

Direkte Analyse von Chlorophyllkataboliten

Vorwissenschaftliche Arbeit verfasst von

Florian Kluibenschedl

Klasse 8a



Betreuer: Mag. Mathias Scherl

BRG Telfs
Weißenbachgasse 37
6410 Telfs

Telfs, Februar 2018

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

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

Abstract

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

Vorwort und Danksagung

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

Inhaltsverzeichnis

Abstract

Vorwort und Danksagung

Allgemeiner Teil	1
1 Themenstellung	2
2 Das Chlorophyll und sein Abbauprozess	4
3 Methoden	6
3.1 HPLC	6
3.2 Massenspektrometrie	7
3.2.1 LC-MS	8
3.2.2 MS Leafspray	8
Experimenteller Teil	10
4 Allgemeine Arbeits- und Analysemethoden	11
4.1 Herstellung von Lösungen für eine Analyse mit HPLC	11
4.2 Chemikalien und Material	11
4.3 Probenmaterial	11
4.4 Reaktion mit Essigsäureanhydrid	11
4.5 Erstellen von Fragmentierungsdiagrammen	12
5 Experimente MS-Leafspray	14
5.1 Gerätebeschreibung Massenspektrometer	14
5.2 Versuchsaufbau	14
5.3 Versuchsdurchführung	15

Inhaltsverzeichnis

5.4	Chlorophyllkataboliten des Brokkoliblattes mithilfe von MS-Leafspray identifiziert	17
5.4.1	Bo-NCC-1	17
5.4.2	Bo-NCC-3	19
5.4.3	Bo-DNCC	21
5.5	Identifikation der Reaktionsprodukte	24
5.5.1	Reaktionsprodukt von Bo-DNCC	24
5.5.2	Reaktionsprodukt von Bo-NCC-3	27
5.5.3	Reaktionsprodukt von Bo-NCC-1	29
6	Experimente LC-MS	32
6.1	HPLC-Gradient sowie Gerätebeschreibung	32
6.2	Aufarbeitung der Probe	32
6.3	Identifikation von Chl-Kataboliten mithilfe von Online-UV/Vis-Spektren	33
6.4	Identifikation von Chl-Kataboliten mithilfe von MS	33
6.5	Chlorophyllkataboliten des Brokkoliblattes mithilfe von LC-MS identifiziert	34
6.6	Identifikation der Reaktionsprodukte mithilfe von LC-MS	39
Ergebnisse und Diskussion	45	
Verweise	46	
Literaturverzeichnis	47	
Abbildungsverzeichnis	49	
Abkürzungsverzeichnis	51	
Anhang	52	

Allgemeiner Teil

1 Themenstellung

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

Eine direkte Analyse von Chl-Kataboliten umgeht die aufwendige Herstellung eines Blattextraktes, das für eine Analyse mit einer High performance liquid chromatography (HPLC) sowie durch Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS) benötigt wird und erlaubt es, Chl-Kataboliten ohne vorherige spezielle Aufarbeitung mithilfe eines Massenspektrometers *direkt* zu analysieren. [1] Für die Durchführung einer solchen direkten Analyse wurde die Methode des MS-Leafspray [2] verwendet (siehe 3.2.2 MS Leafspray).

Es sollte dabei untersucht werden, inwieweit eine direkte Analyse mittels MS Leafspray eine strukturelle Aufklärung von Chl-Kataboliten ermöglicht, sowie, ob das Stattfinden einer Reaktion von Essigsäureanhydrid mit den Chl-Kataboliten festgestellt werden kann. Die Reaktion selbst sollte Aufschluss über die Reaktivitäten unterschiedlicher Carbonsäuren der Chl-Kataboliten und deren struktureller Besonderheiten geben.

Um die Ergebnisse zu überprüfen wurden eine HPLC sowie ein hochauflösendes Massenspektrometer verwendet. Eine Analyse mit diesen Methoden setzt die Herstellung eines Blattextraktes voraus und fällt deswegen nicht mehr unter die direkte Analyse. Es wird damit ein Vergleich dieser beiden Methoden angestrebt.

Was den Vergleich der beiden massenspektrometrischen Methoden anbetrifft wurden sowohl beim hochauflösenden Massenspektrometer als auch mit MS-Leafspray Fragmentierungsdiagramme der Kataboliten im Collision induced Dissociation (CID) Modus erzeugt, mit dem Ziel, eventuelle charakteristische

1 Themenstellung

Eigenschaften herauszufinden und zu vergleichen, inwieweit Fragmentierungen sowie Fragmentierungsdiagramme des hochauflösenden Massenspektrometers mit MS-Leafspray reproduzierbar sind. Mit den Fragmentierungsdiagrammen wird zudem versucht, eine zukünftig bessere Strukturaufklärung zu ermöglichen.

2 Das Chlorophyll und sein Abbauprozess

Jedes Jahr gehen weltweit schätzungsweise 10^9 Tonnen an Chlorophyll scheinbar *verloren*. Der Abbauprozess des Chlorophylls ist damit ob der markanten Farbveränderungen einer der visuell am meisten wahrgenommenen biochemischen Vorgänge und kann sogar aus dem All beobachtet werden [3]. Die schönen, bunten Farben des Laubs werden dabei jedoch nicht durch die Abbauprodukte des Chlorophylls (im Folgenden Chlorophyllkataboliten) hervorgerufen [4], da die Endprodukte des Chlorophyllabbaus farblos sind [3]. Im Folgenden ist immer die Rede vom Abbauprozess in höheren Pflanzen, da gezeigt wurde, dass zum Beispiel (z.B.) marine Lebensformen das Chlorophyll auf einem anderen Wege abbauen und auch dementsprechend andere Endprodukte vorzufinden sind. [3], [5], [6] Die Abbauprodukte fallen in die Kategorie der Phyllobiline und sind Anzeichen für Reifung, Seneszenz und den Zelltod. Der Abbauprozess wird im Rahmen eines Entgiftungsprozesses begangen. [7]

Die Struktur eines Chlorophyllkataboliten konnte erstmalig im Jahre 1991 aufgeklärt werden. Es handelte sich hierbei um einen Hv-Non fluorescent Chlorophylllic Catabolite (NCC) der Gerste (*Hordeum vulgare*) [5], das Endprodukt eines mehrstufigen Abbauprozesses.

2 Das Chlorophyll und sein Abbauprozess

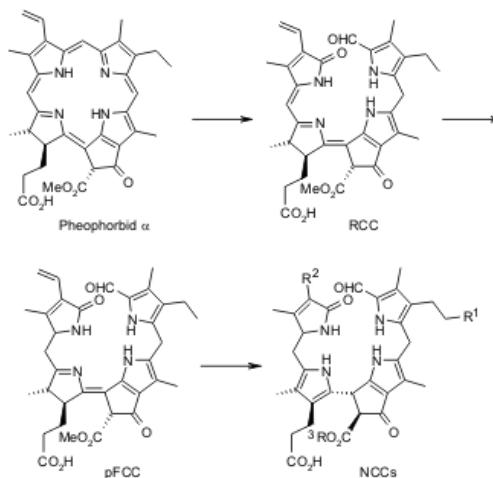


Abbildung 2.1: Der Abbauprozess des Chlorophylls in seneszenten Blättern

In den folgenden Jahren fand man heraus, dass das Chlorophyll zuerst in das Pheophorbid a umgewandelt wird. Im nächsten Schritt wird der Makrozyklus oxygenolytisch (an der Reaktion beteiligtes Enzym: Pheo α Mono-oxygenase [8]) 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. [9], [10] Die unterschiedlichen Arten von NCCs ergeben sich durch Anlagerung der entsprechenden funktionellen Gruppen (z.B. Zuckerring, Hydroxylgruppen, ...) an den pFCC. [10] In Abbildung 2.1 sind die Positionen, an denen diese strukturellen Unterschiede auftreten können gekennzeichnet durch R¹, R², R³.

3 Methoden

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

3.1 HPLC

Die *HPLC* ist eine chromatographische Methode, um lösliche Stoffe präparativ zu trennen. Es sind dabei quantitative als auch qualitative Analysen möglich. [11, S. 165]

Das Trennen der Stoffe basiert auf ihren unterschiedlichen chemischen Eigenschaften. Die Stoffe werden gelöst und bilden zusammen mit dem Lösungsmittel (LM) die mobile Phase, die an der stationären Phase vorbeiströmt, wobei es dabei zu Wechselwirkungen zwischen den gelösten Stoffen mit der stationären Phase kommt. Aufgrund der unterschiedlichen chemischen Eigenschaften und den daraus resultierenden unterschiedlichen Wechselwirkungen hält sich jeder Stoff verschieden lange in der stationären Phase auf. Die Verweildauer eines Stoffes in der Trennsäule wird als Retentionszeit bezeichnet. [11, 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. [11, 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, unpolaren Kohlenwasserstoffketten). [11, S. 189]

Im Rahmen meiner Vorwissenschaftlichen Arbeit wurde die HPLC verwendet, um die Stoffe im Blatt zu trennen und entsprechende Chlorophyllkataboliten zu extrahieren. Das Identifizieren der Kataboliten erfolgte dabei durch einen

3 Methoden

UV/VIS Detektor (nahm UV/VIS Spektren im Wellenlängenbereich von 200nm-800nm auf) sowie durch ein dazu geschaltetes Massenspektrometer (=LC-MS). Um die Chl-Katabolit mit einem hochauflösenden Massenspektrometer zu fragmentieren, wurde der Stoff zu jenen Zeiten, zu denen er in der HPLC eluiert in Eppendorf Reaktionsgefäßten gesammelt.

Die Herstellung eines Blattextraktes für die Analyse mit der HPLC herzustellen wird in Kapitel ?? beschrieben.

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,...). [12, S. 1] Der jetzige Entwicklungsstand in der Massenspektrometrie ist vor allem den Entwicklungen in den letzten vier Jahrzehnten auf diesem Gebiet zu verdanken. [12, S. 6-9]

Um die Molekülmasse der Stoffe zu bestimmen, werden sie zuerst in Gasphasen-Ionen überführt. [12, S. 15] Dabei gibt es unterschiedliche Methoden, diesen Zustand herbeizuführen, wie z.B. Electron Ionization (EI), Chemical Ionization (CI) und Field Ionization (FI). [12, S. 15-30] Nach der Ionisation können die Stoffe detektiert werden. Das Ergebnis wird in einem Massenspektrum festgehalten, in dem auf der Ordinate die relative Intensität der einzelnen Peaks und auf der Abszisse das Verhältnis Masse pro Ladung (m/z) aufgetragen werden, da der Detektor technisch gesehen nicht die Molekülmasse misst, sondern nur obiges Verhältnis.

