

Direkte Analyse von Chlorophyllkataboliten

Vorwissenschaftliche Arbeit verfasst von

Florian Klubenschedl

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. Im Rahmen eines Praktikums am Organischen Institut der Universität Innsbruck wurden die Chlorophyll-Kataboliten frisch gepflückter Brokkolblätter einer direkten Analyse mit MS Leafspray unterzogen.

MS Leafspray stellt dabei eine neue, moderne 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 Chlorophyll-Kataboliten lauten wie folgt: *Bo-NCC-1*, *Bo-NCC-3*, *Bo-DNCC*, *Bo-DNCC-2*, *Bo-DYCC* und *Bo-YCC*. Im Vergleich zur Brokkolifrucht konnten vier weitere Chlorophyll-Kataboliten gefunden werden, was neue Fragen in Bezug auf das Verständnis des Abbauprozesses aufwirft. Für jeden der genannten Chlorophyll-Kataboliten konnten Strukturvorschläge gemacht werden.

Außerdem wurde eine Reaktion am Blatt der Chlorophyll-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 Chlorophyll-Kataboliten erfolgt. Eine sterisch und elektrisch bedingte höhere Reaktivität wird vermutet.

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

Es wurde somit ein wesentlicher Beitrag zur Weiterentwicklung der direkten Analyse mit MS Leafspray geleistet. Des weiteren konnte diese Methode mit der klassischen LC-MS verglichen werden. 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 erfahren konnte ist ungefähr so groß, wie der im Zitat beschriebene¹. Auch wenn die Auseinandersetzung mit diesem Thema nicht immer leicht war, machte es unheimlich viel Spaß, sich mit Fragestellungen sowohl theoretisch als auch praktisch in Form von Experimenten zu beschäftigen, mit dem Ziel, ein solides Verständnis des Forschungsobjektes zu erlangen.

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 alle für die Analyse von Chlorophyllkatalyten notwendigen Arbeiten ein und zeigte mir so zum Beispiel, wie ein Massenspektrometer, eine HPLC oder ein Exikator bedient werden. In der zweiten Woche konnte ich bereits selbstständig agieren und die Experimente (fast) ganz nach meinen Wünschen planen und durchführen.

Die Besprechung und Diskussion der Ergebnisse war selbstverständlich Teil der täglichen Praxis und es machte mir ungeheuer viel Spaß, meine geglaubten Erkenntnisse² zu besprechen und mitzuteilen. So konnte ich Einblick in andere Denkweisen gewinnen und bekam von Herrn Müller immer wieder Publikationen zum Lesen, die mir Denkanstöße und Impulse für weitere Analysen gaben. Auf diese Weise wurde ich zum Beispiel auf die Möglichkeit der Erstellung von Fragmentierungsdiagrammen aufmerksam.

¹obwohl ich nicht einundzwanzig bin

²im Gespräch erwies es sich des öfteren, dass ich mich etwas vertan hatte

Ich denke, ich werde mich an diese Zeit noch lange zurückerinnern können, da ich dabei viel in puncto Zeitmanagement, Planung und dem generellen Ablauf des Forschungsalltags an sich erfahren konnte. Mein Wunsch, eines Tages nach einem erfolgreich absolviertem Studium der Naturwissenschaften in der Forschung tätig zu sein, wurde in dieser Zeit bestärkt. Mir gefällt einfach der Blick auf die Natur aus einer forschungstechnischen Perspektive heraus, was ich auch versuche, in dieser Arbeit ersichtlich zu machen.

Mein weiterer Dank ist an meinen Betreuungslehrer Mag. Mathias Scherl gerichtet. Er schaffte es in der fünften Klasse, mein Interesse an der Chemie zu wecken, dessen Effekt bis heute ungebremst anhält. Durch ihn wurde ich erst auf die Möglichkeit des Praktikums hingewiesen und mein Interesse an der Erforschung des Abbauprozesses von Chlorophyll geweckt. Zusätzlich steht er immer für chemiespezifische Fragen bereit, was ich sehr schätze und durch deren Diskussion ich viel gelernt habe und immer noch lerne.

Ansonsten möchte ich mich bei allen weiteren beteiligten Personen bedanken, die in irgendeinster Weise bei der Verfassung dieser Arbeit hilfreich waren³. Insbesondere seien hier Stefanie Schatz und Theresia Erhart genannt, ebenfalls vom Organischen Institut, die mich während des Praktikums betreuten.

Zu guter Letzt möchte ich mich 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 Glücksgriff - DANKE!

Es hat mir somit das Beschäftigen mit diesem Thema sehr viel Freude bereitet. Das Ergebnis meiner Bemühungen soll in der vorliegenden Arbeit ersichtlich werden. Zu meiner Motivation zum Experimentieren an sich:

„It is well to remember that most arguments in favor of not trying an experiment are too flimsily based.“ - R.B. Woodward

³ein großer Dank gilt meiner Familie und Freunden

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 einer Pufferlösung	10
4.2 Probenmaterial	10
4.3 Reaktion mit Essigsäureanhydrid	10
4.4 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	Identifikation der Chl-Kataboliten des Brokkoliblattes mit MS Leafspray	15
5.4.1	Bo-NCC-1	15
5.4.2	Bo-NCC-3	17
5.4.3	Bo-DNCC	19
5.5	Identifikation der Reaktionsprodukte	22
5.5.1	Reaktionsprodukt des 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 und Gerätebeschreibungen	31
6.2	Aufarbeitung der Probe	31
6.3	Theoretische Grundlagen der Auswertung von Online-UV/Vis Spektren	32
6.4	Theoretische Grundlagen der Auswertung der MS Spektren	32
6.5	Identifikation von Chl-Kataboliten des Brokkoliblattes mit LC-MS	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 des Bo-DYCC	54
7.3.2	Reaktionsprodukt des Bo-DNCC	56
7.3.3	Reaktionsprodukt des Bo-YCC	57
7.3.4	Reaktionsprodukt des 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 - Brokkolifrukt	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 modernen Methode MS Leafspray eine strukturelle Aufklärung von Chl-Kataboliten ermöglicht sowie, ob das Stattfinden einer Reaktion von Essigsäureanhydrid mit den Chl-Kataboliten festgestellt werden kann.

Als Ergebnisse der Reaktion werden Anhydride als Reaktionsprodukte sowie ein Verständnis über die Reaktivitäten von Carbonsäuren der Chl-Kataboliten und deren struktureller Besonderheiten erwartet.

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

Es soll somit das Potential von Fragmentierungsdiagrammen mit 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 jenen von MS Leafspray zu vergleichen, um einen Vergleich der beiden Methoden anstellen zu können.

2 Das Chlorophyll und sein Abbauprozess

2.1 Der Abbauprozess und seine Bedeutung

Jedes Jahr werden weltweit schätzungsweise 10^9 Tonnen an Chlorophyll abgebaut. Der Abbauprozess des Chlorophylls ist damit aufgrund 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 Herbstlaubes werden dabei jedoch nicht primär durch die Abbauprodukte des Chlorophylls (im Folgenden Chlorophyll-Kataboliten) hervorgerufen [2], da die Endprodukte des Chlorophyllabbaus zumeist farbblos 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 dementsprechend andere Endprodukte vorzufinden sind. [1], [3], [4] Die Abbauprodukte fallen in die Klasse der Phyllobiline (heterocyclische Tetrapyrrole) und sind Anzeichen für Reifung, Seneszenz und Zelltod. Der Abbauprozess wird unter anderem im Rahmen eines Entgiftungsprozesses begangen. [5]

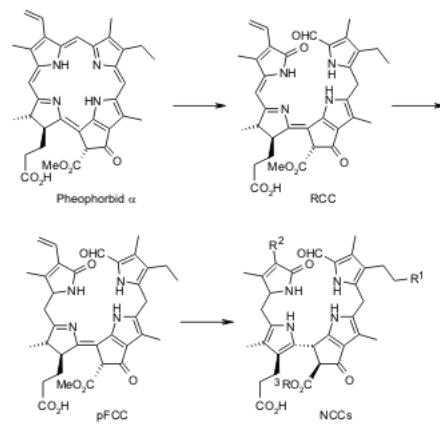


Abbildung 2.1: Abbauprozess des Chlorophylls in seneszenten Blättern

2 Das Chlorophyll und sein Abbauprozess

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

In den darauffolgenden 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 *a* Mono-oxygenase [6]) in der nördlichen *meso* Position geöffnet, woraufhin ein *Red Chlorophyll Catabolite* (RCC) entsteht. Über einen *primary fluorescent 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, Hydroxygruppe) an den pFCC. [8]

2.2 Nummerierung von Phyllobilinen

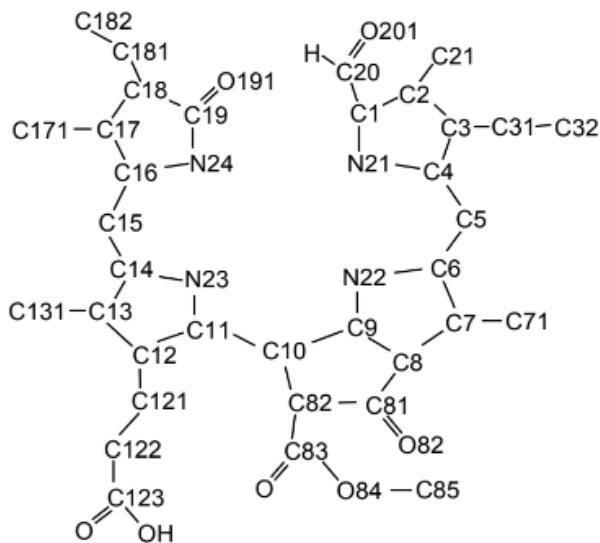


Abbildung 2.2: Positionsangaben und Bezeichnungen der Ringe, die in der restlichen Arbeit für Ausführungen verwendet werden.

3 Methoden

3.1 HPLC

Die HPLC ist eine chromatographische Methode, um lösliche Stoffe analytisch und präparativ zu trennen. [9, S. 165]

Das Trennen der Stoffe basiert auf ihren unterschiedlichen chemischen Eigenschaften. Die Stoffe werden gelöst und bilden zusammen mit dem Laufmittel die mobile Phase, die an einer stationären Phase (in der Trennsäule) vorbeiströmt, wobei es zu Wechselwirkungen zwischen den gelösten Stoffen mit der stationären Phase kommt. Aufgrund der unterschiedlichen Affinität zu einer Phase hält sich jeder Stoff unterschiedlich lang 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 seneszenten Blatt zu trennen und entsprechende Chl-Kataboliten zu isolieren. Die Identifikation der Chl-Kataboliten erfolgte dabei durch einen UV/Vis Detektor (200 nm - 800 nm) sowie durch ein dazu geschaltetes Massenspektrometer (=Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)). 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

3 Methoden

zählt die Methode der HPLC nicht mehr zur direkten Analyse. Sie wurde lediglich 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]

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. Elektronenstoß-Ionisation, Chemische-Ionisation und Feld-Ionisation. [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 Elektrosprayionisation (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 3-6 kV 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 ein Inertgas (in den meisten Fällen Stickstoff) bzw. eine erhitzte Kapillare, um das Lösungsmittel (LM) zu entfernen. Anschließend an diese Ionisation wird die Molekulmasse der Ionen bestimmt. [10, S. 43-44]

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

3 Methoden

3.2.1 LC-MS

Bei der Methode der LC-MS wird eine HPLC mit einem Massenspektrometer gekoppelt. 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 geleitet. 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 vom HPLC- und Massenspektrometerlauf. 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-Kataboliten um einen NCC, Dioxo-Non fluorescent Chlorophyllic Catabolite (DNCC) oder einen Fluorescent Chlorophyllic Catabolite (YCC) handelt. Aus dem Massenspektrum kann die Molekülmasse (in Da) mit allgegenwärtigen Fragmentierungen abgelesen werden. Unter Verwendung eines hochauflösenden Massenspektrometers wird außerdem die elementare Zusammensetzung ersichtlich.

3.2.2 MS Leafspray

Ambient Ionization [11] ermöglicht es, Proben ohne vorherige analytische 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]

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 3-6 kV 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]

3 Methoden

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

Experimenteller Teil

4 Allgemeine Arbeits- und Analysemethoden

4.1 Herstellung einer Pufferlösung

Herstellung eines 3.2 mM NH₄Ac Puffers für eine Analyse mit HPLC:

Es wurden 0.1542 g Ammoniumacetat eingewogen und in 0.5 L Wasser gelöst.

4.2 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 11.09.2017 jeweils in der früh zwischen 07:20 und 07:30 gesammelt. Der Zeitraum für Lagerung und Analyse der Brokkoliblätter betrug maximal drei Tage (danach wurden neue Brokkoliblätter gesammelt).

4.3 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 ca. 2 cm² (entspricht einer Blattmasse von ca. 0.01 g) mit einer Rasierklinge zugeschnitten und anschließend mit 300 µL Essigsäureanhydrid beidseitig benetzt. Die 300 µL ergaben sich aus experimentellen Erfahrungen durch Vorversuche (zu viel LM löst Teile des Blattes heraus, was zu einer Verringerung der Intensitäten in HPLC und MS Leafspray führt).

4 Allgemeine Arbeits- und Analysemethoden

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

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

4.4 Erstellen von Fragmentierungsdiagrammen

Zu den Chl-Kataboliten wurden Fragmentierungsdiagramme erstellt. Dazu wurden 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 wird die NKE (von 0 bis 100 NKE, gemessen wurde in fünf Schritten) aufgetragen, auf der Ordinate die Intensität der jeweiligen Fragmentierung, bezogen auf den höchsten Peak (entspricht 100 %), der während der gesamten Aufnahme beobachtet wurde (angegeben 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 Chl-Kataboliten charakteristische Muster aufweisen. Dieses Wissen könnte für eine zukünftige Strukturaufklärung sowie für die wünschenswerte Schnellidentifikation von Chl-Kataboliten mittels MS Leafspray von Relevanz sein. Ebenso wird gehofft, eine Verbesserungsmöglichkeit von MS Leafspray zu finden.

5 Experimente MS-Leafspray

5.1 Gerätebeschreibung Massenspektrometer

Es wurde ein Thermo LCQ DecaXP im positiven Ionenmodus verwendet.

5.2 Versuchsaufbau

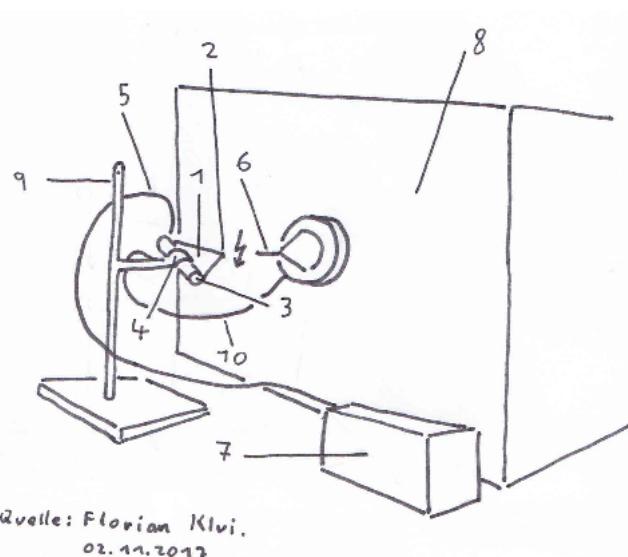


Abbildung 5.1: Leafspray Versuchsaufbau: 1) Filterpapierdreieck, 2) Spitze des Dreiecks, 3) Blattmaterial, von Filterpapier umschlossen, 4) Kupferklemme, 5) Kapillare für LM, 6) Einlass des Massenspektrometers (mit der markanten Spitze zwecks Verdeutlichung etwas übertrieben dargestellt), 7) Syringe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

Das zu analysierende Blatt wurde zugeschnitten und in Filterpapier eingerollt. Das Filterpapierdreieck wurde in einer Kupferklemme eingespannt (Kapitel

5 Experimente MS-Leafspray

5.3). Die Kupferklemme wurde mit einem Kabel (10), das an einem Ionenfallen Massenspektrometer (8) angeschlossen war, verbunden. Zwischen der Kupferklemme (4) und dem Massenspektrometer wurde eine Spannung von 3-6 kV 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 in geladenen Tröpfchen in das Massenspektrometer hineinfliegen. Der Abstand zwischen Filterpapier (2) und Einlass des Massenspektrometers (6) betrug ungefähr 0.5 cm und ist damit der Flugstrecke der Tröpfchen 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 Filterpapierdreieckspitze zum Massenspektrometer. Es gilt zu beachten, dass das Filterpapier in einem gewissen Winkel eingespannt wurde (Abbildung 5.2b), um zu verhindern, dass das LM nicht abfließt, was bei einer waagrechten Anordnung in Form einer *Sackbildung* des LM auftreten kann.

5.3 Versuchsdurchführung

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

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

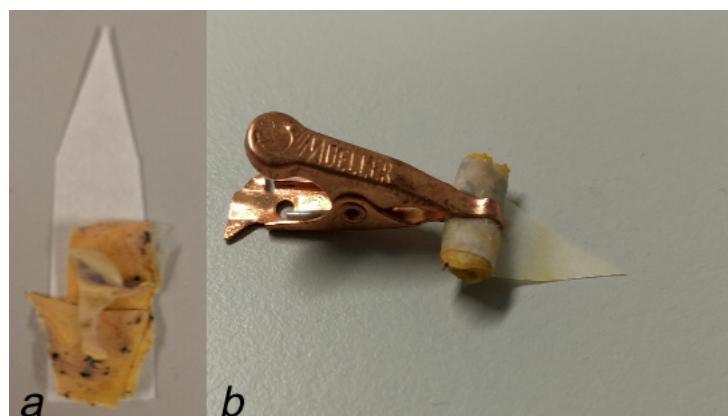


Abbildung 5.3: MS Leaf spray Blattvorbereitung: (a) zugeschnittenes Filterpapierdreieck, mit frischen, seneszenten Brokkoliblättern, (b) eingerolltes *Päckchen*, in Kupferklemme eingespannt

Das erhaltene *Päckchen* wurde durch eine Kupferklemme (Abbildung 5.3b) ca. 0.5 cm vor die Öffnung 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 0.1 und 0.5 μA . Diese Geräteeinstellungen sowie Aufarbeitungsmethoden ermöglichten

5 Experimente MS-Leafspray

das Messen der Fragmentierungsdiagramme, da hierfür lange Analysezeiten von Vorteil sind. Das erste Signal konnte ca. eine Minute nach dem Einschalten der Spannung gemessen werden und erlaubte sinnvolle Messungen bis zu 25 Minuten.

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 Signallintensität 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 Identifikation der Chl-Kataboliten des Brokkoliblattes mit MS Leafspray

Im Folgenden werden die Chl-Kataboliten beschrieben, die sich durch MS Leafspray identifizieren ließen. Die Strukturvorstellungen wurden mit einem hochauflösenden Massenspektrometer überprüft (Kapitel 6.5 und 7). Sie beruhen auf den exakten Molekülmassen und den daraus errechneten möglichen Summenformeln.

Fragmentierungsdiagramme wurden wie in Kapitel 4.4 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] Beobachtet 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 verwertbares Massenspektrum dieser aufzunehmen.

5 Experimente MS-Leafspray

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 $m/z = 311 [M - (Ring A, Zucker, Ring D, CO_2) + K]^+$ (Begründung der Zuordnung siehe Kapitel 7). 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 die exakten Molekülmassen notwendig sind.

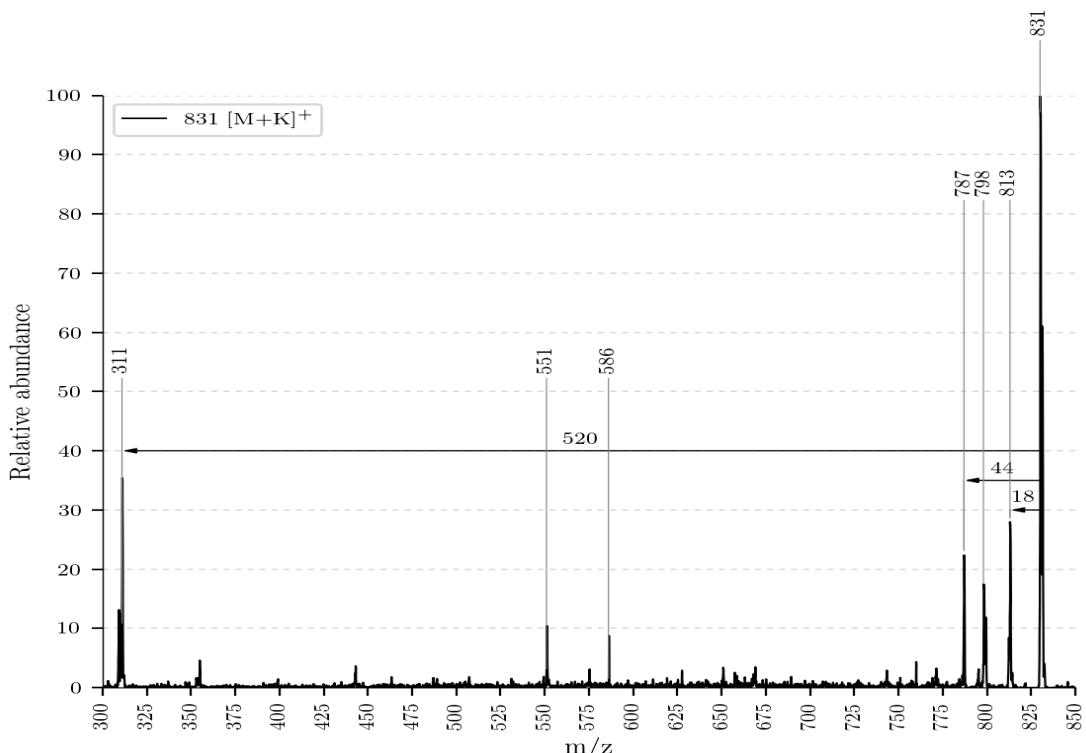


Abbildung 5.4: ESI-MS von Bo-NCC-1 mit $m/z = 831 [M+K]^+$

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, was aber nicht mit der Struktur des Bo-NCC-1 (Abbildung 5.5a) vereinbar wäre. Die Frage, ob es sich bei der Abweichung von einem Da um eine Ungenauigkeit des Massenspektrometers handelt oder ob doch ein anderes Fragment abgespalten wird, bleibt offen, weswegen 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

5 Experimente MS-Leafspray

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 CO₂ Abspaltung wird an Position C-8² eine Carbonsäuregruppe vermutet (wie in [17] gezeigt), die über einen Mechanismus wie unter anderem in Abbildung 7.5a vorgeschlagen, abgespalten wird. Die relativ große Molekülmasse weist zudem auf einen Zucker an Position C-3² hin. Die Summenformel des Bo-NCC-1 konnte über die exakte Molekülmasse mit einem hochauflösenden Massenspektrometer bestimmt werden (Kapitel 7.2.5).

