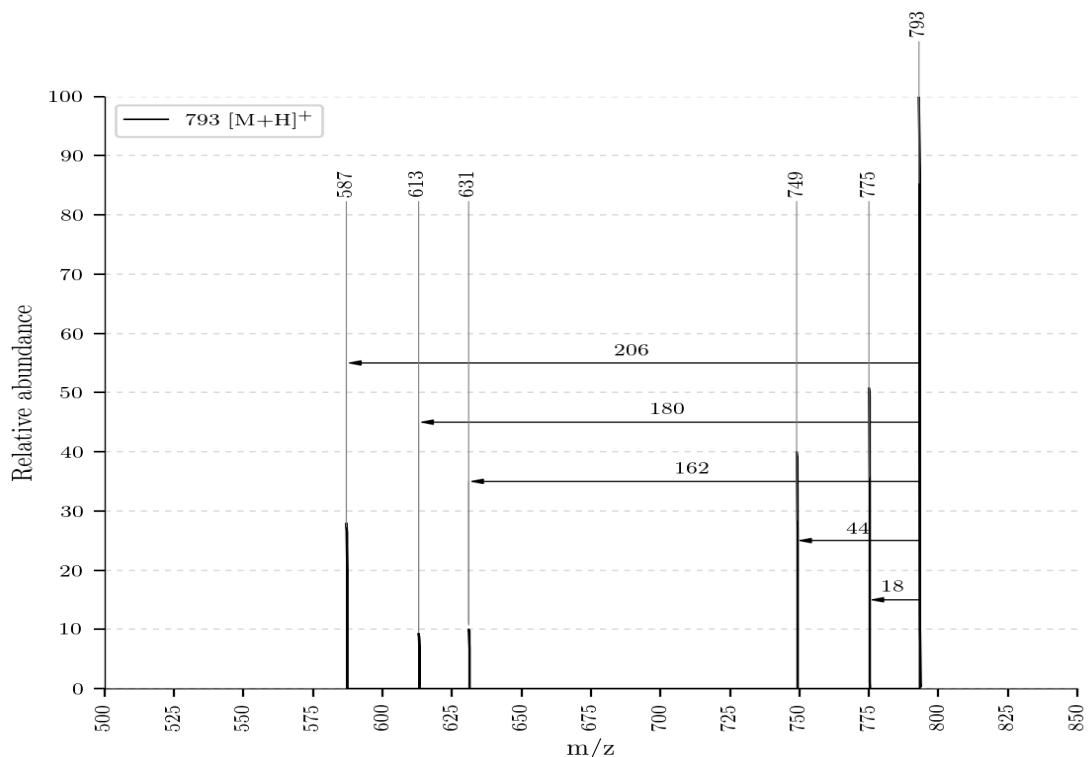


Abbildung 7.11.: ESI-MS Spektrum von Bo-NCC-1 mit $m/z = 793 [M+H]^+$

7. Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

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.

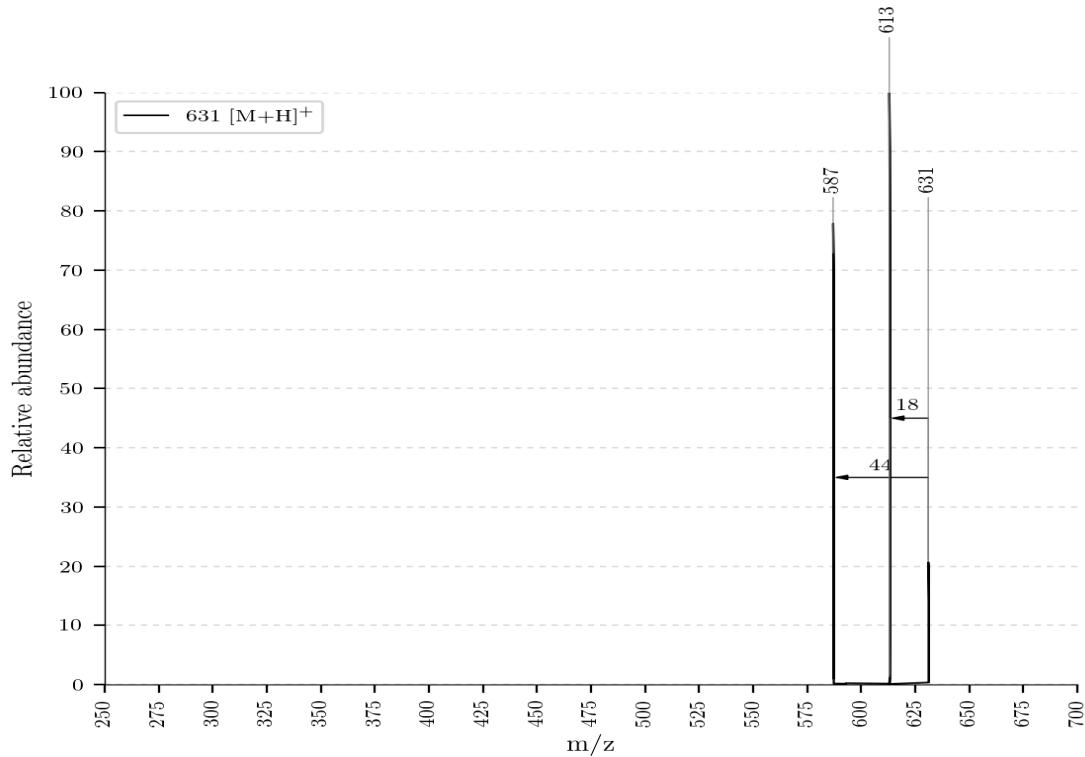


Abbildung 7.12.: ESI-MS Spektrum des Monomethylesters von Bo-DYCC bei $m/z = 631 [M+H]^+$

7. Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

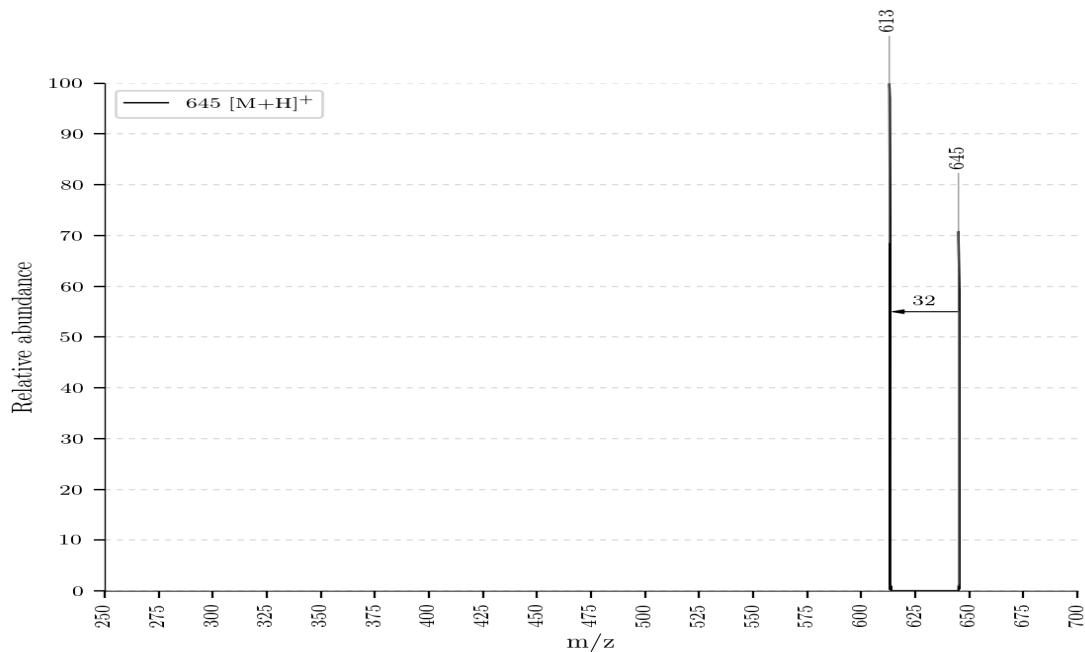


Abbildung 7.13.: ESI-MS Spektrum des Dimethylesters von Bo-DYCC bei $m/z = 645 [M+H]^+$

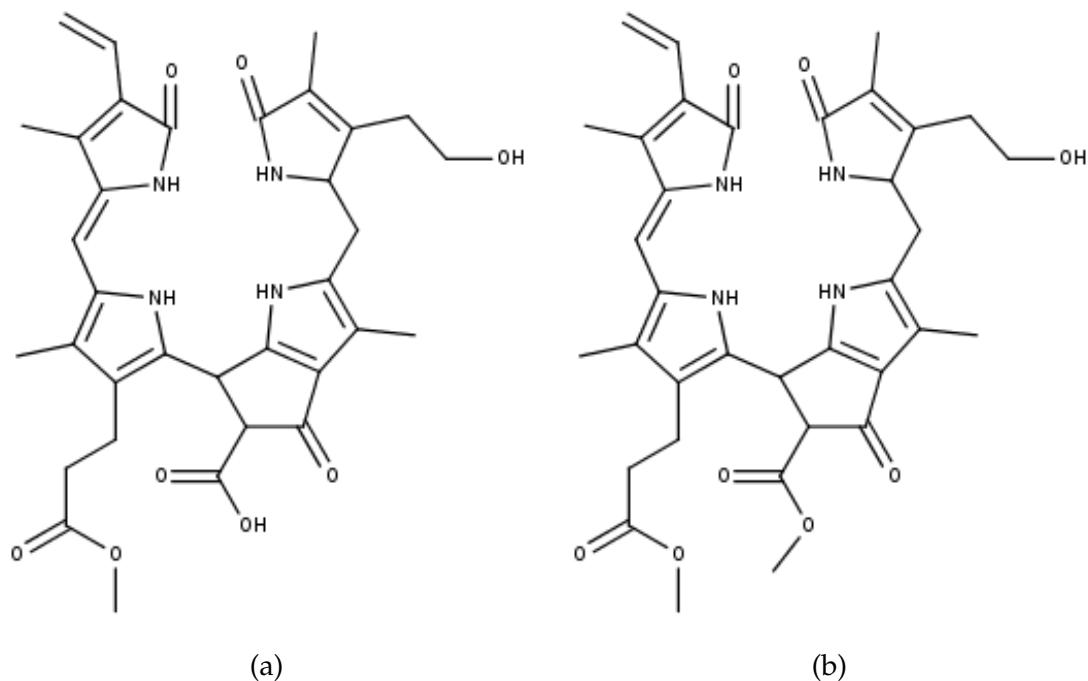


Abbildung 7.14.: Strukturvorschläge: (a) Monomethylierungsprodukt mit Summenformel $C_{34}H_{38}O_8N_4$, (b) Dimethylierungsprodukt mit Summenformel $C_{35}H_{41}O_8N_4$

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.

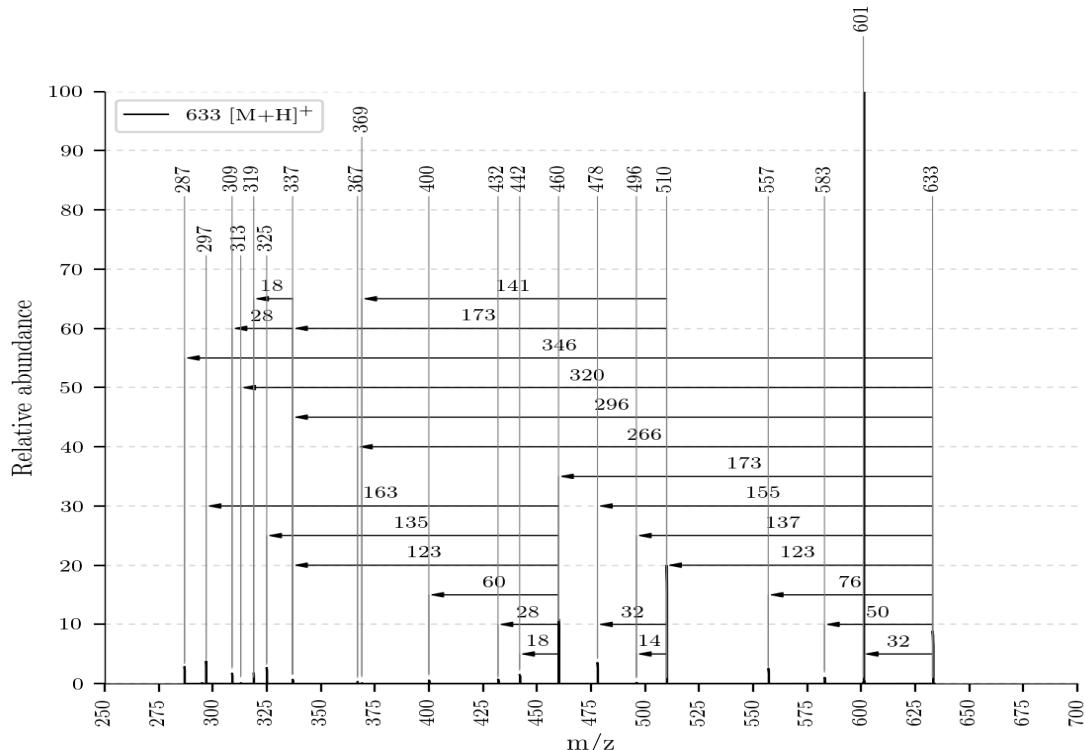


Abbildung 7.15.: ESI-MS Spektrum des Reaktionsproduktes des Bo-DNCC mit $m/z = 633 [M+H]^+$

7. Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

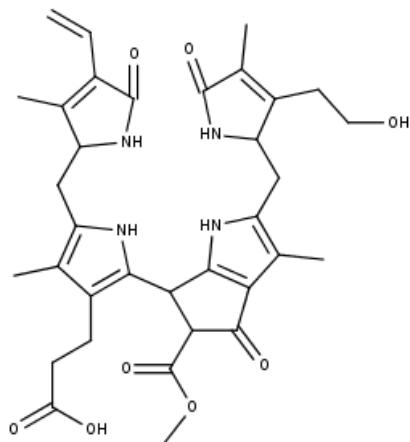


Abbildung 7.16.: Strukturvorschlag für das Reaktionsprodukt von Bo-DNCC mit Summenformel $C_{34}H_{41}O_8N_4$

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).

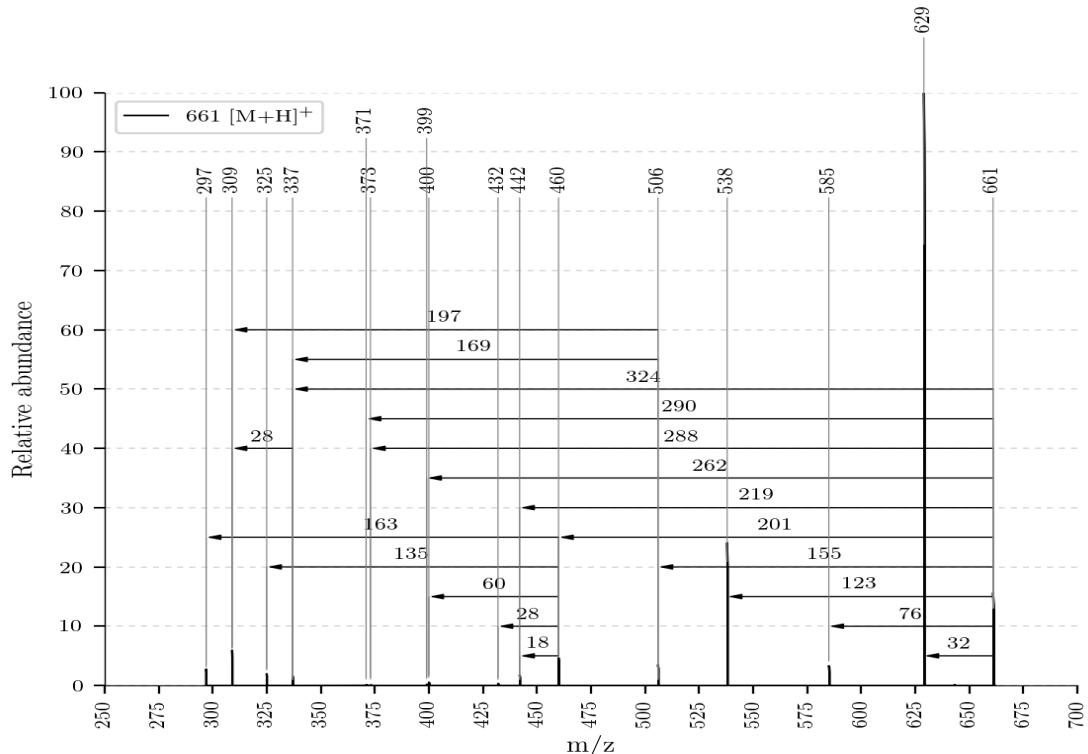


Abbildung 7.17.: ESI-MS des Reaktionsproduktes von Bo-NCC-3 bei $m/z = 661 [M+H]^+$

Ergebnisse und Diskussion

8. Ergebnisse

Da die Ergebnisse bereits im experimentellen Teil ausführlich beschrieben worden sind, folgt hier nur eine Übersicht über die identifizierten Chl-Kataboliten.