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

3 Methoden

(N₂)) beziehungsweise (bzw.) eine erhitzte Kapillare, um das LM zu entfernen. [12, S. 43-44]

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

3.2.1 LC-MS

Bei der Methode der LC-MS wird eine HPLC vor ein Massenspektrometer geschaltet. Dabei trennt die HPLC die Stoffe zuvor auf und eluiert sie anschließend in das Massenspektrometer. [12, S. 217-218] Das Resultat ist je ein Chromatogramm der HPLC und des Massenspektrometers. Es wird somit zu jedem Zeitpunkt eines HPLC-Laufes ein UV/VIS sowie ein Massenspektrum erzeugt. Aus dem UV/VIS Diagramm lässt sich schließen, ob es sich bei einem Kataboliten um einen NCC, Decarboxylated-Non fluorescent Chlorophyllic Catabolite (DNCC) oder einen Fluorescent Chlorophyllic Catabolite (YCC) handelt. Aus dem Massenspektrum wird die Molekülmasse [M+H]⁺ (in Da) ersichtlich. Unter Verwendung eines hochauflösenden Massenspektrometers wird außerdem die atomare Zusammensetzung ersichtlich.

Um die Flussrate bei atmosphärischem Druck zu verringern, wird nur ein Teil des direkt aus der HPLC kommenden Fluxes zum Massenspektrometer hin abgezweigt. Ansonsten wäre die Flussrate zu hoch, was eine Ionisierung der Probe mithilfe einer ESI-Quelle unmöglich machen würde. [12, S. 221]

3.2.2 MS Leafspray

Ambient Ionization [13] ermöglicht es, Proben ohne vorherige präparative Trennung durch chromatographische Trennverfahren direkt in ihrer *natürlichen* Umgebung mithilfe eines Massenspektrometers zu untersuchen. Eine Methode, die auf dem Prinzip der *Ambient Ionization* basiert ist *Paper Spray* [14]. Dabei kommt es zu einer Kombination der ESI sowie der *Ambient Ionisationsmethode* [14].

Die Ionisation der Probe erfolgt ausgehend von einem feuchten, porösen Material (z.B. Papier), das zwischen eine Kupferklemme geklemmt wird. Zwischen der Kapillaröffnung des Massenspektrometers und der Kupferklemme liegt

3 Methoden

eine Spannung im Bereich von 3-6kV an, woraufhin kleine Tröpfchen, die Ionen der Probe enthalten von der Spitze des porösen Materials ausgesendet werden und Ionen der Probe in das Massenspektrometer befördern. [15] Durch Anlegen von Kalibrationskurven mit externen Standards wird außerdem ermöglicht, eine quantitative Bestimmung der Menge des Analyten durchzuführen. [2]

Leaf Spray ist eine Form von Paper Spray, bei der die zu analysierende Pflanze selbst als poröses Material dient und wurde im Rahmen dieser Arbeit für die Identifikation von Chl-Katabolit verwendet. Genauere Ausführungen finden sich in Kapitel 3.2.2.

Experimenteller Teil

4 Allgemeine Arbeits- und Analysemethoden

4.1 Herstellung von Lösungen für eine Analyse mit HPLC

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

4.2 Chemikalien und Material

4.3 Probenmaterial

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

4.4 Reaktion mit Essigsäureanhydrid

Im Rahmen der direkten Analyse der Chl-Katabolit wurden diese einer Reaktion mit Essigsäureanhydrid unterzogen. Die Reaktion wurde dabei direkt am Blatt durchgeführt. Dazu wurden in einem Exikator getrocknete Blätter auf

4 Allgemeine Arbeits- und Analysemethoden

eine Fläche von circa (ca.) 2cm^2 (entspricht einer ungefähren Blattmasse von 0.01g) zugeschnitten und anschließend mit $300\mu\text{L}$ Essigsäureanhydrid beidseitig benetzt. Die $300\mu\text{L}$ ergaben sich, da das Blatt nicht in der Reagenz schwimmen sollte, da sonst Teile des Blattes aus diesem herausgelöst werden, was zu einer Verringerung der Intensitäten in HPLC und MS-Leafspray führt.

Die Reaktion wurde durch eine Vakuumpumpe mit zwischengeschalteten Kühlfallen gestoppt (Verweildauer in der Vakuumpumpe betrug ca 5min). Dabei wurde die Reagenz abgesaugt.

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

4.5 Erstellen von Fragmentierungsdiagrammen

Zu jedem Chl-Katabolit wurde ein Fragmentierungsdiagramm erstellt. Dazu werden die Intensitäten der einzelnen beobachteten Fragmentierungen im Massenspektrometer zur jeweiligen aufgewendeten, normalisierten Kollisionsenergie (in %) (NKE) (alle fünf Einheitsschritte) aufgenommen.

Auf der Abszisse des erhaltenen Diagramms befindet sich die NKE und auf der Ordinate die Intensität der jeweiligen Fragmentierung bezogen auf den höchsten Peak, der während der Aufnahme beobachtet wurde (ebenfalls in Prozent).

Die erhaltenen Kurven wurden mit einem Savitzky-Golay Filter geglättet (siehe 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 normalisierten Kollisionsenergie von null nicht gleich null sind. Es wird im folgenden angenommen, dass dies dennoch so ist.

Aufgenommen wurden die Fragmentierungsdiagramme im CID und im PQD (PQD) Modus.

Es wird damit versucht, herauszufinden, ob bestimmte Abspaltungen der Kataboliten charakteristische Muster aufweisen, um in weiterer Hinsicht weitere

4 Allgemeine Arbeits- und Analysemethoden

strukturelle Eigenschaften über die Kataboliten mithilfe eines Massenspektrometers zu erfahren. Weiters wird ein Vergleich zwischen den Fragmentierungsdiagrammen von MS Leafspray und des hochauflösenden Massenspektrometers versucht. Für diesen Vergleich wurden nur die Diagramme verwendet, die im CID Modus aufgenommen wurden, da das verwendete Massenspektrometer von MS-Leafspray nur in diesem Modus operieren konnte.

5 Experimente MS-Leafspray

5.1 Gerätebeschreibung Massenspektrometer

(Beschreibung Massenspektrometer)

5.2 Versuchsaufbau

Abbildung 5.1 beschreibt schematisch den Versuchsaufbau.

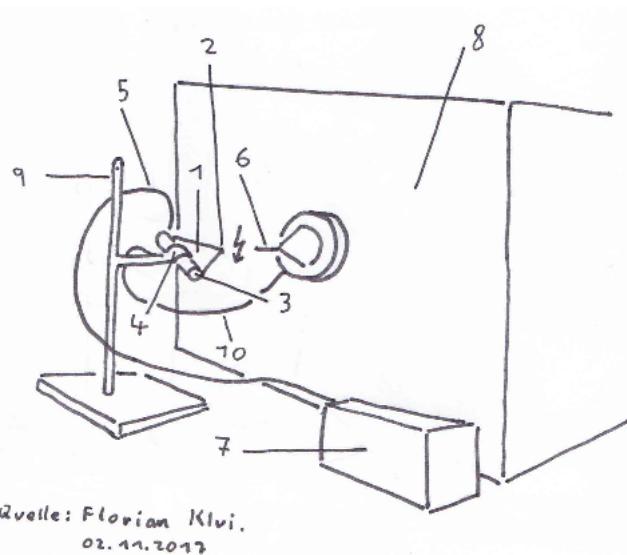


Abbildung 5.1: Leafspray Versuchsaufbau: 1) Filterpapierdreick, 2) Spitze des Dreiecks, 3) Blattmaterial, von Filterpapier umschlossen, 4) Kupferklemme, 5) Kapillare für LM, 6) Einlass des Massenspektrometers (mit der markanten Spitze zwecks Verdeutlichung etwas übertrieben dargestellt), 7) Syringe Pump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

5 Experimente MS-Leafspray

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

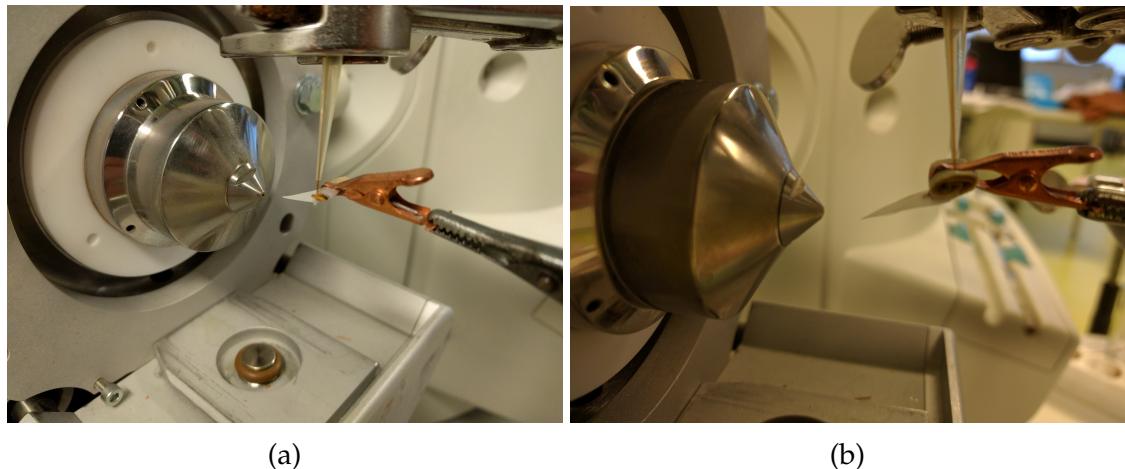


Abbildung 5.2: (a) Einlass des Massenspektrometers mit Kapillare, Kupferklemme und Filterpapier mit Blattmaterial, (b) Detailansicht

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

5.3 Versuchsdurchführung

Frische, senescente Brokkoliblätter und Filterpapier wurden mit Rasierklinge und Schere wie in Abbildung 5.3a ersichtlich zugeschnitten. Anschließend

5 Experimente MS-Leafspray

wurde das Brokkoliblatt auf das Filterpapier gelegt und dieses bis zur Basis des Dreiecks eingerollt.