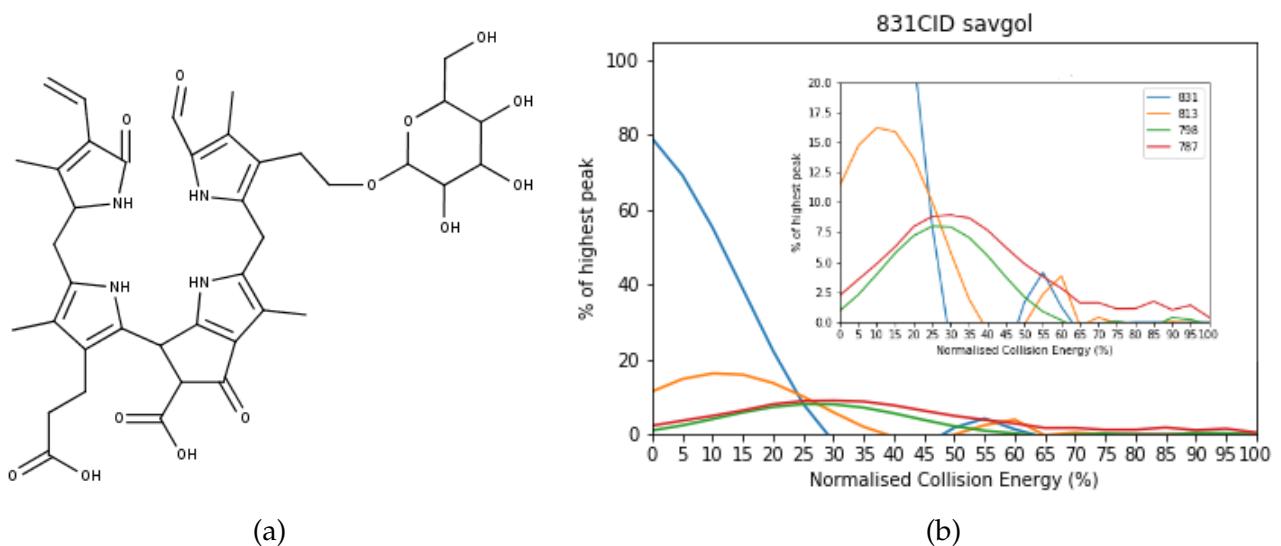


Abbildung 5.5: (a) Strukturvorschlag des Bo-NCC-1 mit Summenformel $C_{40}H_{48}N_4O_{13}$, (b) Fragmentierungsdiagramm von Bo-NCC-1 (blau = 831 [M+K] $^+$, orange = 813 [M - $H_2O + K$] $^+$, grün = 798 [M - (MeOH - nAb.) + K] $^+$, rot = 787 [M - CO₂ + K] $^+$)

5.4.2 Bo-NCC-3

Beim Bo-NCC-3 handelt es sich um einen Chl-Kataboliten, der bisher nicht in der Brokkolifrukt identifiziert wurde [16], weswegen er als dritter, in der 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 $m/z = 667$ [$\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{K}^+$] sowie von CO_2 bei $m/z = 641$ [$\text{M} - \text{CO}_2 + \text{K}^+$] beobachtet. Bei den

5 Experimente MS-Leafspray

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).

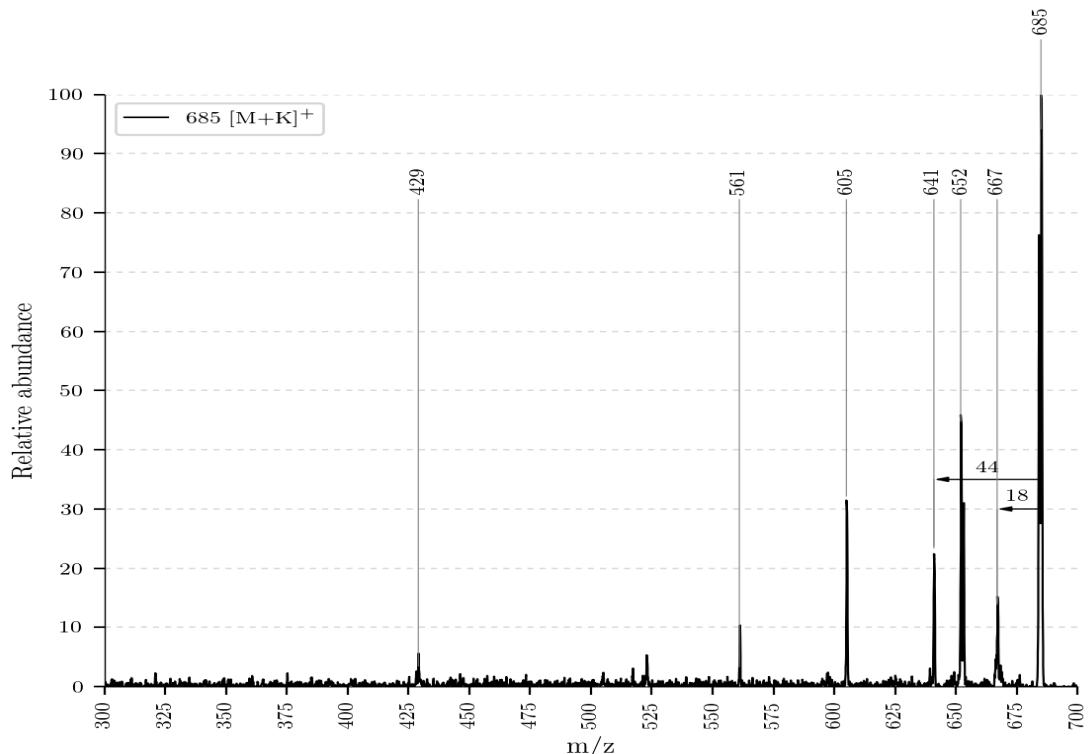


Abbildung 5.6: ESI-MS von *Bo-NCC-3* mit $m/z = 685$ $[M+K]^+$

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 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

5 Experimente MS-Leafspray

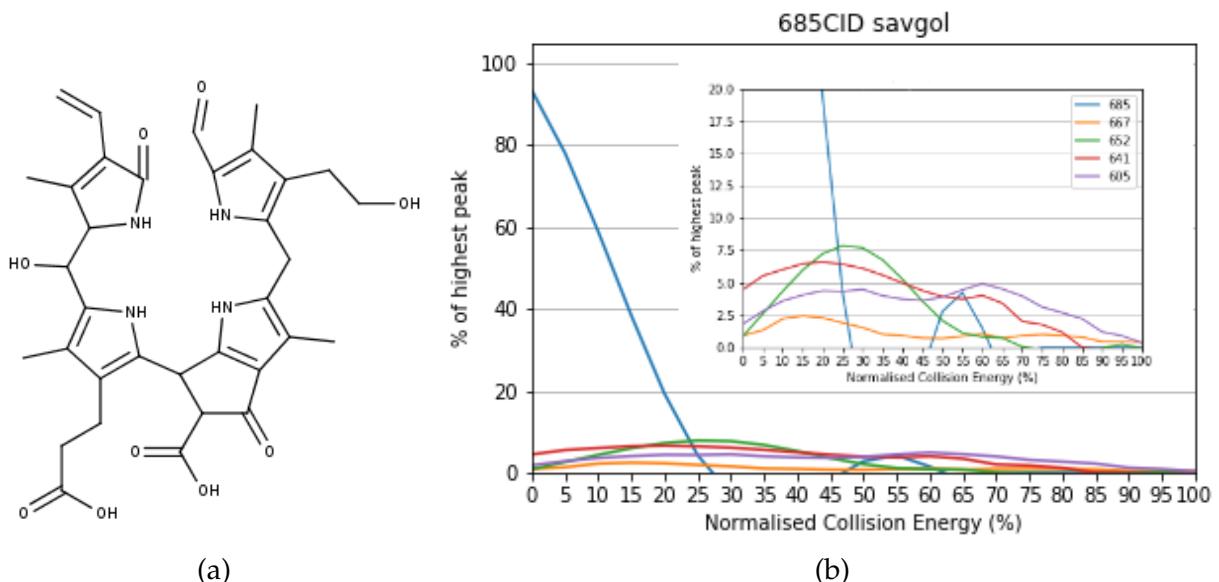


Abbildung 5.7: (a) Strukturvorschlag von *Bo*-NCC-3 mit Summenformel $C_{34}H_{38}N_4O_9$, (b) Fragmentierungsdiagramm von *Bo*-NCC-3 (blau = 685 $[M+K]^{+}$, orange = 667 $[M - H_2O + K]^{+}$, grün = 652 $[M - (\text{MeOH?}) + K]^{+}$, rot = 641 $[M - CO_2 + K]^{+}$, violett = 605 $[M - (nAb.) + K]^{+}$)

lokale Maximum der potentiellen Abspaltung von MeOH würde sich von 25 NKE beim *Bo*-NCC-1 auf 30 NKE beim *Bo*-NCC-3 verschieben (Abbildungen 5.5b und 5.7b).

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

5.4.3 Bo-DNCC

Es wird vermutet, dass der *Bo*-DNCC des Brokkoliblattes ident ist mit dem *Bo*-DNCC der Brokkolifrucht. [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).

5 Experimente MS-Leafspray

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).

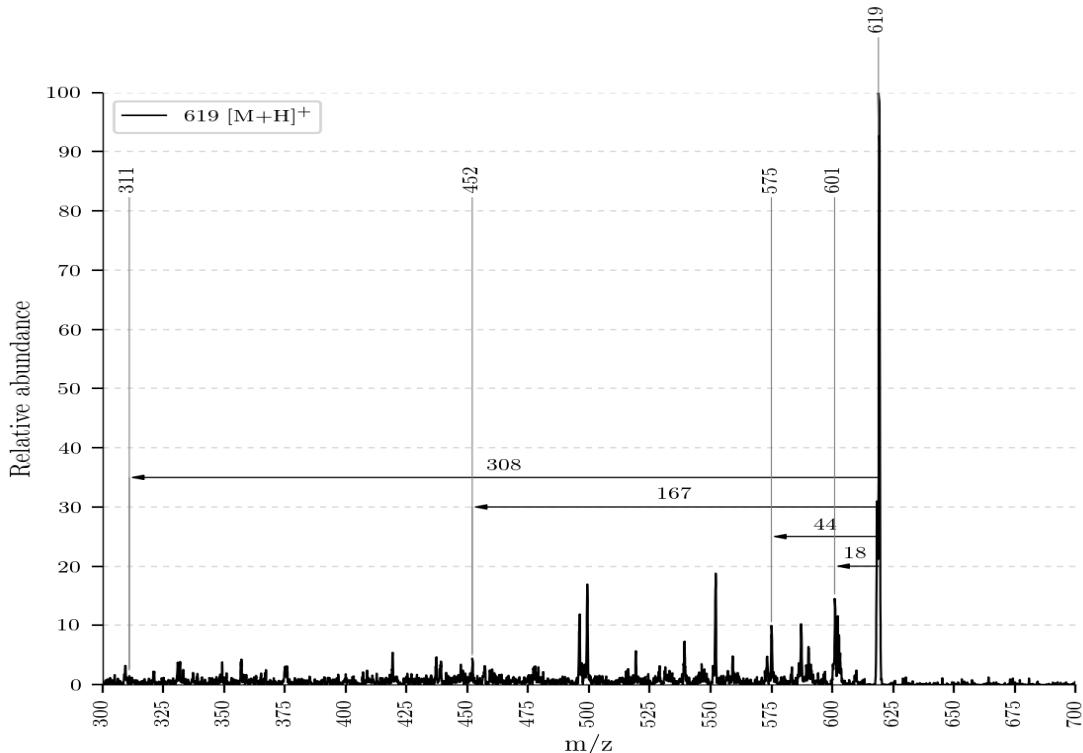


Abbildung 5.8: ESI-MS von *Bo-DNCC* bei $m/z = 619 [M+H]^+$

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.

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 beim *Bo-NCC-1* und *Bo-NCC-3* (Abbildungen 5.5b und 5.7b). Das zweite Maximum kann noch

5 Experimente MS-Leafspray

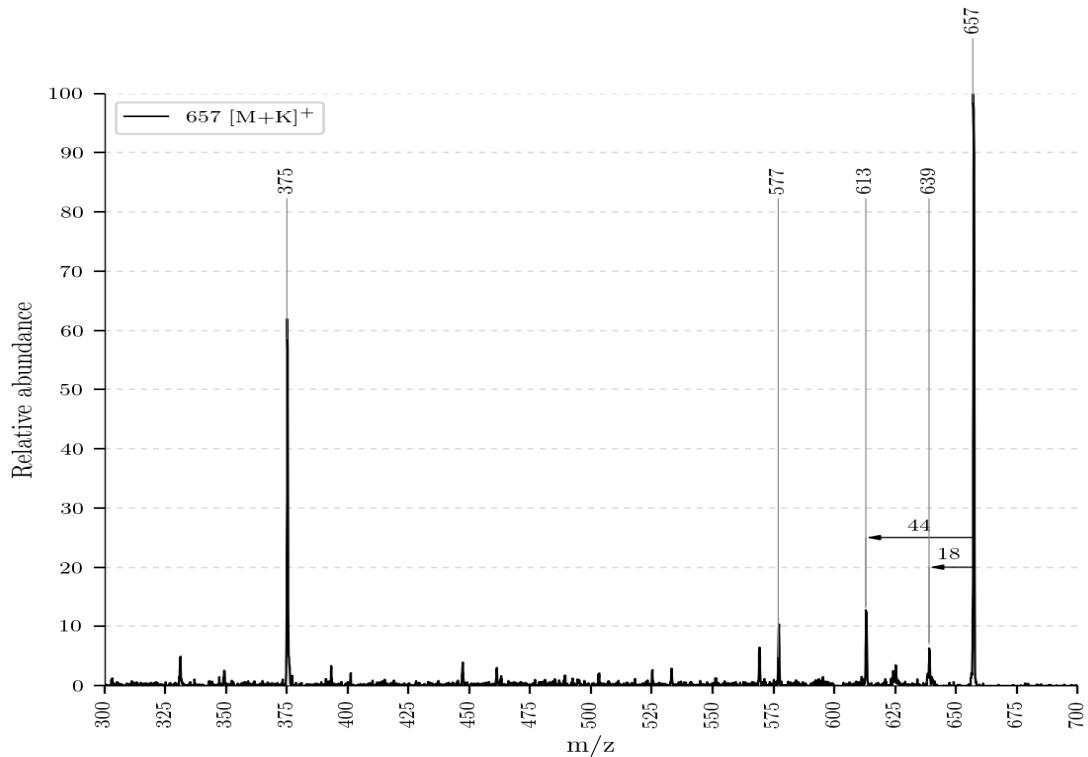


Abbildung 5.9: ESI-MS von *Bo*-DNCC bei $m/z = 657$ $[M+K]^+$

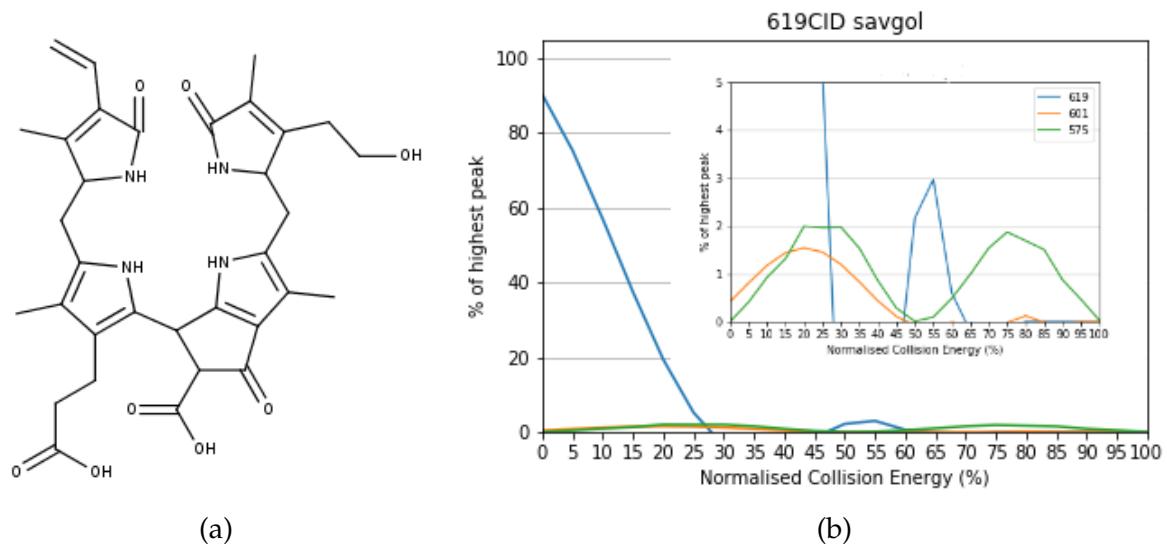


Abbildung 5.10: (a) Strukturvorschlag von *Bo*-DNCC mit Summenformel $C_{33}H_{38}N_4O_8$, (b) Fragmentierungsdiagramm von *Bo*-DNCC (blau = 619 $[M+H]^+$, orange = 601 $[M - H_2O + H]^+$, grün = 575 $[M - CO_2 + H]^+$)

5 Experimente MS-Leafspray

nicht geklärt werden, da es bei den anderen bisher analysierten Kataboliten nicht beobachtet wurde.

Es ist fraglich, ob der Vergleich mit den Fragmentierungsdiagrammen von *Bo-NCC-1* und *Bo-NCC-3* möglich ist, da bei diesen das $[M+K]^+$ Ion aufgenommen wurde.

5.5 Identifikation der Reaktionsprodukte

Für den Nachweis der Reaktionsprodukte wurde der gleiche Versuchsaufbau wie in Kapitel 5.2 beschrieben verwendet. Das Anhydrid als Reaktionsprodukt konnte durch Verwendung von Acetonitril als LM isoliert werden.

5.5.1 Reaktionsprodukt des Bo-DNCC

Das Reaktionsprodukt des *Bo-DNCC* konnte mit $m/z = 699 [M+K]^+$ bestimmt werden (Strukturvorschlag - Abbildung 5.11). Identifiziert wurde es über die charakteristische Abspaltung von Essigsäure ($M = 60$ Da) bei $m/z = 639 [M - CH₃COOH + K]^+$. 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-1*), wie in [17] publiziert.

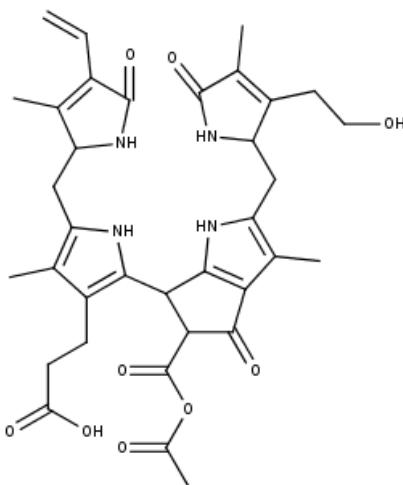


Abbildung 5.11: Strukturvorschlag des Reaktionsproduktes mit Summenformel $C_{35}H_{41}N_4O_9$

5 Experimente MS-Leafspray

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 Prominenz 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 Reaktionsprodukten ebenfalls beobachtet wurde. Die anderen Fragmentierungen in Abbildung 5.12 konnten nicht zugeordnet werden.

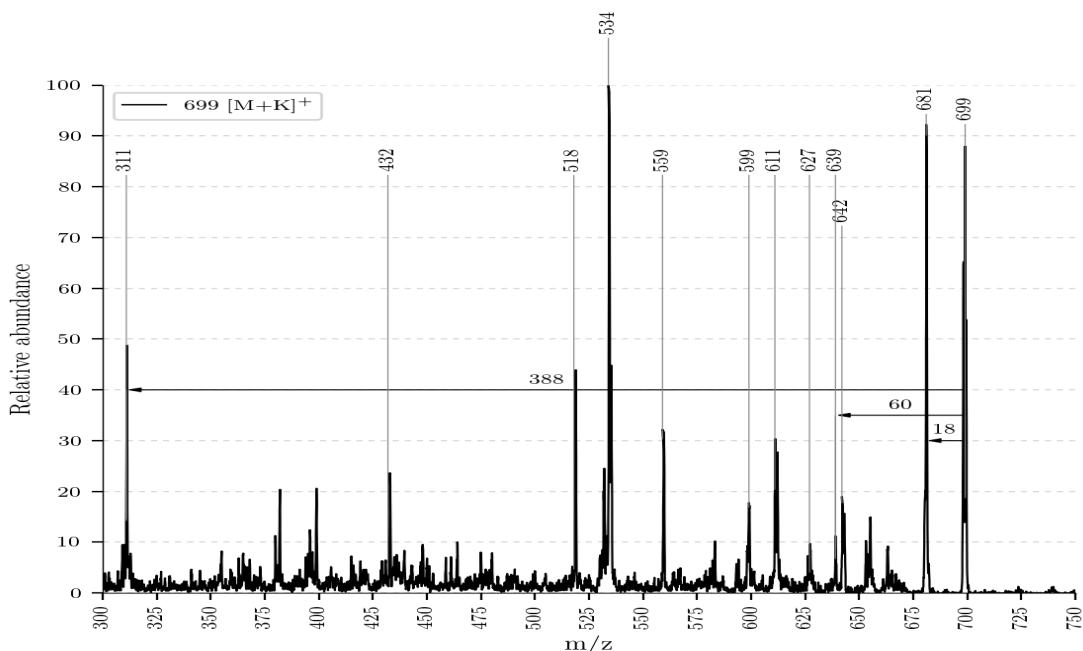


Abbildung 5.12: ESI-MS Spektrum des Reaktionsproduktes mit $m/z = 699$ $[\text{M}+\text{K}]^+$

Diskussion der Abspaltung bei $m/z = 599$ $[\text{M} - (\text{nAb.}) + \text{K}^+]$: Die Abspaltung von 100 Da bei $m/z = 599$ $[\text{M} - (\text{nAb.}) + \text{K}^+]$ erreicht im Fragmentierungsdigramm 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

5 Experimente MS-Leafspray

die andere Abspaltung ein Minimum aufweist.