8.1. Liste aller identifizierten Chl-Kataboliten und deren Reaktionsprodukten

In Tabelle 8.1 werden alle Verbindungen aufgelistet, die ich im Rahmen meiner Arbeit in den diversen Experimenten identifizieren konnte. Index zur Tabelle:

Chl-Katabolit . . . vorgeschlagene Bezeichnung für mit großer Sicherheit identifizierte Chl-Kataboliten

Summenformel . . . die Summenformel des $[M+H]^+$ Ions, gemessen in ESI-MS und LC-MS Experimenten - bei mit * gekennzeichneten handelt es sich um die Summenformel des ungeladenen Chl-Kataboliten.

M+H . . . Molekülmasse des $[M+H]^+$ Ions, die in ESI-MS oder LC-MS Experimente gemessen wurde

Frag. I . . . gibt an, ob bei den ESI-MS Experimenten ein Fragmentierungsdiagramm erstellt wurde

MS-Leafspray . . . Molekülmasse des $[M+K]^+$ Ions, sofern mit MS-Leafspray gemessen

Frag. II . . . gibt an, ob bei den MS-Leafspray Experimenten ein Fragmentierungsdiagramm erstellt wurde

Typ . . . gibt die Art des Chl-Kataboliten an, sofern dies klar ist - bei mit * gekennzeichneten handelt es sich um Anhydride

HPLC . . . gibt an, ob Chl-Katabolit mithilfe von UV/Vis Spektren in der HPLC identifiziert werden konnte

H. . . . (Herkunft) gibt an, ob es sich bei der Verbindung um ein Reaktionsprodukt handelt und wenn ja, welcher Chl-Katabolit das Edukt war

Chl-Katalbolit	Summenformel	[M+H] ⁺	Frag. I	MS-Leafspray	Frag. II	Typ	HPLC	H.
Bo-DYCC	C ₃₃ H ₃₇ O ₈ N ₄	617.2599	✓	x	x	DYCC	30.94?	-
Bo-DNCC	C ₃₃ H ₃₉ O ₈ N ₄	619.2798	✓	657	✓	DNCC	26.72	-
•	C ₃₄ H ₃₇ O ₈ N ₄	629.2641	x	x	•	-	-	-
-	C ₃₄ H ₃₉ O ₈ N ₄	631.2795	✓	x	x	DYCC	29.91, 30.94	Bo-DYCC
-	C ₃₄ H ₄₁ O ₈ N ₄	633.2955	✓	x	x	DNCC	28.8	Bo-DNCC
•	C ₃₆ H ₃₃ O ₇ N ₄	633.2339	x	x	•	-	-	-
Bo-YCC	C ₃₄ H ₃₇ O ₉ N ₄	645.2593	✓	x	x	YCC	-	-
-	C ₃₅ H ₄₁ O ₈ N ₄	645.2953	x	x	x	DYCC	-	Bo-DYCC
Bo-NCC-3	C ₃₄ H ₃₉ O ₉ N ₄	647.2748	✓	685	✓	NCC	33.04	-
•	C ₃₄ H ₃₅ O ₁₀ N ₄	659.2348	x	x	•	-	-	-
-	C ₃₅ H ₃₉ O ₉ N ₄	659.2741	✓	x	x	YCC	37.09	Bo-YCC
-	C ₃₅ H ₄₁ O ₉ N ₄	661.2902	✓	x	x	NCC	-	Bo-NCC-3
-	C ₃₆ H ₄₃ O ₉ N ₄	675.306	✓	x	x	NCC	-	Bo-NCC-3
Bo-DNCC-2	C ₃₉ H ₄₇ O ₁₃ N ₄	779.3181	x	x	x	DNCC	-	-
Bo-NCC-1	C ₄₀ H ₄₉ O ₁₃ N ₄	793.3336	✓	831	✓	NCC	29.91	-
-	C ₄₀ H ₅₁ O ₁₃ N ₄	795.3491	✓	x	x	-	-	-
-	C ₄₁ H ₅₁ O ₁₃ N ₄	807.3491	✓	x	x	NCC	40.03	Bo-NCC-1
-	C ₄₁ H ₅₃ O ₁₃ N ₄	809.3649	x	x	x	-	-	795
-	C ₄₂ H ₅₃ O ₁₃ N ₄	821.3652	x	x	x	NCC	47.28	Bo-NCC-1
-	C ₃₅ H ₄₁ N ₄ O ₉ *	x	x	699	✓	DNCC*	-	Bo-DNCC
-	C ₃₆ H ₄₀ N ₄ O ₁₀ *	x	x	727	✓	NCC*	-	Bo-NCC-3
-	C ₄₂ H ₅₀ N ₄ O ₁₄ *	x	x	873	✓	NCC*	-	Bo-NCC-1

Tabelle 8.1.: Übersicht über die gefundenen Chl-Katalbolen des Brokkoliblattes und ihren Reaktionsprodukten

9. Diskussion

Im Folgenden werden die im Experimentellen Teil beschriebenen Ergebnisse in Hinblick auf die in Kapitel 1 gestellten Fragen analysiert. Es werden dabei nur die wichtigsten, sogenannte Highlights herausgenommen, da eine genauere Ausführung den Rahmen sprengen würde.

9.1. zur direkten Analyse, MS Leafspray und der Reaktion mit Essigsäureanhydrid

Wie in Kapitel 5 ersichtlich, konnten die Chl-Kataboliten erfolgreich in einer direkten Analyse mithilfe von MS Leafspray identifiziert werden.

Zu Beginn waren die Experimente jedoch von deutlichen Misserfolgen geprägt. Es scheiterte z.B. bereits daran, ein schönes, konstantes Signal im Massenspektrometer zu bekommen. Auch ein Optimieren des Signals durch Kalibrierung und andere Methoden brachte keine Besserung. Erst die Entwicklung der in Kapitel 5 beschriebenen Blattvorbereitungstechnik(en) konnte zusammen mit der Erkenntnis, dass man gelegentlich vom positiven in den negativen Ionenmodus schalten muss zu schönen und vor allem verwertbaren Massenspektren und Fragmentierungsdiagrammen führen¹.

Nachdem die Chl-Kataboliten des Brokkoliblattes erfolgreich identifiziert wurden, konnten mit der gleichen Methode auch die Reaktionsprodukte der Chl-Kataboliten mit Essigsäureanhydrid gemessen werden. Unter Verwendung von Essigsäureanhydrid als LM konnten dabei sogar die Anhydride als Reaktionsprodukte identifiziert werden.

¹diese Erkenntnis ist einem Zufall zu verdanken: während dem Messen verschwand das Signal plötzlich und ich befürchtete schon, das Massenspektrometer verstopft zu haben (eine Katastrophe) - nach einem mehr oder weniger zufälligem Umschalten in den negativen Ionenmodus und dem sofortigen Zurückschalten in den positiven war das Signal wieder in vollster Intensität vorhanden

9. Diskussion

Zur Reaktivität der Carbonsäuren wurde beobachtet, dass die freie Carbonsäure an Position 8^2 deutlich reaktiver ist wie jene an Position 12^2 . Vermutlich ist dies durch die bevorzugte sterische Umgebung begründet, wobei dies bisher reine Spekulation ist.

9.2. zu den Fragmentierungsdiagrammen und Strukturaufklärung

Es konnten für alle mit MS Leafspray gemessenen Verbindungen Fragmentierungsdiagramme erfolgreich aufgenommen werden. In der Arbeit wurde vorgeschlagen, dass eine Analyse dieser über den Vergleich von Minima und Maxima möglich ist. Auf diese Weise kann ein Einblick auf massenspektrometrische Eigenschaften der Verbindungen gewonnen werden.

Es wird vermutet, dass die Fragmentierungsdiagramme charakteristisch für einen Chl-Kataboliten sind, weil dieselben Diagramme bei zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführten Experimenten erstellt wurden. Es handelt sich dabei jedoch nur um eine Theorie, die noch in weiterer, gezielter experimenteller Arbeit verifiziert werden müsste.

Um einen Blick in die Zukunft zu wagen, könnte man diese Fragmentierungsdiagramme verwenden, um eine Schnellidentifikation von Chl-Kataboliten durchzuführen. Ein Anwendungsgebiet wäre hier beispielsweise die Landwirtschaft, wo ein Bauer mithilfe von MS Leafspray *am Feld* Chl-Kataboliten identifizieren könnte. Um diese Schnellidentifikation zu programmieren, könnte man auf die Methode des Deep-Learnings zurückgreifen, die ein Analysieren der Diagramme erleichtern und vor allem automatisieren könnte.

Unter Verwendung eines solchen DeepLearning Netwerkes ist es außerdem denkbar, dass man aus den Fragmentierungsdiagramm weitere Strukturmerkmale *herauskitzeln* kann, was einen Fortschritt in Bezug auf Strukturaufklärung mit dem Massenspektrometer bedeuten würde.

Außerdem ist denkbar, dass über eine intensivere Erforschung der Fragmentierungsdiagramme ein tieferer Einblick in die Eigenschaften der chemischen Bindung in komplexen Molekülen gewonnen werden kann. Auch hier ist eine Anwendung von DeepLearning denkbar.

9. Diskussion

9.3. zum Vergleich direkte Analyse - klassischer Ansatz

In Tabelle 9.1 werden die wesentlichen Unterschiede der beiden Analysemethoden, die ich während meiner Arbeit beobachten konnte, aufgelistet. Die Liste stellt nicht den Anspruch, vollständig zu sein.

Man kann sagen, dass beide Methoden ihre Vorzüge haben und auch dementsprechend eingesetzt werden sollten.

9. Diskussion

+/-	direkte Analyse	+/-	klassischer Ansatz
+ kurze Blattvorbereitungszeit für die Analyse		- lange Blattvorbereitungszeit für die Analyse (Aufreibung, Abzentrifugieren, ...)	
+ lange Analysezeiten, die z.B. für die Erstellung von Fragmentierungsdiagrammen verwendet werden kann		- 75min. Zeit vergeht, bis analysiert werden kann - erzeugen von Fragmentierungsdiagrammen nur über Sammeln in EPPIs möglich	
+ erlaubt einfache Isolierung von Anhydriden durch Verwendung von Acetonitril als LM		- Isolierung von Anhydriden als Reaktionsprodukt schwer möglich, da bevorzugtes LM MeOH	
+ erlaubt Analyse von vielen Blättern in kurzer Zeit (ca. 30min. pro Blatt, wenn man viele Chl-Kataboliten analysiert)		- (fast) vollständige Analyse eines Blattes dauert bis zu 100min., sofern sehr effizient gearbeitet wird	
- man bekommt kein Chromatogramm, über das man alle Chl-Kataboliten potentiell herausfinden kann - es besteht die Gefahr, dass einige Chl-Kataboliten nicht analysiert werden		+ weniger Chl-Kataboliten gehen verloren	
- nur $[M+K]^+$ Ionen		- $[M+K]^+$ Ionen	
- Molekülmasse nur auf 1 signifikante Kommastelle messbar - Summenformel kann nicht berechnet werden		+ Molekülmasse auf 3 signifikante Kommastellen messbar - Möglichkeit, Summenformel zu berechnen	
+ theoretisch relativ einfach automatisierbar		- aufwändig zum automatisieren	
- Massenspektrometer kann mit der Zeit verschmutzen		+ Massenspektrometer nicht so anfällig für ein Verschmutzen	

Tabelle 9.1.: Vergleich von direkter Analyse mit einer klassischen Analyse

9.4. zum Vergleich Brokkoliblatt - Brokkolifrucht

In meiner Arbeit wurden die Chl-Kataboliten des Brokkoliblattes untersucht. Im Vergleich zu einer kürzlich veröffentlichten Publikation [16], in der die Brokkolifrucht analysiert wurde, konnte ich etwas mehr davon finden. Tabelle 9.2 listet die jeweiligen Chl-Kataboliten auf:

Brokkoliblatt	Brokkolifrucht
Bo-NCC-1	✓
x	Bo-NCC-2
Bo-NCC-3	x
Bo-DNCC	✓
Bo-DYCC	x
Bo-YCC	x
Bo-DNCC-2	x

Tabelle 9.2.: Vergleich der Chl-Kataboliten im Brokkoliblatt und der Brokkolifrucht

9.5. Rück- und Ausblick

Ich denke, mir ist es gelungen, die in der Themenstellung gestellten Fragen weitestgehend zu beantworten. Was mich besonders freut, ist, dass ich mit MS Leafspray eine Methode verwenden sowie weiterentwickeln konnte, die meines Erachtens zusammen mit den Fragmentierungsdiagrammen ein enormes Zukunftspotential hat. Natürlich sind meine Erkenntnisse auf dem Gebiet der Fragmentierungsdiagramme noch nicht gefestigt, doch denke ich, dass ich mit dieser Arbeit einen wesentlichen Grundstein für weitere Forschung in diesem Gebiet legen konnte.

Durch die parallele Analyse mit LC-MS konnte ein erfolgreicher Vergleich der beiden Methoden gemacht werden, was aufgrund der Bewährtheit von LC-MS ein gutes Licht auf MS Leafspray wirft.

Außerdem konnten andere Chl-Kataboliten im Brokkoliblatt nachgewiesen werden wie in der Frucht an sich, was neue Fragen zum Verständnis des Chl-Abbauprozesses aufwirft.

9. Diskussion

Demnach leiste ich mit dieser Arbeit einen wesentlichen Beitrag zur Methodenverbesserung, Analyseerweiterung und dem Verständnis des Abbauweges des Chlorophylls im Allgemeinen. Für mich selbst gilt, dass ich durch die Arbeit an dieser Arbeit meine Persönlichkeit wesentlich entwickeln konnte, insbesondere was eigenständiges Arbeiten in jeglicher Hinsicht und Sammeln von Erfahrung anbelangt.

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, 66).
- [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: Autor	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
A.1. Fragmentierungsdiagramme des Reaktionsproduktes von Bo- DYCC, Quelle: Autor	77
A.2. Fragmentierungsdiagramme und MS-Spektrum des Reaktions- produktes von Bo-DNCC, Quelle: Autor	78
A.3. Fragmentierungsdiagramme und MS-Spektrum eines vermeintli- chen Chl-Kataboliten mit m/z = 667 Da, Quelle: Autor	79
B.1. Fragmentierungsdiagramme von Bo-DYCC, Quelle: Autor	81
B.2. Fragmentierungsdiagramme von Bo-DNCC, Quelle: Autor	82
B.3. Fragmentierungsdiagramme von Bo-NCC-1, Quelle: Autor	83
B.4. Fragmentierungsdiagramme von Bo-NCC-3, Quelle: Autor	84
B.5. Fragmentierungsdiagramme des Reaktionsproduktes von Bo- DYCC, Quelle: Autor	84
B.6. Fragmentierungsdiagramme des Reaktionsproduktes von Bo- DNCC, Quelle: Autor	85
B.7. Fragmentierungsdiagramme des Reaktionsproduktes von Bo- NCC-3, Quelle: Autor	86

Tabellenverzeichnis

6.1.	Übersicht über die Chl-Kataboliten des Brokkoliblattes, Quelle: Autor	35
6.2.	Übersicht über die Reaktionsprodukte der Chl-Kataboliten des Brokkoliblattes, Quelle: Autor	42
8.1.	Übersicht über die Chl-Kataboliten des Brokkoliblattes unter Berücksichtigung der Erkenntnisse aller Methoden, Quelle: Autor	61
9.1.	Vergleich beider Methoden, Quelle: Autor	65
9.2.	Vergleich der Chl-Kataboliten - Brokkoliblatt und Brokkolifrucht, Quelle: Autor	66

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, 62

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

Anhang A.