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

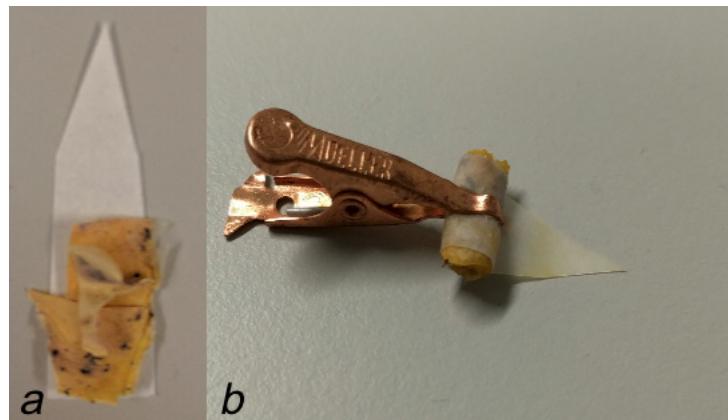


Abbildung 5.3: Leaf spray Blattvorbereitung: (a) zugeschnittenes Filterpapierdreieck, mit frischen, seneszenten Brokkoliblättern, (b) eingerolltes *Päckchen*, in Kupferklemme eingespannt

Das erhaltene *Päckchen* wurde durch eine Kupferklemme (Abbildung 5.3b) ca. 0.5cm vor die Kapillare des Massenspektrometers gehalten (Abbildung 5.2b). Um ein konstantes Signal zu erhalten versorgte eine Kapillare, die wie in Abbildung 5.2a befestigt war, das *Päckchen* mit einem konstanten LM-Fluss (als LM wurden Methanol (MeOH) sowie Acetonitril verwendet). Die Flussrate des LM betrug zu Beginn $12\mu\text{L min}^{-1}$, um das Blatt schneller zu befeuchten und wurde ab dem Erhalt des ersten Signals auf $5\mu\text{L min}^{-1}$ zurückgefahren. Es zeigte sich, dass bei dieser Flussrate das Signal bei annähernd gleichbleibend hoher Intensität am längsten bleibt. Der Spraystrom betrug zwischen xx und xx μA . Diese Geräteeinstellungen sowie Aufarbeitungsmethoden ermöglichen das Messen der Fragmentierungsdiagramme, da hierfür eine längere Analysezeit vonnöten ist. Das erste Signal konnte nach ca. einer Minute nach dem Einschalten der Spannung gemessen werden und erlaubte Messungen bis zu 25min.

5 Experimente MS-Leafspray

(Platz für Beschreibung der Einstellungen des Gerätes)

Aufgenommen wurden die Massenspektrum 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 gewechselt wurde, wenn die Intensität des Signals im positiven Ionenmodus abnahm. Das Wechseln des Modus konnte die gewünschte Intensität wieder erhöhen. Es wurde somit ein ähnliches Verhalten der Intensitäten im Zeitverlauf beobachtet wie in [15] 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 Chlorophyllkataboliten des Brokkoliblattes mithilfe von MS-Leafspray identifiziert

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

Fragmentierungsdiagramme wurden wie in Kapitel 4.5 beschrieben erstellt.

5.4.1 Bo-NCC-1

Beim Bo-NCC-1 handelt es sich um einen strukturidenten Kataboliten, wie er auch in der Brokkolifrucht gefunden wurde. [16] Gefunden wurde die protonierte Verbindung bei m/z = 793 [M+H]⁺ und das Kaliumsalz bei m/z = 831 [M+K]⁺ (Massenspektrum Abbildung 5.4). Aufgrund der geringen Intensitäten der protonierten Verbindung war es nicht möglich, ein verwertbares Massenspektrum dieser aufzunehmen.

Der Katabolit bei m/z = 831 [M+K]⁺ zeigt Abspaltungen von H₂O bei m/z = 813 [M - H₂O + K]⁺, von CO₂ bei m/z = 787 [M - CO₂ + K]⁺ und eine Folge von Abspaltungen bei m/z = 311 [M - (Ring A, Ring D, Zucker, CO₂) + K]⁺, bei der Ring A mit einem Zucker, Ring D sowie CO₂ abgespalten wird (siehe Kapitel,

5 Experimente MS-Leafspray

Katabolit 619, hochauflösende Massenspektrometrie). Die Abspaltungen bei $m/z = 798$ [$M - (\text{noch Aufklärungsbedarf (nAb.)}) + K]^+$, $m/z = 586$ [$M - (\text{nAb.}) + K]^+$ und $m/z = 551$ [$M - (\text{nAb.}) + K]^+$ können nicht eindeutig zugeordnet werden, da hierzu weitere experimentelle Daten vonnöten sind.

Das Fragment bei $m/z = 798$ [$M - (\text{MeOH?}) + K]^+$ ist insofern interessant, da es sich hierbei um eine Abspaltung von MeOH (-32 Da) handeln könnte (es wird angenommen, dass die Abweichung um eins durch Ungenauigkeiten des Massenspektrometers zustandekommt), was aber nicht mit der Struktur des Bo-NCC-1 (siehe Abbildung 5.5a) vereinbar ist. Aufgrunde ihrer Ungeklärtheit wird auf diese Abspaltung in den weiteren Ausführungen nicht näher eingegangen.

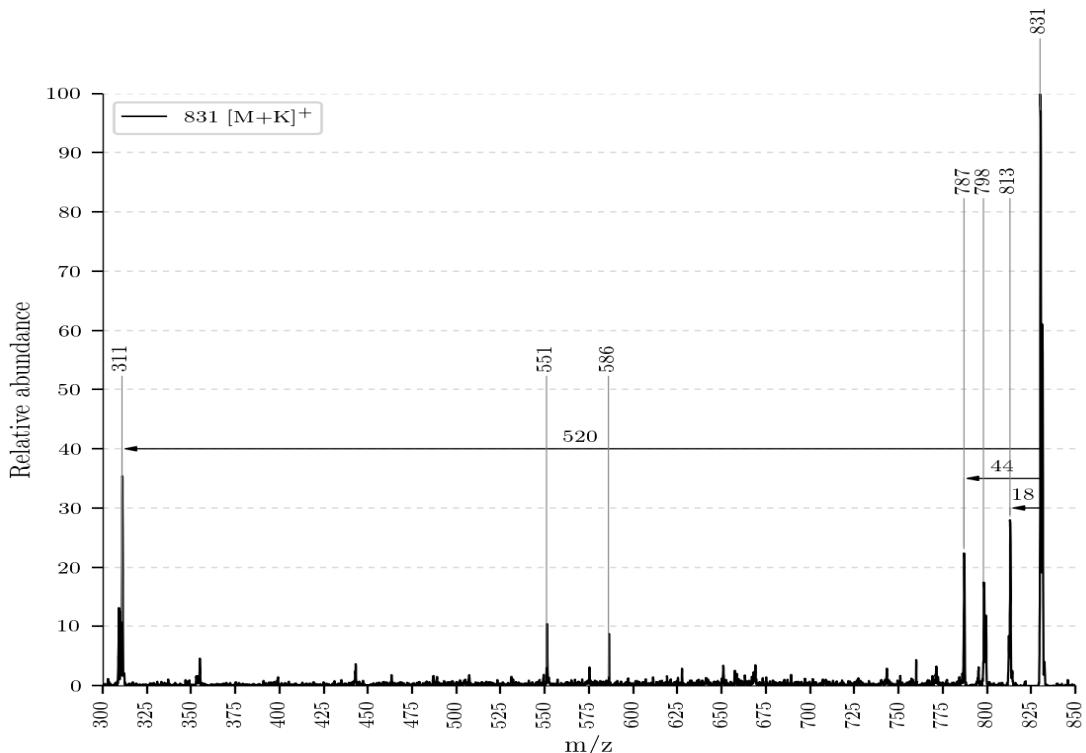


Abbildung 5.4: ESI-MS von Bo-NCC-1 mit $m/z = 831$ [M+K]⁺ und den Abspaltungen

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

5 Experimente MS-Leafspray

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

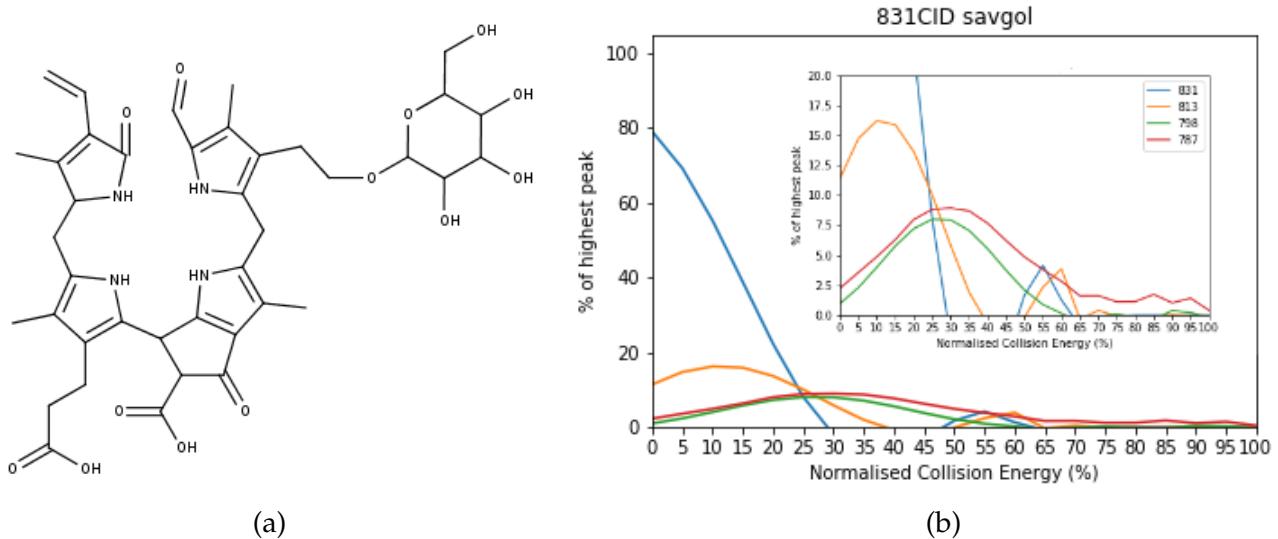


Abbildung 5.5: (a) Strukturvorschlag des Bo-NCC-1 mit Summenformel $C_{40}\text{H}_{48}\text{N}_4\text{O}_{13}$, (b) Fragmentierungsdiagramm von Bo-NCC-1 (blau = 831 [$\text{M} + \text{K}]^+$, orange = 813 [$\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{K}]^+$, grün = 798 [$\text{M} - (\text{MeOH} - \text{nAb.})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

5.4.2 Bo-NCC-3

Beim Bo-NCC-3 handelt es sich um einen Kataboliten, der nicht in der Brokkolifrukt identifiziert wurde, weswegen er als dritter, in der Brokkolipflanze gefundener Katabolit den Index 3 erhält. [16] Analysiert wurde das Kaliumsalz mit $m/z = 685$ [$\text{M} + \text{K}]^+$.

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 Abspaltungen bei $m/z = 429$ [$\text{M} - (\text{nAb.}) + \text{K}]^+$, $m/z = 561$ [$\text{M} - (\text{nAb.}) + \text{K}]^+$, $m/z = 605$ [$\text{M} - (\text{nAb.}) + \text{K}]^+$ und $m/z = 652$ [$\text{M} - (\text{nAb.}) + \text{K}]^+$ ist nicht eindeutig geklärt, welche Fragmente hierbei entstanden sind. Für das Fragment bei $m/z = 652$ [$\text{M} - (\text{MeOH?}) + \text{K}]^+$ gilt das gleiche wie bei der

5 Experimente MS-Leafspray

Abspaltung von $m/z = 798 [M - (\text{MeOH?}) + \text{K}]^+$ von Bo-NCC-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 identifiziert werden.