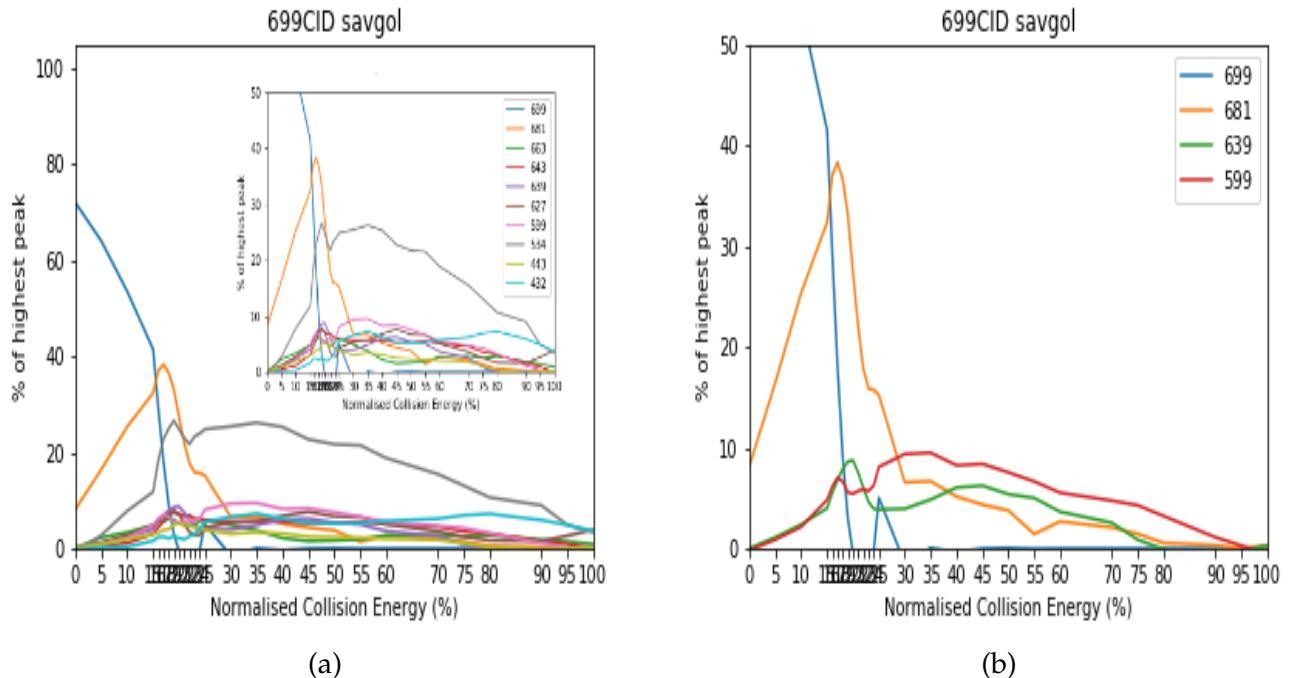


Abbildung 5.13: (a) Fragmentierungsdiagramm des *Bo*-DNCC mit allen beobachteten Abspaltungen (blau = 699 $[M+K]^+$, orange = 681 $[M - H_2O + K]^+$, grün = 663 $[M - (2 \times H_2O) + K]^+$, rot = 643 $[M - (nAb.) + K]^+$, violett = 639 $[M - CH_3COOH + K]^+$, braun = 627 $[M - (nAb.) + K]^+$, pink = 599 $[M - (nAb.) + K]^+$, grau = 534 $[M - (nAb.) + K]^+$, hellgrün = 443 $[M - (nAb.) + K]^+$, türkis = 432 $[M - (nAb.) + K]^+$), (b) Fragmentierungsdiagramm mit ausgewählten Abspaltungen (blau = 699 $[M+K]^+$, orange = 681 $[M - H_2O + K]^+$, grün = 639 $[M - CH_3COOH + K]$, rot = 599 $[M - (nAb.) + K]^+$)

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 und ist länger beobachtbar (vergleiche Abbildungen 5.10b und 5.13b). Es gilt zu bedenken, dass beim nicht umgesetzten *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 bedingt sein.

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

5 Experimente MS-Leafspray

nimmt dabei kontinuierlich bis zu einer Intensität von 80 NKE ab (Abbildung 5.13b). Ein lokales Minimum der Abspaltung befindet sich zwischen 23 NKE und 30 NKE.

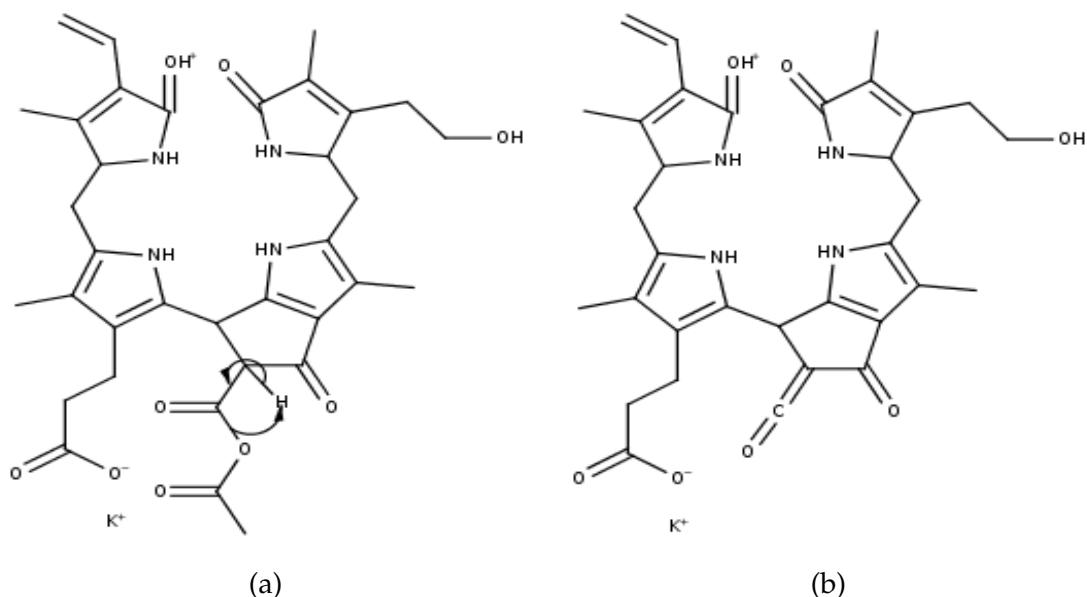


Abbildung 5.14: (a) vorgeschlagener Mechanismus der Essigsäureabspaltung und (b) das Produkt, wobei CH_3COOH als stabiles Neutralteilchen abgespalten wird

5 Experimente MS-Leafspray

5.5.2 Reaktionsprodukt von Bo-NCC-3

Die Masse des Reaktionsproduktes des *Bo*-NCC-3 konnte mit $m/z = 727 [M+K]^+$ bestimmt werden. Eine Abspaltung von Essigsäure wurde bei $m/z = 667 [M - \text{CH}_3\text{COOH} + \text{K}]^+$ beobachtet. Weiters wurde eine Abspaltung von H_2O bei $m/z = 709 [M - \text{H}_2\text{O} + \text{K}]^+$ beobachtet. Bei der Abspaltung bei $m/z = 627 [M - (\text{nAb.}) + \text{K}]^+$ könnte es sich um die gleiche Abspaltung wie beim Reaktionsprodukt des *Bo*-DNCC handeln, da auch ein Fragment mit $M = 100$ Da abgespalten wird. Die anderen Abspaltungen (Abbildung 5.15) konnten nicht eindeutig zugeordnet werden.

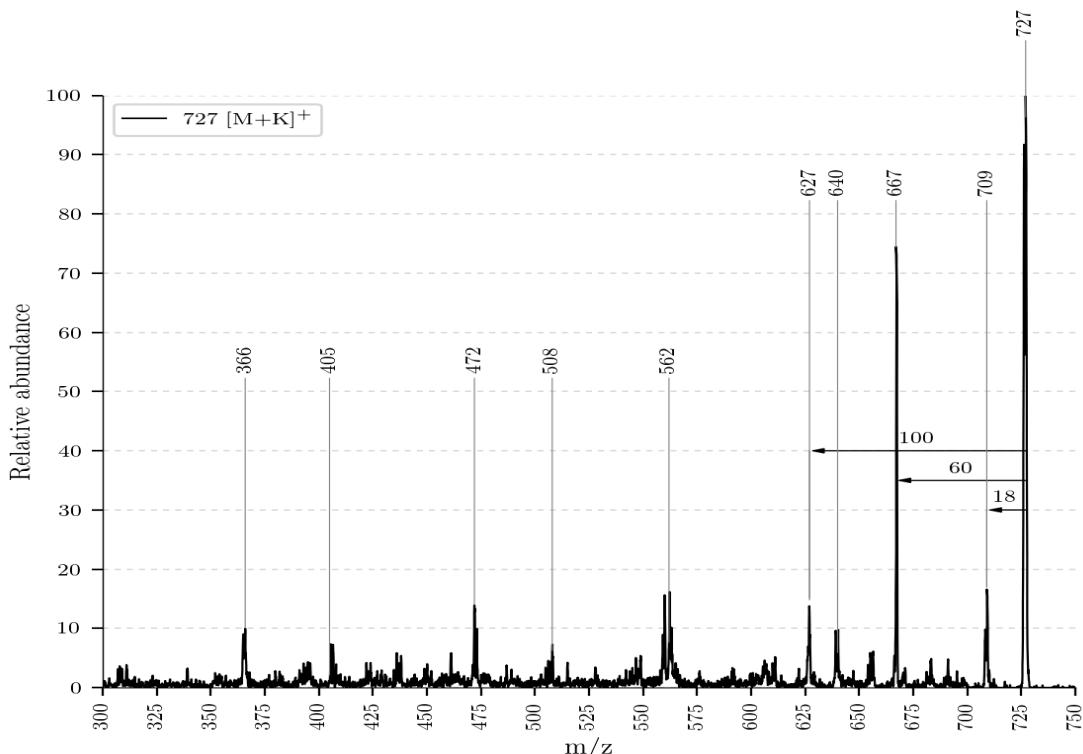


Abbildung 5.15: ESI-MS Spektrum des Reaktionsproduktes bei $m/z = 727 [M+K]^+$

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

5 Experimente MS-Leafspray

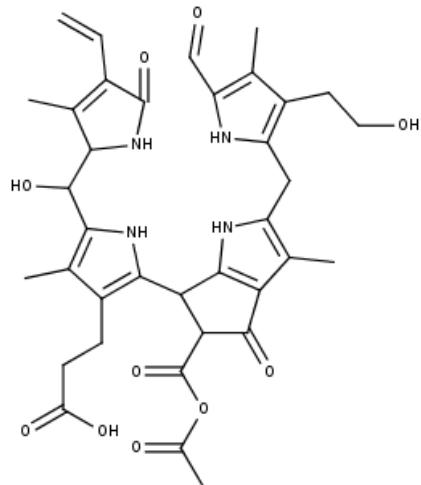


Abbildung 5.16: Strukturvorschlag des Reaktionsproduktes mit Summenformel $C_{36}H_{40}N_4O_{10}$

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

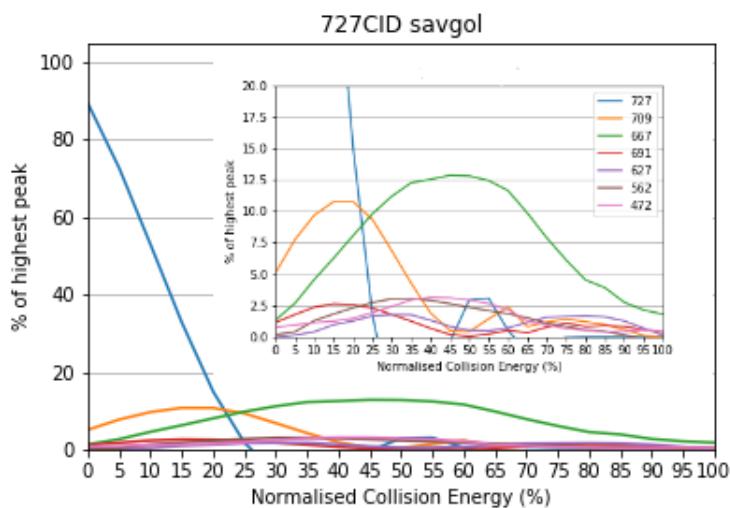


Abbildung 5.17: Fragmentierungsdiagramm des Reaktionsproduktes (blau = 727 $[M+K]^+$, orange = 709 $[M - H_2O + K]^+$, grün = 667 $[M - CH_3COOH + K]^+$, rot = 691 $[M - (nAb.) + K]^+$, violett = 627 $[M - (nAb.) + K]^+$, braun = 562 $[M - (nAb.) + K]^+$, pink = 472 $[M - (nAb.) + K]^+$)

5.5.3 Reaktionsprodukt von Bo-NCC-1

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

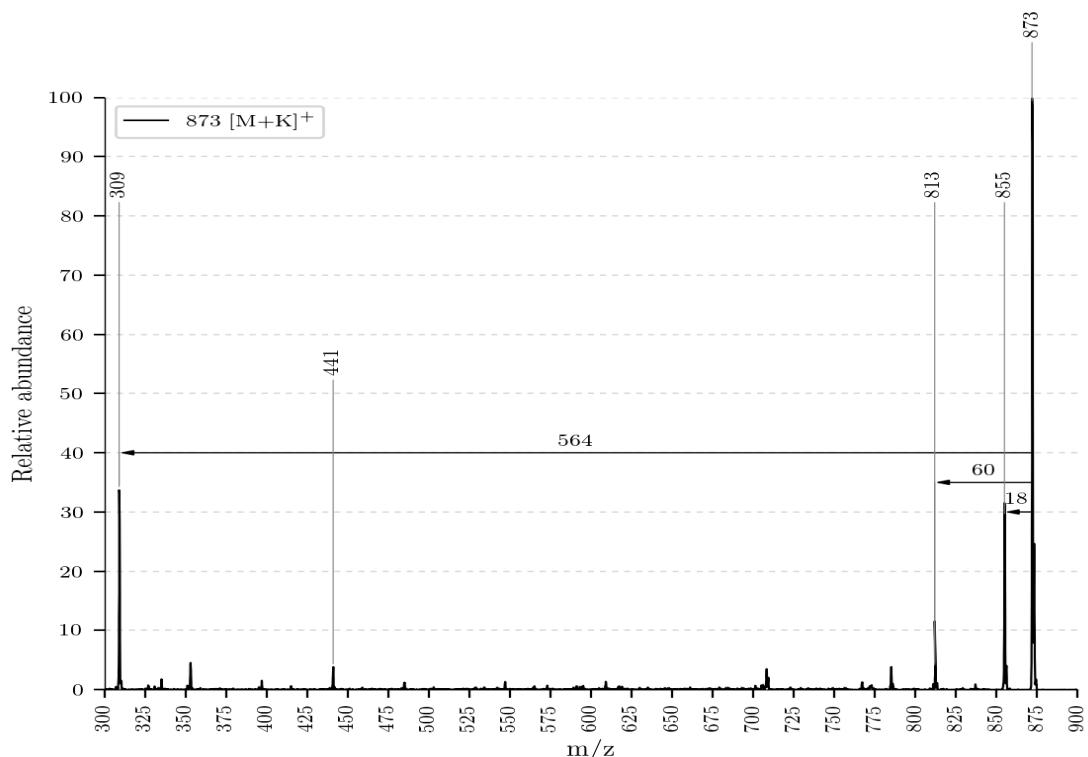


Abbildung 5.18: ESI-MS des Reaktionsproduktes bei $m/z = 873$ $[M+K]^+$

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 NKE ab. Dieser Zusammenhang wurde in zwei voneinander unabhängigen Experimenten beobachtet (Abbildung 5.20a und Abbildung 5.20b). Die Ursache könnte

5 Experimente MS-Leafspray

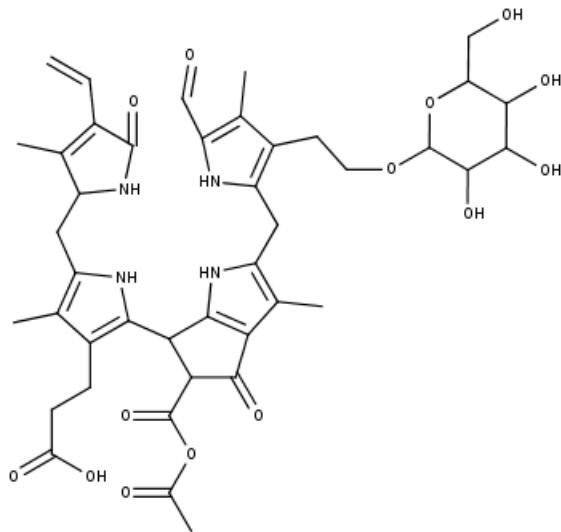


Abbildung 5.19: Strukturvorschlag des Reaktionsproduktes mit Summenformel $C_{42}H_{50}N_4O_{14}$

beim Zuckerring liegen, der die Elektronenverteilung vermutlich so beeinflusst, dass die Abspaltungen bereits bei niedrigeren Energien erfolgen. Eine Analyse möglicher Konformationen wurde aufgrund der zahlreichen Möglichkeiten nicht durchgeführt. Es würde sich jedoch anbieten, eine solche Analyse in zukünftigen Forschungen durchzuführen, um einen besseres Verständnis der Anregung eines Moleküls im Massenspektrometer zu erlangen.

Die Abspaltung von Essigsäure bei $m/z = 813 [M - CH_3COOH + K]^+$ wird in den Abbildungen 5.20a und 5.20b fälscherweise mit $m/z = 812$ angeführt.

5 Experimente MS-Leafspray

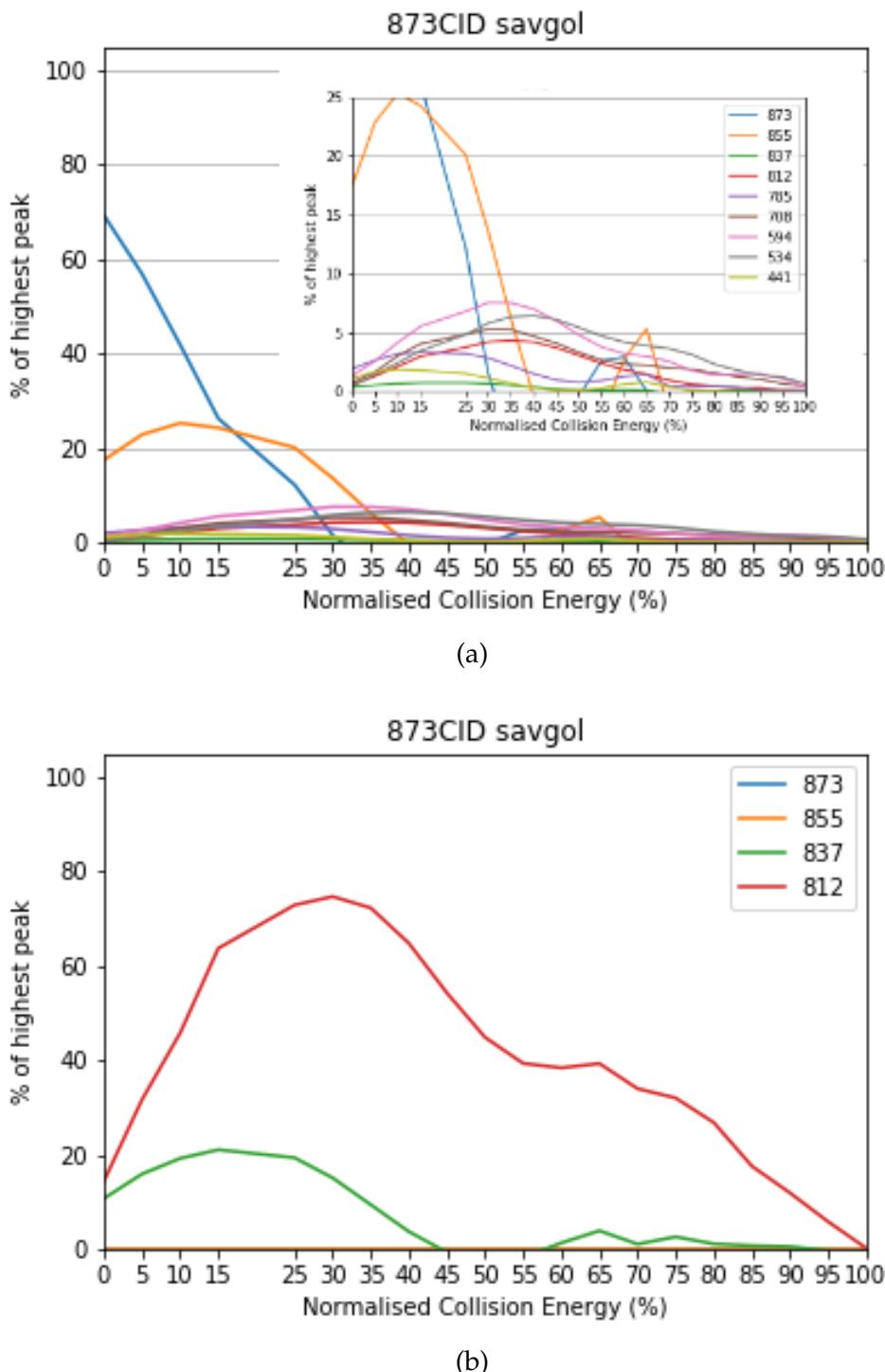


Abbildung 5.20: Fragmentierungsdiagramm des Reaktionsproduktes: (a) Experiment am 13.09.2017 (11:00) - (blau = 873, orange = 855, grün = 837, rot = 812, violett = 765, braun = 708, pink = 594, grau = 534, hellgrün = 441), (b) Experiment am 13.09.2017 (09:45) - schlechter gelungen, weswegen die Abspaltungen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

Als Massenspektrometer wurde ein Thermo LTQ Orbitrap XL im positiven Ionenmodus verwendet (3-6 kV Sprayspannung, m/z von 300 - 1000). Dieses wurde auch für die Messungen von Kapitel 7 verwendet.

6.2 Aufarbeitung der Probe

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

Beim Injizieren 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 Intensitätsverringernd.

Bevor die Blätter wie oben beschrieben aufgerieben wurden, wurden sie in einem Exikator getrocknet (ca. einen halben bis ganzen Tag). Die Blätter, an

6 Experimente LC-MS

denen die Reaktion (Kapitel 4.3) stattgefunden hatte, wurden nach dem Stoppen der Reaktion der gleichen Aufarbeitungsmethode unterzogen.

6.3 Theoretische Grundlagen der Auswertung von Online-UV/Vis Spektren

Mithilfe einer HPLC kann bestimmt werden, ob es sich bei einem bestimmten Chl-Kataboliten um einen NCC, DNCC oder YCC handelt. Man erhält zu jedem Peak im HPLC Chromatogramm ein Online-UV/Vis Spektrum, 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 deformylierten Carbonylgruppe dieses konjugierte System nicht mehr, weswegen die Bande bei 315 nm verschwindet, der sonstige für einen NCC typische Kurvenverlauf bleibt jedoch erhalten. Bei einem YCC führt die Reduktion der Verbindung zwischen Ring C und D (Einführung einer Doppelbindung zwischen Position C-15 und C-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 Grundlagen der Auswertung der MS Spektren

Über das an die HPLC gekoppelte Massenspektrometer wird zu jedem Zeitpunkt eines HPLC Laufes ein Massenspektrum aufgenommen und ein entsprechendes Chromatogramm erzeugt. Die hervorgehobenen Peaks in den folgenden Chromatogrammen zeigen an, zu welchem Zeitpunkt welcher Chl-Katabolit in Bezug auf seine Molekülmasse gefunden wurde. Da das Massenspektrometer erst nach 10 min. an die HPLC gekoppelt wurde, muss man, um die entsprechende Retentionszeit im HPLC Chromatogramm zu erhalten, zu jedem Zeitpunkt im Chromatogramm des Massenspektrometers ca. 11 min.

6 Experimente LC-MS

dazuzählen (1 min. wird für das Zurücklegen des Weges von der HPLC zum Massenspektrometer benötigt).

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 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 Identifikation von Chl-Kataboliten des Brokkoliblattes mit LC-MS

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 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-Katabolit (NCC, DNCC, YCC, DYCC) und die Retentionszeit in der HPLC (soweit eindeutig feststellbar) angegeben.