Fragmentierungsdiagramme und MS-Spektren der MS-Leafspray Experimente

Im Folgenden befinden sich Fragmentierungsdiagramme von Verbindungen, die mit MS-Leafspray erstellt wurden, aus diversen Gründen jedoch nicht im Hauptteil der Arbeit behandelt werden. Sie werden hier aufgelistet, um einen tieferen Einblick in die Fragmentierungsdiagramme zu bekommen und diese anhand des hiermit erhaltenen größeren Datensatzes selbst besser bewerten zu können. Auf eine eingehendere Erklärung und Analyse wird verzichtet.

A.1. Reaktionsprodukt von Bo-DYCC

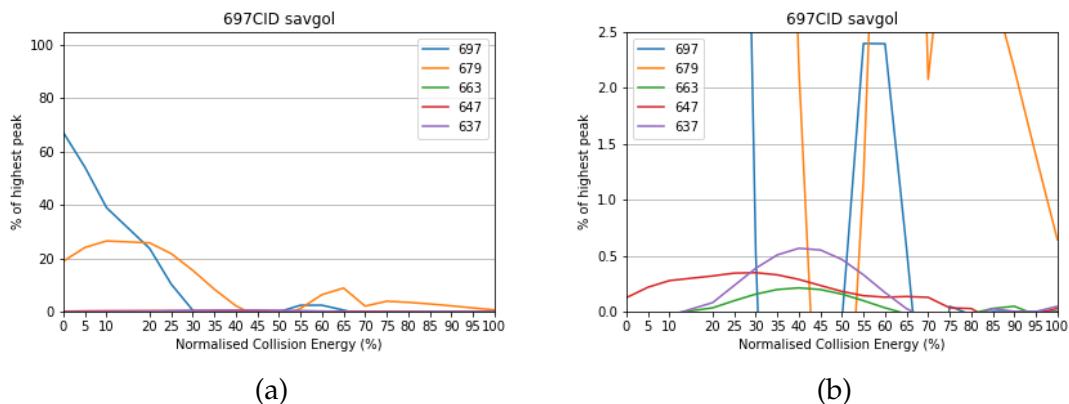


Abbildung A.1.: Fragmentierungsdiagramme des Reaktionsproduktes von Bo-DYCC: (a) $m/z = 697 [M+K]^+$ - es handelt sich dabei um das Anhydrid, (b) Ausschnitt aus (a)

Anhang A. Fragmentierungsdiagramme und MS-Spektren der MS-Leafspray Experimente

A.2. Reaktionsprodukt von Bo-DNCC

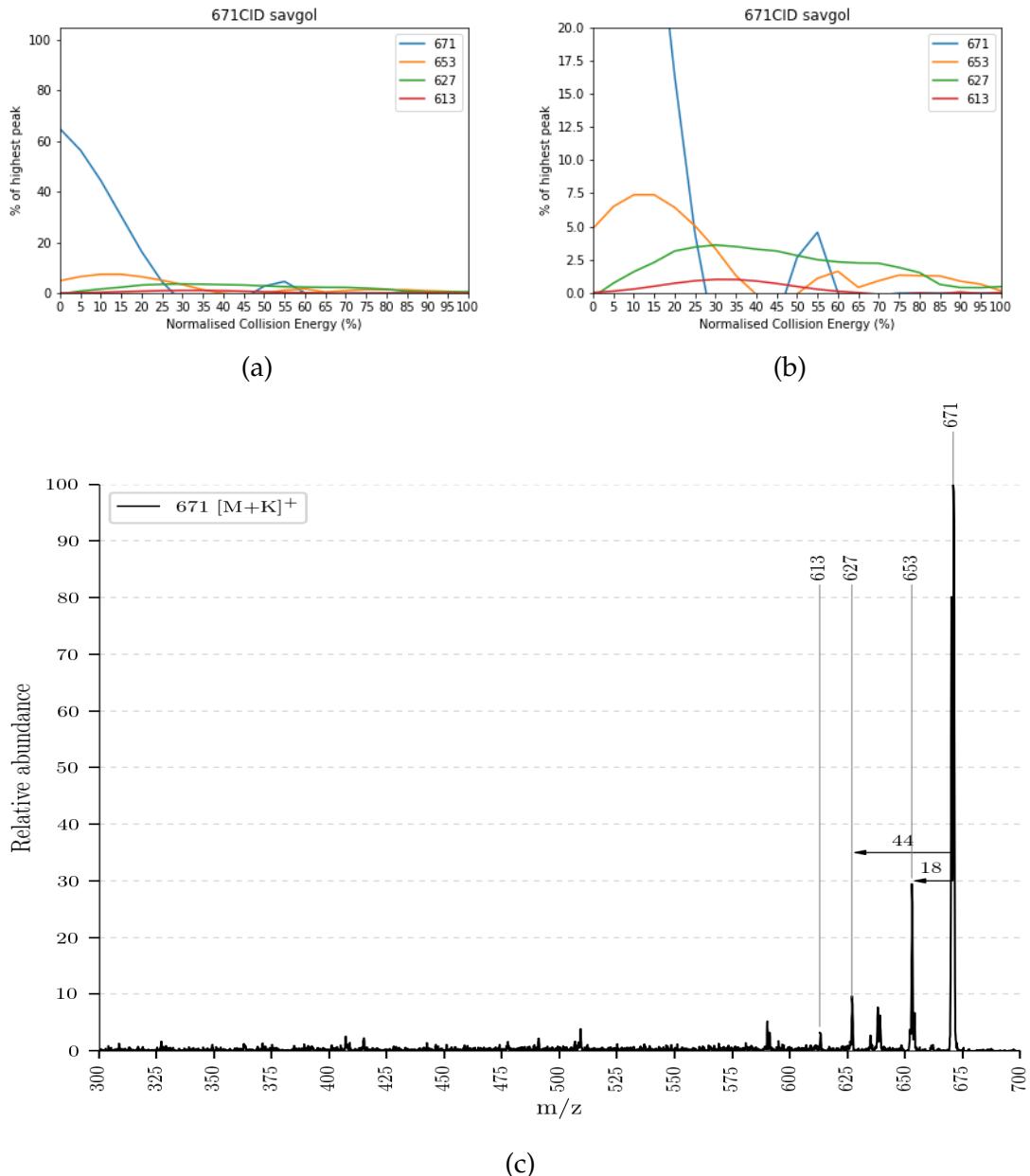


Abbildung A.2.: Fragmentierungsdiagramme und MS-Spektrum des Reaktionsproduktes von Bo-DNCC: (a) $m/z = 671 [M+K]^+$ - es handelt sich dabei um einen Methylester, (b) Ausschnitt aus Diagramm (a), (c) MS-Spektrum bei $m/z = 671 [M+K]^+$

Anhang A. Fragmentierungsdiagramme und MS-Spektren der MS-Leafspray Experimente

A.3. Reaktionsprodukt von Chl-Katabolit mit m/z = 667 Da [M+K]⁺

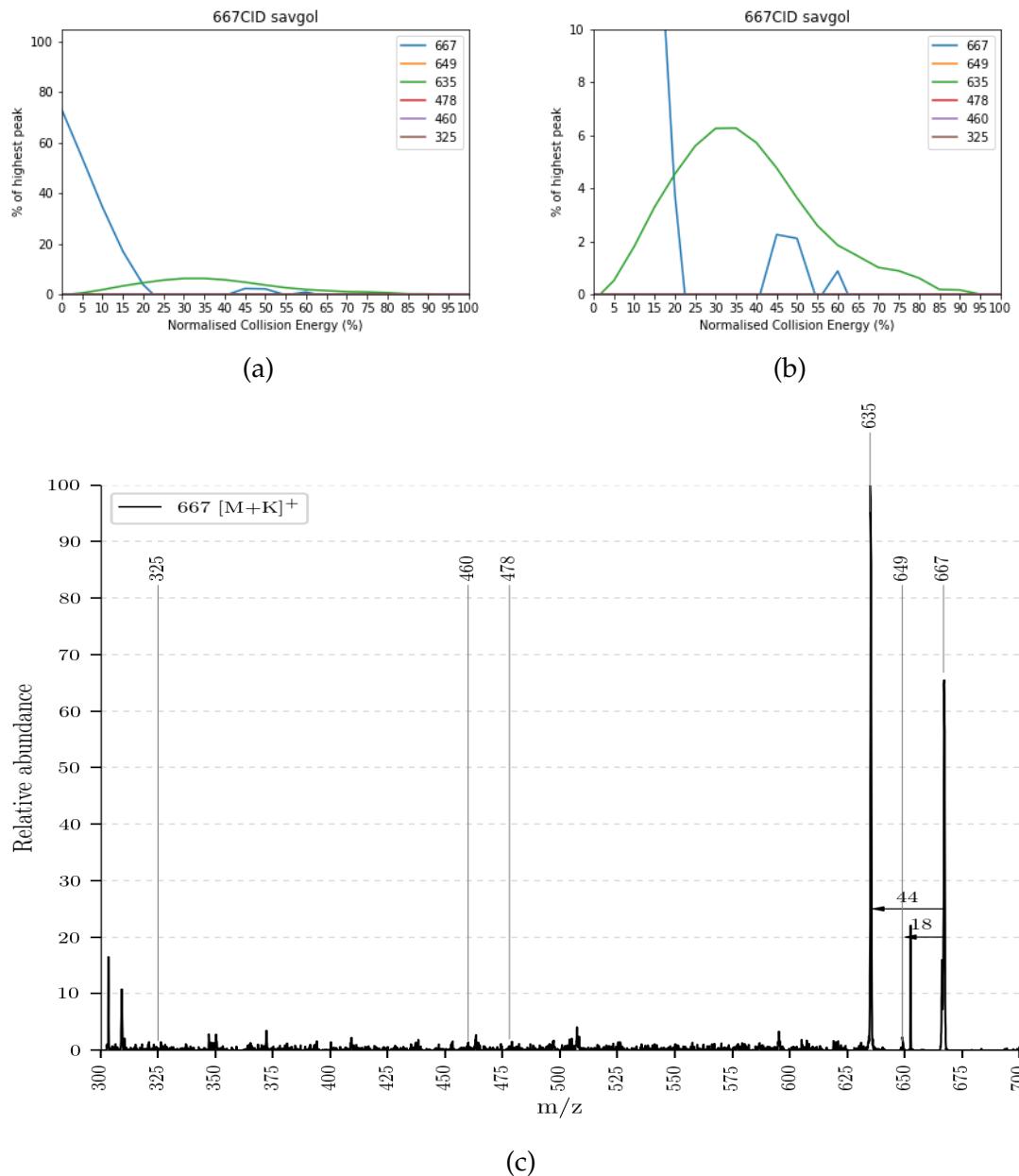


Abbildung A.3.: Fragmentierungsdiagramme und MS-Spektrum eines vermeintlichen Chl-Kataboliten mit m/z = 667 [M+K]⁺: (a) Fragmentierungsdiagramm, (b) Ausschnitt aus Diagramm (a), (c) MS-Spektrum bei m/z = 667 [M+K]⁺

Anhang B.

Fragmentierungsdiagramme der ESI-MS Experimente

Im Folgenden befinden sich Fragmentierungsdiagramme, die bei den Experimenten mit ESI-MS aufgenommen wurden. Sie werden im Hauptteil der Arbeit nicht behandelt, da sie nicht dazu notwendig sind, um die Fragenstellungen in Kapitel 1 zu beantworten. Als Zusatzmaterial bieten sie jedoch einen qualitativen Vergleich zu den Fragmentierungsdiagrammen, die mit MS Leafspray erzeugt wurden. Ein direkter Vergleich ist nicht möglich, da mit ESI-MS lediglich $[M+H]^+$ -Ionen aufgenommen, wohingegen mit MS Leafspray nur $[M+K]^+$ -Ionen.

Außerdem konnten bei den ESI-MS Experimenten Fragmentierungsdiagramme im CID und PQD Modus erstellt werden. Ein Vergleich der beiden erweist sich als außerordentlich interessant.

So weisen die Chl-Kataboliten im PQD Modus in Bezug auf die Kontinuität zumeist schöne Kurvenverläufe auf, was bei den im CID Modus generierten zumeist nicht der Fall ist. Diese besitzen dafür häufig charakteristisch erscheinende Verläufe mit markanten Merkmalen.

Bei den ESI-MS Experimenten wurden auch die einzelnen Fragmente auf ihre Fragmente hin untersucht. So wurden bis auf die 3. Ebene fragmentiert. Im Diagramm wird es angegeben durch die Überschrift in der Form z.B. 619CID40-575CID100-452CID. Dabei wurde der Chl-Katalysator bei $m/z = 619$ $[M+H]^+$ bei einer NKE von 40 im CID Modus fragmentiert, das Fragment bei $m/z = 575$ $[M+H]^+$ isoliert und bei einer NKE von 100 im CID Modus das erhaltene Fragment bei $m/z = 452$ $[M+H]^+$ im CID fragmentiert. Die von der letzten Stufe erhaltenen Intensitäten werden im Fragmentierungsdiagramm aufgetragen. Im Beispiel handelt es sich um einen $(m/z)^3$ Versuch.