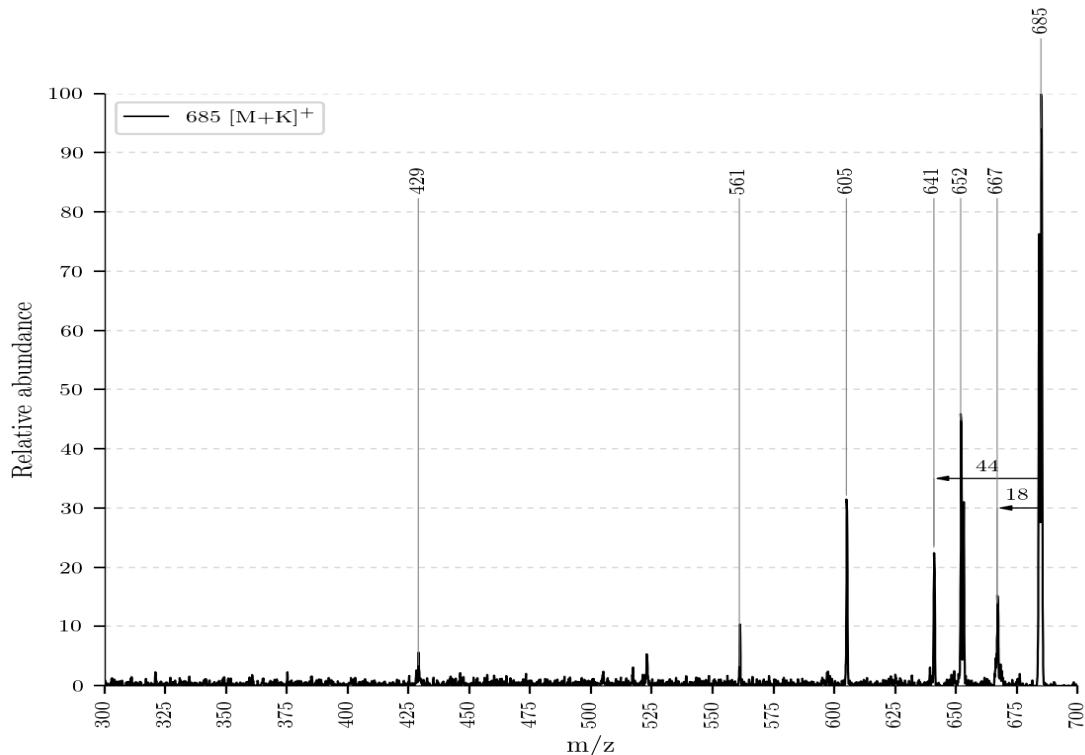


Abbildung 5.6: ESI-MS von Bo-NCC-3 mit $m/z = 685 [\text{M}+\text{K}]^+$ und den Abspaltungen

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 (NKE von 15 im Vergleich zu 20 von CO_2).

Im Vergleich zum Bo-NCC-1 hat 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 (Abbildungen 5.5b und 5.7b). Die potentiellen Abspaltungen von MeOH bei $m/z = 652 [\text{M} - (\text{MeOH?}) + \text{K}]^+$ und jene bei $m/z = 605 [\text{M} - (\text{nAb.}) + \text{K}]^+$ werden nicht in diese Betrachtungen mit aufgenommen, da ihre Sinnhaftigkeit nicht geklärt ist. Das lokale Maximum der potentiellen Abspaltung von MeOH würde

5 Experimente MS-Leafspray

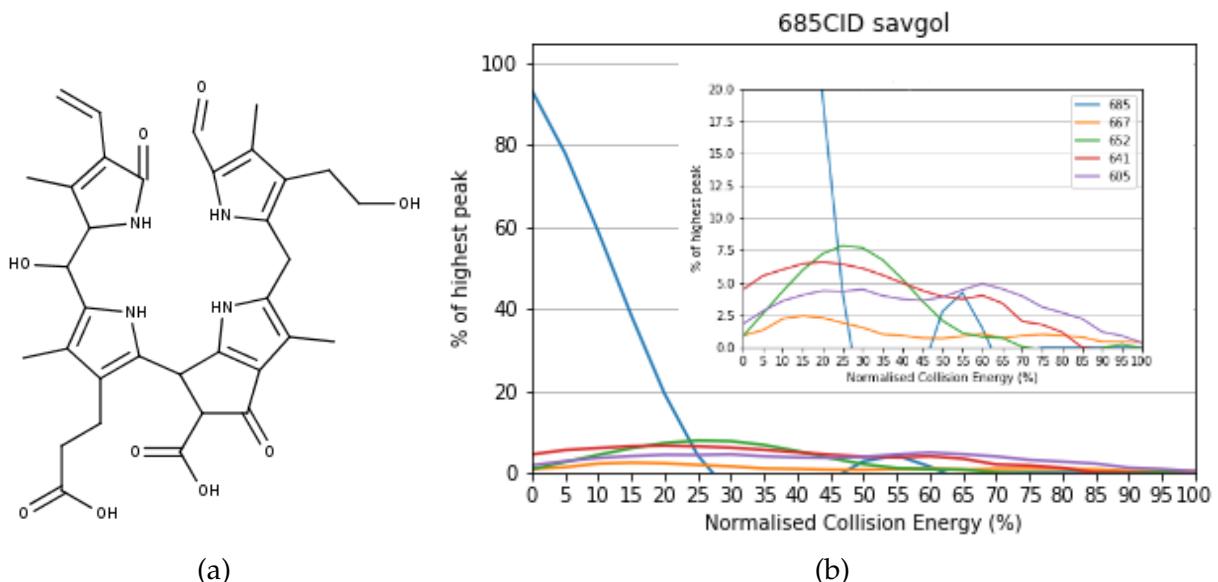


Abbildung 5.7: (a) Strukturvorschlag von Bo-NCC-3 mit Summenformel $C_{34}H_{38}N_4O_9$, (b) Fragmentierungsdiagramm von Bo-NCC-3 (blau = $685 [M+K]^+$, orange = $667 [M - H_2O + K]^+$, grün = $652 [M - (MeOH?)] + K^+$, rot = $641 [M - CO_2 + K]^+$, violett = $605 [M - (nAb.) + K]^+$)

sich von 25 NKE beim Bo-NCC-1 auf 30 NKE beim Bo-NCC-3 verschieben (Abbildungen 5.5b und 5.7b).

Wie beim Bo-NCC-1 weist die CO_2 Abspaltung auf eine freie Carbonsäure an Position .. hin. Aufgrund der durch die Summenformel erhaltene Sauerstoffanzahl wird angenommen, dass sich an Position .. 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 $m/z = 619 [M+H]^+$ (Massenspektrum Abbildung 5.8) und mit $m/z = 657 [M+K]^+$ (Massenspektrum Abbildung 5.9).

Der Katabolit bei $m/z = 619 [M+H]^+$ zeigte Abspaltungen von H_2O bei $m/z = 601 [M - H_2O + H]^+$, von CO_2 bei $m/z = 575 [M - H_2O + H]^+$, von Ring D

5 Experimente MS-Leafspray

(zusammen mit einer Abspaltung von CO_2) bei $m/z = 452$ [$\text{M} - (\text{Ring D}, \text{CO}_2) + \text{H}]^+$ und von Ring A, Ring D und CO_2 bei $m/z = 311$ [$\text{M} - (\text{Ring A}, \text{Ring D}, \text{CO}_2) + \text{H}]^+$ (Abbildung 5.8).

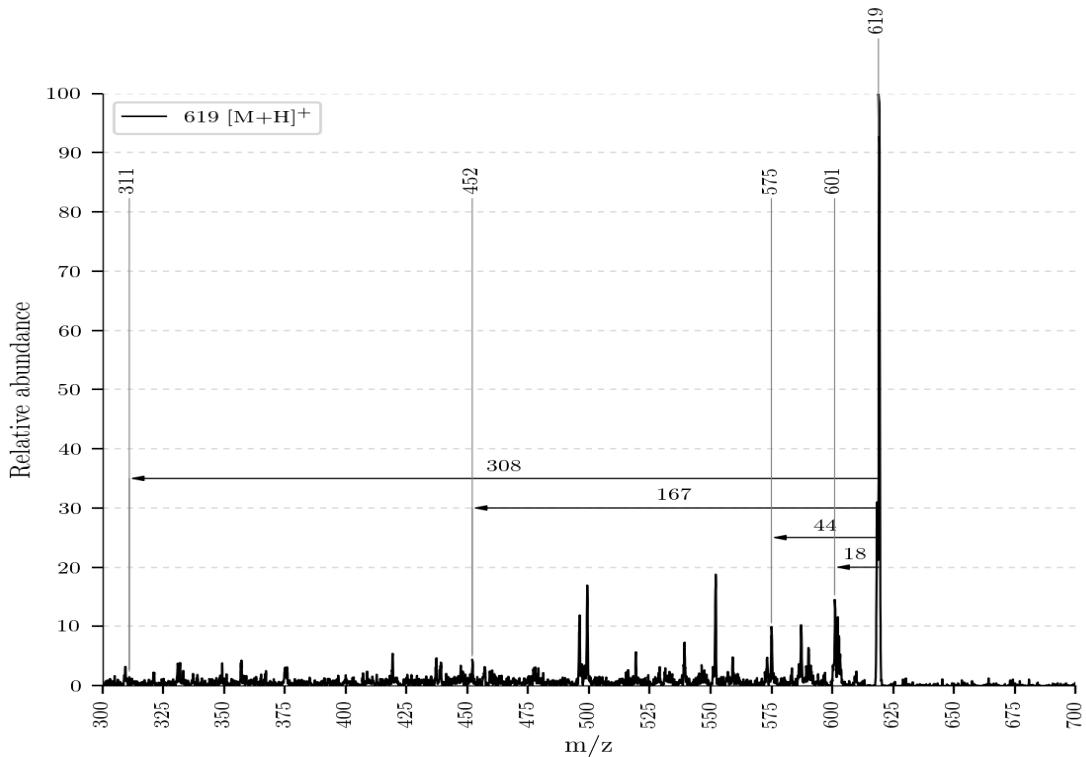


Abbildung 5.8: ESI-MS von Bo-DNCC bei $m/z = 619$ [$\text{M}+\text{H}]^+$ und den Abspaltungen

Das Kaliumsalz des Bo-DNCCs mit $m/z = 657$ [$\text{M}+\text{K}]^+$ zeigte Abspaltungen von H_2O bei $m/z = 639$ [$\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{K}]^+$ und von CO_2 bei $m/z = 613$ [$\text{M} - \text{CO}_2 + \text{K}]^+$ (Abbildung 5.9).