6 Experimente LC-MS

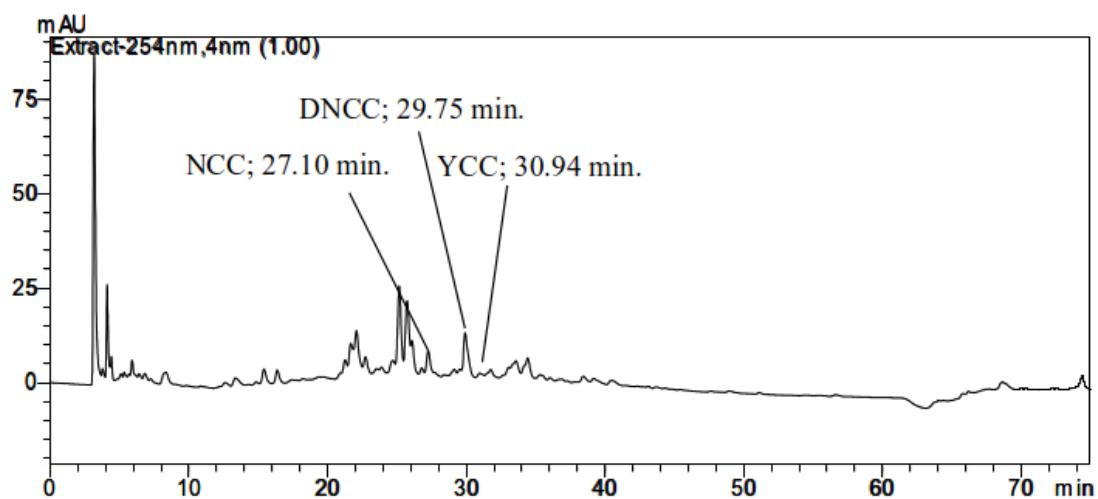


Abbildung 6.1: HPLC Chromatogramm - die hervorgehobenen Peaks entsprechen den Retentionszeiten und der Art der Chl-Kataboliten, die über ein Online-UV/Vis Spektrum bestimmt wurden; gefunden wurden ein NCC bei 27.10 min. (Abbildung 7.10a), ein DNCC bei 29.75 min. (Abbildung 7.10b) und ein YCC bei 30.94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

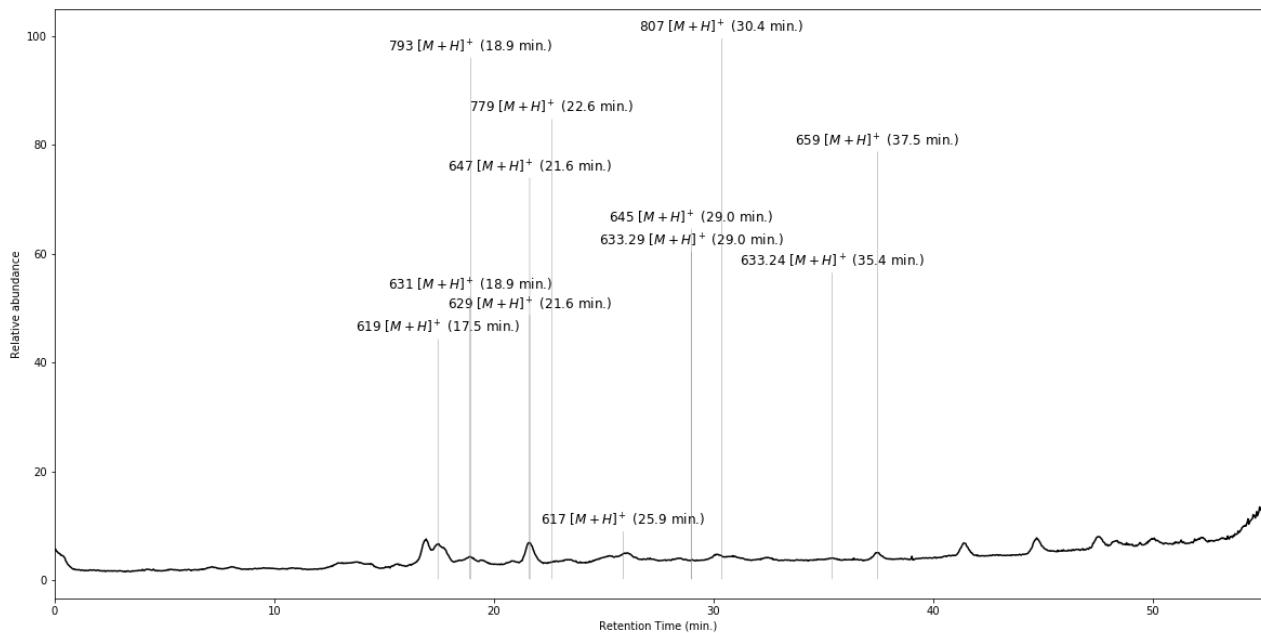


Abbildung 6.2: LC-MS Chromatogramm

6 Experimente LC-MS

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

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)

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-Kataboliten um genau ein C-Atom und zwei H-Atome unterscheiden (entspricht einem Massenunterschied von 14 Da).

Da alle identifizierten Chl-Kataboliten eine freie Carbonsäuregruppe an Position C-8² besitzen, wird angenommen, dass diese bei der Aufarbeitung der Probe mit MeOH (Kapitel 6.2) mit diesem reagieren und einen Methylester bilden. 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 27.10 min. konnte über Online-UV/Vis ein NCC (Abbildung 7.10a) identifiziert werden, da er bei einer Wellenlänge von 315 nm eine charakteristische Bande aufweist. Der von den Retentionszeiten da-

6 Experimente LC-MS

zugehörige Chl-Katabolit im Massenspektrum wäre der *Bo*-DNCC (mit einer Retentionszeit von 17.5 min. im Massenspektrometer - Abbildung 6.2). Bei diesem handelt es sich jedoch um einen DNCC. Es wurde versucht, das unlogische Ergebnis durch Überlagerungen mehrerer Chl-Kataboliten zu erklären, was aber nicht möglich war (Abbildung 6.3). Es bleibt somit das Zustandekommen dieses UV/Vis Spektrums ungeklärt.

Bei einer Retentionszeit von 29.75 min. 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*-DYCC ist zu dieser Retentionszeit im Massenspektrometer vorzufinden und trägt damit vermutlich zur Entstehung des Signals bei, was die Verzerrungen bewirken könnte (Abbildung 6.3).

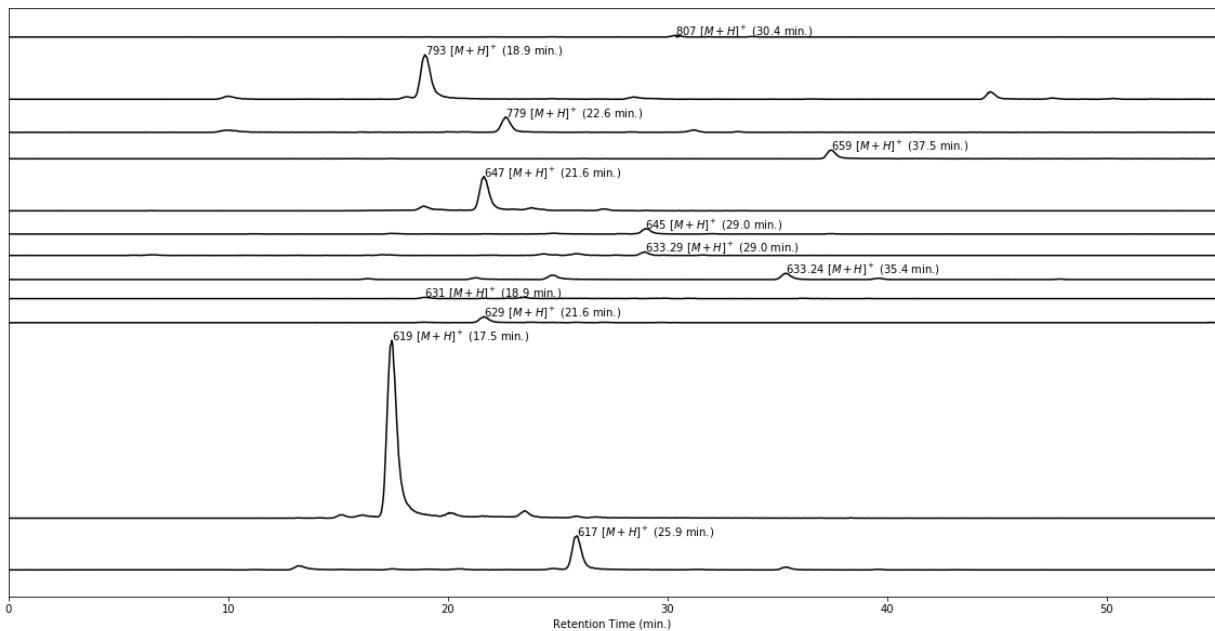


Abbildung 6.3: LC-MS Chromatogramm zur besseren Darstellung von Überlagerungen von Chl-Kataboliten, um diverse unlogische Schlüsse besser verstehen zu können

Bei einer Retentionszeit von 30.94 min. ist das UV/Vis Spektrum charakteristisch für einen YCC (Abbildung 7.10b). Im Massenspektrometer wurde zu

6 Experimente LC-MS

dieser Retentionszeit der Methylester des *Bo*-DYCC gefunden (bei einer Retentionszeit von 18.9 min.). 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*-NCC-1 oder *Bo*-NCC-3). Diese Überlagerungen könnten durch Isomere der einzelnen Chl-Kataboliten bedingt sein.

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 Isomere werden nicht beachtet. Mithilfe dieser Abbildung sollten etwaige Überlagerungen ersichtlich werden.

6 Experimente LC-MS

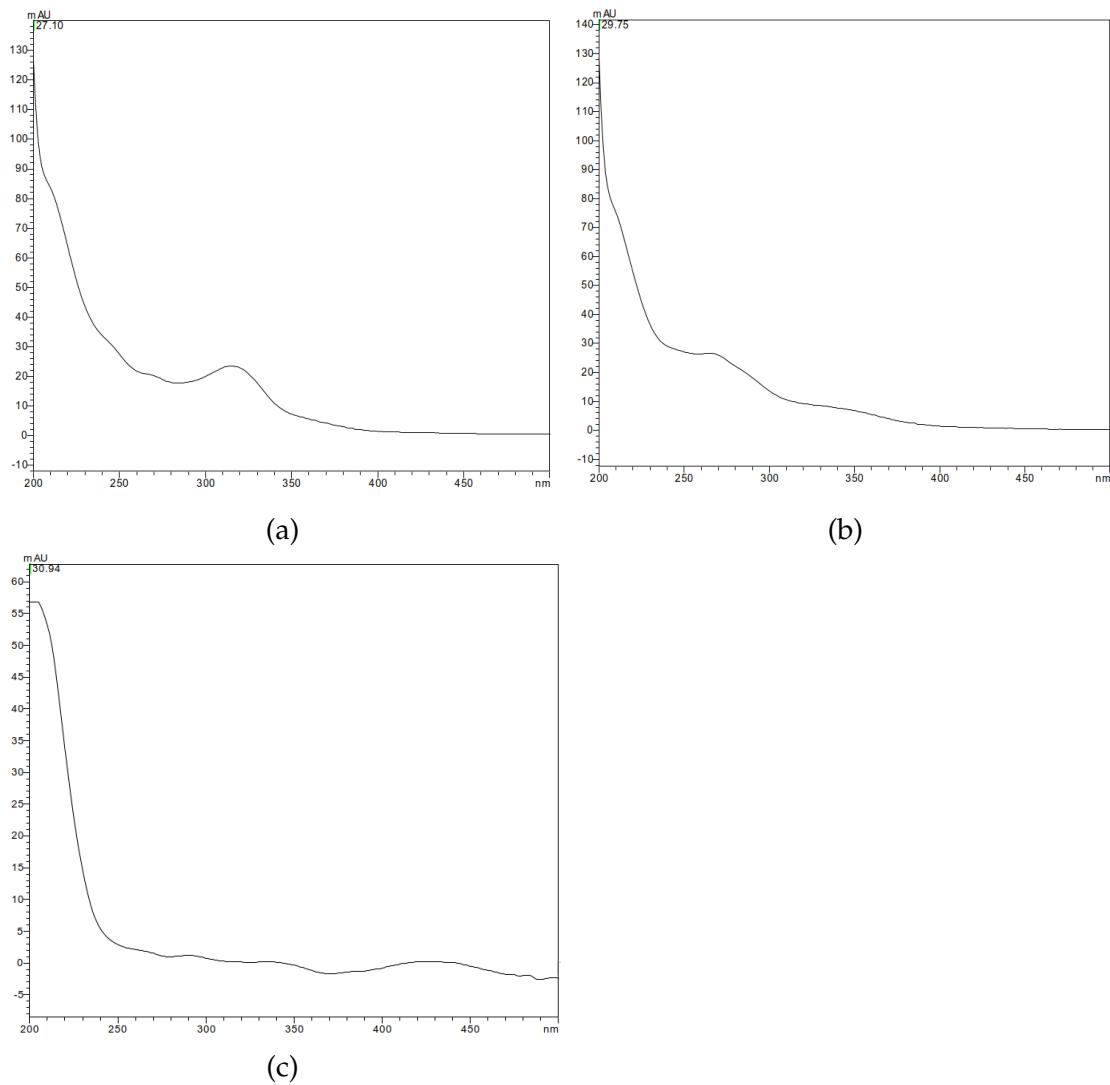


Abbildung 6.4: Online-UV/Vis Spektren: (a) charakteristisch für einen NCC - RT = 27.25 min.,
(b) charakteristisch für einen DNCC - RT = 29.91 min., (c) charakteristisch für
einen YCC - RT = 30.94 min.

6.6 Identifikation der Reaktionsprodukte

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

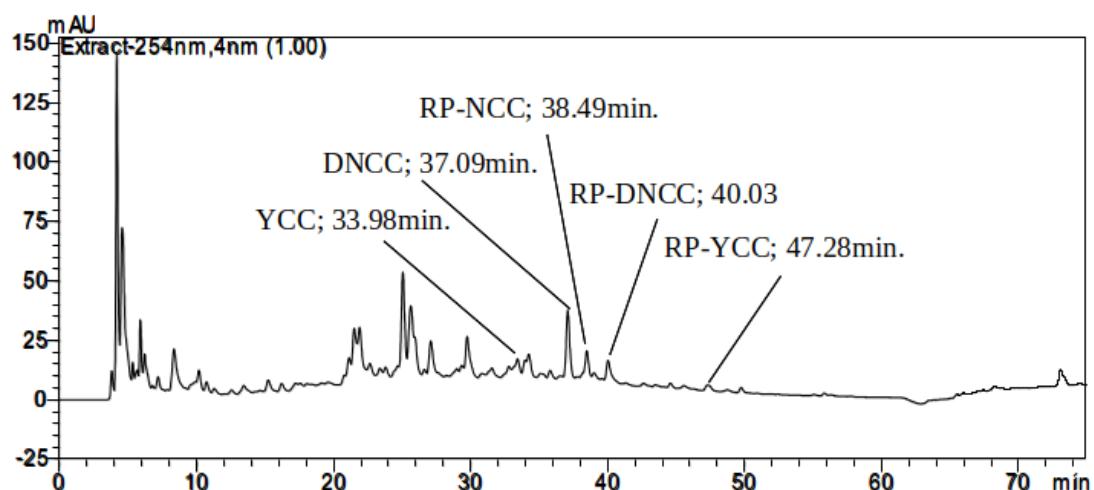


Abbildung 6.5: HPLC Chromatogramm, gefunden wurden Reaktionsprodukte mit den Eigenschaften eines NCCs ($t_R = 38.49$ min.), eines DNCCs ($t_R = 40.03$ min.), eines YCCs ($t_R = 47.28$ min.) und eines weiteren DNCCs ($t_R = 37.09$ min.); beim YCC bei $t_R = 33.98$ min. könnte es sich um einen weiteren 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 39.0 min im Vergleich zu 18.9 min, Verbindung mit $m/z = 629 [M+H]^+$ bei 31.8 min im Vergleich zu 21.6 min und Verbindung mit $m/z = 645 [M+H]^+$ bei 34.5 min im Vergleich zu 29.0 min (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).

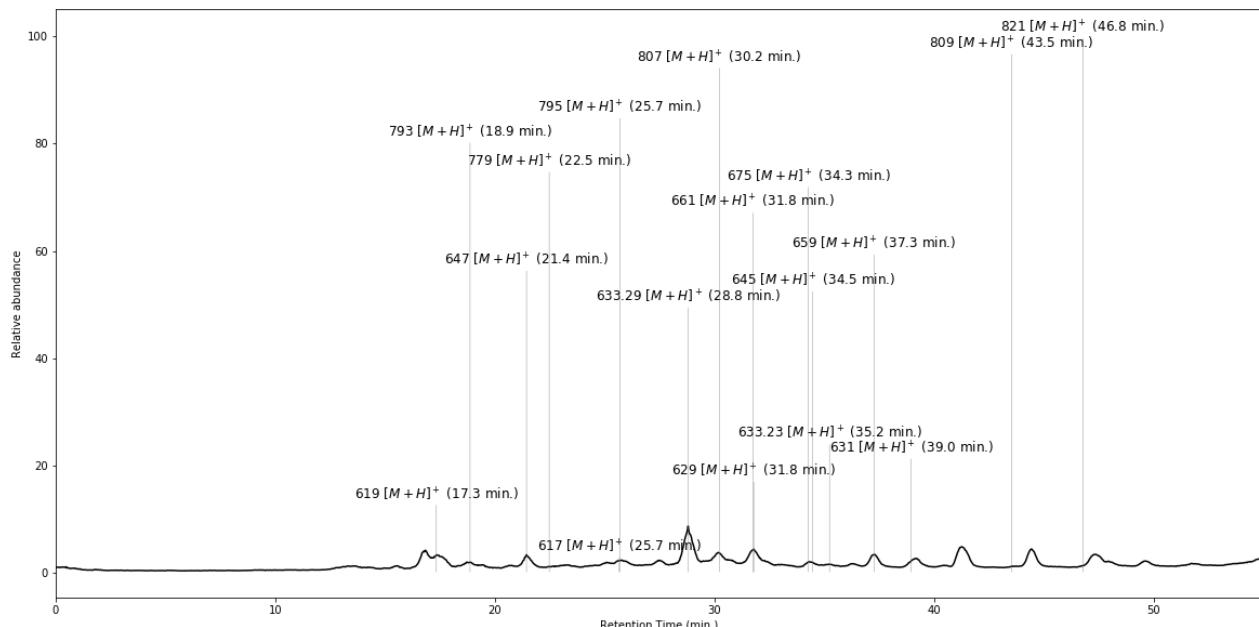


Abbildung 6.6: LC-MS Chromatogramm

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.

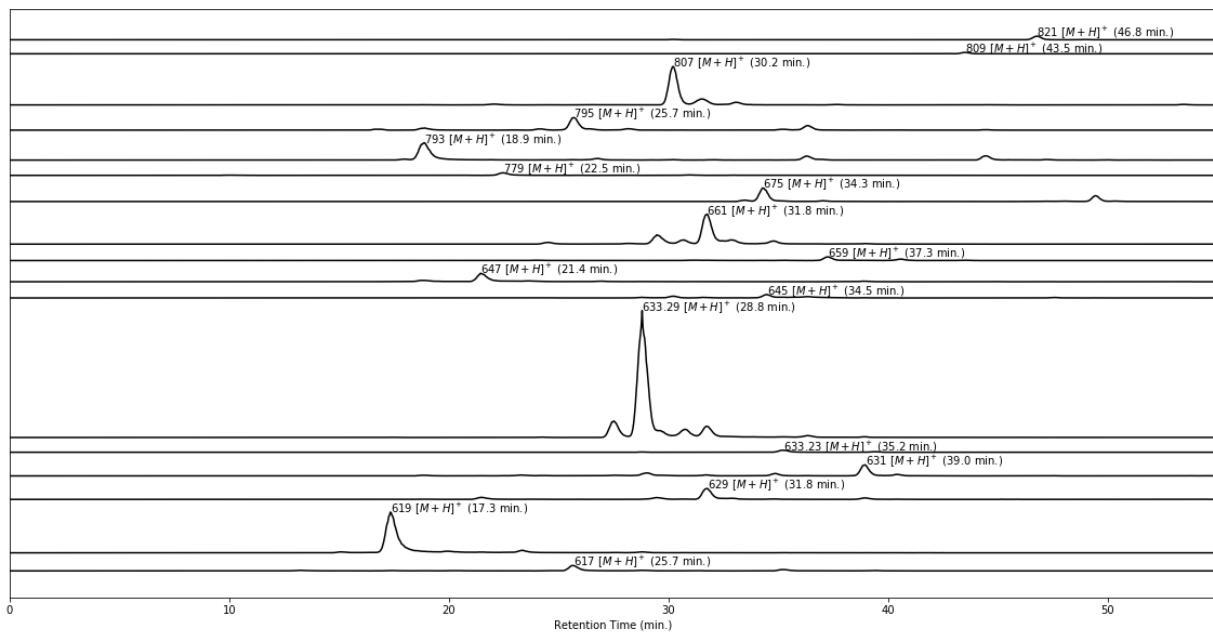


Abbildung 6.7: LC-MS Chromatogramm

6 Experimente LC-MS

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

Bezeichnung	Summenformel	M (in Da)	Typ	t_R^{HPLC} (in min.)	H.
Bo-DYCC	$C_{33}H_{37}O_8N_4$	617.2599	DYCC	30.94?	-
Bo-DNCC	$C_{33}H_{39}O_8N_4$	619.2798	DNCC	26.72	-
•	$C_{34}H_{37}O_8N_4$	629.2641	•	-	-
-	$C_{34}H_{39}O_8N_4$	631.2795	DYCC	29.91, 30.94	Bo-DYCC
-	$C_{34}H_{41}O_8N_4$	633.2955	DNCC	28.8	Bo-DNCC
•	$C_{36}H_{33}O_7N_4$	633.2339	•	-	-
Bo-YCC	$C_{34}H_{37}O_9N_4$	645.2593	YCC	-	-
-	$C_{35}H_{41}O_8N_4$	645.2953	DYCC	-	Bo-DYCC
Bo-NCC-3	$C_{34}H_{39}O_9N_4$	647.2748	NCC	33.04	-
•	$C_{34}H_{35}O_{10}N_4$	659.2348	•	-	-
-	$C_{35}H_{39}O_9N_4$	659.2741	YCC	37.09	Bo-YCC
-	$C_{35}H_{41}O_9N_4$	661.2902	-	-	Bo-NCC-3
-	$C_{36}H_{43}O_9N_4$	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 ($t_R = 33.98$ min.), ein DNCC ($t_R = 37.09$ min.), ein NCC ($t_R = 38.94$ min.), ein weiterer DNCC ($t_R = 40.03$ min.) und ein YCC ($t_R = 47.28$ min.) identifiziert werden (Abbildungen 6.8a-e).