Anhang B. Fragmentierungsdiagramme der ESI-MS Experimente

B.1. Bo-DYCC

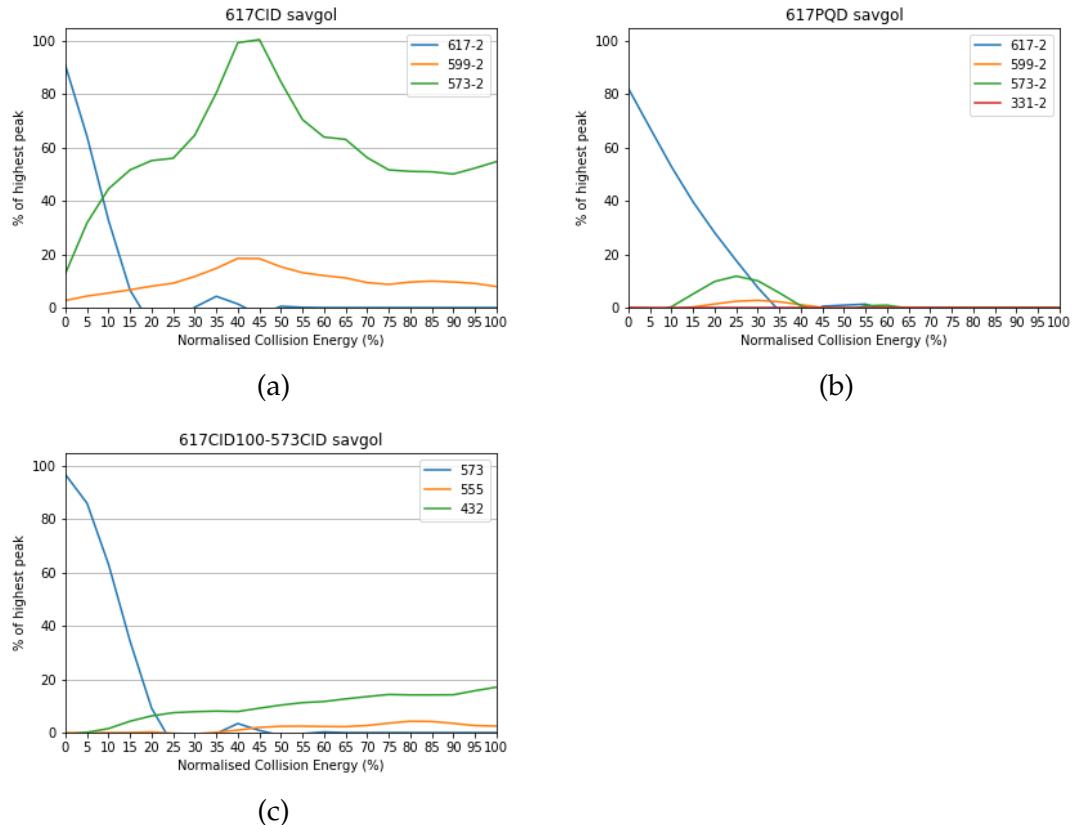


Abbildung B.1.: Fragmentierungsdiagramme von Bo-DYCC: (a) $m/z = 617$ $[M+H]^+$ im CID Modus, (b) $m/z = 617$ $[M+H]^+$ im PQD Modus, (c) $(m/z)^2 = 573$ $[M+H]^+$ im CID Modus

Anhang B. Fragmentierungsdiagramme der ESI-MS Experimente

B.2. Bo-DNCC

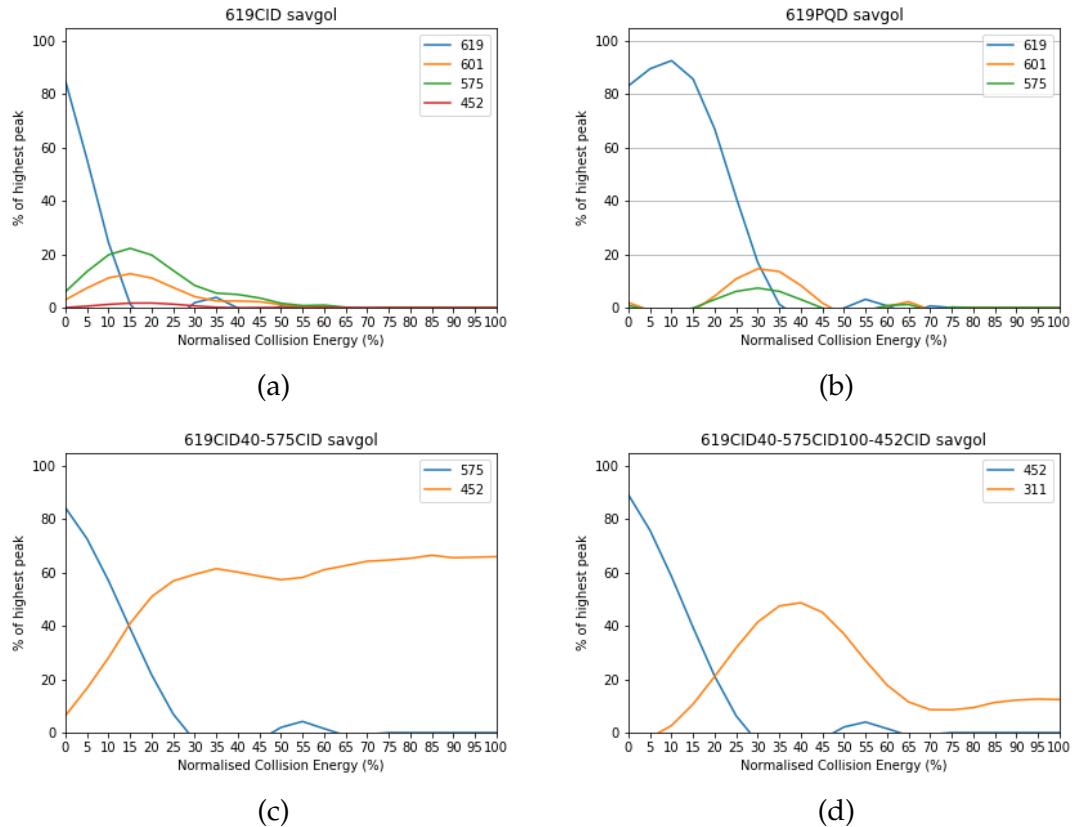


Abbildung B.2.: Fragmentierungsdiagramme von Bo-DNCC: (a) $m/z = 619 [M+H]^+$ im CID Modus, (b) $m/z = 619 [M+H]^+$ im PQD Modus, (c) $(m/z)^2 = 575 [M+H]^+$ im CID Modus, (d) $(m/z)^3 = 452 [M+H]^+$ im CID Modus

Anhang B. Fragmentierungsdiagramme der ESI-MS Experimente

B.3. Bo-NCC-1

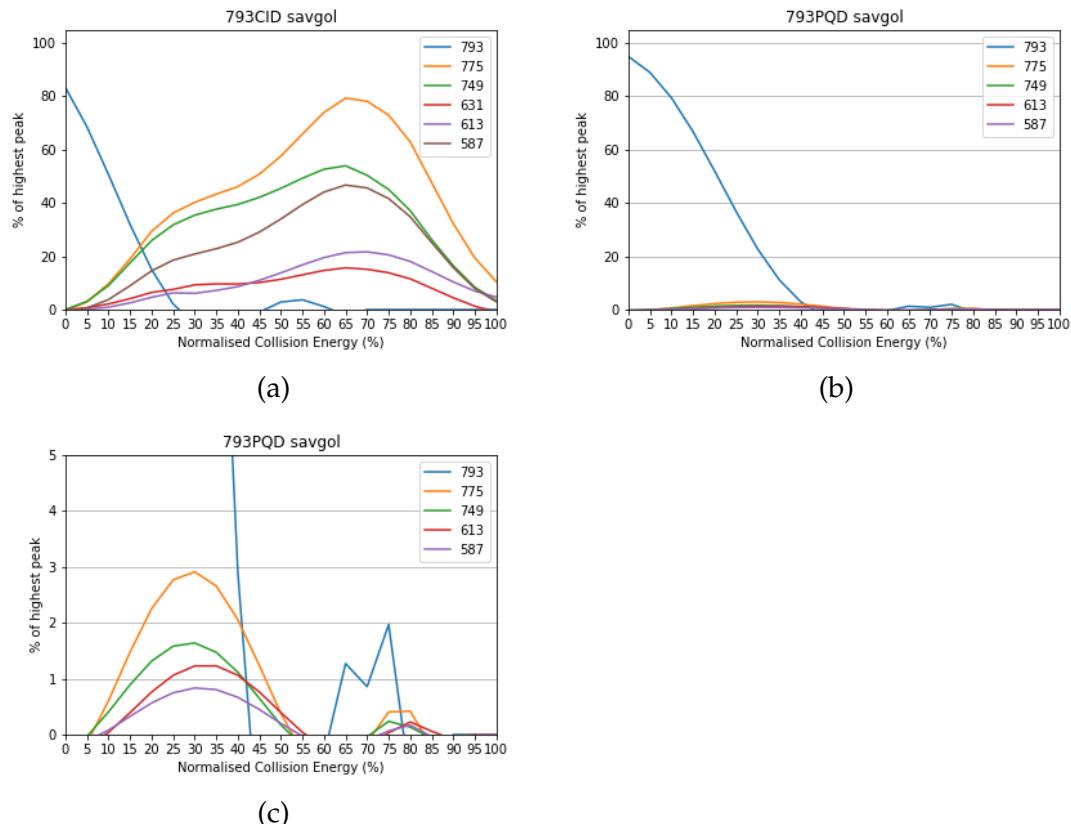


Abbildung B.3.: Fragmentierungsdiagramme von Bo-NCC-1: (a) $m/z = 793$ $[M+H]^+$ im CID Modus, (b) $m/z = 793$ $[M+H]^+$ im PQD Modus, (c) Ausschnitt aus Diagramm (b)

Anhang B. Fragmentierungsdiagramme der ESI-MS Experimente

B.4. Bo-NCC-3

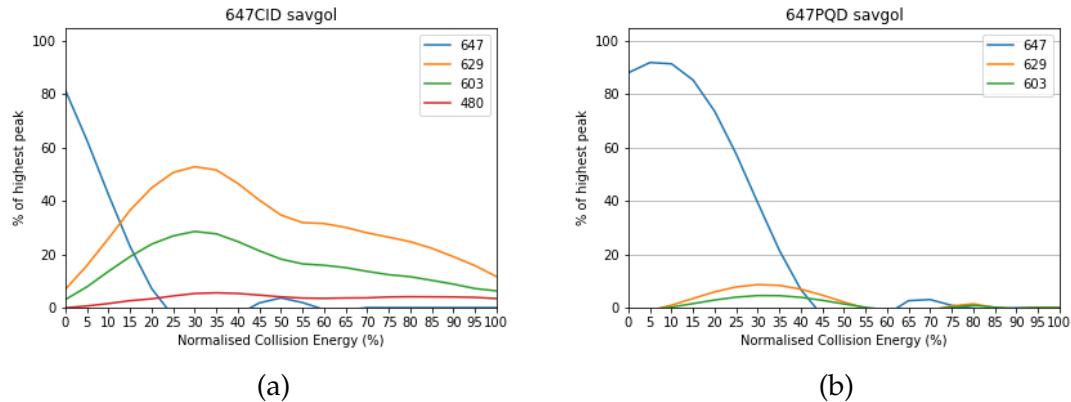


Abbildung B.4.: Fragmentierungsdiagramme von Bo-NCC-3: (a) $m/z = 647$ $[M+H]^+$ im CID Modus, (b) $m/z = 647$ $[M+H]^+$ im PQD Modus

B.5. Reaktionsprodukt von Bo-DYCC

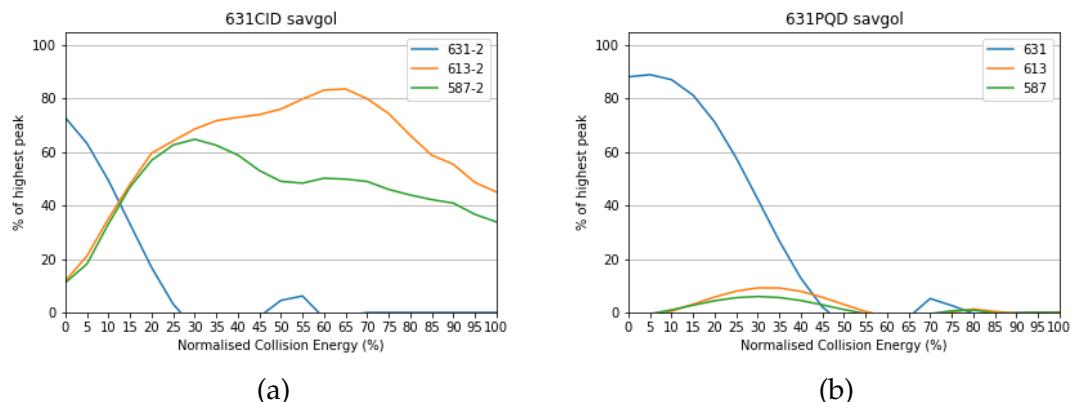


Abbildung B.5.: Fragmentierungsdiagramme des Reaktionsproduktes von Bo-DYCC: (a) $m/z = 631$ $[M+H]^+$ im CID Modus, (b) $m/z = 631$ $[M+H]^+$ im PQD Modus

Anhang B. Fragmentierungsdiagramme der ESI-MS Experimente

B.6. Reaktionsprodukt von Bo-DNCC

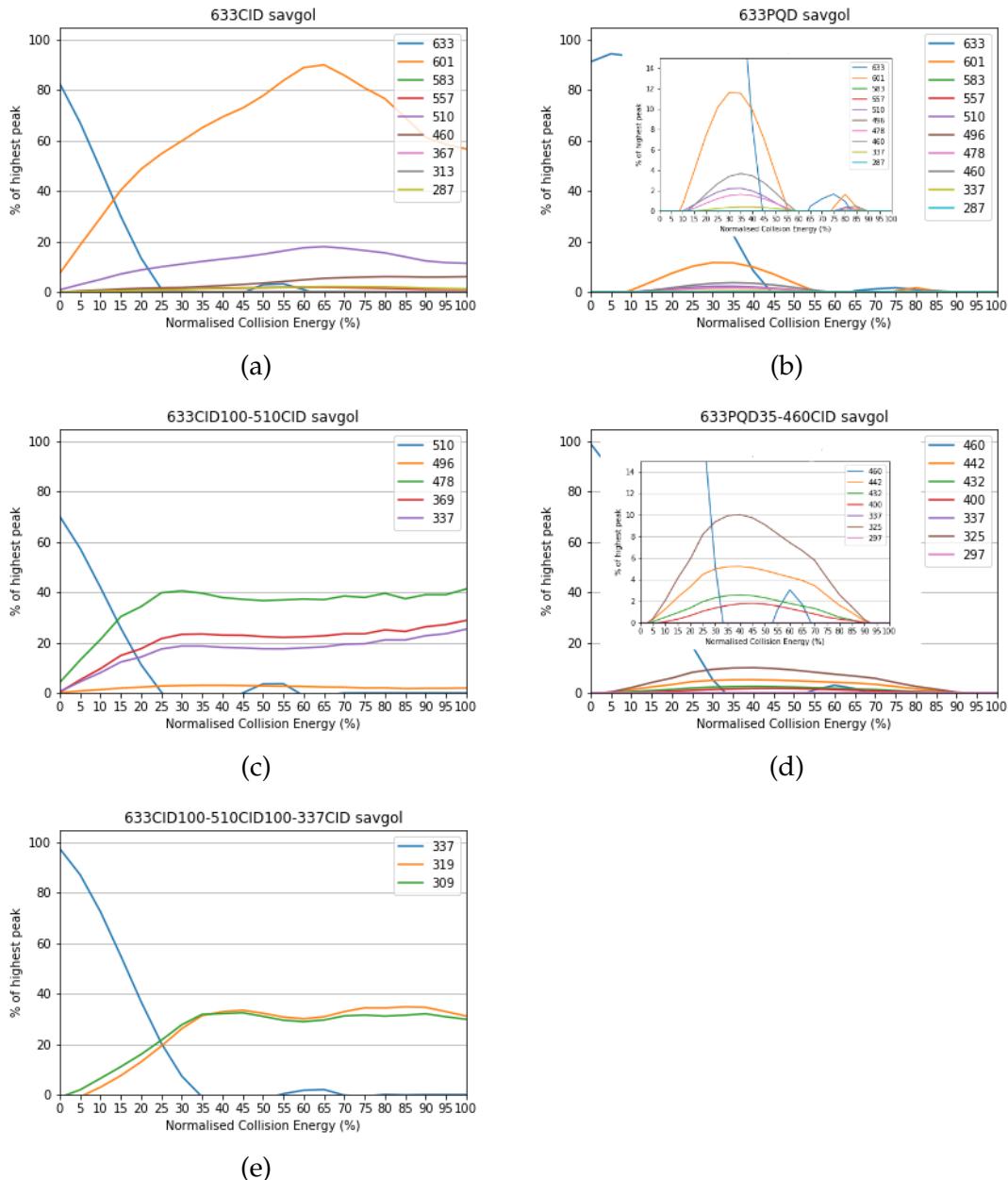


Abbildung B.6.: Fragmentierungsdiagramme des Reaktionsproduktes von Bo-DNCC: (a) $m/z = 633 [M+H]^+$ im CID Modus, (b) $m/z = 633 [M+H]^+$ im PQD Modus, (c) $(m/z)^2 = 510 [M+H]^+$ im CID Modus, (d) $(m/z)^2 = 460 [M+H]^+$ im PQD Modus, (e) $(m/z)^3 = 337 [M+H]^+$ im CID Modus