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

5 Experimente MS-Leafspray

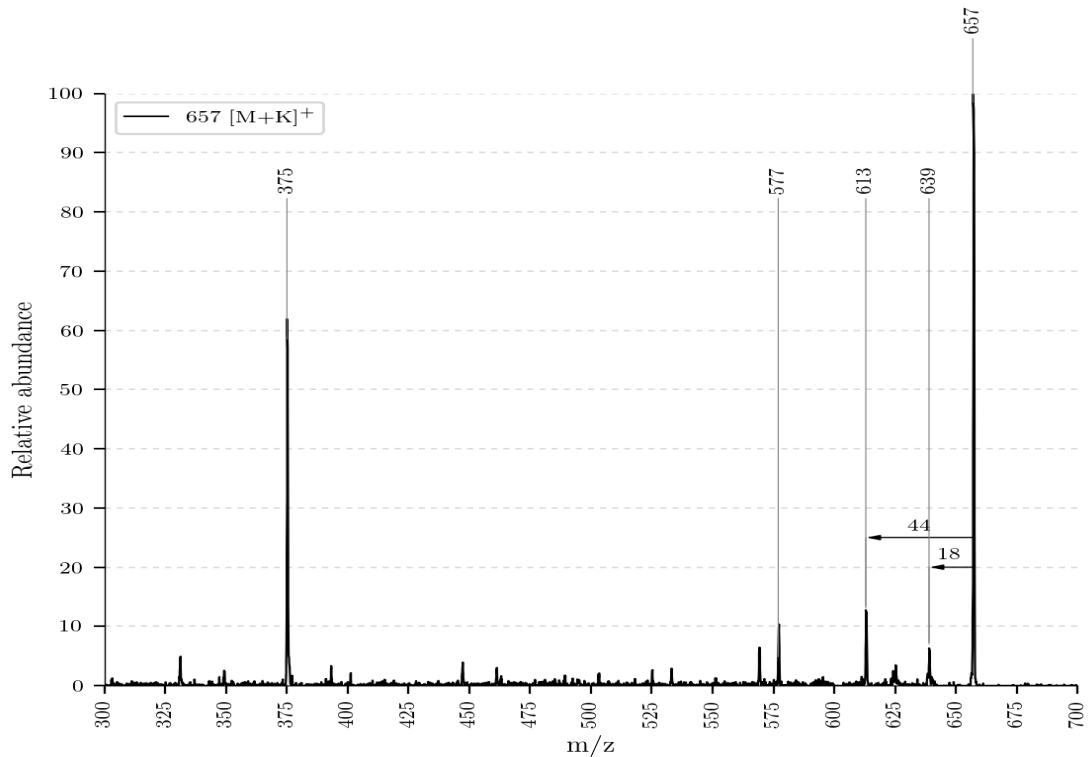


Abbildung 5.9: ESI-MS von Bo-DNCC bei $m/z = 657 [M+K]^+$ und den Abspaltungen

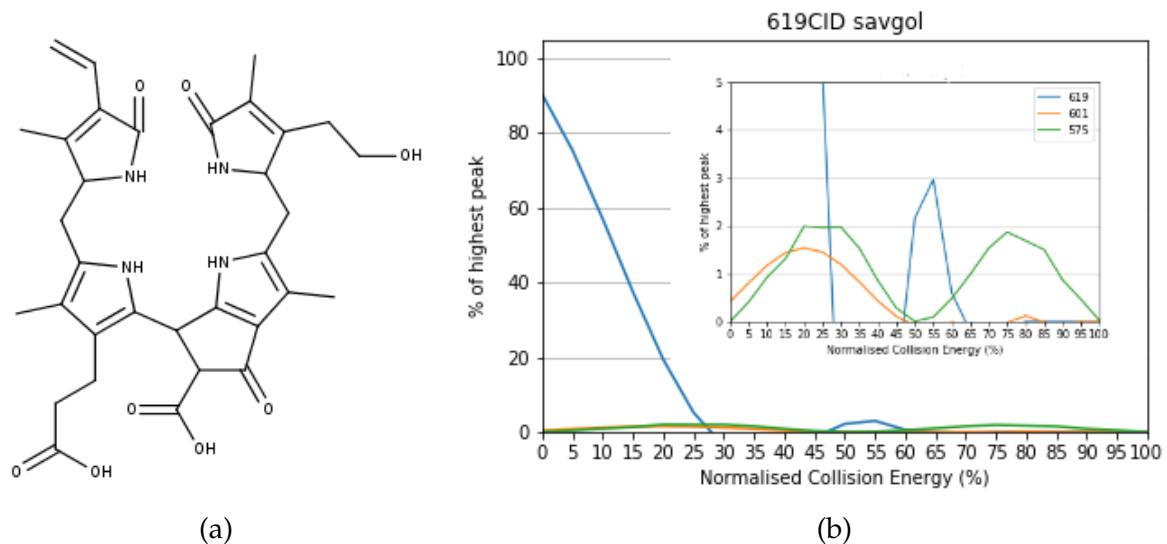


Abbildung 5.10: (a) Struktur von Bo-DNCC mit Summenformel $C_{33}H_{38}N_4O_8$, (b) Fragmentierungsdiagramm von Bo-DNCC (blau = $619 [M+H]^+$, orange = $601 [M - H_2O + H]^+$, grün = $575 [M - H_2O + H]^+$)

5.5 Identifikation der Reaktionsprodukte

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

5.5.1 Reaktionsprodukt von Bo-DNCC

Das Produkt der Reaktion von Bo-NCC-3 mit Essigsäureanhydrid 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 $m/z = 639$ $[M - CH_3COOH + K]^+$. Ein Mechanismus für die Abspaltung wird in Abbildung 5.14a vorgeschlagen. Dieser Mechanismus ähnelt dem Mechanismus der Abspaltung von MeOH (z.B. beobachtbar bei einem Cj-NCC), wie in [17] beschrieben.

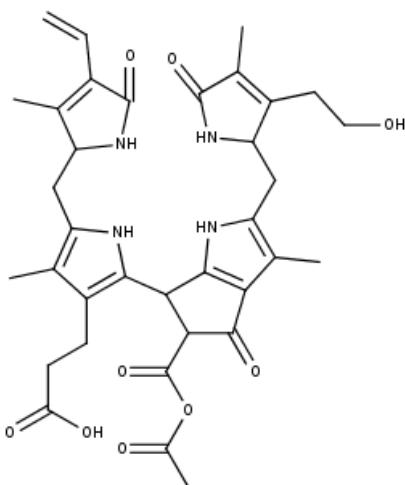


Abbildung 5.11: Strukturvorschlag des Reaktionsproduktes mit Summenformel $C_{33}H_{40}N_4O_9$

Es wurden Abspaltungen von H_2O bei $m/z = 681$ $[M - H_2O + K]^+$, von CH_3COOH bei $m/z = 639$ $[M - CH_3COOH + K]^+$ und von Ring A und Ring D mit CO_2 bei $m/z = 311$ $[M - (Ring A, Ring D, CO_2) + K]^+$ beobachtet. Zur Identifikation der Reaktionsprodukte wurde die CH_3COOH Abspaltung aufgrund ihrer Dominanz und Eindeutigkeit herangezogen (unter anderem (u.a.)

5 Experimente MS-Leafspray

Abbildung 5.13b). Das Fragment bei $m/z = 599 [M - (nAb.) + K]^+$ ist interessant, da eine Abspaltung von 100 Da bei anderen Kataboliten ebenfalls beobachtet wurde. Die anderen Fragmentierungen in Abbildung 5.12 konnten nicht zugeordnet werden.

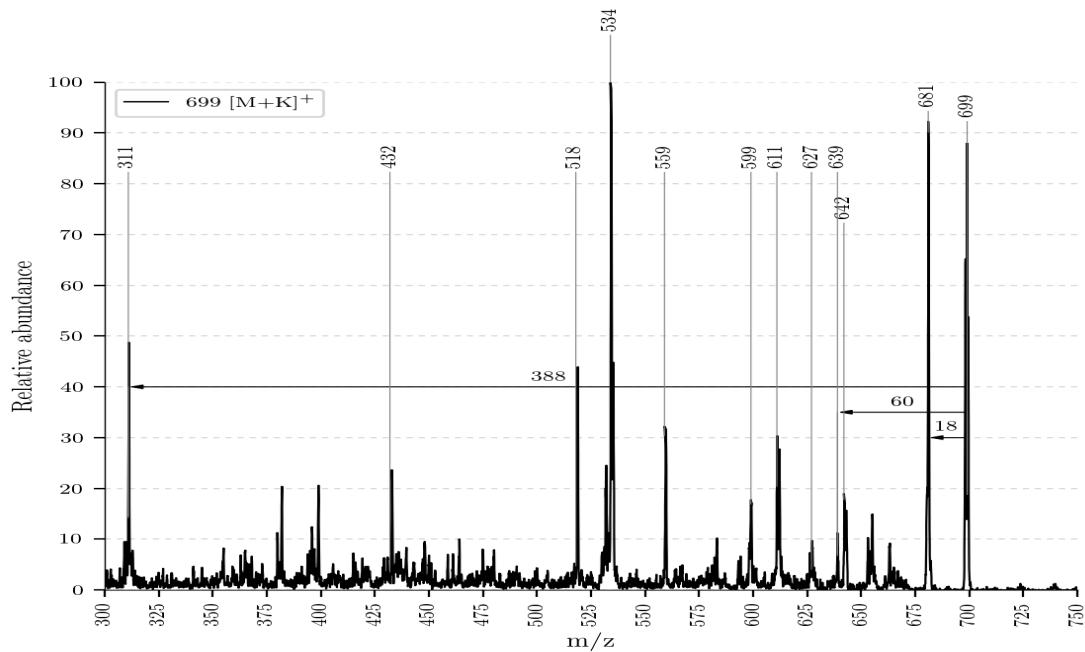


Abbildung 5.12: ESI-MS Spektrum des Reaktionsproduktes mit $m/z = 699 [M+K]^+$

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

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

5 Experimente MS-Leafspray

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 reagierten Bo-DNCC das $[\text{M}+\text{H}]^+$ -Ion aufgenommen wurde, wohingegen man beim reagierten Bo-DNCC das $[\text{M}+\text{K}]^+$ -Ion analysierte. Der Unterschied im Verlauf der Kurven könnte somit auch durch diesen Umstand hervorgerufen werden.