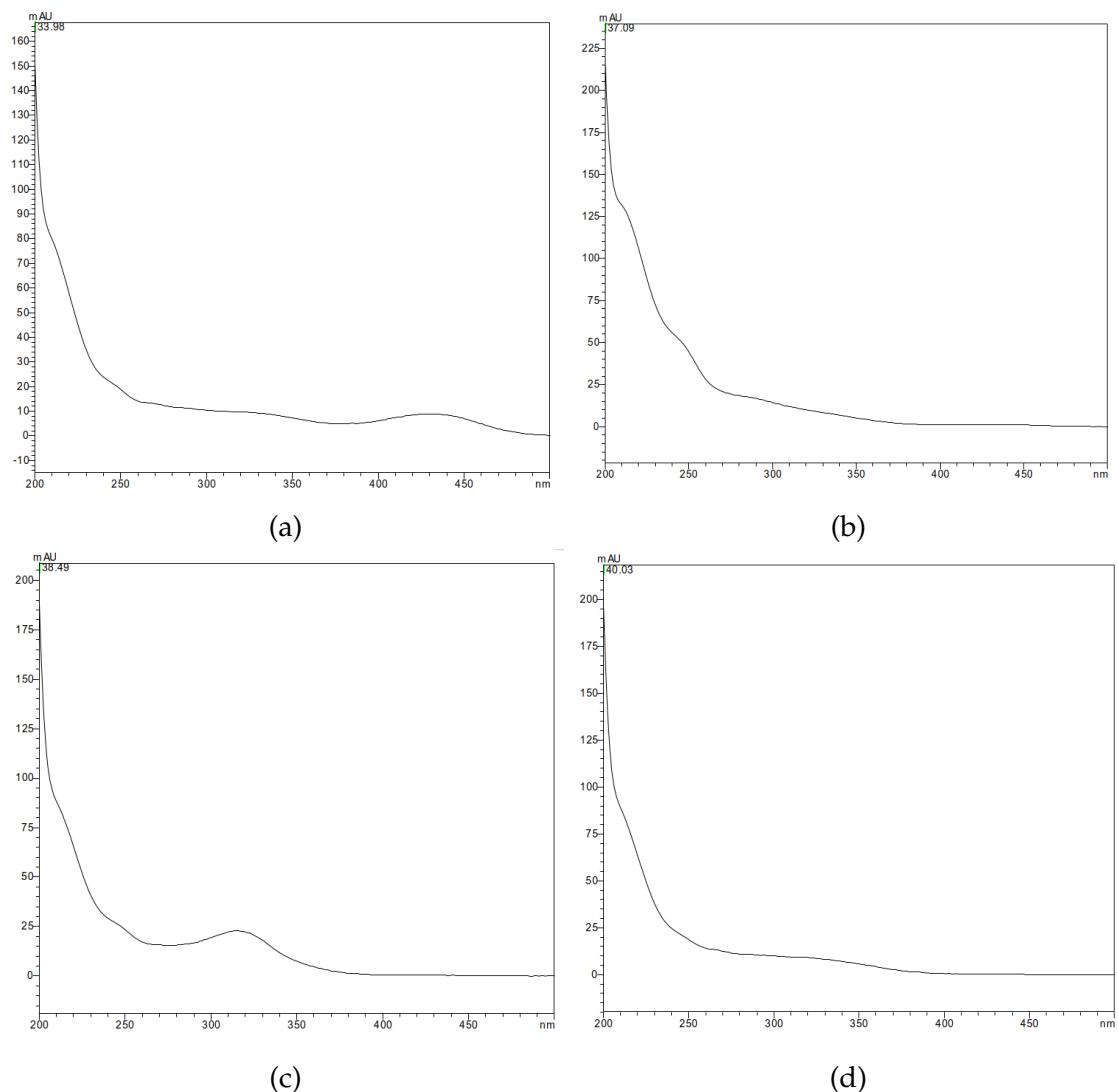


Abbildung 6.8: Online-UV/Vis Spektren: charakteristisch für (a) YCC - $t_R = 33.98$ min., (b) DNCC - $t_R = 37.09$ min., (c) NCC - $t_R = 38.94$ min., (d) DNCC - $t_R = 40.03$ min., (e) YCC - $t_R = 47.28$ min.

6 Experimente LC-MS

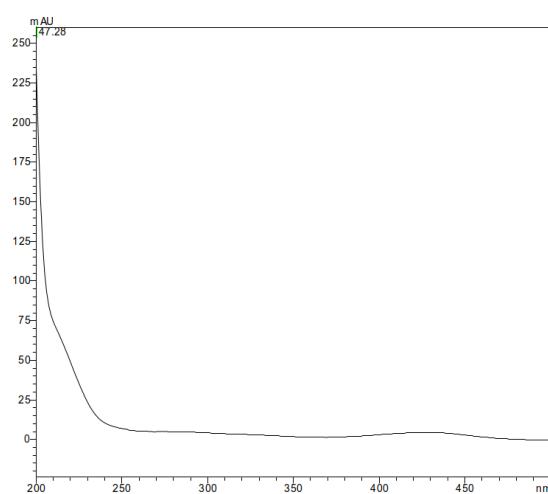


Abbildung 6.9

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

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. 0.5 min.). Die erhaltene Lösung wurde in das Massenspektrometer injiziert 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

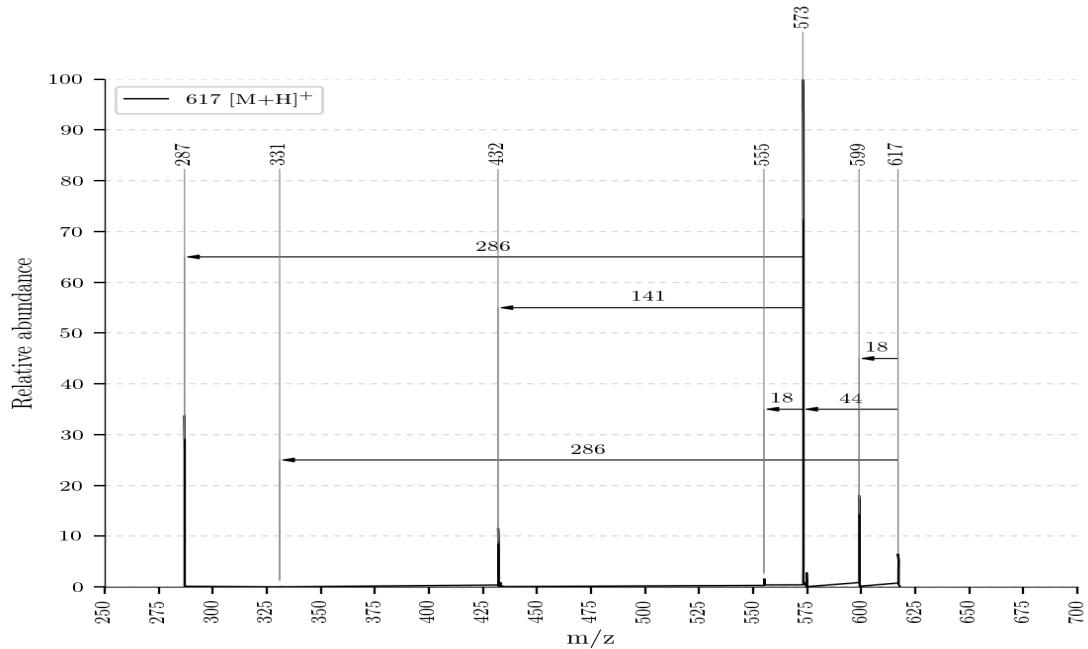


Abbildung 7.1: ESI-MS Spektrum von Bo-DYCC mit $m/z = 617$ $[M+H]^+$

Die Struktur des Bo-DYCC wird wie in Abbildung 7.2 vorgeschlagen. Aufgrund der CO_2 Abspaltung wird eine freie Carbonsäure an Position C-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 C-16 hin.

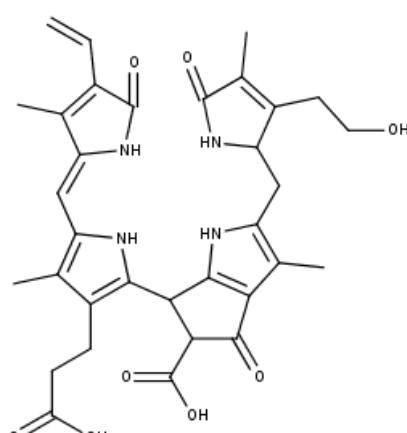


Abbildung 7.2: Strukturvorschlag von Bo-DYCC mit Summenformel $C_{33}H_{36}N_4O_8$

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.

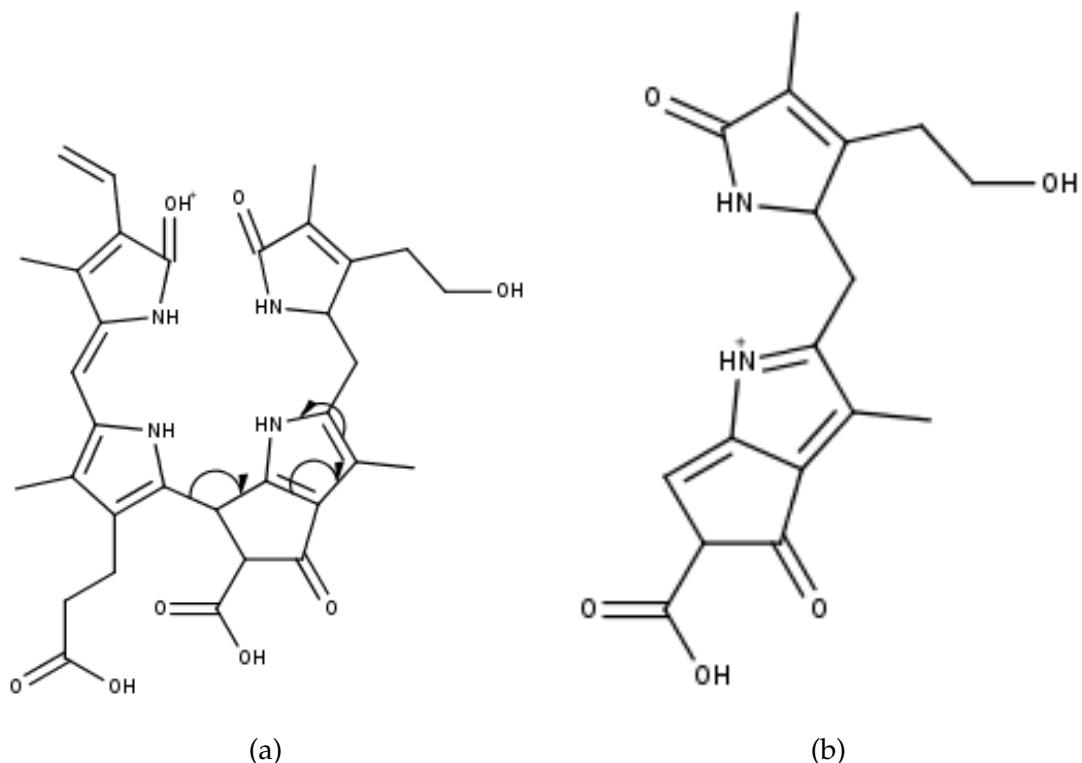


Abbildung 7.3: Mechanistischer Vorschlag für die Abspaltung von Ring C und Ring D: (a) vorgeschlagene Bewegung der Elektronen, (b) Resultat der Abspaltung bei $m/z = 331$ $[\text{M} - (\text{Ring C, Ring D}) + \text{H}]^+$ und Summenformel $\text{C}_{17}\text{H}_{19}\text{O}_5\text{N}_2$

7 Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

7.2.2 Bo-DNCC

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

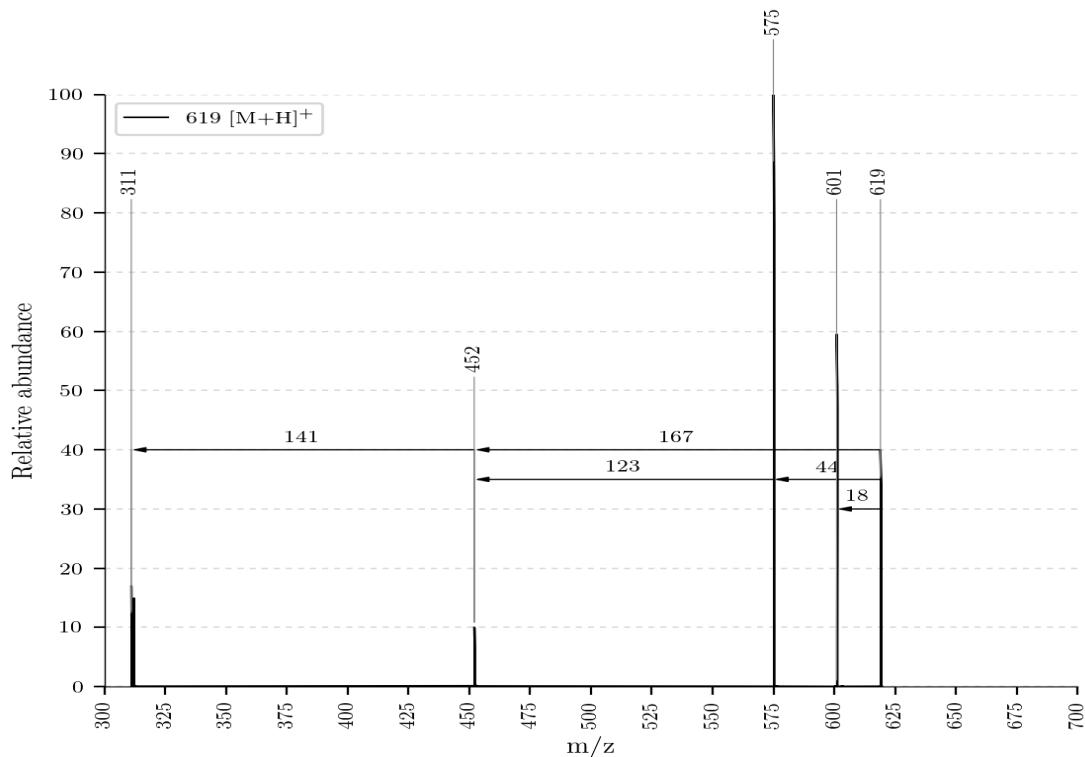


Abbildung 7.4: ESI-MS Spektrum von *Bo*-DNCC bei $m/z = 619 [M+H]^+$

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

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

7 Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

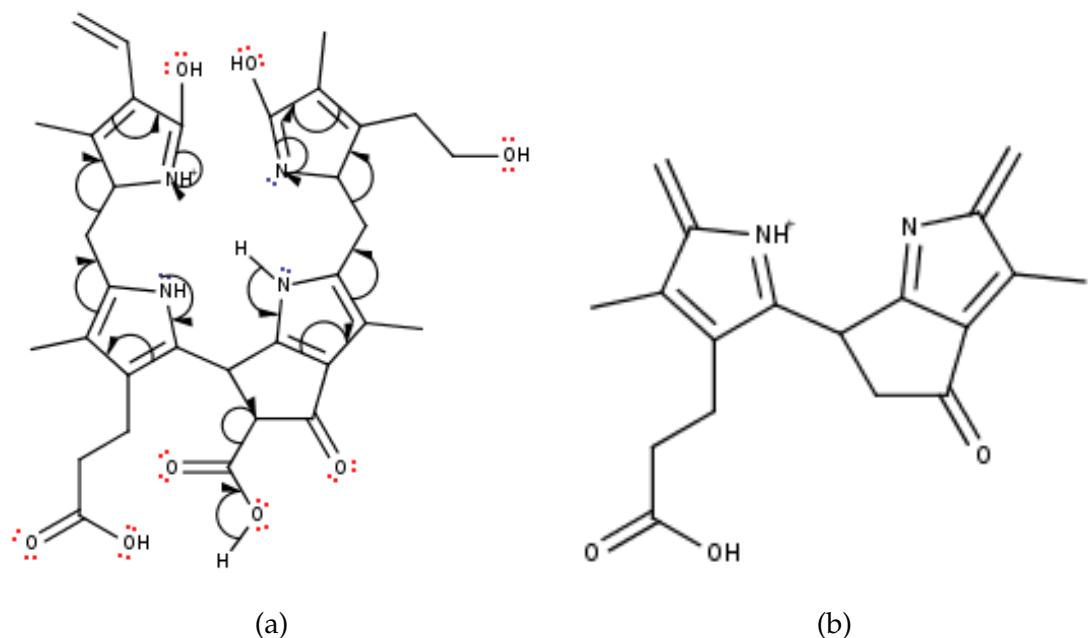


Abbildung 7.5: vorgeschlagener Abspaltungsmechanismus von Ring D und Ring A: (a) vorgeschlagene Elektronenbewegung, (b) Mesomer 1 der Abspaltung mit $m/z = 311$ $[M - (\text{Ring D, Ring A}) + H]^+$ und Summenformel $C_{18}H_{19}O_3N_2$

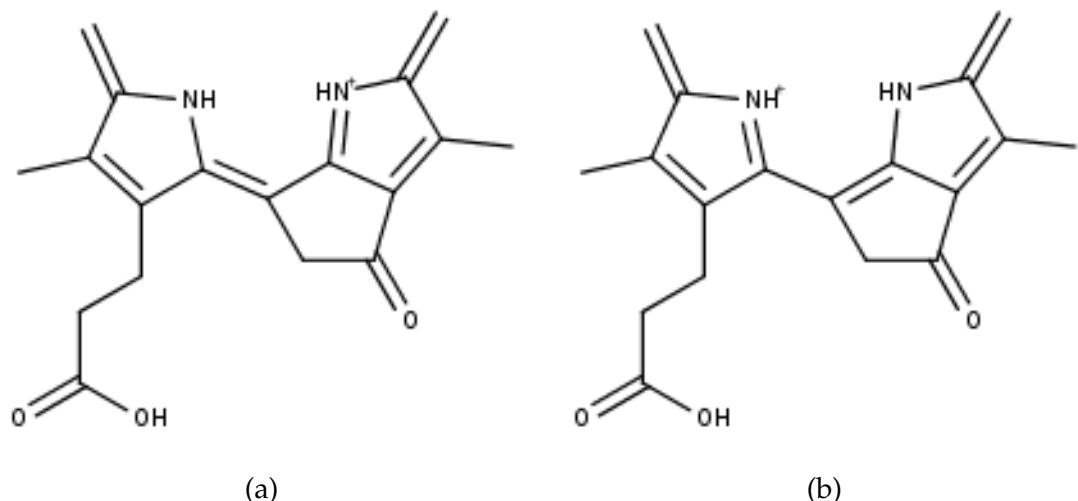


Abbildung 7.6: Mesomere des Abspaltungsproduktes: (a) Mesomer 2, (b) Mesomer 3

7 Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

7.2.3 Bo-YCC

Der *Bo-YCC* konnte, so wie der *Bo-DYCC* nicht mit MS Leafspray aufgenommen werden, dafür jedoch im Rahmen der hier verwendeten Methode. Er wurde mit $m/z = 645 [M+H]^+$ identifiziert und zeigt Abspaltungen von H_2O bei $m/z = 627 [M - H_2O + H]^+$ und von CO_2 bei $m/z = 601 [M - CO_2 + H]^+$ (Abbildung 7.7).

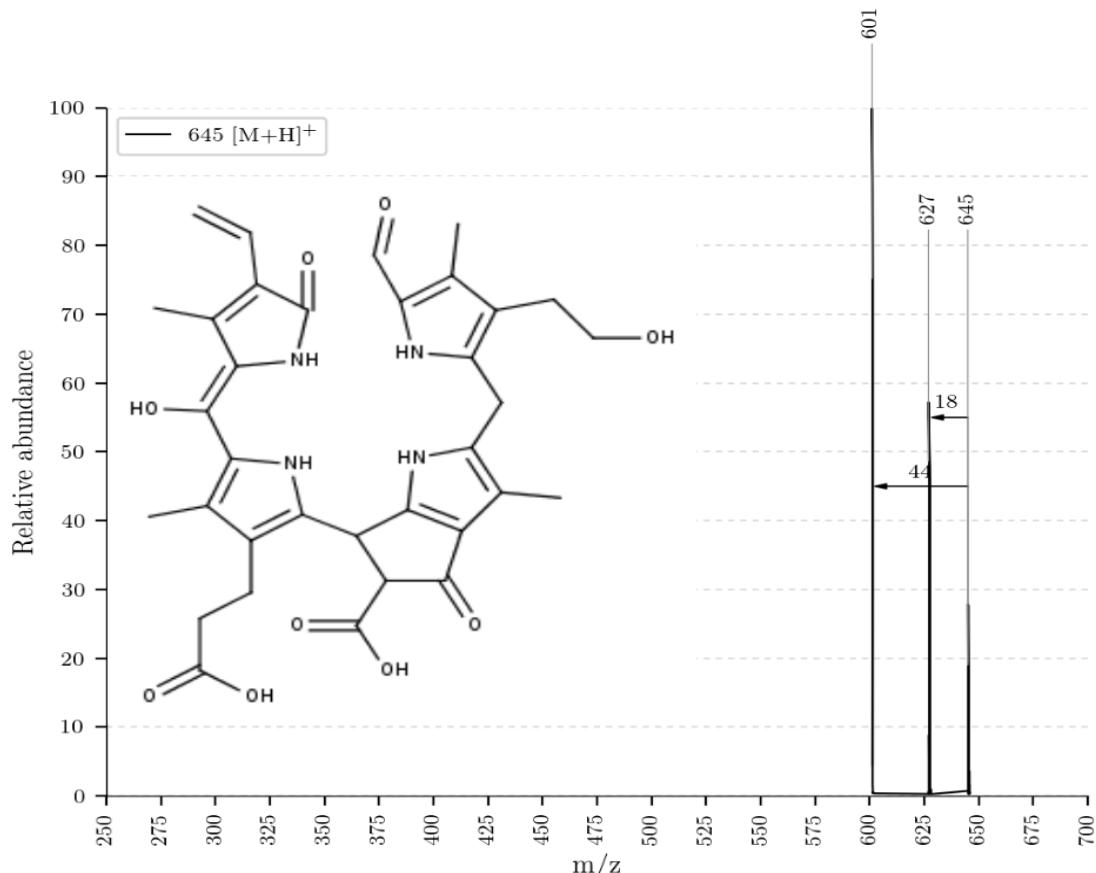


Abbildung 7.7: ESI-MS Spektrum von *Bo-YCC* mit $m/z = 645 [M+H]^+$ und Strukturvorschlag mit Summenformel $C_{34}H_{36}O_9N_4$

Die Abspaltung von CO_2 hilft, ihn vom Dimethylierungsprodukt des *Bo-DYCC* zu unterscheiden. Es wird deswegen an Position C-8² eine freie Carbonsäure und an Position C-16 eine Doppelbindung mit einer Hydroxygruppe angenommen (Abbildung 7.7).

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 C-16 wird angenommen, dass beim Abspaltungsprodukt eine Keto-Enol-Tautomerie vorliegt, 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.