Anhang B. Fragmentierungsdiagramme der ESI-MS Experimente

B.7. Reaktionsprodukt von Bo-NCC-3

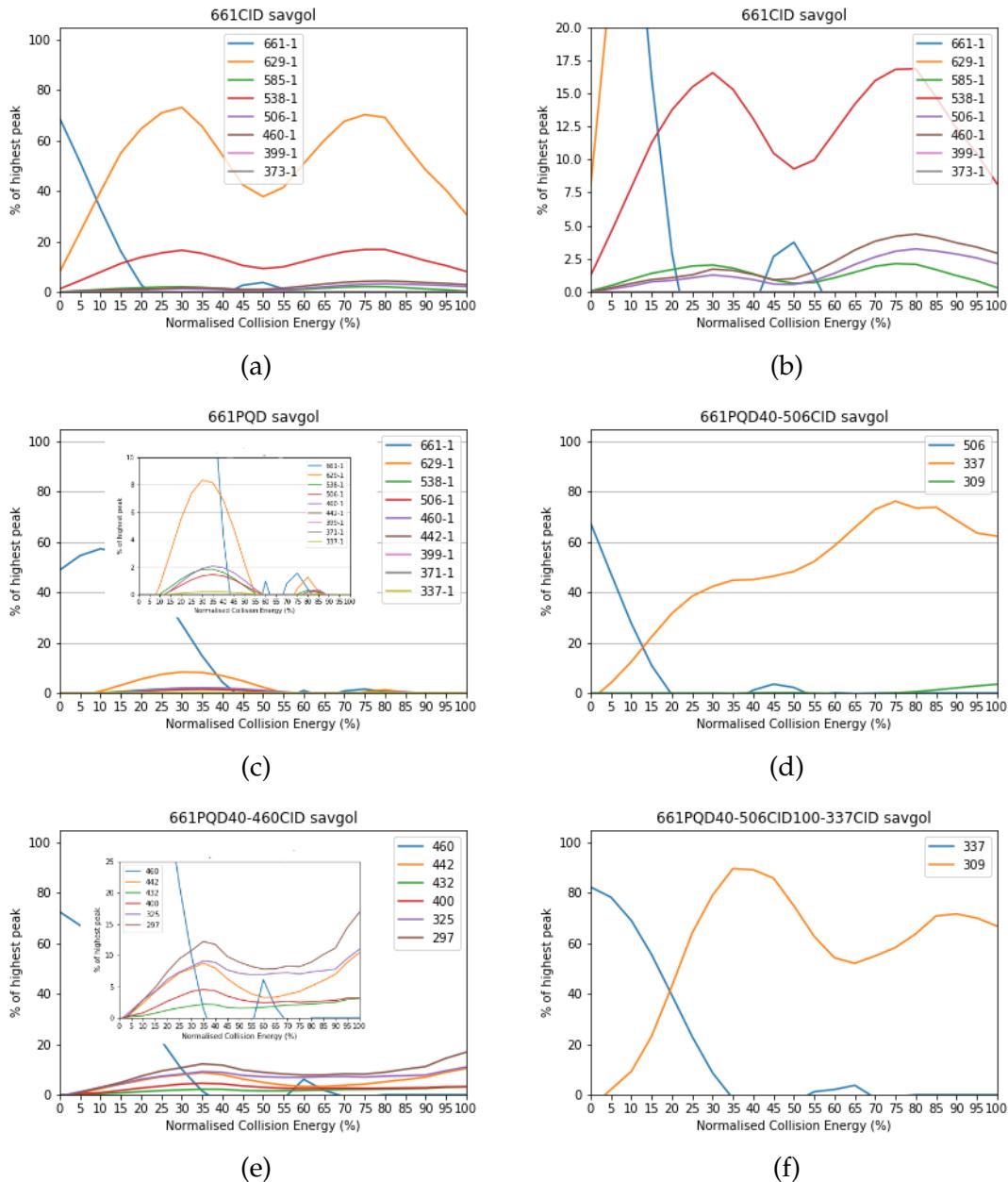


Abbildung B.7.: Fragmentierungsdiagramme des Reaktionsproduktes von Bo-NCC-3: (a) $m/z = 661 [M+H]^+$ im CID Modus, (b) Ausschnitt aus Diagramm (a), (c) $m/z = 661 [M+H]^+$ im PQD Modus, (d) $(m/z)^2 = 506 [M+H]^+$ im CID Modus, (e) $(m/z)^2 = 460 [M+H]^+$ im CID Modus, (f) $(m/z)^3 = 337 [M+H]^+$ im CID Modus

Anhang C.

Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

Im Folgenden findet sich der Programmcode, den ich im Rahmen der Datenauswertung für meine VWA schrieb. Die Referenzen für diverse verwendete Bibliotheken befinden sich im jeweiligen Codeteil. Die Jupyter Notebooks, in denen die Programme geschrieben wurde, können unter

<https://github.com/Progklui/vwaFloKlui/tree/master/content/Anhang/Code> abgerufen werden (sie befinden sich in den jeweiligen Ordnern).

C.1. Programm zur Erstellung von Fragmentierungsdiagrammen

```
1 # coding: utf-8
2
3 # # Savitzky-Golay Filter for smoothing Fragmentation-diagrams
4
5 # Function in which savitzky-golay filter is applied:
6
7 def savgolay_filter_catabolites(ms_data, ms_name, mode_value, mode):
8     np.set_printoptions(precision=2)
9     ms_savgol = savgol_filter(ms_data, 23, 6, mode=mode_value) #
10    apply sav-gol filter
11
12    area_initial = trapz(ms_data, dx=5)
13    area_savgol = trapz(ms_savgol, dx=5)
14
15    # x_values = np.array
16    # [0,5,10,15,20,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,100])
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
16     x_values = np.array([0,5,10,15,25,30,35,40,45,50,55,60,65,70,75,80,85,90,95,100])
17
18     ax = plt.axes()
19     ax.set_xlim([0, 100])
20     ax.set_ylim([0, 105])
21     ax.set_xticks(x_values)
22
23     if(mode == 'initial'):
24         line = plt.plot(x_values, ms_data, label = i)
25     elif(mode == 'initial-savgol'):
26         line1 = plt.plot(x_values, ms_data, label = i + ' initial',
27                           area: '+' + str(round(area_initial)))
27         line2 = plt.plot(x_values, ms_savgol, label = i + ' savgol',
28                           area: '+' + str(round(area_savgol)))
29     elif(mode == 'savgol'):
30         line = plt.plot(x_values, ms_savgol, label = i)
31
32     # Following code could be used for SVM/SVR but is not "smoothing" function
33     # svr_rbf = SVR(kernel='rbf', C=1e3, gamma=0.1)
34     # y_rbf = svr_rbf.fit(x_values.reshape(-1, 1), np.array(ms_data)).predict(x_values.reshape(-1, 1))
35     # plt.plot(x_values, y_rbf, color='navy', label='RBF model')
36
37     plt.xlabel('Normalised Collision Energy (%)')
38     plt.ylabel('% of highest peak')
39     plt.legend()
40     ax.yaxis.grid()
41
42
43 # Import needed modules:
44
45 import numpy as np
46 from numpy import trapz
47 import pandas as pd
48 import matplotlib.pyplot as plt
49 from scipy.signal import savgol_filter
50
51 from sklearn.svm import SVR # import support-vector machine
52
53
54 data = pd.io.parsers.read_csv("csv/
55                               Kuerbis-Analyse-Bindungskinetik-Fragmente873-Version1.csv")
56
57 # Specify dataset on which to apply the filter:
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
59 catabolite = input("Specify fragmentation path: ")
60 fragmentation_mode = input("Specify fragmentation mode: ")
61
62 catabolites_string = input("Specify [M]-fragments of above catabolite
63   : ")
64 catabolites = catabolites_string.split(",")
65 print(catabolites)
66
67 # Call above defined function and print output:
68
69 specify_diagrams = ['initial', 'initial-savgol', 'savgol']
70
71 for x in specify_diagrams:
72     for i in catabolites:
73         value = data[[i]].values
74         diag = np.array(value[3:23].astype(np.int))
75         value_new = savgolay_filter_catabolites(np.hstack(diag), i,
76                                              'nearest', x)
77         plt.title(catabolite+fragmentation_mode+' '+x)
78
79         diag_name = 'Diagrams_output/' + catabolite+fragmentation_mode+'-' +
80                     catabolites[o]+x
81         plt.savefig(diag_name+'.png')
82         plt.show()
```

content/Anhang/Code/VWA_Savitzky–Golay–Filter.py

C.2. Programm zur Erstellung von Chromatogrammen für LC-ESI-MS

```
1 # coding: utf-8
2
3 # # Generate LC-MS chromatograms for analysis of overlaying effects
4
5 def cc(arg):
6     return mcolors.to_rgba(arg, alpha=0.6)
7
8 # Detecting peaks from dataset and scaling:
9
10 def detect_peaks(x, mph=None, mpd=1, threshold=0, edge='rising',
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
12     kpsh=False, valley=False, show=False, ax=None):
13
14     """Detect peaks in data based on their amplitude and other
15     features.
16
17     Parameters
18
19     x : 1D array-like
20         data.
21     mph : {None, number}, optional (default = None)
22         detect peaks that are greater than minimum peak height.
23     mpd : positive integer, optional (default = 1)
24         detect peaks that are at least separated by minimum peak
25         distance (in
26         number of data).
27     threshold : positive number, optional (default = 0)
28         detect peaks (valleys) that are greater (smaller) than
29         'threshold'
30         in relation to their immediate neighbors.
31     edge : {None, 'rising', 'falling', 'both'}, optional (default = 'rising')
32         for a flat peak, keep only the rising edge ('rising'), only
33         the
34         falling edge ('falling'), both edges ('both'), or don't
35         detect a
36         flat peak (None).
37     kpsh : bool, optional (default = False)
38         keep peaks with same height even if they are closer than 'mpd'
39
40     Returns
41
42     ind : 1D array-like
43         indeces of the peaks in 'x'.
44
45     Notes
46
47     The detection of valleys instead of peaks is performed internally
48     by simply
49     negating the data: 'ind_valleys = detect_peaks(-x)'
50
51     The function can handle NaN's
52
53     See this IPython Notebook [1]_.
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
53
54 References
55
56 .. [1] http://nbviewer.ipython.org/github/demotu/BMC/blob/master/
57 notebooks/DetectPeaks.ipynb
58
59 Examples
60
61 >>> from detect_peaks import detect_peaks
62 >>> x = np.random.randn(100)
63 >>> x[60:81] = np.nan
64 >>> # detect all peaks and plot data
65 >>> ind = detect_peaks(x, show=True)
66 >>> print(ind)
67
68 >>> x = np.sin(2*np.pi*5*np.linspace(0, 1, 200)) + np.random.
69 randn(200)/5
70 >>> # set minimum peak height = 0 and minimum peak distance = 20
71 >>> detect_peaks(x, mph=0, mpd=20, show=True)
72
73 >>> x = [0, 1, 0, 2, 0, 3, 0, 2, 0, 1, 0]
74 >>> # set minimum peak distance = 2
75 >>> detect_peaks(x, mpd=2, show=True)
76
77 >>> x = np.sin(2*np.pi*5*np.linspace(0, 1, 200)) + np.random.
78 randn(200)/5
79 >>> # detection of valleys instead of peaks
80 >>> detect_peaks(x, mph=0, mpd=20, valley=True, show=True)
81
82 >>> x = [0, 1, 1, 0, 1, 1, 0]
83 >>> # detect both edges
84 >>> detect_peaks(x, edge='both', show=True)
85
86 """
87
88 x = np.atleast_1d(x).astype('float64')
89 if x.size < 3:
90     return np.array([], dtype=int)
91 if valley:
92     x = -x
93 # find indices of all peaks
94 dx = x[1:] - x[:-1]
95 # handle NaN's
96 indnan = np.where(np.isnan(x))[0]
97 if indnan.size:
98     x[indnan] = np.inf
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```

99     dx[np.isnan(dx)][o] = np.inf
100    ine, ire, ife = np.array([[], [], []], dtype=int)
101    if not edge:
102        ine = np.where((np.hstack((dx, o)) < o) & (np.hstack((o, dx))
103 > o))[o]
104    else:
105        if edge.lower() in ['rising', 'both']:
106            ire = np.where((np.hstack((dx, o)) <= o) & (np.hstack((o,
107 dx)) > o))[o]
108        if edge.lower() in ['falling', 'both']:
109            ife = np.where((np.hstack((dx, o)) < o) & (np.hstack((o,
110 dx)) >= o))[o]
111    ind = np.unique(np.hstack((ine, ire, ife)))
112    # handle NaN's
113    if ind.size and indnan.size:
114        # NaN's and values close to NaN's cannot be peaks
115        ind = ind[np.in1d(ind, np.unique(np.hstack((indnan, indnan-1,
116 indnan+1))), invert=True)]
117    # first and last values of x cannot be peaks
118    if ind.size and ind[o] == o:
119        ind = ind[1:]
120    if ind.size and ind[-1] == x.size-1:
121        ind = ind[:-1]
122    # remove peaks < minimum peak height
123    if ind.size and mph is not None:
124        ind = ind[x[ind] >= mph]
125    # remove peaks - neighbors < threshold
126    if ind.size and threshold > o:
127        dx = np.min(np.vstack([x[ind]-x[ind-1], x[ind]-x[ind+1]]),
128 axis=o)
129        ind = np.delete(ind, np.where(dx < threshold)[o])
130    # detect small peaks closer than minimum peak distance
131    if ind.size and mpd > 1:
132        ind = ind[np.argsort(x[ind])][:-1] # sort ind by peak
133        height
134        idel = np.zeros(ind.size, dtype=bool)
135        for i in range(ind.size):
136            if not idel[i]:
137                # keep peaks with the same height if kpsh is True
138                idel = idel | (ind >= ind[i] - mpd) & (ind <= ind[i]
+ mpd) & (x[ind[i]] > x[ind] if kpsh else True)
139            idel[i] = o # Keep current peak
140        # remove the small peaks and sort back the indices by their
141        # occurrence
142        ind = np.sort(ind[~idel])
143
144    if show:
145        if indnan.size:

```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```

139     x[indnan] = np.nan
140
141 if valley:
142     x = -x
143
144     _plot(x, mph, mpd, threshold, edge, valley, ax, ind)
145
146
147 def _plot(x, mph, mpd, threshold, edge, valley, ax, ind):
148     """Plot results of the detect_peaks function, see its help."""
149     try:
150         import matplotlib.pyplot as plt
151     except ImportError:
152         print('matplotlib is not available.')
153     else:
154         if ax is None:
155             _, ax = plt.subplots(1, 1, figsize=(8, 4))
156
157         ax.plot(x, 'b', lw=1)
158         if ind.size:
159             label = 'valley' if valley else 'peak'
160             label = label + 's' if ind.size > 1 else label
161             ax.plot(ind, x[ind], '+', mfc=None, mec='r', mew=2, ms=8,
162                     label='%d %s' % (ind.size, label))
163             ax.legend(loc='best', framealpha=.5, numpoints=1)
164             ax.set_xlim(-.02*x.size, x.size*.02-1)
165             ymin, ymax = x[np.isfinite(x)].min(), x[np.isfinite(x)].max()
166             yrang = ymax - ymin if ymax > ymin else 1
167             ax.set_ylim(ymin - 0.1*yrang, ymax + 0.1*yrang)
168             ax.set_xlabel('Data #', fontsize=14)
169             ax.set_ylabel('Amplitude', fontsize=14)
170             mode = 'Valley detection' if valley else 'Peak detection'
171             ax.set_title("%s (mph=%s, mpd=%d, threshold=%s, edge=%s)" %
172                         (mode, str(mph), mpd, str(threshold), edge))
173             # plt.grid()
174             plt.show()
175
176
177 # Import needed modules:
178
179 import numpy as np
180 import pandas as pd
181 import matplotlib.pyplot as plt
182 from matplotlib import colors as mcolors
183 from scipy.signal import argrelextrema
184 from scipy.signal import find_peaks_cwt
185
186 from numpy import trapz
187

```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
188 # Load and specify dataset:  
189  
190 data = pd.io.parsers.read_csv("Kuerbis_Analyse_7min_LC-ESI-MS_12min.  
191     csv")  
192  
193 helpvalue = ['617', '619', '629', '631', '633.23', '633.29', '645', '  
194     647.27', '647.31', '659.23', '659.27', '661', '675', '793', '795',  
195     '807', '809', '821']  
196 #helpvalue = ['619', '633.23', '645', '647', '675', '821']  
197  
198 xs = data[['Zeit']].values  
199 xs = np.hstack(xs)  
200  
201 list_x_values = []  
202 list_y_values = []  
203 list_catabolite = []  
204 list_isomer = []  
205  
206 # Retrieve assumed constants for developing an equilibrium theory (though not working as found out):  
207  
208 ys = 0  
209 i = 0  
210 highest_peak = []  
211  
212 fig = plt.figure(figsize=(20,10))  
213 ax = plt.axes()  
214  
215 area_617 = 0  
216 area_619 = 0  
217 area_631 = 0  
218 area_63329 = 0  
219 area_645 = 0  
220 area_647 = 0  
221 area_659 = 0  
222 area_661 = 0  
223 area_675 = 0  
224 area_793 = 0  
225 area_795 = 0  
226 area_807 = 0  
227 area_809 = 0  
228 area_821 = 0  
229  
230 height_617 = 0  
231 height_619 = 0  
232 height_631 = 0  
233 height_63329 = 0
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
233 height_645 = 0
234 height_647 = 0
235 height_659 = 0
236 height_661 = 0
237 height_675 = 0
238 height_793 = 0
239 height_795 = 0
240 height_807 = 0
241 height_809 = 0
242 height_821 = 0
243
244 distance_for_integration = 0.1
245
246 for h in helpvalue:
247     ys = data[[helpvalue[i]]].values
248     ys = np.hstack(ys)
249
250     highest_peak.append(ys.max())
251
252     if (i == 0):
253         print(helpvalue[i])
254         area_617 = trapz(ys, dx=distance_for_integration)
255         height_617 = ys.max()
256     elif (i == 1):
257         print(helpvalue[i])
258         area_619 = trapz(ys, dx=distance_for_integration)
259         height_619 = ys.max()
260     elif (i == 3):
261         print(helpvalue[i])
262         area_631 = trapz(ys, dx=distance_for_integration)
263         height_631 = ys.max()
264     elif (i == 5):
265         print(helpvalue[i])
266         area_63329 = trapz(ys, dx=distance_for_integration)
267         height_63329 = ys.max()
268     elif (i == 6):
269         print(helpvalue[i])
270         area_645 = trapz(ys, dx=distance_for_integration)
271         height_645 = ys.max()
272     elif (i == 7):
273         print(helpvalue[i])
274         area_647 = trapz(ys, dx=distance_for_integration)
275         height_647 = ys.max()
276     elif (i == 10):
277         print(helpvalue[i])
278         area_659 = trapz(ys, dx=distance_for_integration)
279         height_659 = ys.max()
280     elif (i == 11):
281         print(helpvalue[i])
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
282     area_661 = trapz(ys, dx=distance_for_integration)
283     height_661 = ys.max()
284 elif (i == 12):
285     print(helpvalue[i])
286     area_675 = trapz(ys, dx=distance_for_integration)
287     height_675 = ys.max()
288 elif (i == 13):
289     print(helpvalue[i])
290     area_793 = trapz(ys, dx=distance_for_integration)
291     height_793 = ys.max()
292 elif (i == 14):
293     print(helpvalue[i])
294     area_795 = trapz(ys, dx=distance_for_integration)
295     height_795 = ys.max()
296 elif (i == 15):
297     print(helpvalue[i])
298     area_807 = trapz(ys, dx=distance_for_integration)
299     height_807 = ys.max()
300 elif (i == 16):
301     print(helpvalue[i])
302     area_809 = trapz(ys, dx=distance_for_integration)
303     height_809 = ys.max()
304 elif (i == 17):
305     print(helpvalue[i])
306     area_821 = trapz(ys, dx=distance_for_integration)
307     height_821 = ys.max()
308
309     i = i+1
310
311 Ka_617 = area_631/area_617
312 Kh_617 = height_631/height_617
313 Ka_619 = area_63329/area_619
314 Kh_619 = height_63329/height_619
315 Ka_645 = area_659/area_645
316 Kh_645 = height_659/height_645
317 Ka_647 = area_661/area_647
318 Kh_647 = height_661/height_647
319 Ka2_647 = area_675/area_647
320 Kh2_647 = height_675/height_647
321 Ka_793 = area_807/area_793
322 Kh_793 = height_807/height_793
323 Ka2_793 = area_821/area_793
324 Kh2_793 = height_821/height_793
325 Ka_795 = area_809/area_795
326 Kh_795 = height_809/height_795
327
328 print('Ka_617')
329 print(Ka_617)
330 print(Kh_617)
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
331 print('Ka_619')
332 print(Ka_619)
333 print(Kh_619)
334 print('Ka_645')
335 print(Ka_645)
336 print(Kh_645)
337 print('Ka_647')
338 print(Ka_647)
339 print(Kh_647)
340 print('Ka2_647')
341 print(Ka2_647)
342 print(Kh2_647)
343 print('Ka_793')
344 print(Ka_793)
345 print(Kh_793)
346 print('Ka2_793')
347 print(Ka2_793)
348 print(Kh2_793)
349 print('Ka_795')
350 print(Ka_795)
351 print(Kh_795)

352

353 highest_peak = np.array(highest_peak).max()

355
356 ys = o
357 i=0
358 previous_mass = o

359
360 for h in helpvalue:
361     ys = data[[helpvalue[i]]].values
362     ys = np.hstack(ys)

363
364     y = []
365     for x in ys:
366         y.append(((x/highest_peak)*100)+previous_mass+10)
367
368     y = np.array(y)

369
370     previous_mass = y.max()
371     x_max_arg = y.argmax()

372
373     #local_maxima = argrelextrema(y, np.greater, order=200)
374     #local_maxima = find_peaks_cwt(y, np.arange(1, 350))
375     local_maxima = detect_peaks(y, mph=0.04, mpd=350)
376     #first_isomer = np.partition(np.array(y).flatten(), -1)[-1]
377     #first_isomer = np.round(np.array(np.hstack(y)[local_maxima])).argsort()[-o:]
378     #print(first_isomer)
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
379 #y_help = np.sort(y[local_maxima])
380
381 line = plt.plot(xs, y, color = 'black', label = h + '[M+H]^++')
382 ax.annotate(xy=(xs[x_max_arg], previous_mass), s = h + r' $[M+H]
383 ]^+$ ('+str(np.round(xs[x_max_arg], 1))+'' min.)')
384
385 list_x_values.append(xs[x_max_arg])
386 list_y_values.append(previous_mass)
387 list_catabolite.append(h)
388
389 #u=1
390 #for x in xs[local_maxima]:
391     #ax.annotate(xy=(x, y[np.where(x)]), s = h + r' $[M+H]^+$-
392     #Isomer '+str(u)+'' ('+str(np.round(x, 1))+'' min.))
393
394     #list_x_values.append(x)
395     #list_y_values.append(y[np.where(x)])
396     #list_catabolite.append(h)
397     #list_isomer.append(u)
398
399     #u = u+1
400
401 plt.yticks([])
402 plt.xlabel('Retention Time (min.)')
403 plt.xlim(0,65)
404 plt.savefig('Kuerbis_Analyse_Reaktion3h_LC-ESI-MS.png')
405 plt.show()
406
407
408 # Load and specify another dataset:
409
410 data = pd.io.parsers.read_csv("Kuerbis_Analyse_7min_LC-ESI-
411 MS_12min_Spektrum.csv")
412
413 xs = data[['Time']].values
414 xs = np.hstack(xs)
415
416 ys = data[['Intensity']].values
417 ys = np.hstack(ys)
418
419 # Print whole chromatogram for completion purpose:
420
421 fig = plt.figure(figsize=(20,10))
422 ax = plt.axes()
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
425 #ax.annotate(xy=(xs[x_max_arg], previous_mass), s = h + r' ${M+H}^{+}$+$\n426 ('+str(np.round(xs[x_max_arg], 1))+'' min.) ')\n427\n428 highest_peak = np.array(ys).max()\ny = []\n429 for z in ys:\n    y.append(((z/highest_peak)*100))\n430 ys = y\n431\n432 line = plt.plot(xs, ys, color = 'black', label = ' ')\n433\n434 highest_peak = np.array(list_y_values).max()\n435 helper = []\n436 for t in list_y_values:\n    helper.append(((t/highest_peak)*100))\n437 list_y_values = helper\n438\n439 i = 0\n440 for index in list_x_values:\n    h = list_catabolite[i]\n    #u = list_isomer[i]\n    text = h + r' ${M+H}^{+}$+$\n        ('+str(np.round(index, 1))+'' min.) '\n    plt.annotate(\n        text, xy=(index, 0), xycoords='data',\n        xytext=(index, list_y_values[i]), textcoords='data',\n        rotation=0, size=12, horizontalalignment='center',\n        verticalalignment='bottom',\n        arrowprops=dict(arrowstyle='-', color="#808080",\n        linewidth=0.4, shrinkA=0.05, shrinkB=1))\n    i = i+1\n450\n451 #ax.annotate(xy=(x, y[np.where(x)]), s = h + r' ${M+H}^{+}$-$Isomer '$+\n452 str(u)+'' ('+str(np.round(x, 1))+'' min.) ')\n453\n454 plt.xlabel('Retention Time (min.)')\n455 plt.ylabel('Relative abundance')\n456 plt.xlim(0,65)\n457 plt.savefig('Kuerbis-Analyse_Ganzes_Spektrum.png')\n458 plt.show()
```

content/Anhang/Code/VWA_Analyse_LC-ESI-MS.py

C.3. Programm zur Erstellung von MS-Spektren

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
2 # coding: utf-8
3
4 # # Drawing nice-looking MS-spectra with fragmentation paths
5
6 # Import needed modules:
7
8 import pandas as pd
9 import numpy as np
10 import math as mt
11 import matplotlib.pyplot as plt
12
13 from matplotlib import rcParams
14
15
16 # Define filetypes and other general stuff:
17
18 filetype = "png"          # "png" or "pdf"
19 """str: Filetype of the outputfile
20
21 Tested with "pdf" and "png"
22 """
23
24 figdpi = 200
25 """int: DPI of the image output file
26 """
27
28
29 # correct DPI of figure if using pdf
30 if filetype.lower() == "pdf":
31     figdpi = 72
32
33 params = {'backend': 'pdf',
34            'figure.dpi': figdpi, # 72 for pdf
35            'axes.labelsize': 10,
36            'font.size': 10,
37            'legend.fontsize': 8,
38            'legend.frameon': True,
39            'xtick.labelsize': 8,
40            'ytick.labelsize': 8,
41            'font.family': 'serif',
42            'text.usetex': True,
43            'text.latex.unicode': True,
44            'axes.linewidth': 0.5,
45            'xtick.major.size': 4, # major tick size in points
46            'xtick.minor.size': 2, # minor tick size in points
47            'xtick.direction': 'out',
48            'ytick.major.size': 4, # major tick size in points
49            'ytick.minor.size': 2, # minor tick size in points
50            'ytick.direction': 'out',
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
51    }
52 plt.rcParams.update(params)
53
54 # Retrieve the maximum peak on which to scale all the others:
55
56 def _get_max_peak(x_value, raw_values):
57     """Search for the local peak next to the x-value.
58
59     The value searches in the near area of the given x-value for the
60     maximum (local)
61     peak, which corresponds to the data.
62
63     Args:
64         x_value (float): m/z value (x-coordinate) of the point, to be
65         annotated
66         raw_values (Pandas.DataFrame): Data values, which should be
67         annotated
68
69     Returns:
70         y value of the peak, next to the given x value
71
72     """
73     #print(x_value)
74     #print(raw_values[raw_values["m/z"] == x_value])
75     raw_values_index = raw_values[raw_values["m/z"] == x_value].index
76     [0]
77
78     #print(raw_values_index)
79     value, index = float(raw_values.loc[raw_values_index - 1, "intensity_normalized"]), raw_values_index - 1
80
81     #for z in range(-5, 15):
82     #if float(raw_values.loc[raw_values_index + z, "intensity_normalized"]) > value:
83     #    value, index = float(raw_values.loc[raw_values_index + z, "intensity_normalized"]), raw_values_index + z
84     #return value
85
86
87 # Retrieve the positions of the points:
88
89 def annotate_point(x1, y_pos=0, text=' ', raw_values=None):
90     """Annotate a specific point.
91
92     Annotate a point with a label. The label will be placed
93     vertically
94     with an additional line.
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
92     The function uses the data values and searches for the peak of
93     the
94     value to be annotated. Therefore the ''raw_values'' parameter is
95     used
96
97     Args:
98         x1 (float): m/z value (x-coordinate) of the point, to be
99             annotated
100            y_pos (Optional[float]): Position of the label beginning (y-
101              coordinate).
102              The value uses the scale of the datapoints.
103              text (str): Label text
104              raw_values (Pandas.DataFrame): Data values, which should be
105              annotated
106
107             """
108
109             delta_point_annotate_line_pixel = 1
110
111             if raw_values is not None:
112
113                 if __get_max_peak(x1, raw_values) < (y_pos -
114                     delta_point_annotate_line_pixel):
115                     xy_text = (x1, y_pos)
116                 else:
117                     xy_text = (x1, __get_max_peak(x1, raw_values) +
118                     delta_point_annotate_line_pixel)
119
120                     plt.annotate(
121                         text, xy=(x1, __get_max_peak(x1, raw_values) +
122                         delta_point_annotate_line_pixel), xycoords='data',
123                         xytext=xy_text, textcoords='data',
124                         rotation=90, size=8, horizontalalignment='center',
125                         verticalalignment='bottom',
126                         arrowprops=dict(arrowstyle='-', color="#808080",
127                         linewidth=0.4, shrinkA=0.05, shrinkB=1))
128
129
130     # Calculate distance between the annotated points:
131
132     def annotate_distance(x1=0, x2=0, y_pos=0, text='', raw_values=None,
133                           rotate_text=0):
134
135         """Annotate the distance between two peaks
136
137         Annotate the distance between two given peaks. The text can be
138         placed with a
139         given angle.
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
619
620
621
622
623
624
625
626
627
627
628
629
629
630
631
632
632
633
633
634
634
635
635
636
636
637
637
638
638
639
639
640
640
641
641
642
642
643
643
644
644
645
645
646
646
647
647
648
648
649
649
650
650
651
651
652
652
653
653
654
654
655
655
656
656
657
657
658
658
659
659
660
660
661
661
662
662
663
663
664
664
665
665
666
666
667
667
668
668
669
669
670
670
671
671
672
672
673
673
674
674
675
675
676
676
677
677
678
678
679
679
680
680
681
681
682
682
683
683
684
684
685
685
686
686
687
687
688
688
689
689
690
690
691
691
692
692
693
693
694
694
695
695
696
696
697
697
698
698
699
699
700
700
701
701
702
702
703
703
704
704
705
705
706
706
707
707
708
708
709
709
710
710
711
711
712
712
713
713
714
714
715
715
716
716
717
717
718
718
719
719
720
720
721
721
722
722
723
723
724
724
725
725
726
726
727
727
728
728
729
729
730
730
731
731
732
732
733
733
734
734
735
735
736
736
737
737
738
738
739
739
740
740
741
741
742
742
743
743
744
744
745
745
746
746
747
747
748
748
749
749
750
750
751
751
752
752
753
753
754
754
755
755
756
756
757
757
758
758
759
759
760
760
761
761
762
762
763
763
764
764
765
765
766
766
767
767
768
768
769
769
770
770
771
771
772
772
773
773
774
774
775
775
776
776
777
777
778
778
779
779
780
780
781
781
782
782
783
783
784
784
785
785
786
786
787
787
788
788
789
789
790
790
791
791
792
792
793
793
794
794
795
795
796
796
797
797
798
798
799
799
800
800
801
801
802
802
803
803
804
804
805
805
806
806
807
807
808
808
809
809
810
810
811
811
812
812
813
813
814
814
815
815
816
816
817
817
818
818
819
819
820
820
821
821
822
822
823
823
824
824
825
825
826
826
827
827
828
828
829
829
830
830
831
831
832
832
833
833
834
834
835
835
836
836
837
837
838
838
839
839
840
840
841
841
842
842
843
843
844
844
845
845
846
846
847
847
848
848
849
849
850
850
851
851
852
852
853
853
854
854
855
855
856
856
857
857
858
858
859
859
860
860
861
861
862
862
863
863
864
864
865
865
866
866
867
867
868
868
869
869
870
870
871
871
872
872
873
873
874
874
875
875
876
876
877
877
878
878
879
879
880
880
881
881
882
882
883
883
884
884
885
885
886
886
887
887
888
888
889
889
890
890
891
891
892
892
893
893
894
894
895
895
896
896
897
897
898
898
899
899
900
900
901
901
902
902
903
903
904
904
905
905
906
906
907
907
908
908
909
909
910
910
911
911
912
912
913
913
914
914
915
915
916
916
917
917
918
918
919
919
920
920
921
921
922
922
923
923
924
924
925
925
926
926
927
927
928
928
929
929
930
930
931
931
932
932
933
933
934
934
935
935
936
936
937
937
938
938
939
939
940
940
941
941
942
942
943
943
944
944
945
945
946
946
947
947
948
948
949
949
950
950
951
951
952
952
953
953
954
954
955
955
956
956
957
957
958
958
959
959
960
960
961
961
962
962
963
963
964
964
965
965
966
966
967
967
968
968
969
969
970
970
971
971
972
972
973
973
974
974
975
975
976
976
977
977
978
978
979
979
980
980
981
981
982
982
983
983
984
984
985
985
986
986
987
987
988
988
989
989
990
990
991
991
992
992
993
993
994
994
995
995
996
996
997
997
998
998
999
999
999
999
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
129     Args:  
130         x1 (float): m/z value (x-coordinate) of the left point  
131         x2 (float): m/z value (x-coordinate) of the right point  
132         y_pos (Optional[float]): Position of the label beginning (y-  
133             coordinate).  
134             The value uses the scale of the datapoints.  
135             text (str): Label text  
136             raw_values (Pandas.DataFrame): Data values, which should be  
137             annotated  
138                 rotate_text (Optional[int]): Rotation of the label, should be  
139                 0 or 90  
140  
141             """  
142             delta_point_annotate_line_pixel = 1  
143  
144             if raw_values is not None:  
145                 if __get_max_peak(x1, raw_values) < (y_pos -  
146                     delta_point_annotate_line_pixel):  
147                         plt.annotate(  
148                             '', xy=(x1, __get_max_peak(x1, raw_values) +  
149                                 delta_point_annotate_line_pixel), xycoords='data',  
150                                 xytext=(x1, y_pos), textcoords='data',  
151                                 arrowprops=dict(arrowstyle='-', color="#808080",  
152                                     linewidth=0.4, shrinkA=0.05, shrinkB=0.05))  
153  
154             if __get_max_peak(x2, raw_values) < (y_pos -  
155                 delta_point_annotate_line_pixel):  
156                 plt.annotate(  
157                     '', xy=(x2, __get_max_peak(x2, raw_values) +  
158                         delta_point_annotate_line_pixel), xycoords='data',  
159                         xytext=(x2, y_pos), textcoords='data',  
160                         arrowprops=dict(arrowstyle='-', color="#808080",  
161                             linewidth=0.4, shrinkA=0.05, shrinkB=0.05))  
162  
163             plt.annotate(  
164                 text, xy=((x1 if x1 <= x2 else x2) + mt.fabs((x1 - x2)) / 2,  
165                     y_pos), xycoords='data',  
166                     rotation=rotate_text, size=8,  
167                     horizontalalignment='center', verticalalignment='bottom',  
168                     xytext=(0, 2), textcoords='offset points')
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
166 # Helper functions
167
168
169 # Set the size and margins of the figure:
170
171 def _figsize_and_margins(plotsize, subplots=(1, 1), **  
    absolute_margins):  
    """Determine figure size and margins from plot size and absolute  
    margins  