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

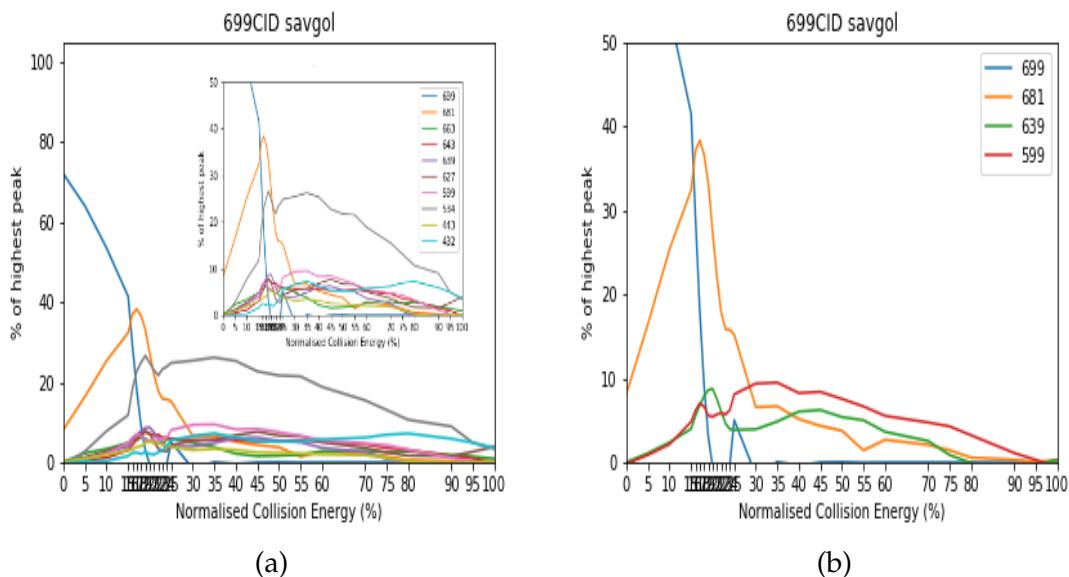


Abbildung 5.13: (a) Fragmentierungsdiagramm des Bo-NCC-3 mit allen beobachteten Abspaltungen (blau = 699 $[\text{M}+\text{K}]^+$, orange = 681 $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{K}]^+$, grün = 663 $[\text{M} - (2\text{xH}_2\text{O}) + \text{K}]^+$, rot = 643 $[\text{M} - (\text{nAb.}) + \text{K}]^+$,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

5 Experimente MS-Leafspray

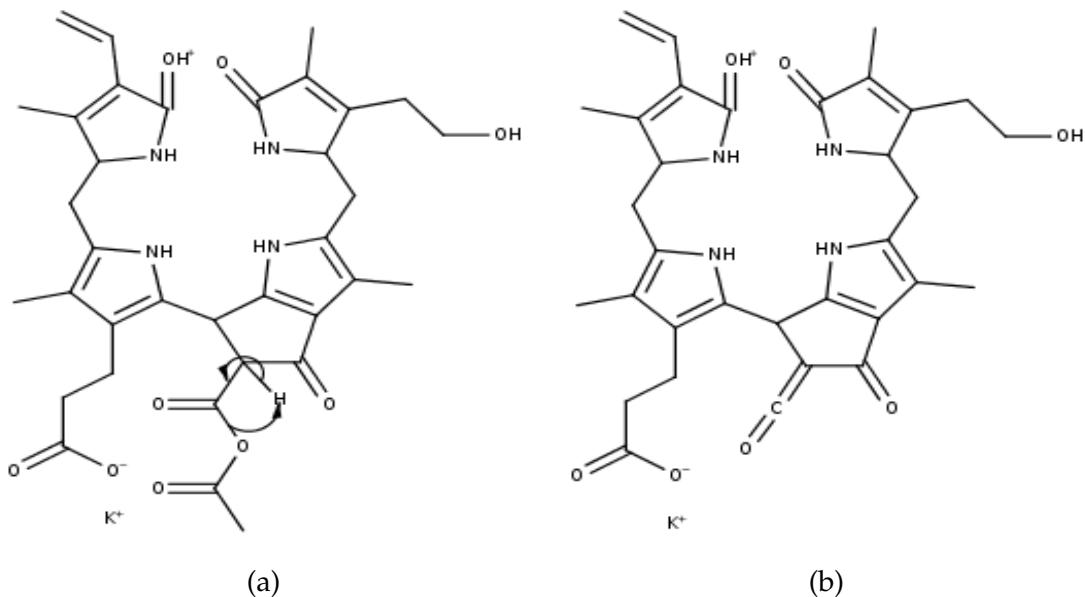


Abbildung 5.14: (a) vorgeschlagener Mechanismus der Essigsäureabspaltung und (b) das Produkt, wobei CH_3COOH als stabiles Neutralteilchen abgespalten wird

5.5.2 Reaktionsprodukt von Bo-NCC-3

Die Molekülmasse des Produktes der Reaktion von Bo-NCC-3 konnte mit m/z = 727 [M+K]⁺ bestimmt werden. Eine Abspaltung von Essigsäure wurde bei m/z = 667 [M+K]⁺ beobachtet. Weiters wurde eine Abspaltung von H₂O bei m/z = 709 [M - H₂O + K]⁺ beobachtet. Bei der Abspaltung bei m/z = 627 [M - (nAb.) + K]⁺ könnte es sich um die gleiche Abspaltung wie beim Reaktionsprodukt des Bo-DNCC handeln, da auch ein Fragment mit M = 100 Da abgespalten wird. Die anderen Abspaltungen (Abbildung 5.15) konnten nicht zugeordnet werden.

Es wurde beobachtet, dass die Abspaltung von H_2O bei niedrigeren Energien erfolgt wie jene von CH_3COOH . Im Vergleich zum Fragmentierungsdigramm des Reaktionsproduktes des Bo-DNCC 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 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 des Chl-Kataboliten vorgeschlagen.

5 Experimente MS-Leafspray

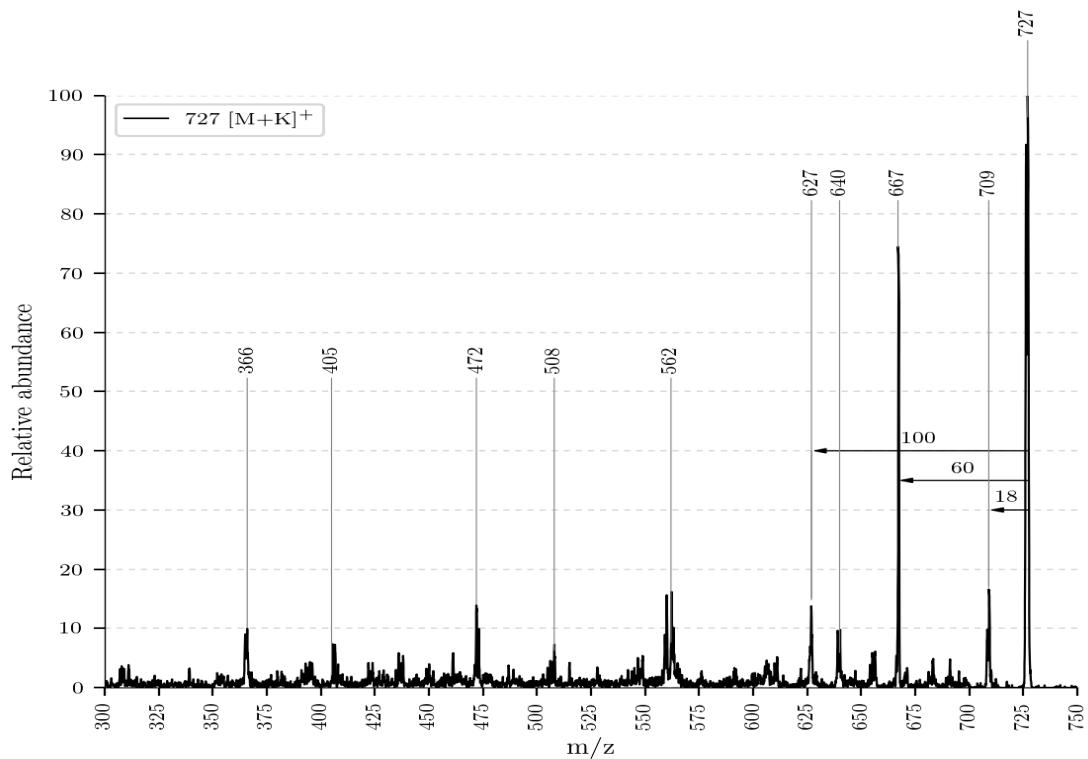


Abbildung 5.15: ESI-MS Spektrum des Reaktionsproduktes bei $m/z = 727 [M+K]^+$

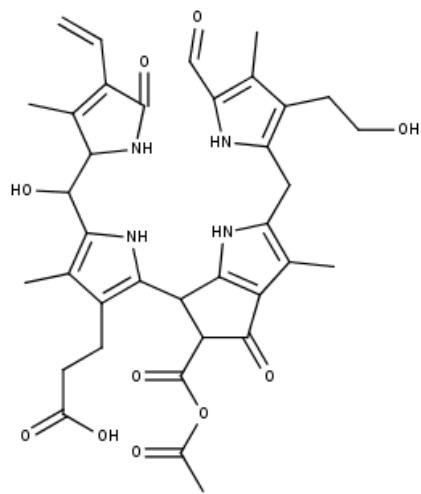


Abbildung 5.16: Strukturvorschlag des Reaktionsproduktes mit Summenformel $C_{36}H_{40}N_4O_{10}$

5 Experimente MS-Leafspray

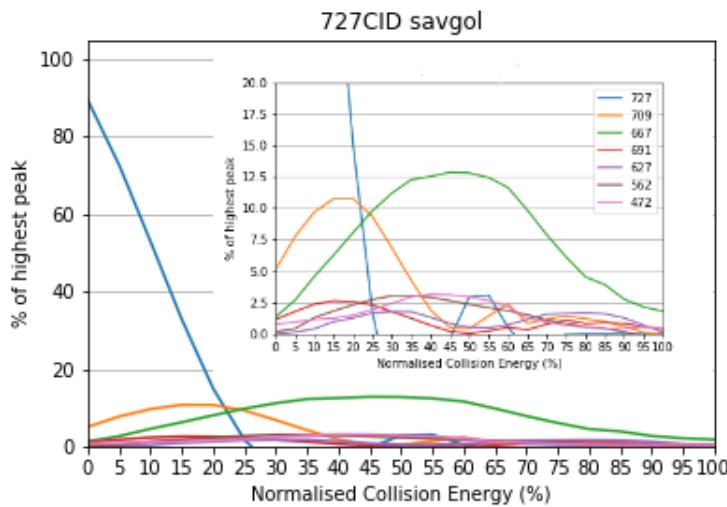


Abbildung 5.17: Fragmentierungsdiagramm des Reaktionsproduktes (lbau = 727 $[M+K]^+$, orange = 709 $[M - H_2O + K]^+$, grün = 667 $[M - CH_3COOH + K]^+$, rot = 691 $[M - ? + K]^+$, violett = 627 $[M - ? + K]^+$, braun = 562 $[M - ? + K]^+$, pink = 472 $[M - ? + K]^+$)