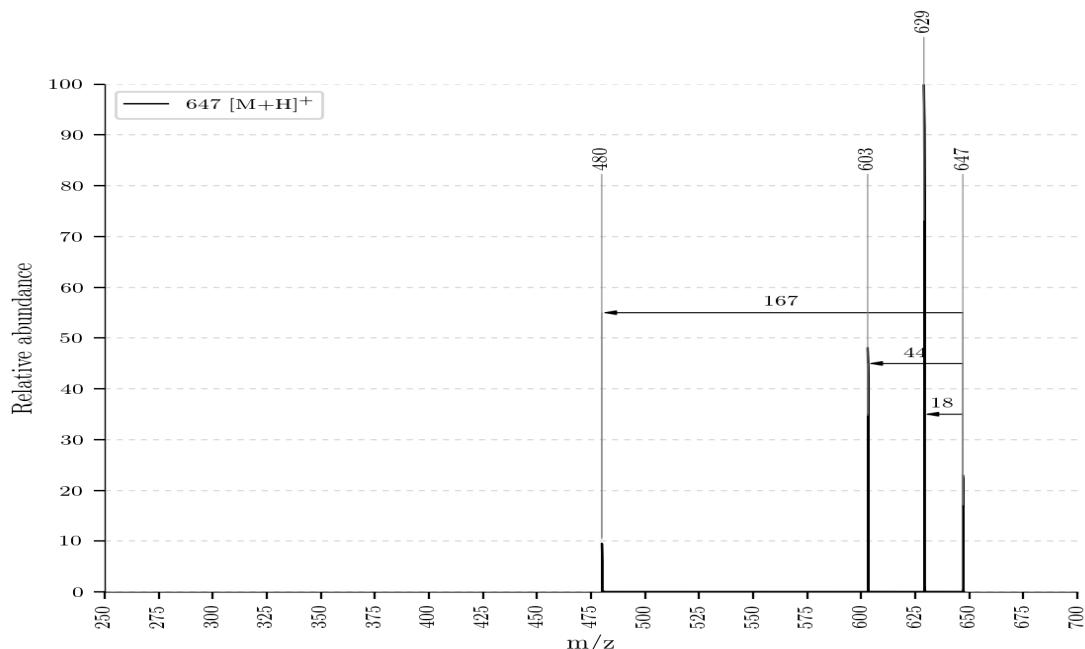


Abbildung 7.8: ESI-MS Spektrum von *Bo-NCC-3* mit $m/z = 647 [M+H]^+$

7 Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

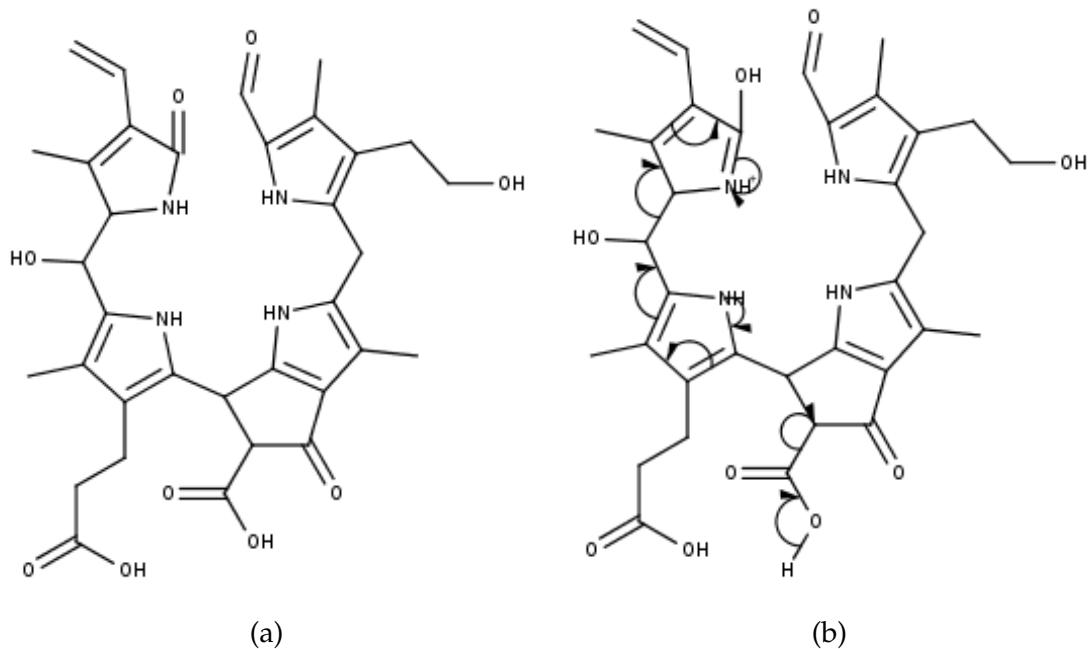


Abbildung 7.9: (a) Strukturvorschlag von Bo-NCC-3 mit Summenformel C₃₄H₃₉O₉N₄, (b) vorgeschlagener Mechanismus für die Abspaltung von Ring D mit CO₂

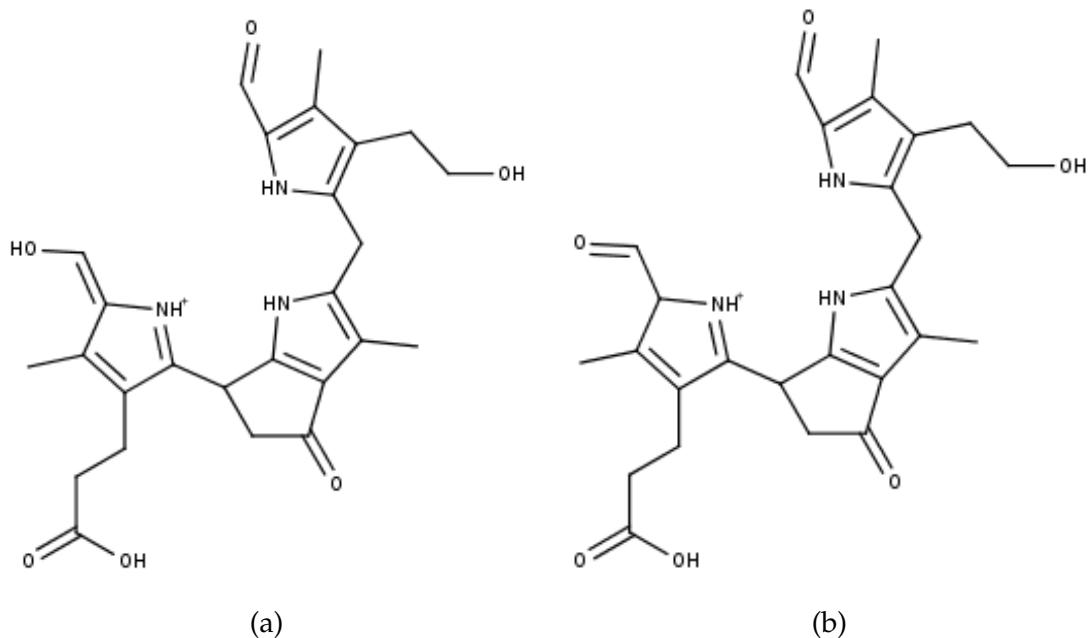


Abbildung 7.10: vorgeschlagene Keto-/Enol Tautomerie beim Abspaltungsprodukt von Ring D mit Summenformel C₂₆H₃₀O₆N₃: (a) Enolform, (b) Aldehyd (vermutlich stabiler)

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 $m/z = 613 [M - (Zucker, H_2O) + H]^+$ und von Zucker zusammen mit CO_2 bei $m/z = 587 [M - (Zucker, CO_2) + H]^+$.

Die Struktur wird wie in Abbildung 5.5a vorgeschlagen.

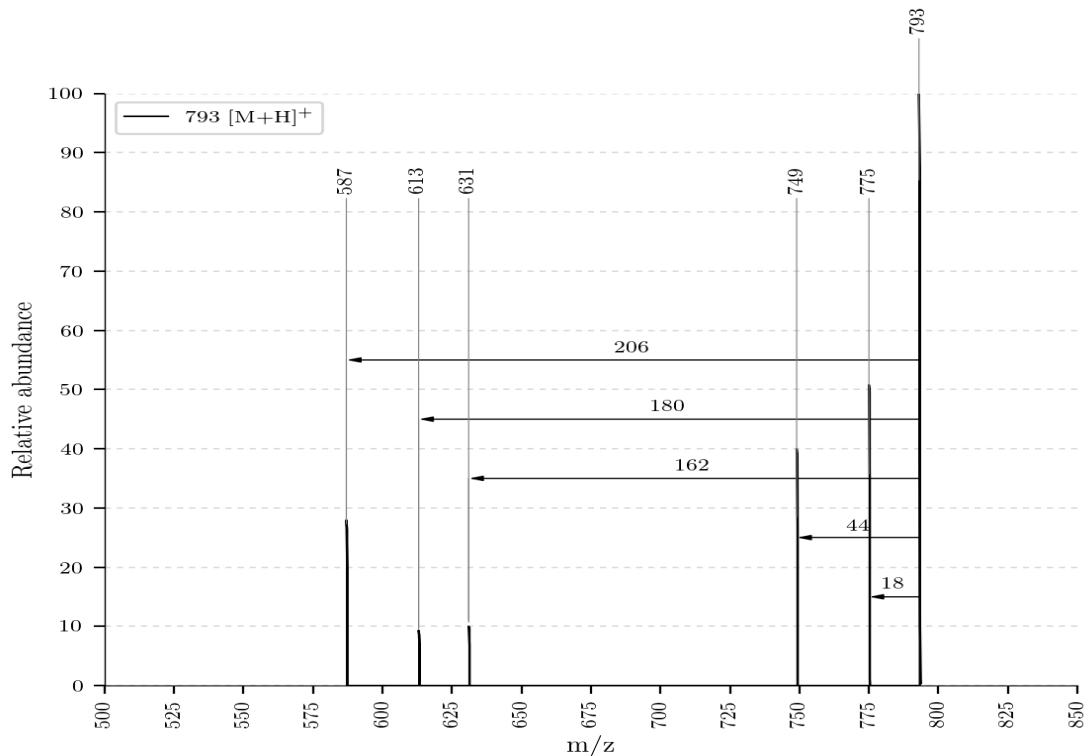


Abbildung 7.11: ESI-MS Spektrum von Bo-NCC-1 mit $m/z = 793 [M+H]^+$

7.3 Reaktionsprodukte der Chl-Kataboliten

7.3.1 Reaktionsprodukte des 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 C-12³ vermutet, da das Ion eine Abspaltung von CO_2 bei $m/z = 587 [M - \text{CO}_2 + H]^+$ zeigt (Abbildung 7.12).

Beim Reaktionsprodukt bei $m/z = 645 [M+H]^+$ handelt es sich um einen Dimethylester, an den Positionen C-8² und C-12³. Dies zeigt die Abspaltung von MeOH bei $m/z = 613 [M - \text{MeOH} + H]^+$ (Abbildung 7.13).

Dies ist überraschend, da bei den meisten anderen untersuchten Chl-Kataboliten die Bildung eines Monomethylesters an Position C-8² beobachtet wurde, welche durch das häufige natürliche Vorhandensein von Methylestern als günstiger angesehen werden kann.

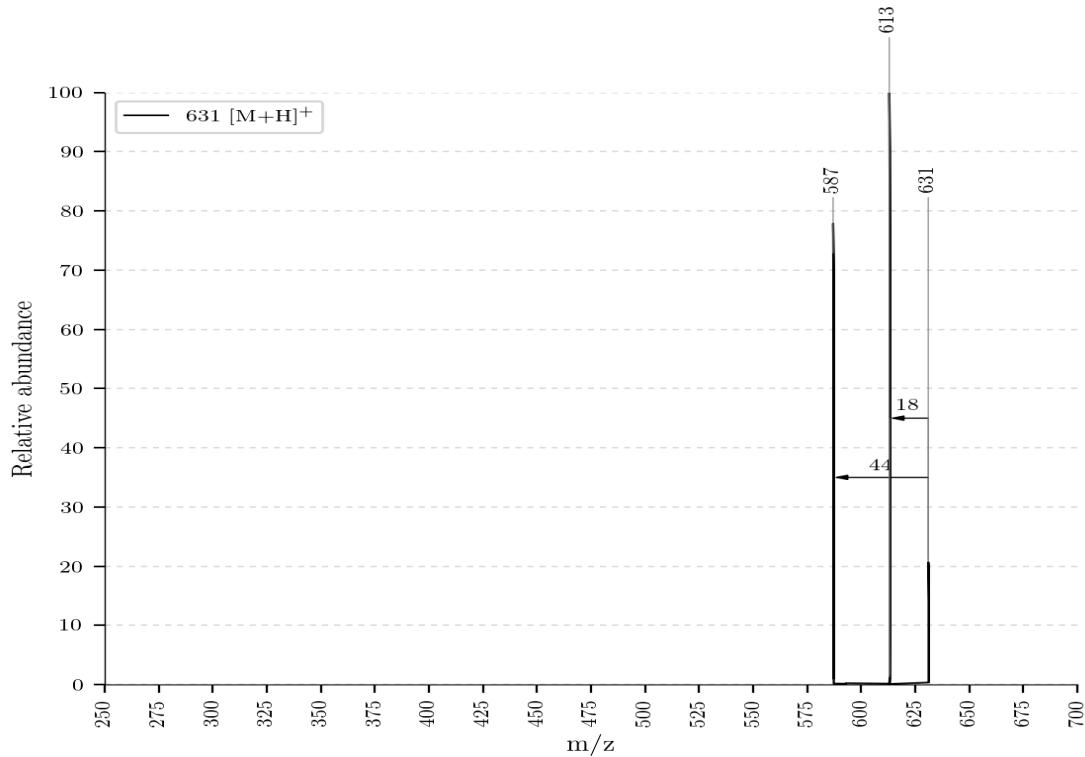


Abbildung 7.12: ESI-MS Spektrum des Monomethylesters von *Bo*-DYCC bei $m/z = 631 [M+H]^+$

7 Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

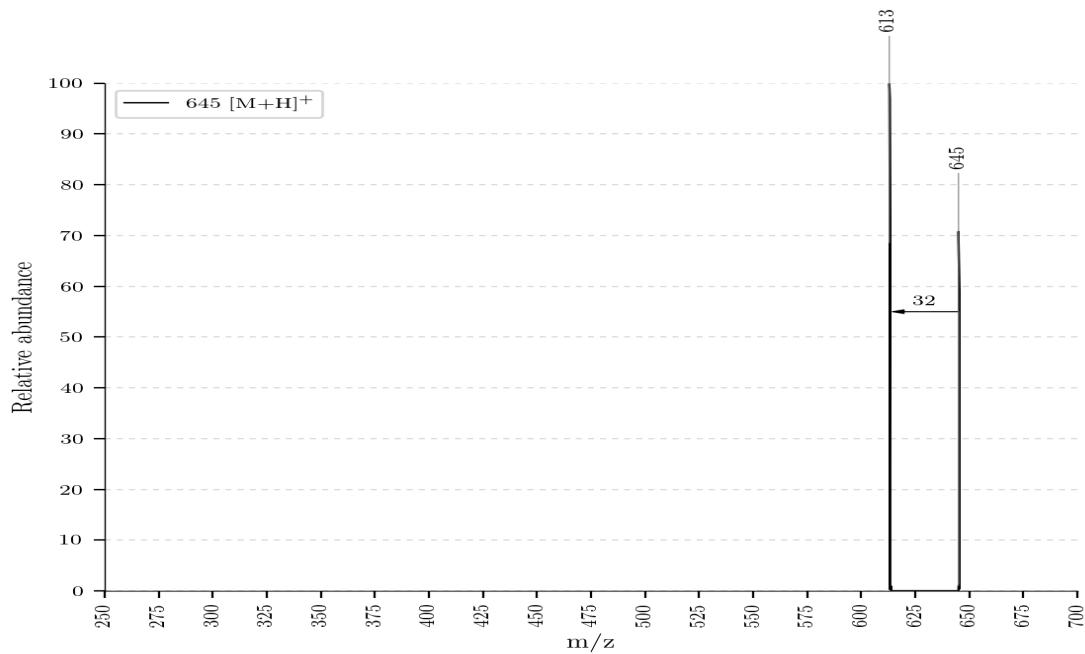


Abbildung 7.13: ESI-MS Spektrum des Dimethylesters von Bo-DYCC bei $m/z = 645$ $[M+H]^+$

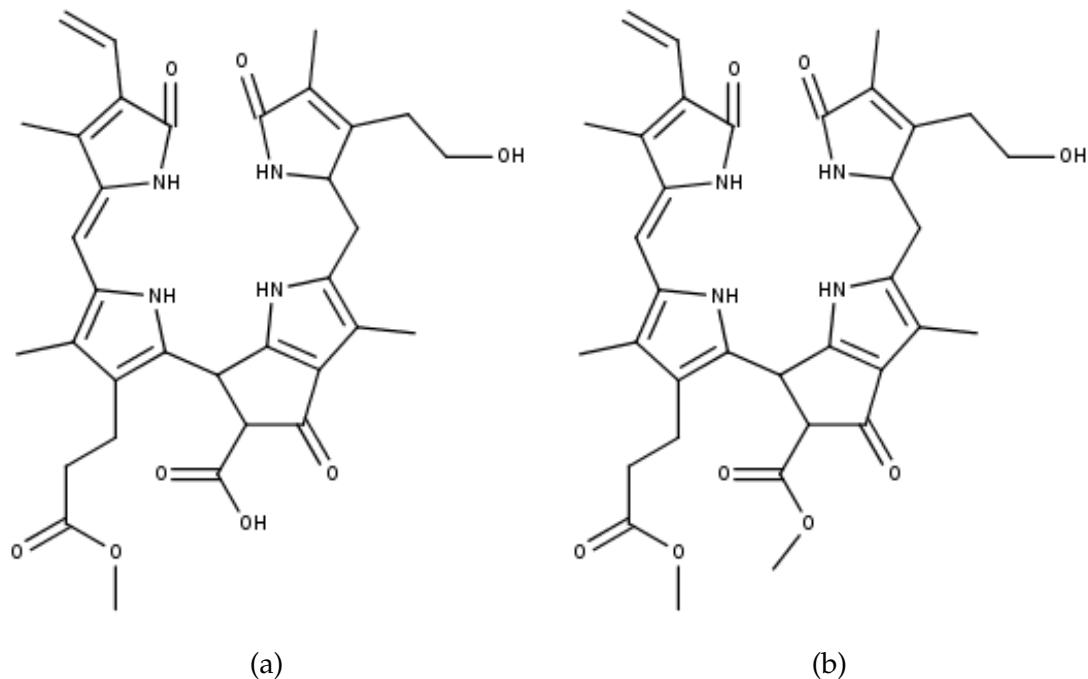


Abbildung 7.14: Strukturvorschläge: (a) Monomethylierungsprodukt mit Summenformel $C_{34}H_{38}O_8N_4$, (b) Dimethylierungsprodukt mit Summenformel $C_{35}H_{41}O_8N_4$

7 Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

7.3.2 Reaktionsprodukt des 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 C-8² ausbildet. Auf eine Diskussion aller in Abbildung 7.15 ersichtlichen Fragmentierungen wird ob der Menge verzichtet.

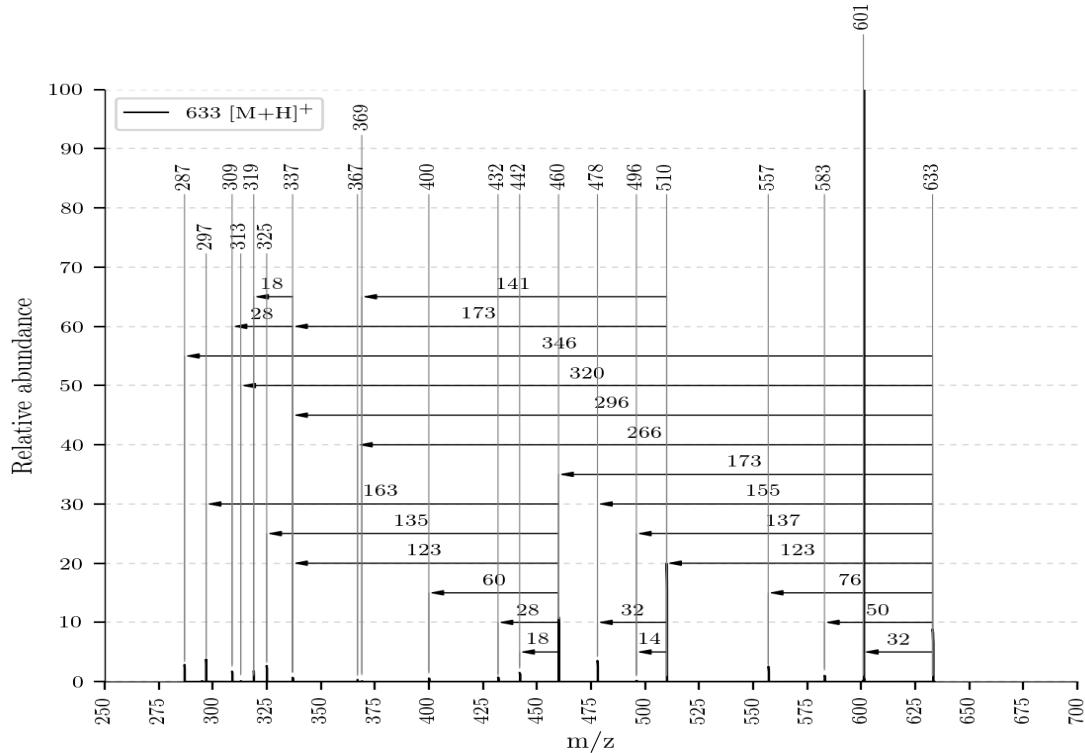


Abbildung 7.15: ESI-MS Spektrum des Reaktionsproduktes des Bo-DNCC mit $m/z = 633 [M+H]^+$

7 Strukturaufklärung der Chl-Kataboliten mit ESI-MS

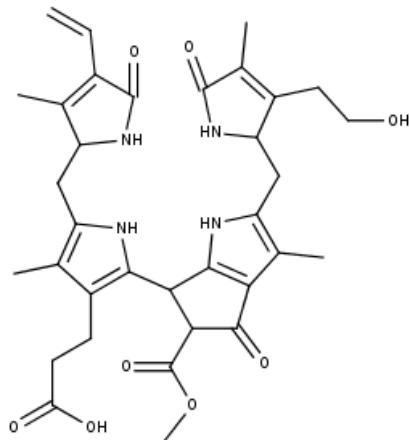


Abbildung 7.16: Strukturvorschlag für das Reaktionsprodukt von *Bo*-DNCC mit Summenformel $C_{34}H_{41}O_8N_4$

7.3.3 Reaktionsprodukt des Bo-YCC

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

7.3.4 Reaktionsprodukt des Bo-NCC-1

Das Reaktionsprodukt des *Bo*-NCC-1 konnte ebenfalls nicht gesammelt und näher identifiziert werden. Es wurde 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).