173 Args:  

174     plotsize: (width, height) of plot area in inch  

175     subplots: (nrows, ncols) of subplots  

176     left, right, top, bottom: absolute margins around plot area  

177     wspace, hspace: width and height spacing between subplots  

178
179 Returns:  

180     size: figure size for figsize argument of figure()  

181     margins: relative margins dict suitable for subplots_adjust  

182     ()  

183
184 Example: making 2x2 grid of 3" square plots with specific  

185 spacings:  

186     sz, rm = figsize_and_margins((3,3), (2,2), left=1, right=.5,  

187                                     top=.5, bottom=1,  

188                                     wspace=.5, hspace  

189                                     =.5)
190     figure(figsize=sz)
191     subplots_adjust(**rm)
192     subplot(221); subplot(222)
193     subplot(223); subplot(224)
194
195 Source: http://scipy-central.org/item/65/1/absolute-plot-size-and  

196 -margins-in-matplotlib
197 """
198
199 pw, ph = plotsize
200 nr, nc = subplots
201 amarg = absolute_margins
202 # dictionary for relative margins
203 # initialize from rcParams with margins not in amarg
204 rmarg = dict((m, rcParams['figure.subplot.' + m])
205               for m in ('left', 'right', 'top', 'bottom', 'wspace',
206             'hspace'))
207               if m not in amarg
208
209 # subplots_adjust wants wspace and hspace relative to plotsize:
210 if 'wspace' in amarg:
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```

208     rmarg[ 'wspace' ] = float(amarg[ 'wspace' ]) / pw
209     if 'hspace' in amarg:
210         rmarg[ 'hspace' ] = float(amarg[ 'hspace' ]) / ph
211     # in terms of the relative margins:
212     # width * (right - left)
213     #   = ncols * plot_width + (ncols - 1) * wspace * plot_width
214     # height * (top - bottom)
215     #   = nrows * plot_height + (nrows - 1) * hspace * plot_height
216     # solve for width and height, using absolute margins as necessary
217     :
218     width = float((nc + (nc - 1) * rmarg[ 'wspace' ]) * pw + amarg.get(
219         'left', 0) + amarg.get('right', 0)) / (
220             rmarg.get('right', 1) - rmarg.get('left', 0))
221     height = float((nr + (nr - 1) * rmarg[ 'hspace' ]) * ph + amarg.get(
222         'top', 0) + amarg.get('bottom', 0)) / (
223             rmarg.get('top', 1) - rmarg.get('bottom', 0))
224
225     # now we can get any remaining relative margins
226     if 'left' in amarg:
227         rmarg[ 'left' ] = float(amarg[ 'left' ]) / width
228     if 'right' in amarg:
229         rmarg[ 'right' ] = 1 - float(amarg[ 'right' ]) / width
230     if 'top' in amarg:
231         rmarg[ 'top' ] = 1 - float(amarg[ 'top' ]) / height
232     if 'bottom' in amarg:
233         rmarg[ 'bottom' ] = float(amarg[ 'bottom' ]) / height
234     # return figure size and relative margins
235     return (width, height), rmarg
236
237 def __get_ax_size(ax, fig):
238     """
239     Source: http://scipy-central.org/item/65/1/absolute-plot-size-and-
240     -margins-in-matplotlib
241     """
242     bbox = ax.get_window_extent().transformed(fig.dpi_scale_trans.
243     inverted())
244     width, height = bbox.width, bbox.height
245     width *= fig.dpi
246     height *= fig.dpi
247     return width, height
248
249 def __conv_inch(length_mm):
250     """Converts a length from millimeters to inch
251
252     Args:
253         length_mm (int, float): length in millimeters to be converted
254
255     Returns:
256         float: The converted length in inch

```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
252     """
253     return length_mm / 25.4
254
255 def generate_massspectra_plot_automatic_labels(input_filename,
256     output_filename):
257     print("Generate {} mass spectra plot ({1}.{2}) from {3}.[xy/txt]"
258         .format(filetype.upper(), output_filename,
259                 filetype, input_filename))
260
261     # min and max value of the x axis
262     min_xaxis = 50
263     max_xaxis = 425
264
265     # dimensions of the single plot
266     figwidth_mm = 141
267     left_margin_mm = 14
268     right_margin_mm = 2
269     top_margin_mm = 26
270     bottom_margin_mm = 13
271
272     plotwidth_mm = figwidth_mm - left_margin_mm - right_margin_mm
273     plotheight_mm = plotwidth_mm * 0.8
274
275     hspace_mm = 0.1 # horizontal space between two plots
276
277     # read xy input data
278     raw_values = pd.read_csv(input_filename + ".xy", sep=" ", names=[ "m/z", "intensity"],
279                             dtype={ "m/z": np.float64, "intensity": np.float64 })
280
281     # normalize input data
282     max_val = np.max(raw_values[ 'intensity' ])
283     raw_values[ "intensity_normalized" ] = raw_values[ 'intensity' ] / max_val * 100.0 # normalize intensity to percent
284
285     # read txt captions
286     caption_values = pd.read_csv(input_filename + ".txt", sep=";", names=[ "m/z", "caption" ],
287                                   dtype={ "m/z": np.float64 })
288
289     # find maximum value for each annotate peak - necessary for later
290     # calculation of annotation lines
291     for i in caption_values.index:
292         raw_values_index = raw_values[ raw_values[ "m/z" ] == caption_values.ix[i][ "m/z" ] ].index[0]
293         value, index = float( raw_values.loc[ raw_values_index - 5, "intensity_normalized" ] ), raw_values_index - 5
294
295         for z in range(-5, 15):
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
291     if float(raw_values.loc[raw_values_index + z, "intensity_normalized"]) > value:
292         value, index = float(raw_values.loc[raw_values_index + z, "intensity_normalized"]), raw_values_index + z
293
294         caption_values.loc[i, "m/z"] = float(raw_values.loc[index, "m/z"])
295         caption_values.loc[i, "intensity_normalized"] = value # add
296         intensity to caption table
297
298         # dimension for the annotations in pixel
299         delta_x_text_labels_mm = 3.8
300         delta_point_annotate_line_mm = 1
301         label_annotate_arm_high_mm = 5.3
302         delta_y_diagonal_annotate_arm_mm = 3.5
303         delta_y_baseline_axistop_mm = 6.3
304         delta_label_mznumber_pixel_mm = 7
305
306         fsize, margins = __figsize_and_margins(plotsize=__conv_inch(
307             plotwidth_mm), __conv_inch(plotheight_mm)),
308             subplots=(1, 1),
309             left=__conv_inch(left_margin_mm),
310             right=__conv_inch(right_margin_mm),
311             top=__conv_inch(top_margin_mm),
312             bottom=__conv_inch(bottom_margin_mm),
313             wspace=0.01, hspace=
314             __conv_inch(hspace_mm))
315         fig = plt.figure(figsize=fsize, )
316         plt.subplots_adjust(**margins)
317         ax = fig.add_subplot(111)
318
319         # delta_dimension in pixel calculate from mm
320         delta_x_text_labels_pixel = __conv_inch(delta_x_text_labels_mm) *
321             fig.dpi
322         delta_point_annotate_line_pixel = __conv_inch(
323             delta_point_annotate_line_mm) * fig.dpi
324         label_annotate_arm_high_pixel = __conv_inch(
325             label_annotate_arm_high_mm) * fig.dpi
326         delta_y_diagonal_annotate_arm = __conv_inch(
327             delta_y_diagonal_annotate_arm_mm) * fig.dpi
328         delta_y_baseline_axistop = __conv_inch(
329             delta_y_baseline_axistop_mm) * fig.dpi
330         delta_label_mznumber_pixel = __conv_inch(
331             delta_label_mznumber_pixel_mm) * fig.dpi
332
333         # plot spectra line
334         ax.plot(raw_values["m/z"], raw_values["intensity_normalized"],
335             color="black", linewidth=0.8)
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```

325 # set x axes range
326 if min_xaxis is not None and max_xaxis is not None:
327     ax.set_xlim([int(min_xaxis), int(max_xaxis)])
328
329 length_x_axis_pixel, length_y_axis_pixel = __get_ax_size(ax, fig)
330 x_axis_min, x_axis_max = ax.get_xlim()
331 y_axis_min, y_axis_max = ax.get ylim()
332
333 list_text_pos = list()
334 if len(caption_values.index) > 0:
335
336     # annotate from basepeak
337     basepeak_index = caption_values[caption_values["intensity_normalized"] >= 100.0].index
338     if len(basepeak_index) == 0:
339         basepeak_index = [len(caption_values) / 2]
340
341     # annotate peaks left from basepeak
342     for z in caption_values.loc[:basepeak_index[0], "m/z"].sort_index(ascending=False):
343         x_value_pixel = (z - x_axis_min) / (x_axis_max - x_axis_min) * length_x_axis_pixel
344
345         if len(list_text_pos) == 0:
346             list_text_pos.append(x_value_pixel)
347         else:
348             if x_value_pixel > list_text_pos[-1] + delta_x_text_labels_pixel:
349                 list_text_pos.append(x_value_pixel)
350             else:
351                 list_text_pos.append(list_text_pos[-1] + delta_x_text_labels_pixel)
352
353     # annotate peaks right from basepeak
354     if basepeak_index[0] + 1 in caption_values.index:
355         for z in caption_values.loc[basepeak_index[0] + 1:, "m/z"]:
356             x_value_pixel = (z - x_axis_min) / (x_axis_max - x_axis_min) * length_x_axis_pixel
357
358             if x_value_pixel < list_text_pos[0] - delta_x_text_labels_pixel:
359                 list_text_pos.insert(0, x_value_pixel)
360             else:
361                 list_text_pos.insert(0, list_text_pos[0] - delta_x_text_labels_pixel)
362
363     # move annotation to left, if the label is out of the axes
364     range

```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```

364     if len(list_text_pos) > 0 and max(list_text_pos) >=
length_x_axis_pixel:
365         print("move labels to left")
366         calc_delta = max(list_text_pos) - length_x_axis_pixel
367         for index in range(len(list_text_pos) - 1, 0, -1):
368             print("change", list_text_pos[index], calc_delta)
369             if index > 1 and list_text_pos[index] - calc_delta >
list_text_pos[index - 1] + delta_x_text_labels_pixel:
370                 list_text_pos[index] = list_text_pos[index] -
calc_delta
371             break
372         else:
373             list_text_pos[index] = list_text_pos[index] -
calc_delta
374
375     for i in caption_values.index:
376
377         label_x_pos = list_text_pos.pop()
378         x_value = float(caption_values.loc[i, "m/z"])
379         y_value = float(caption_values.loc[i, "
intensity_normalized"])
380         label_text = str(caption_values.loc[i, "caption"])
381
382         x_value_pixel = (x_value - x_axis_min) / (x_axis_max -
x_axis_min) * length_x_axis_pixel
383         y_value_pixel = (y_value - y_axis_min) / (y_axis_max -
y_axis_min) * length_y_axis_pixel
384         label_y_pos_pixel = length_y_axis_pixel +
delta_y_baseline_axistop
385         length_y_annotation_line = label_y_pos_pixel -
y_value_pixel - delta_point_annotation_line_pixel
386         label_annotation_arm_low_pixel = length_y_annotation_line -
label_annotation_arm_high_pixel - delta_y_diagonal_annotation_arm
387
388         if label_annotation_arm_low_pixel < 0:
389             label_annotation_arm_low_pixel = 0
390
391         ax.annotate("{:.0f}".format(x_value),
392                     xy=(x_value_pixel, y_value_pixel +
delta_point_annotation_line_pixel),
393                     xycoords='axes pixels', rotation=90,
394                     xytext=(label_x_pos, label_y_pos_pixel),
395                     textcoords='axes pixels', size=8,
396                     arrowprops=dict(arrowstyle="",
397                                     connectionstyle="arc ,angleA
=-90,armA=" + str(label_annotation_arm_high_pixel) +
",angleB= 90,
398                     armB=" + str(label_annotation_arm_low_pixel) +

```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```

399                                         ",rad=0",
400     linewidth=0.5, color="#808080"),
401                                         horizontalalignment='center',
402                                         verticalalignment='bottom')
403     ax.annotate(label_text,
404                 xy=(x_value_pixel, y_value_pixel +
405                     delta_point_annotation_line_pixel),
406                 xycoords='axes pixels', rotation=90,
407                 xytext=(label_x_pos, label_y_pos_pixel +
408                     delta_label_mznumber_pixel),
409                 textcoords='axes pixels', size=8,
410                 horizontalalignment='center',
411                 verticalalignment='bottom'
412             )
413
414
415 # remove top and right axis
416 ax.spines['top'].set_visible(False)
417 ax.spines['right'].set_visible(False)
418 ax.get_xaxis().tick_bottom()
419 ax.get_yaxis().tick_left()
420
421 # label axes
422 ax.set_xlabel(r"$m/z$")
423 ax.set_ylabel(r"$Intensity \,[\%]$")
424
425 # set x labels
426 plt.xticks(rotation='vertical')
427 start, end = ax.get_xlim()
428 ax.xaxis.set_ticks(np.arange(start, end + 1, 25))
429
430 # set y labels
431 ax.set_ylimits(0, 100)
432 start, end = ax.get_ylimits()
433 ax.yaxis.set_ticks(np.arange(start, end + 1, 10))
434
435 # set grid
436 plt.grid(True, axis="y", color='black', linestyle=':', linewidth
437 =0.1)
438 plt.show()
439
440 plt.savefig(output_filename + "." + filetype, dpi=fig.dpi, format
441 =filetype)
442 plt.close()
443
444 def generate_massspectra_two_plot_manual_annotation(input_filename1,
445 input_filename2, output_filename):
446     print("Generate {0} mass spectra plot ({1}.{2}) from {3}.xy and
447 {4}.xy".format(filetype.upper(), output_filename,