5.5.3 Reaktionsprodukt von Bo-NCC-1

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

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

5 Experimente MS-Leafspray

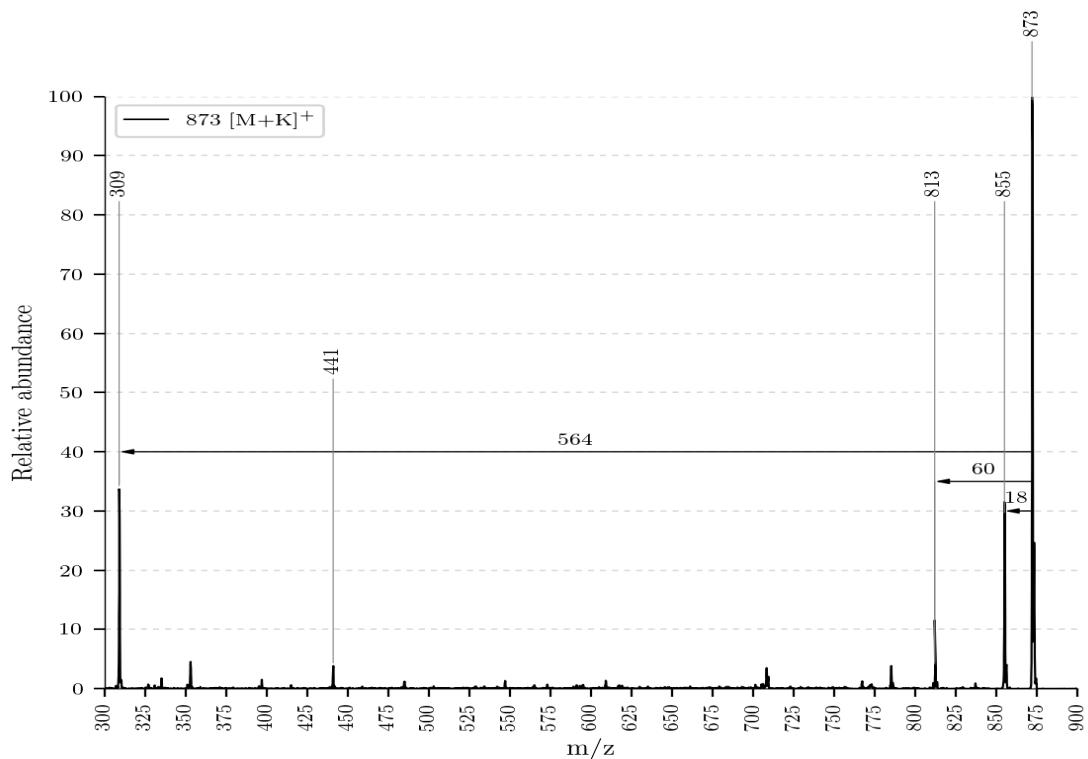


Abbildung 5.18: ESI-MS des Reaktionsproduktes bei $m/z = 873$ $[M+K]^+$

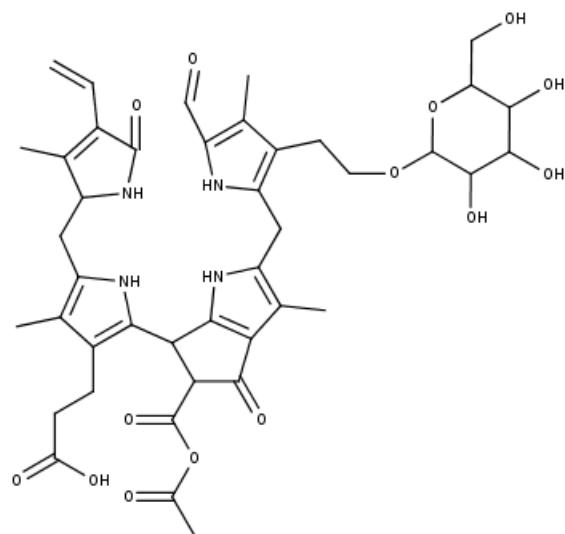


Abbildung 5.19: Strukturvorschlag des Reaktionsproduktes mit Summenformel $C_{42}H_{50}N_4O_{14}$

5 Experimente MS-Leafspray

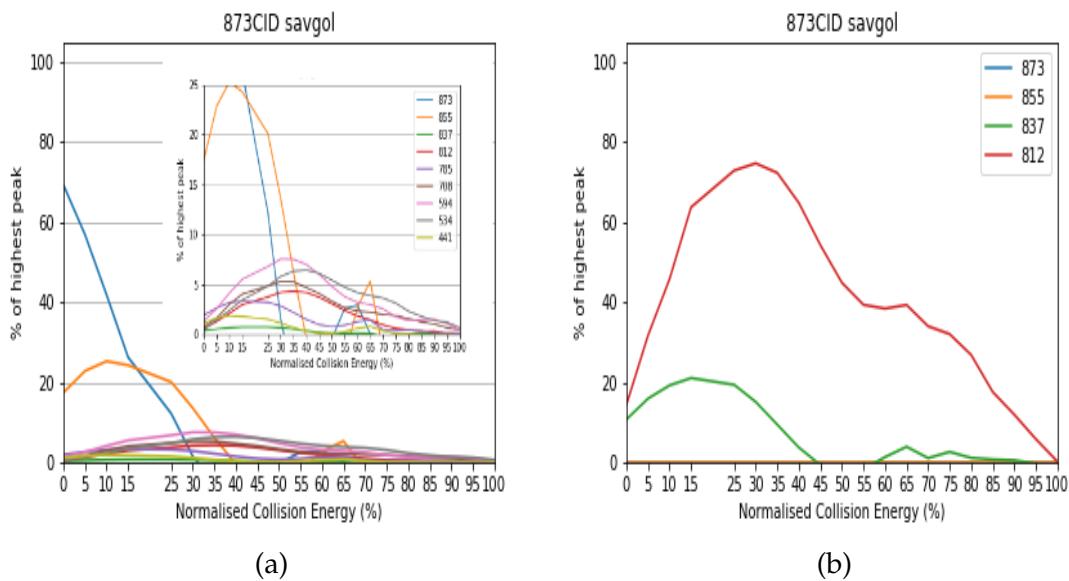


Abbildung 5.20: Fragmentierungsdiagramm des Reaktionsproduktes: (a) Experiment am 13.09.2017 (11:00) - (blau = 873, orange = 855, grün = 837, rot = 812, violett = 765, braun = 708, pink = 594, grau = 534, hellgrün = 441), (b) Experiment am 13.09.2017 (09:45) - schlechter gelungen, weswegen die Abspaltungen 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 des MS Leafspray zu überprüfen. In Kombination mit einem hochauflösenden Massenspektrometer wurde zudem die Ermittlung der Strukturen der Chlorophyllkataboliten ermöglicht bzw. erleichtert.

6.1 HPLC-Gradient sowie Gerätebeschreibung

6.2 Aufarbeitung der Probe

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

Da beobachtet wurde, dass die erhaltene Lösung nach der beschriebenen Aufarbeitung nicht homogen ist, wurde versucht, sie mithilfe von Filterpapier zu filtern. Es zeigte sich jedoch, dass dies die Intensitäten in der HPLC stark reduziert (siehe Anhang), weswegen die oben beschriebene Aufarbeitung beibehalten wurde. Beim Einspritzen wurde somit lediglich versucht, die ungelösten Bestandteile im Blattextrakt nicht mitzunehmen, da diese die HPLC mit der Zeit verunreinigen könnten.

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

6.3 Identifikation von Chl-Kataboliten mithilfe von Online-UV/Vis Spektren

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

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

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

6.4 Identifikation von Chl-Kataboliten mithilfe von MS

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

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

6 Experimente LC-MS

denen des Massenspektrometers im Rahmen eines LC-MS Versuches in Einklang zu bringen (die Retentionszeiten der über HPLC identifizierten Chl-Katabolit stimmten mit jenen des Massenspektrometers oft nicht überein). Da die Verwendung von Daten aus der HPLC zur Analyse der Chl-Katabolit 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, zu erklären.

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 Chlorophyllkataboliten des Brokkoliblattes mithilfe von LC-MS identifiziert

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

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

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

6 Experimente LC-MS

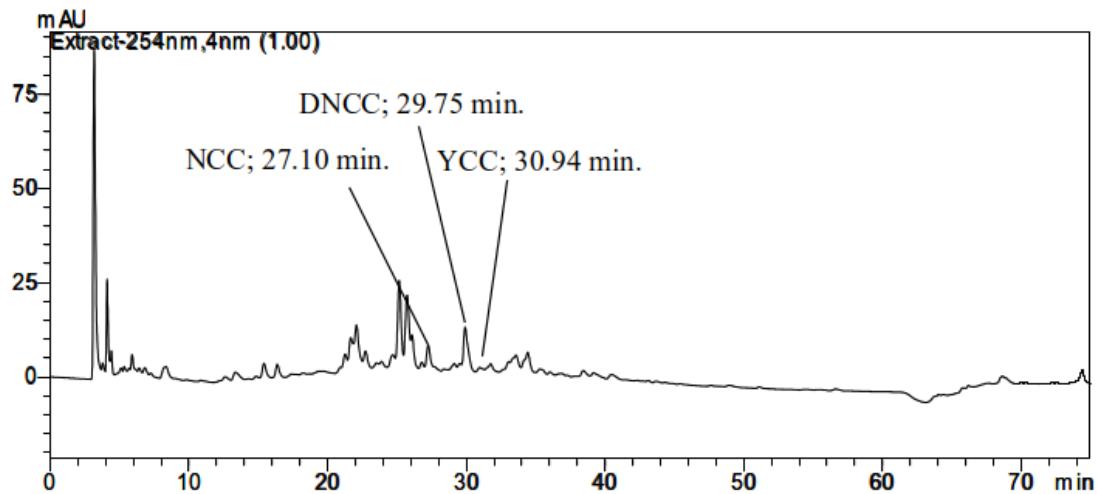


Abbildung 6.1: HPLC Chromatogramm - die hervorgehobenen Peaks entsprechen den Retentionszeiten und der Art des Chl-Kataboliten, die über ein Online-UV/Vis Spektrum bestimmt wurden; gefunden wurden ein NCC bei 27.10min. (Abbildung 6.4a), ein DNCC bei 29.75min. (Abbildung 6.4b) und ein YCC bei 30.94min.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

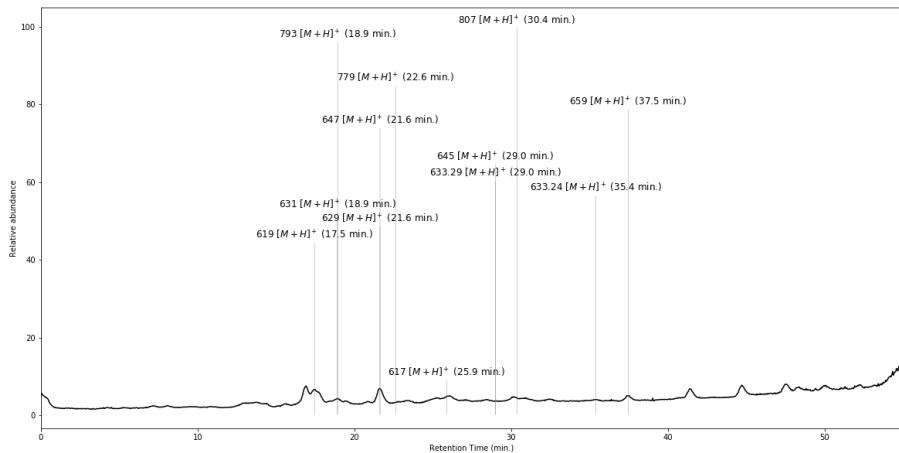


Abbildung 6.2: LC-MS Chromatogramm

6 Experimente LC-MS

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

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

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

Bei einer Retentionszeit von 27.10min. konnte über Online-UV/Vis ein NCC (Abbildung 6.4a) identifiziert werden, da er bei einer Wellenlänge von 315nm eine charakteristische Bande aufweist. Der von den Retentionszeiten dazugehörige Chl-Katabolit im Massenspektrum wäre der Bo-DNCC (mit einer Retentionszeit von 17.5min im Massenspektrometer - Abbildung 6.2). Bei diesem handelt es sich jedoch um einen DNCC. Es wurde versucht, das unlogische Ergebnis durch Überlagerungen mehrerer Chl-Katabolit zu erklären, was aber nicht möglich war (Abbildung 6.3). Es bleibt somit das Zustandekommen dieses UV/Vis Spektrums ungeklärt.