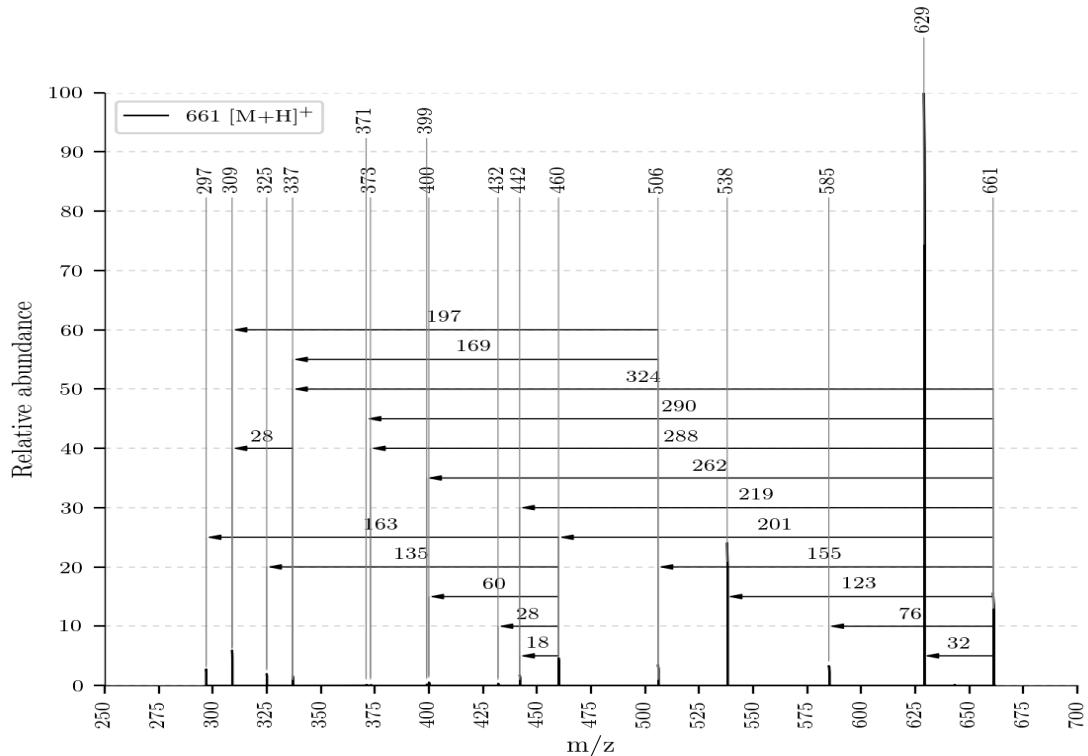


Abbildung 7.17: ESI-MS des Reaktionsproduktes von *Bo*-NCC-3 bei $m/z = 661 [M+H]^+$

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-Katabolit	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-Kataboliten des Brokobilates 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 8² deutlich reaktiver ist wie jene an Position 12². 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, in der 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 Deep-Learning 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.

Im Folgenden wird eine Theorie zur Interpretation der im CID-Modus aufgenommenen Fragmentierungsdiagramme entwickelt. Im Massenspektrometer

9 Diskussion

kommt es durch teilweise Umwandlung kinetischer Energie in intramolekulare Energie zur Anregung des Molekül und dementsprechend zu Schwingungen desselben. Diese Schwingungen führen letztendlich zum Bindungsbruch und zu den messbaren Fragmenten. Bei der Erstellung der Fragmentierungsdiagramme wurde die Intensität dieser Fragmente zur aufgewendeten NKE gemessen.

Was bei der Betrachtung der Diagramme auffällt, ist, dass sie Minima und Maxima besitzen, die im Praktischen Teil der Arbeit ausführlich beschrieben worden sind. Außerdem nehmen die Intensitäten bei höheren Energien zumeist ab. Die meisten Maxima befinden sich in einem Bereich von 10 bis 50 NKE.

Chl-Kataboliten sind von ihrer räumlichen Struktur komplexe Moleküle und können aufgrund von Drehungen um Einfachbindungen diverse räumliche Strukturen annehmen, die aufgrund von sterischen Effekten thermodynamisch nicht gleich stabil sind. Wenn ein solcher Chl-Katalysator energetisch angeregt wird und demnach schwingt, gibt es vermutlich bestimmte energetisch stabile räumliche Anordnungen, die abhängig von der NKE sind. Das könnte bedeuten, dass es bestimmte NKEs gibt, die den Chl-Katalysatoren in bestimmte räumliche Anordnungen bringen, bei denen eine Abspaltung eines Ringes beispielsweise energetisch günstig ist.

Nach diesem Modell wäre bei einer großen NKE die Anregung so groß, dass es zu sterischen intramolekularen Hinderungen kommt, die Abspaltungen entweder gänzlich verhindern oder das Molekül zum unkontrollierten Auseinanderbrechen bringt. Das Entstehen von Maxima einer Abspaltung kann durch das Einnehmen eines für diese Abspaltung energetisch günstigen Zustandes erklärt werden. Minima könnten das Einnehmen eines Übergangszustandes beschreiben.

Bei der vorliegenden Betrachtung werden die Intensitäten der Abspaltungen aufgrund der unterschiedlichen Ionisierbarkeit nicht berücksichtigt. Es wird angenommen, dass die Ionisierbarkeit nicht von der NKE abhängt.

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, herausgearbeitet. Die Liste stellt nicht den Anspruch, vollständig zu sein.

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	- 75 min. 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. 30 min. pro Blatt, wenn man viele Chl-Kataboliten analysiert)	- (fast) vollständige Analyse eines Blattes dauert bis zu 100 min., 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	+ höhere Wahrscheinlichkeit des Auffindens von Chl-Kataboliten		
- bevorzugt $[M+K]^+$ Ionen	- bevorzugt $[M+H]^+$ 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 zu 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 persönlich gilt, dass ich durch diese Arbeit meine Persönlichkeit wesentlich weiterentwickeln 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. 7, 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. 7).
- [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, 19, 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.shtm (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	22
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 27.10 min., eines DNCC bei 29.75 min. sowie eines YCC bei 30.94 min., Quelle: Autor	38
6.5 HPLC Chromatogramm nach 3 h Reaktionsdauer, Quelle: Autor	39
6.6 LC-MS Chromatogramm nach 3 h Reaktionsdauer, Quelle: Autor	40
6.7 LC-MS Chromatogramm nach 3 h Reaktionsdauer - Aufspaltung, Quelle: Autor	41
6.8 Online-UV/Vis Spektren mit der Charakteristik eines YCC bei 33.98 min., eines DNCC bei 37.09 min. eines NCC bei 38.94 min. sowie eines DNCC bei 40.03 min., Quelle: Autor	43
6.9	44
6.10 Online-UV/Vis Spektren mit der Charakteristik eines YCC bei 47.28 min., 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 Vorschlag für die Keto-Enol-Tautomerie 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 <i>Bo</i> -DYCC, Quelle: Author	55
7.14 Strukturvorschläge für das Mono- und Dimethylierungsprodukt des <i>Bo</i> -DYCC, Quelle: Autor	55
7.15 ESI-MS Spektrum des Reaktionsproduktes von <i>Bo</i> -DNCC, Quelle: Autor	56
7.16 Strukturvorschlag für das Reaktionsprodukt von <i>Bo</i> -DNCC, Quel- le: Autor	57
7.17 ESI-MS des Reaktionsproduktes von <i>Bo</i> -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

ca. circa. 11, 31

Chl-Katabolit Chlorophyll-Kataboliten. 2, 4, 5, 7, 8, 10, 11, 15, 17, 31–37, 39, 40, 45, 51, 54, 62, 64

CID Collision Induced Dissociation. 2

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

EPPI Eppendorf Reaktionsgefäß. 5

ESI Elektrosprayionisation. 6, 7

HPLC High performance liquid chromatography. 2, 5–7, 10, 11, 31–35, 37, 39, 45

LC-MS Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. 5, 6, 31, 33, 34, 36, 37, 39–41, 45, 57

LM Lösungsmittel. 6, 12–14, 22

m/z Masse pro Ladung. 6, 15

MeOH Methanol. 14, 16, 18, 19, 22, 28, 31, 35, 39, 42, 54, 56

nAb. noch Aufklärungsbedarf. 16–20, 23, 24, 26, 27

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

NKE normalisierten Kollisionsenergie (in %). 11, 16–20, 23–26, 28, 64

RP Reversed-phase. 5

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

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

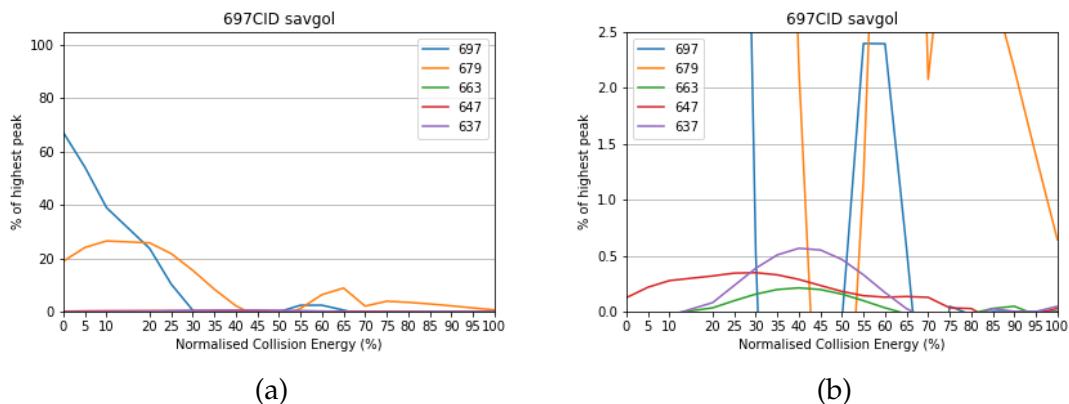


Abbildung A.1: Fragmentierungsdiagramme des Reaktionsproduktes von Bo-DYCC: (a) $m/z = 697 [M+K]^+$ - es handelt sich dabei um das Anhydrid, (b) Ausschnitt aus (a)

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

A.2 Reaktionsprodukt von Bo-DNCC

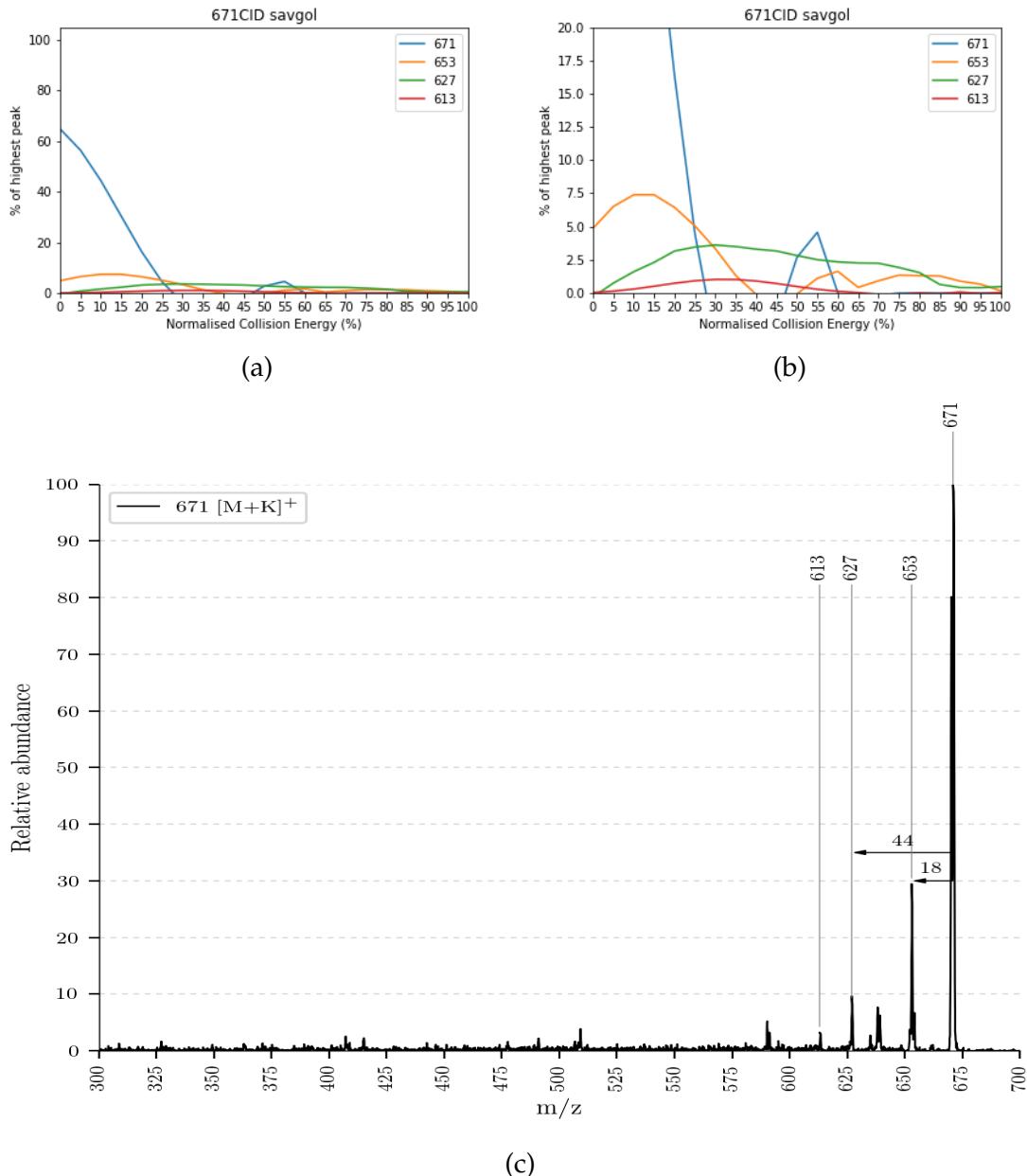


Abbildung A.2: Fragmentierungsdiagramme und MS-Spektrum des Reaktionsproduktes von Bo-DNCC: (a) $m/z = 671 [M+K]^+$ - es handelt sich dabei um einen Methylester, (b) Ausschnitt aus Diagramm (a), (c) MS-Spektrum bei $m/z = 671 [M+K]^+$

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

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

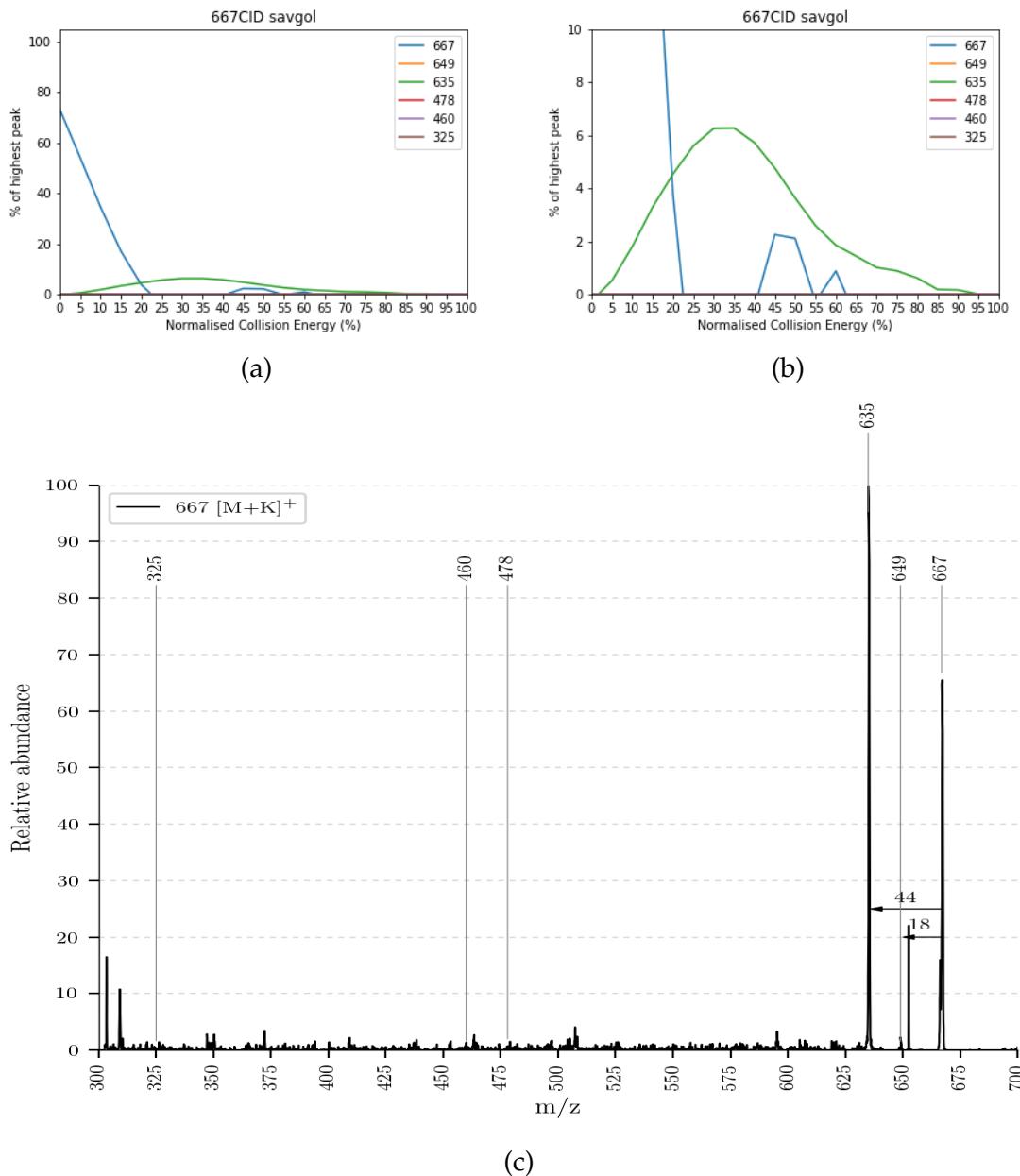


Abbildung A.3: Fragmentierungsdiagramme und MS-Spektrum eines vermeintlichen Chl-Kataboliten mit $m/z = 667$ $[M+K]^+$: (a) Fragmentierungsdiagramm, (b) Ausschnitt aus Diagramm (a), (c) MS-Spektrum bei $m/z = 667$ $[M+K]^+$

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

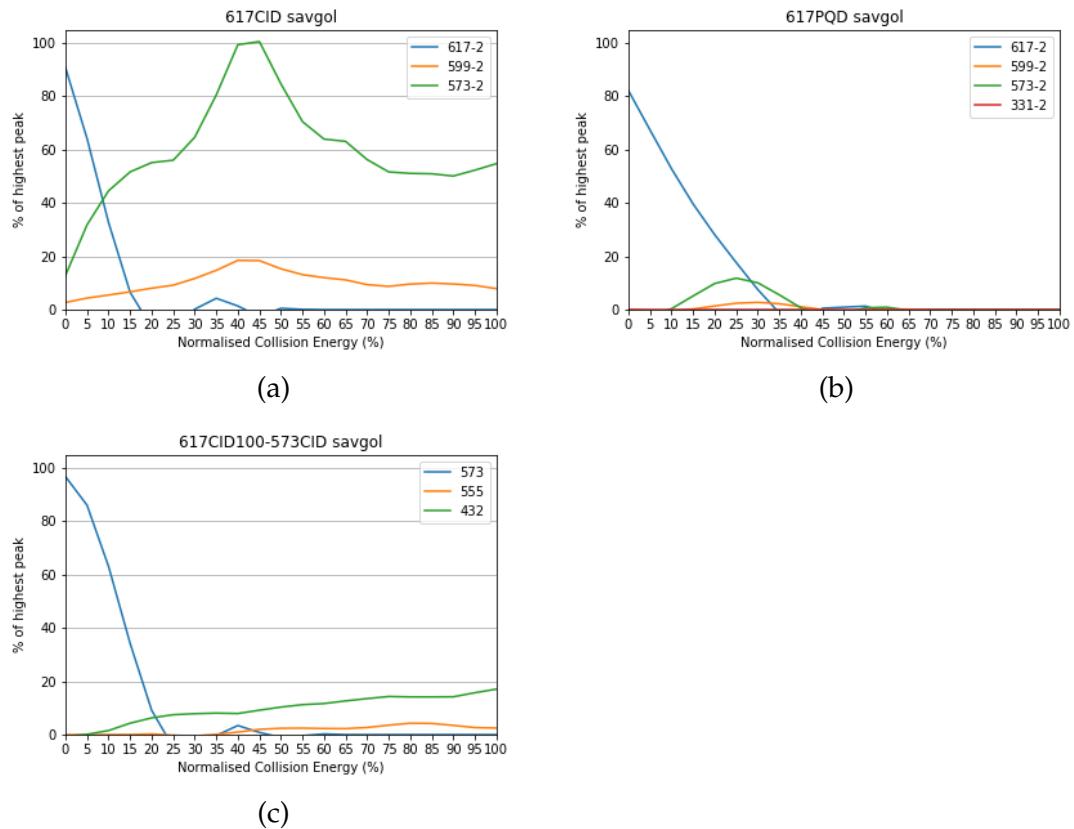


Abbildung B.1: Fragmentierungsdiagramme von Bo-DYCC: (a) $m/z = 617$ $[M+H]^+$ im CID Modus, (b) $m/z = 617$ $[M+H]^+$ im PQD Modus, (c) $(m/z)^2 = 573$ $[M+H]^+$ im CID Modus

Anhang B Fragmentierungsdiagramme der ESI-MS Experimente

B.2 Bo-DNCC

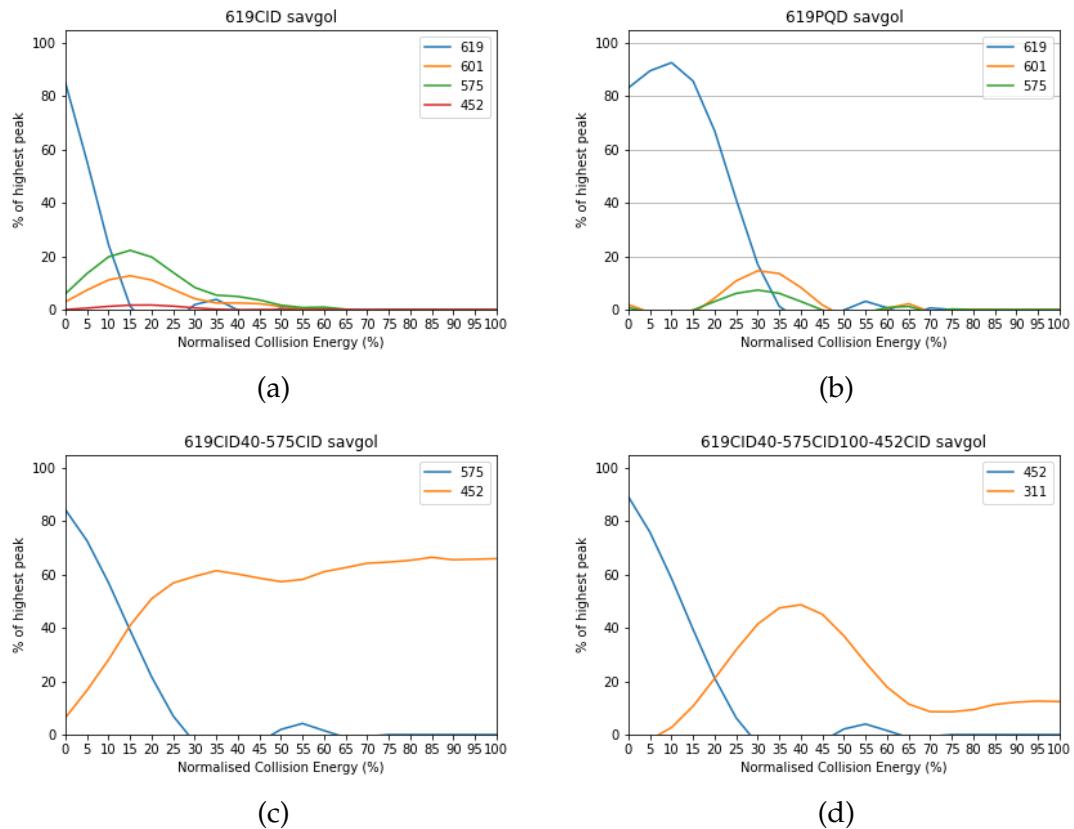


Abbildung B.2: Fragmentierungsdiagramme von Bo-DNCC: (a) $m/z = 619$ $[M+H]^+$ im CID Modus, (b) $m/z = 619$ $[M+H]^+$ im PQD Modus, (c) $(m/z)^2 = 575$ $[M+H]^+$ im CID Modus, (d) $(m/z)^3 = 452$ $[M+H]^+$ im CID Modus