```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
438     filetype , input_filename1 ,
439
440     input_filename2))
441
442 # min and max value of the x axis
443 min_xaxis = 50
444 max_xaxis = 475
445
446 # labels
447 label1 = "Substance 1"
448 label2 = "Substance 2"
449
450 # dimensions of the single plot
451 figwidth_mm = 141
452 left_margin_mm = 14
453 right_margin_mm = 2
454 top_margin_mm = 5
455 bottom_margin_mm = 13
456
457 plotwidth_mm = figwidth_mm - left_margin_mm - right_margin_mm
458 plotheight_mm = plotwidth_mm * 0.8
459
460 hspace_mm = 25 # horizontal space between two plots
461
462 # read xy input data
463 raw_values1 = pd.read_csv(input_filename1 + ".xy", sep=" ", names
464 =["m/z", "intensity"],
465                               dtype={"m/z": np.float64, "intensity":
466 np.float64})
467 # normalize input data
468 max_val = np.max(raw_values1['intensity'])
469 raw_values1["intensity_normalized"] = raw_values1['intensity'] /
470 max_val * 100.0 # normalize intensity to percent
471
472 # read xy input data
473 raw_values2 = pd.read_csv(input_filename2 + ".xy", sep=" ", names
474 =["m/z", "intensity"],
475                               dtype={"m/z": np.float64, "intensity":
476 np.float64})
477 # normalize input data
478 max_val = np.max(raw_values2['intensity'])
479 raw_values2["intensity_normalized"] = raw_values2['intensity'] /
480 max_val * 100.0 # normalize intensity to percent
481
482 fsize , margins = __figsize_and_margins(plotsize=(__conv_inch(
483 plotwidth_mm) , __conv_inch(plotheight_mm)),
484 subplots=(1, 1),
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
477     left=__conv_inch(
478         left_margin_mm), right=__conv_inch(right_margin_mm),
479         top=__conv_inch(
480             top_margin_mm), bottom=__conv_inch(bottom_margin_mm),
481             wspace=0.01, hspace=
482             __conv_inch(hspace_mm))
483     fig = plt.figure(figsize=fsize, )
484     plt.subplots_adjust(**margins)
485
486     ax = fig.add_subplot(211)
487
488     # plot spectra line
489     plt1, = ax.plot(raw_values1["m/z"], raw_values1[
490         "intensity_normalized"], color="black", linewidth=0.8, label=label1)
491
492     legend = plt.legend(handles=[plt1], loc=2)
493     legend.get_frame().set_linewidth(0)
494
495     # set x axes range
496     if min_xaxis is not None and max_xaxis is not None:
497         ax.set_xlim([int(min_xaxis), int(max_xaxis)])
498
499     # annotate plot1
500     annotate_point(253, 60, r'Peak 1', raw_values1)
501     annotate_distance(385, 403, 45, r'$-18$', raw_values1,
502         rotate_text=90)
503     annotate_distance(367, 385, 45, r'$-18$', raw_values1,
504         rotate_text=90)
505     annotate_distance(321, 349, 75, r'$xy$', raw_values1, rotate_text
506         =0)
507     annotate_point(403, 60, r'Peak 2', raw_values1)
508
509     # remove top and right axis
510     ax.spines['top'].set_visible(False)
511     ax.spines['right'].set_visible(False)
512     ax.get_xaxis().tick_bottom()
513     ax.get_yaxis().tick_left()
514
515     # label axes
516     ax.set_ylabel(r"$Intensity \,[\%]$")
517
518     # set x labels
519     plt.xticks(rotation='vertical')
520     start, end = ax.get_xlim()
521     ax.xaxis.set_ticks(np.arange(start, end + 1, 25))
522
523     # set y labels
524     ax.set_yscale('log')
525     start, end = ax.get_yscale()
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
518     ax.yaxis.set_ticks(np.arange(start, end + 1, 10))
519
520     # set grid
521     plt.grid(True, axis="y", color='black', linestyle=':', linewidth=0.1)
522
523     # set x labels
524     plt.xticks(rotation='vertical')
525     start, end = ax.get_xlim()
526     ax.xaxis.set_ticks(np.arange(start, end + 1, 25))
527     # set y labels
528     ax.set_ylim(0, 100)
529     start, end = ax.get_ylim()
530     ax.yaxis.set_ticks(np.arange(start, end + 1, 10))
531     # set grid
532     plt.grid(True, axis="y", color='black', linestyle=':', linewidth=0.1)
533
534     # generate plot2
535     ax = fig.add_subplot(212)
536
537     plt2, = ax.plot(raw_values2["m/z"], raw_values2["intensity_normalized"], color="#606060", linewidth=0.8,
538                      label=label2)
539     legend = plt.legend(handles=[plt2], loc=2)
540     legend.get_frame().set_linewidth(0)
541
542     # set x axes range
543     if min_xaxis is not None and max_xaxis is not None:
544         ax.set_xlim([int(min_xaxis), int(max_xaxis)])
545
546     # annotate
547     annotate_point(253, 60, r'Peak 1', raw_values2)
548     annotate_point(189, 60, r'189', raw_values2)
549     annotate_point(215, 60, r'215', raw_values2)
550     annotate_distance(385, 445, 30, r'Multiple'"\n"r'line'"'\n"
551     annotation', raw_values2)
552     annotate_distance(367, 385, 45, r'-18', raw_values2, rotate_text=90)
553     annotate_distance(349, 367, 45, r'-18', raw_values2, rotate_text=90)
554     annotate_distance(321, 349, 75, r'xy', raw_values2, rotate_text=0)
555     annotate_point(445, 60, r'Peak 2', raw_values2)
556
557     # remove top and right axis
558     ax.spines['top'].set_visible(False)
559     ax.spines['right'].set_visible(False)
      ax.xaxis().tick_bottom()
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
560     ax.get_yaxis().tick_left()
561
562     # label axes
563     ax.set_xlabel(r"$m/z$")
564     ax.set_ylabel(r"$Intensity \,[\%]$")
565
566     # set x labels
567     plt.xticks(rotation='vertical')
568     start, end = ax.get_xlim()
569     ax.xaxis.set_ticks(np.arange(start, end + 1, 25))
570
571     # set y labels
572     ax.set_ylim(0, 100)
573     start, end = ax.get_ylim()
574     ax.yaxis.set_ticks(np.arange(start, end + 1, 10))
575
576     # set grid
577     plt.grid(True, axis="y", color='black', linestyle=':', linewidth=0.1)
578     plt.show()
579
580     plt.savefig(output_filename + "." + filetype, dpi=fig.dpi, format=filetype)
581     plt.close()
582
583
584 # Function used to draw most of my MS-spectra -> is calculating the
585 # distance and plotting:
586
587 def generate_massspectra_plot_distance_peak_manual_annotation(
588     input_filename, output_filename):
589     print("Generate {} mass spectra plot ({1}.{2}) from {3}.[xy/txt]"
590          .format(filetype.upper(), output_filename,
591                  filetype, input_filename))
592
593     # min and max value of the x axis
594     min_xaxis = 300
595     max_xaxis = 700
596
597     plotSubstance = '619 [M+H]^{+}'
598
599     # dimensions of the single plot
600     figwidth_mm = 141
601     left_margin_mm = 14
602     right_margin_mm = 2
603     top_margin_mm = 5
604     bottom_margin_mm = 13
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
603 plotwidth_mm = figwidth_mm - left_margin_mm - right_margin_mm
604 plotheight_mm = plotwidth_mm * 0.8
605
606 hspace_mm = 0.1 # horizontal space between two plots
607
608 # read xy input data
609 raw_values = pd.read_csv(input_filename + ".xy", sep=" ", names=[ "m/z", "intensity"],
610                           dtype={"m/z": np.float32, "intensity": np.float32})
611 # normalize input data
612 max_val = np.max(raw_values['intensity'])
613 raw_values["intensity_normalized"] = (raw_values['intensity'] / max_val) * 100.0 # normalize intensity to percent
614
615 fsize, margins = __figsize_and_margins(plotsize=(__conv_inch(plotwidth_mm), __conv_inch(plotheight_mm)),
616                                         subplots=(1, 1),
617                                         left=__conv_inch(left_margin_mm),
618                                         right=__conv_inch(right_margin_mm),
619                                         top=__conv_inch(top_margin_mm),
620                                         bottom=__conv_inch(bottom_margin_mm),
621                                         wspace=0.01, hspace=
622                                         __conv_inch(hspace_mm))
623 fig = plt.figure(figsize=fsize, )
624 plt.subplots_adjust(**margins)
625 ax = fig.add_subplot(111)
626
627 # plot spectra line
628 line1 = ax.plot(raw_values["m/z"], raw_values["intensity_normalized"], color="black", linewidth=0.8)
629 plt.legend([plotSubstance], loc=2)
630
631 # set x axes range
632 if min_xaxis is not None and max_xaxis is not None:
633     ax.set_xlim([int(min_xaxis), int(max_xaxis)])
634
635 # annotations
636 # length in data value (in %)
637 annotate_distance(619, 601, 30, '$18$', raw_values, rotate_text=0)
638 annotate_distance(619, 575, 35, '$44$', raw_values, rotate_text=0)
639 annotate_distance(619, 452, 40, '$167$', raw_values, rotate_text=0)
640 annotate_distance(575, 452, 35, '$123$', raw_values, rotate_text=0)
641 annotate_distance(452, 311, 40, '$141$', raw_values, rotate_text=0)
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
639     annotate_point(619, 83, r'619', raw_values)
640     annotate_point(601, 83, r'601', raw_values)
641     annotate_point(575, 110, r'575', raw_values)
642     annotate_point(452, 53, r'452', raw_values)
643     annotate_point(311, 83, r'311', raw_values)
644
645 #633
646 #annotate_distance(633, 601, 5, '$32$', raw_values, rotate_text
647 =o)
648 #annotate_distance(633, 583, 10, '$50$', raw_values, rotate_text
649 =o)
650 #annotate_distance(633, 557, 15, '$76$', raw_values, rotate_text
651 =o)
652 #annotate_distance(633, 510, 20, '$123$', raw_values, rotate_text
653 =o)
654 #annotate_distance(633, 496, 25, '$137$', raw_values, rotate_text
655 =o)
656 #annotate_distance(633, 478, 30, '$155$', raw_values, rotate_text
657 =o)
658 #annotate_distance(633, 460, 35, '$173$', raw_values, rotate_text
659 =o)
660 #annotate_distance(633, 367, 40, '$266$', raw_values, rotate_text
661 =o)
662 #annotate_distance(633, 337, 45, '$296$', raw_values, rotate_text
663 =o)
664 #annotate_distance(633, 313, 50, '$320$', raw_values, rotate_text
665 =o)
666 #annotate_distance(633, 287, 55, '$346$', raw_values, rotate_text
667 =o)
668 #annotate_distance(510, 496, 5, '$14$', raw_values, rotate_text
669 =o)
670 #annotate_distance(510, 478, 10, '$32$', raw_values, rotate_text
671 =o)
672 #annotate_distance(510, 369, 65, '$141$', raw_values, rotate_text
673 =o)
674 #annotate_distance(510, 337, 60, '$173$', raw_values, rotate_text
675 =o)
676 #annotate_distance(460, 442, 5, '$18$', raw_values, rotate_text
677 =o)
678 #annotate_distance(460, 432, 10, '$28$', raw_values, rotate_text
679 =o)
680 #annotate_distance(460, 400, 15, '$60$', raw_values, rotate_text
681 =o)
682 #annotate_distance(460, 337, 20, '$123$', raw_values, rotate_text
683 =o)
684 #annotate_distance(460, 325, 25, '$135$', raw_values, rotate_text
685 =o)
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
667 #annotate_distance(460, 297, 30, '$163$', raw_values, rotate_text
668 =0)
669 #annotate_distance(337, 319, 65, '$18$', raw_values, rotate_text
670 =0)
671 #annotate_distance(337, 309, 60, '$28$', raw_values, rotate_text
672 =0)
673 #annotate_point(633, 83, r'633', raw_values)
674 #annotate_point(601, 110, r'601', raw_values)
675 #annotate_point(583, 83, r'583', raw_values)
676 #annotate_point(557, 83, r'557', raw_values)
677 #annotate_point(510, 83, r'510', raw_values)
678 #annotate_point(496, 83, r'496', raw_values)
679 #annotate_point(478, 83, r'478', raw_values)
680 #annotate_point(460, 83, r'460', raw_values)
681 #annotate_point(442, 83, r'442', raw_values)
682 #annotate_point(432, 83, r'432', raw_values)
683 #annotate_point(400, 83, r'400', raw_values)
684 #annotate_point(369, 93, r'369', raw_values)
685 #annotate_point(367, 83, r'367', raw_values)
686 #annotate_point(337, 83, r'337', raw_values)
687 #annotate_point(325, 73, r'325', raw_values)
688 #annotate_point(319, 83, r'319', raw_values)
689 #annotate_point(313, 73, r'313', raw_values)
690 #annotate_point(309, 83, r'309', raw_values)
691 #annotate_point(297, 73, r'297', raw_values)
692 #annotate_point(287, 83, r'287', raw_values)

693 # remove top and right axis
694 ax.spines['top'].set_visible(False)
695 ax.spines['right'].set_visible(False)
696 ax.get_xaxis().tick_bottom()
697 ax.get_yaxis().tick_left()

698 # label axes
699 ax.set_xlabel("m/z")
700 ax.set_ylabel("Relative abundance") #$Relative abundance\,[\%]$

701 # set x labels
702 plt.xticks(rotation='vertical')
703 start, end = ax.get_xlim()
704 ax.xaxis.set_ticks(np.arange(start, end + 1, 25))

705 # set y labels
706 ax.set_ylimits(0, 100)
707 start, end = ax.get_ylimits()
708 ax.yaxis.set_ticks(np.arange(start, end + 1, 10))

709 # set grid
```

Anhang C. Python Code-Listings für die Erstellung der Grafiken

```
713     plt.grid(True, axis="y", color='black', linestyle=':', linewidth
714             =0.1)
715     plt.savefig(output_filename + ".png")
716
717     plt.show()
718     plt.close()

719 # Specify dataset and function to generate the MS-spectra:
720
721 if __name__ == "__main__":
722     # generate_massspectra_plot_automatic_labels("examples/inputs/
723     # substance1", "examples/ex1")
724
725     generate_massspectra_plot_distance_peak_manual_annotation("data/
726     raw/Kuerbis_Analyse_Bindungskinetik_Fragmente61927", "data/ex2")
727
728     # generate_massspectra_two_plot_manual_annotation("examples/
729     # inputs/substance1", "examples/inputs/substance2", "examples/ex3")
```

content/Anhang/Code/VWA_generate_mz_diagrams.py

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