Anhang B Fragmentierungsdiagramme der ESI-MS Experimente

B.3 Bo-NCC-1

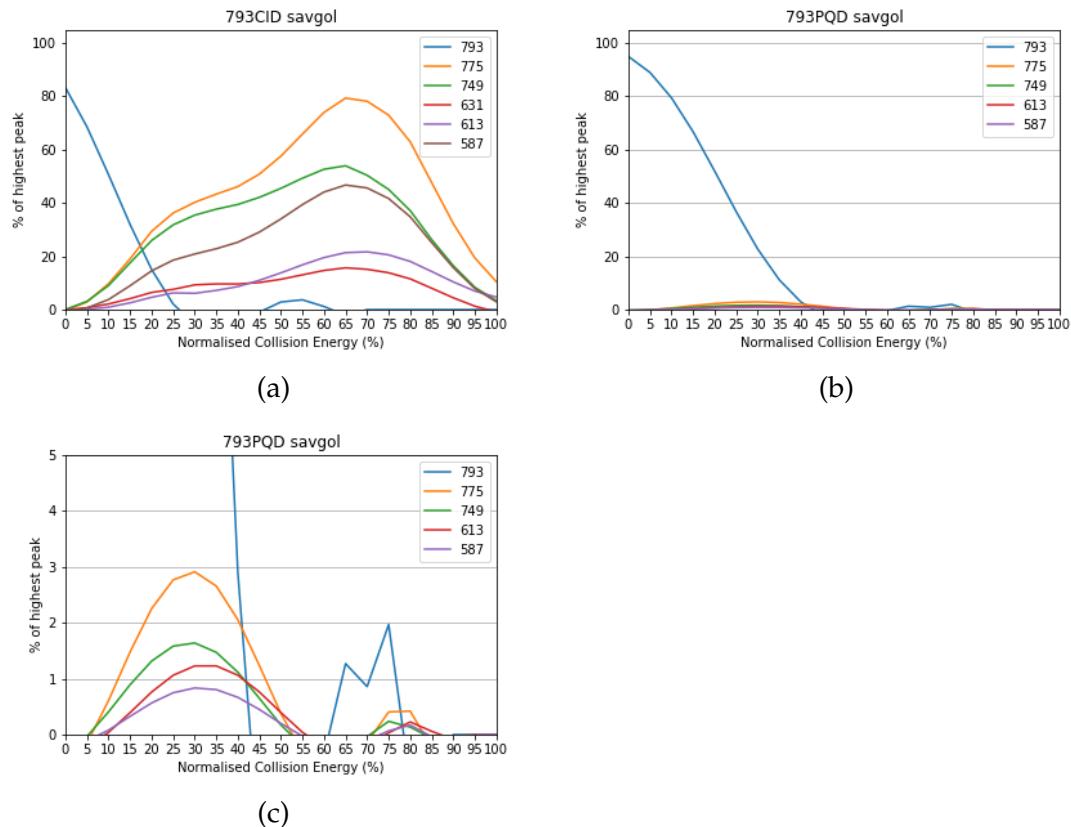


Abbildung B.3: Fragmentierungsdiagramme von Bo-NCC-1: (a) $m/z = 793$ $[M+H]^+$ im CID Modus, (b) $m/z = 793$ $[M+H]^+$ im PQD Modus, (c) Ausschnitt aus Diagramm (b)

Anhang B Fragmentierungsdiagramme der ESI-MS Experimente

B.4 Bo-NCC-3

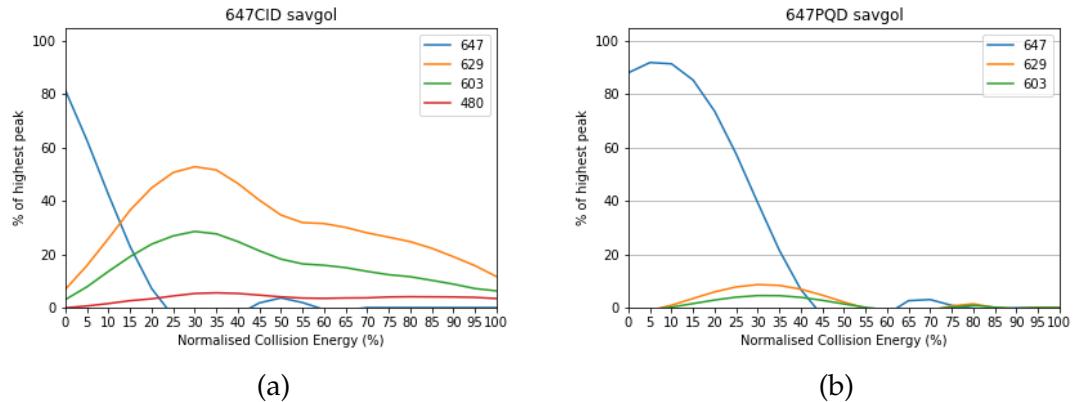


Abbildung B.4: Fragmentierungsdiagramme von Bo-NCC-3: (a) $m/z = 647 [M+H]^+$ im CID Modus, (b) $m/z = 647 [M+H]^+$ im PQD Modus

B.5 Reaktionsprodukt von Bo-DYCC

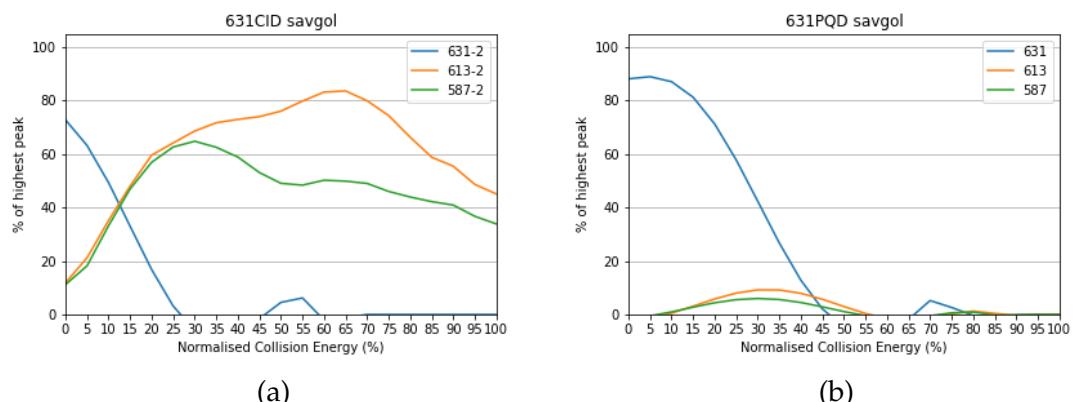


Abbildung B.5: Fragmentierungsdiagramme des Reaktionsproduktes von Bo-DYCC: (a) $m/z = 631 [M+H]^+$ im CID Modus, (b) $m/z = 631 [M+H]^+$ im PQD Modus

Anhang B Fragmentierungsdiagramme der ESI-MS Experimente

B.6 Reaktionsprodukt von Bo-DNCC

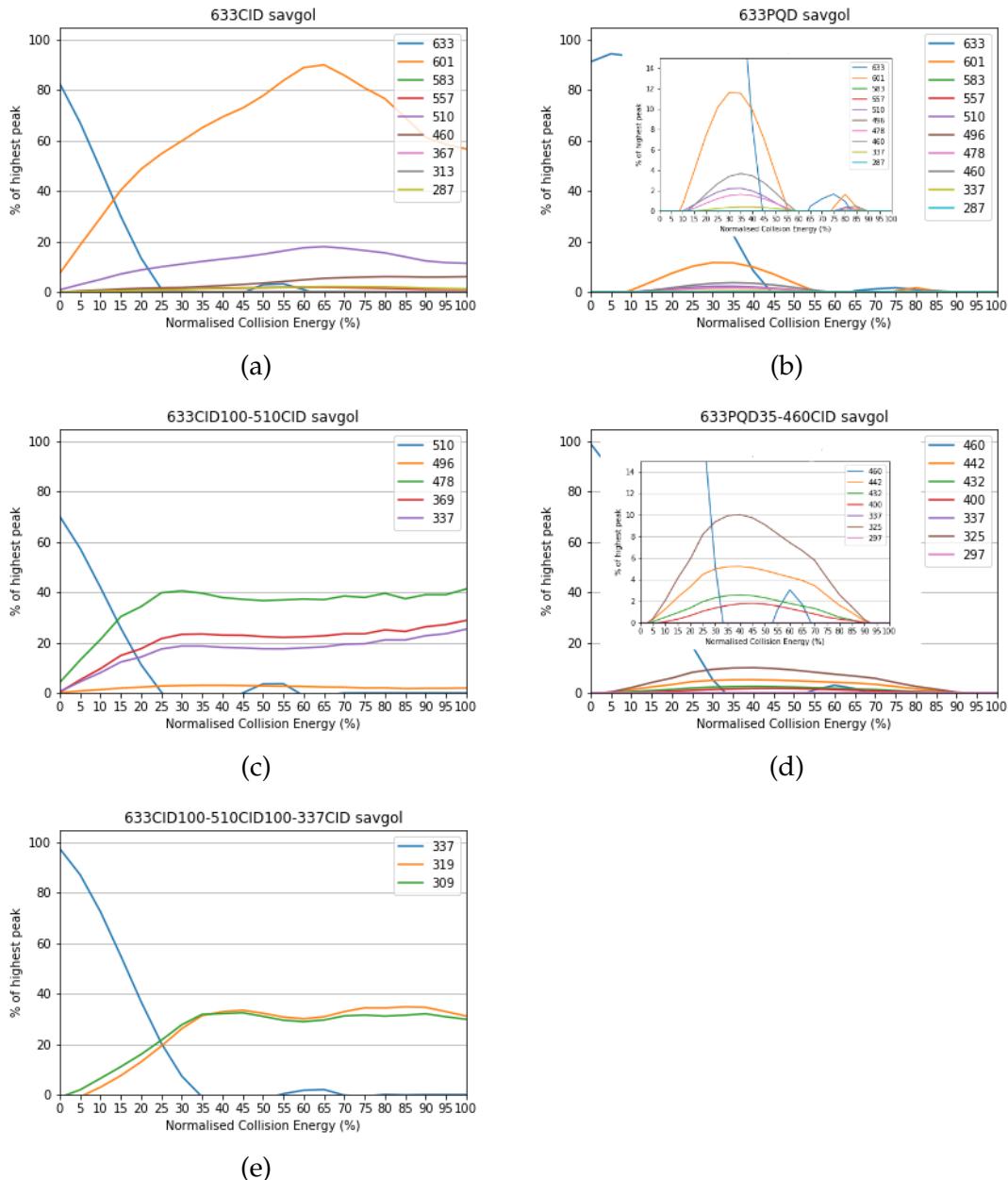


Abbildung B.6: Fragmentierungsdiagramme des Reaktionsproduktes von Bo-DNCC: (a) $m/z = 633 [M+H]^+$ im CID Modus, (b) $m/z = 633 [M+H]^+$ im PQD Modus, (c) $(m/z)^2 = 510 [M+H]^+$ im CID Modus, (d) $(m/z)^2 = 460 [M+H]^+$ im PQD Modus, (e) $(m/z)^3 = 337 [M+H]^+$ im CID Modus

Anhang B Fragmentierungsdiagramme der ESI-MS Experimente

B.7 Reaktionsprodukt von Bo-NCC-3

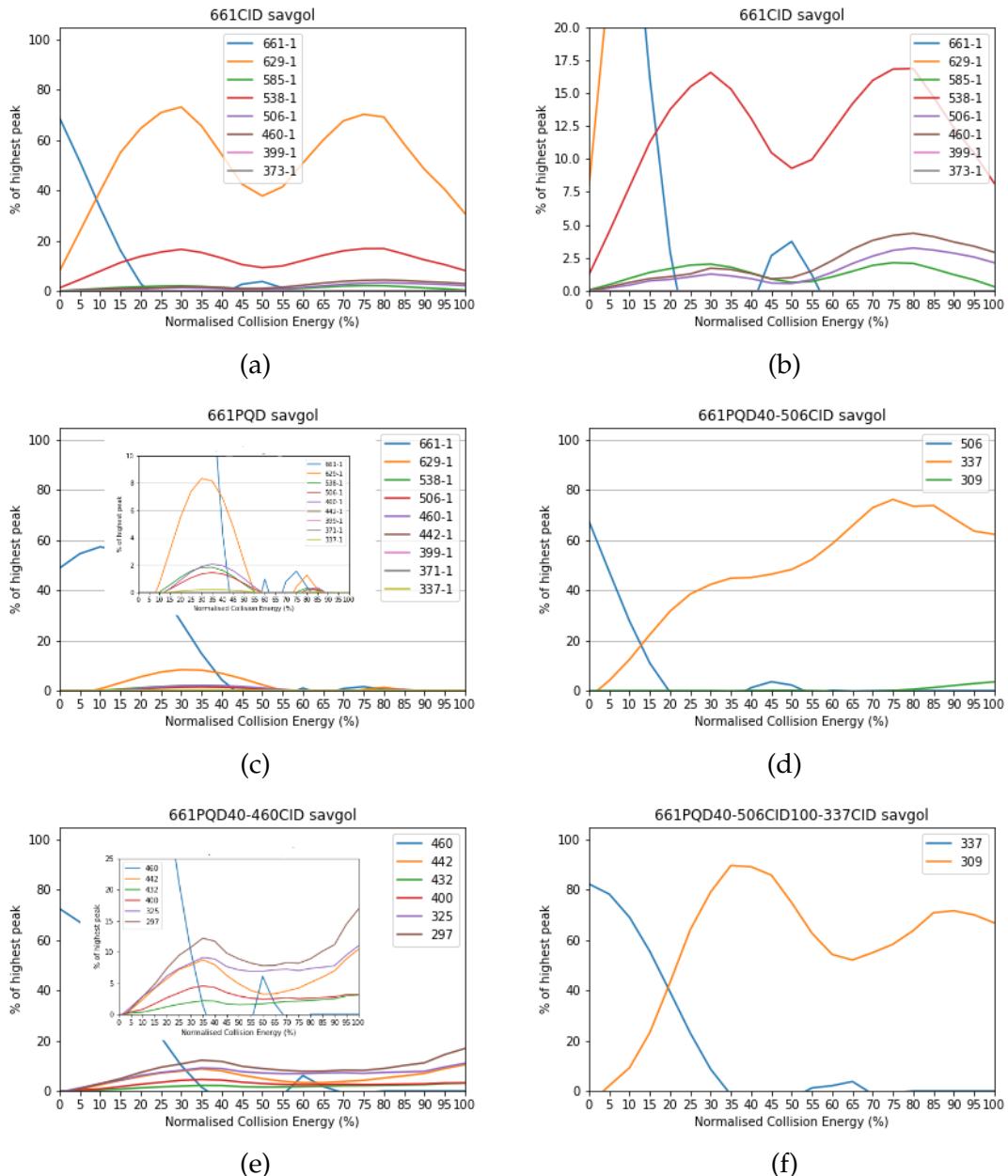


Abbildung B.7: Fragmentierungsdiagramme des Reaktionsproduktes von Bo-NCC-3; (a) $m/z = 661$ $[M+H]^+$ im CID Modus, (b) Ausschnitt aus Diagramm (a), (c) $m/z = 661$ $[M+H]^+$ im PQD Modus, (d) $(m/z)^2 = 506$ $[M+H]^+$ im CID Modus, (e) $(m/z)^2 = 460$ $[M+H]^+$ im CID Modus, (f) $(m/z)^3 = 337$ $[M+H]^+$ 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',
11                  both=False, show=False, ax=None)
```

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 x = np.atleast_1d(x).astype('float64')
88 if x.size < 3:
89     return np.array([], dtype=int)
90 if valley:
91     x = -x
92 # find indices of all peaks
93 dx = x[1:] - x[:-1]
94 # handle NaN's
95 indnan = np.where(np.isnan(x))[0]
96 if indnan.size:
97     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 fig = plt.figure(figsize=(20,10))  
212 ax = plt.axes()  
213  
214 area_617 = 0  
215 area_619 = 0  
216 area_631 = 0  
217 area_63329 = 0  
218 area_645 = 0  
219 area_647 = 0  
220 area_659 = 0  
221 area_661 = 0  
222 area_675 = 0  
223 area_793 = 0  
224 area_795 = 0  
225 area_807 = 0  
226 area_809 = 0  
227 area_821 = 0  
228  
229 height_617 = 0  
230 height_619 = 0  
231 height_631 = 0  
232 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 distance_for_integration = 0.1

244 for h in helpvalue:
245     ys = data[[helpvalue[i]]].values
246     ys = np.hstack(ys)

247     highest_peak.append(ys.max())

248     if (i == 0):
249         print(helpvalue[i])
250         area_617 = trapz(ys, dx=distance_for_integration)
251         height_617 = ys.max()
252     elif (i == 1):
253         print(helpvalue[i])
254         area_619 = trapz(ys, dx=distance_for_integration)
255         height_619 = ys.max()
256     elif (i == 3):
257         print(helpvalue[i])
258         area_631 = trapz(ys, dx=distance_for_integration)
259         height_631 = ys.max()
260     elif (i == 5):
261         print(helpvalue[i])
262         area_6329 = trapz(ys, dx=distance_for_integration)
263         height_6329 = ys.max()
264     elif (i == 6):
265         print(helpvalue[i])
266         area_645 = trapz(ys, dx=distance_for_integration)
267         height_645 = ys.max()
268     elif (i == 7):
269         print(helpvalue[i])
270         area_647 = trapz(ys, dx=distance_for_integration)
271         height_647 = ys.max()
272     elif (i == 10):
273         print(helpvalue[i])
274         area_659 = trapz(ys, dx=distance_for_integration)
275         height_659 = ys.max()
276     elif (i == 11):
277         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=o
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]^{++} (' + str(np.round(xs[x_max_arg], 1)) + ' min.)')
383
384 list_x_values.append(xs[x_max_arg])
385 list_y_values.append(previous_mass)
386 list_catabolite.append(h)
387
388 #u=1
389 #for x in xs[local_maxima]:
390     #ax.annotate(xy=(x, y[np.where(x)]), s = h + r' $[M+H]^{++} - Isomer ' + str(u) + ' (' + str(np.round(x, 1)) + ' min.)')
391
392     #list_x_values.append(x)
393     #list_y_values.append(y[np.where(x)])
394     #list_catabolite.append(h)
395     #list_isomer.append(u)
396
397     #u = u+1
398
399 i = i+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-MS_12min_Spektrum.csv")
411
412 xs = data[['Time']].values
413 xs = np.hstack(xs)
414
415 ys = data[['Intensity']].values
416 ys = np.hstack(ys)
417
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' $[M+H]^+' +$  
426 ('+str(np.round(xs[x_max_arg], 1))+'' min.)')  
427  
428 highest_peak = np.array(ys).max()  
429 y = []  
430 for z in ys:  
431     y.append(((z/highest_peak)*100))  
432 ys = y  
433  
434 line = plt.plot(xs, ys, color = 'black', label = ' ')  
435  
436 highest_peak = np.array(list_y_values).max()  
437 helper = []  
438 for t in list_y_values:  
439     helper.append(((t/highest_peak)*100))  
440 list_y_values = helper  
441  
442 i = 0  
443 for index in list_x_values:  
444     h = list_catabolite[i]  
445     #u = list_isomer[i]  
446     text = h + r' $[M+H]^+' +$ ('+str(np.round(index, 1))+'' min.)'  
447     plt.annotate(  
448         text, xy=(index, 0), xycoords='data',  
449         xytext=(index, list_y_values[i]), textcoords='data',  
450         rotation=0, size=12, horizontalalignment='center',  
451         verticalalignment='bottom',  
452             arrowprops=dict(arrowstyle='-', color="#808080",  
453 linewidth=0.4, shrinkA=0.05, shrinkB=1))  
454     i = i+1  
455  
456 #ax.annotate(xy=(x, y[np.where(x)]), s = h + r' $[M+H]^+$-Isomer '+'  
457 ('+str(np.round(x, 1))+'' min.)')  
458  
459 plt.xlabel('Retention Time (min.)')  
plt.ylabel('Relative abundance')  
plt.xlim(0,65)  
plt.savefig('Kuerbis-Analyse_Ganzes_Spektrum.png')  
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 # Define filetypes and other general stuff:
16
17 filetype = "png"          # "png" or "pdf"
18 """str: Filetype of the outputfile
19
20 Tested with "pdf" and "png"
21 """
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        """Annotate the distance between two peaks
135
136        Annotate the distance between two given peaks. The text can be
137        placed with a
138        given angle.

```

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
143     delta_point_annotate_line_pixel = 1
144
145     if raw_values is not None:
146         if __get_max_peak(x1, raw_values) < (y_pos -
147             delta_point_annotate_line_pixel):
148             plt.annotate(
149                 '', xy=(x1, __get_max_peak(x1, raw_values) +
150             delta_point_annotate_line_pixel), xycoords='data',
151                 xytext=(x1, y_pos), textcoords='data',
152                 arrowprops=dict(arrowstyle='-', color="#808080",
153             linewidth=0.4, shrinkA=0.05, shrinkB=0.05))
154
155         if __get_max_peak(x2, raw_values) < (y_pos -
156             delta_point_annotate_line_pixel):
157             plt.annotate(
158                 '', xy=(x2, __get_max_peak(x2, raw_values) +
159             delta_point_annotate_line_pixel), xycoords='data',
160                 xytext=(x2, y_pos), textcoords='data',
161                 arrowprops=dict(arrowstyle='-', color="#808080",
162             linewidth=0.4, shrinkA=0.05, shrinkB=0.05))
163
164     plt.annotate(
165         '', xy=(x1, y_pos), xycoords='data',
166         xytext=(x2, y_pos), textcoords='data',
167         arrowprops=dict(arrowstyle='<|-', head_length=0.4, head_width
168 =0.1,
169             color="black", linewidth=0.6, shrinkA=0.05,
170             shrinkB=0.05))
171     plt.annotate(
172         text, xy=((x1 if x1 <= x2 else x2) + mt.fabs((x1 - x2)) / 2,
173         y_pos), xycoords='data',
174         rotation=rotate_text, size=8,
175         horizontalalignment='center', verticalalignment='bottom',
176         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