6 Experimente LC-MS

Bei einer Retentionszeit von 29.75min. konnte ein UV/Vis Spektrum eines DNCCs (Abbildung 6.4b) aufgenommen werden. Nach den Retentionszeiten im Massenspektrometer (Abbildung 6.2) kann diesem UV/Vis Spektrum der Chl-Katabolit Bo-NCC-1 zugeordnet werden. Auch der Methylester des Bo-YDNCC ist zu dieser Retentionszeit im Massenspektrometer vorzufinden und trägt damit vermutlich zur Entstehung des Signals bei, was die Verzerrungen bewirken könnte (Abbildung 6.3).

Bei einer Retentionszeit von 30.94min. ist das UV/Vis Spektrum charakteristisch für einen YCC (Abbildung 6.4b). Im Massenspektrometer wurde zu dieser Retentionszeit der Methylester des Bo-YDNCC gefunden (bei einer Retentionszeit von 18.9min). Auch hier lässt sich keine Verbindung finden, bei der die Retentionszeiten von HPLC und Massenspektrometer exakt zusammenpassen. Es könnte auch hier wieder zu einer Überlagerung kommen (vielleicht mit dem Bo-YDNCC). Diese Überlagerungen könnten durch Isomere der einzelnen Chl-Katabolit bedingt sein.

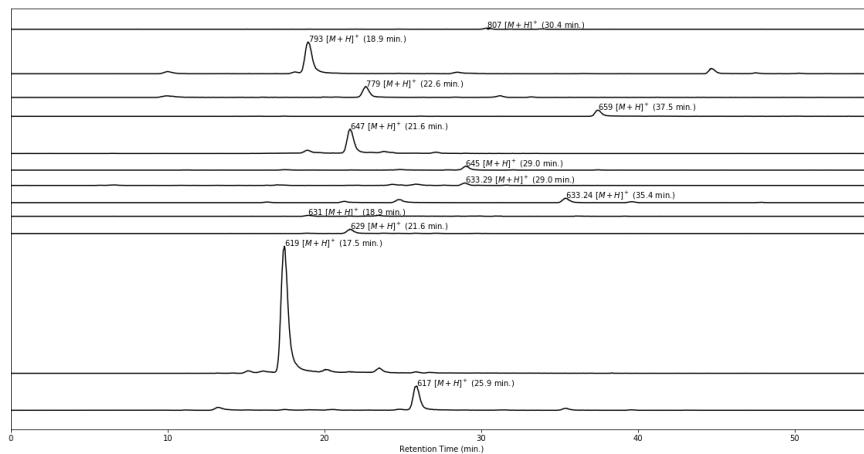


Abbildung 6.3: LC-MS Chromatogramm zur besseren Darstellung von Überlagerungen von Chlorophyllkataboliten, um diverse unlogische Schlüsse besser verstehen zu können

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

6 Experimente LC-MS

Peaks handelt es sich um jene, bei denen die jeweilige Verbindung die höchste Intensität im Chromatogramm zeigte. Mithilfe dieser Abbildung sollten etwaige Überlagerungen herausgefunden werden.

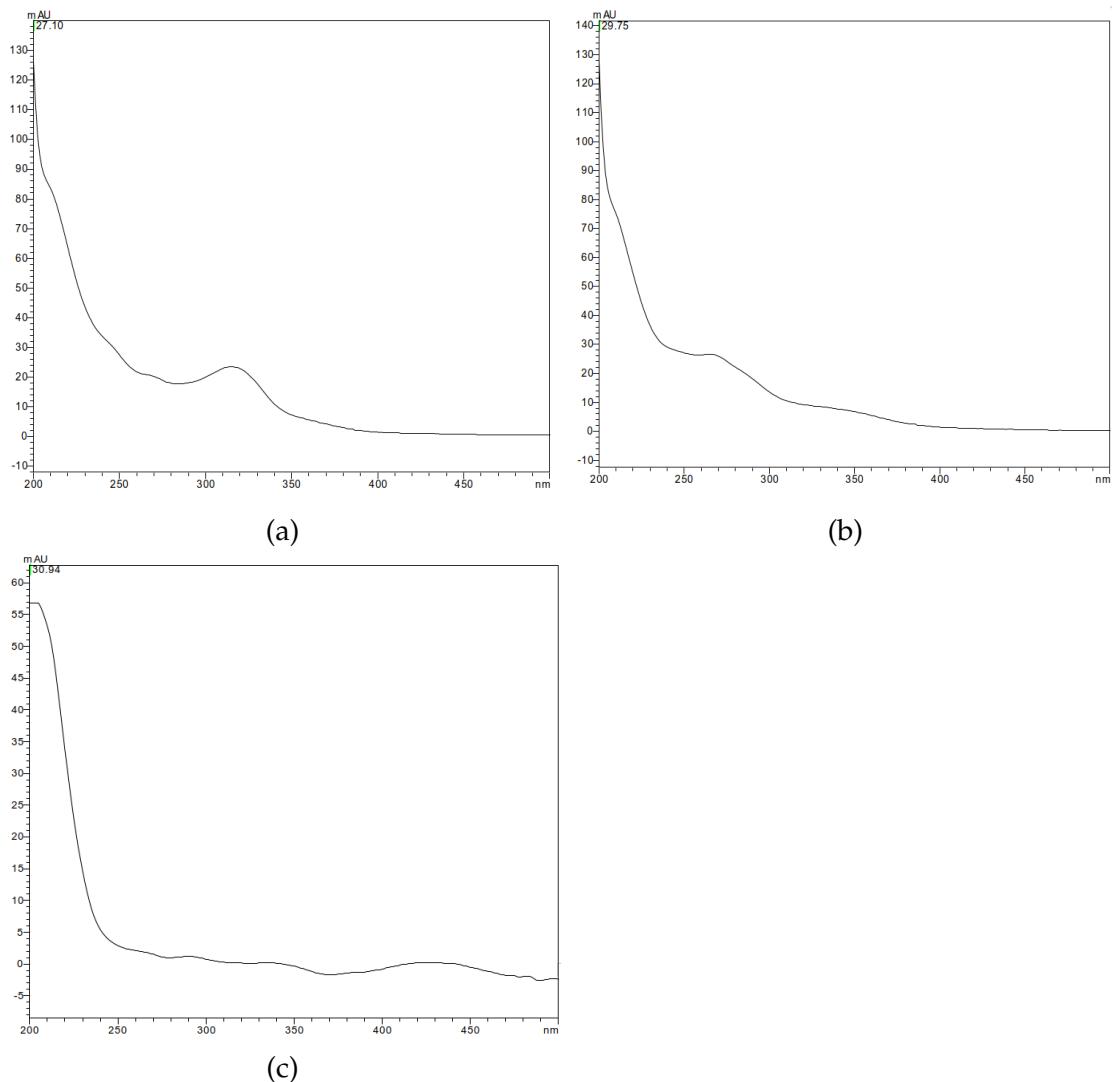


Abbildung 6.4: Online-UV/Vis Spektren: (a) charakteristisch für einen NCC - RT = 27.25min.,
(b) charakteristisch für einen DNCC - RT = 29.91min., (c) charakteristisch für
einen YCC - RT = 30.94min.

6.6 Identifikation der Reaktionsprodukte mithilfe von LC-MS

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 Abbildung 6.8a-e dargestellt. Es handelt sich dabei um die Hauptreaktionsprodukte, die in der HPLC dadurch charakterisiert sind, dass sich ihre Retentionszeit nach hinten verschiebt. Sie dürften somit apolarere Eigenschaften besitzen wie die Chl-Katabolit, was vermutlich durch den Methylester bedingt ist. Über die Verschiebung der Peaks im HPLC Chromatogramm ist das Stattfinden der Reaktion 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.

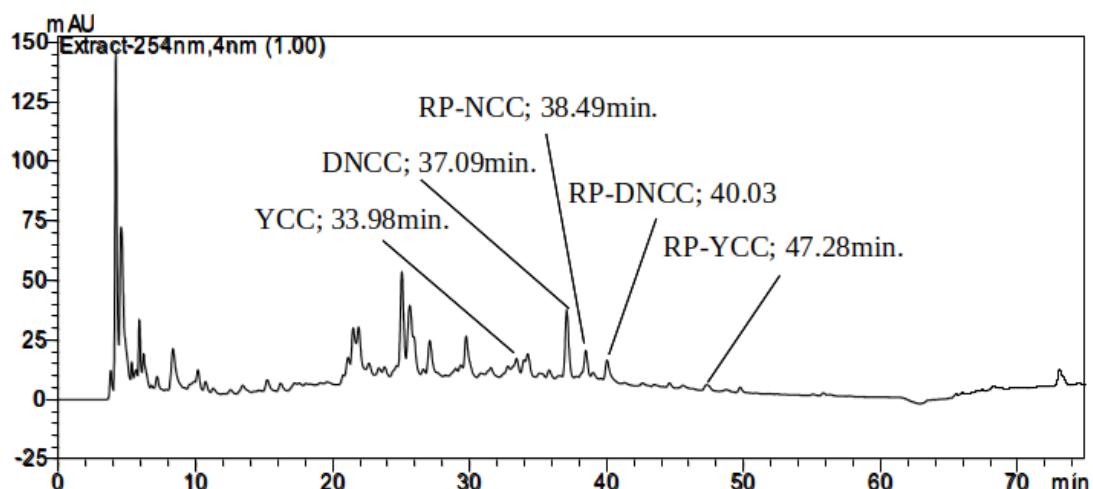


Abbildung 6.5: HPLC Chromatogramm, gefunden wurden Reaktionsprodukte mit den Eigenschaften eines NCCs (RT = 38.49min.), eines DNCCs (RT = 40.03min.), eines YCCs (RT = 47.28min.) und eines weiteren DNCCs (37.09min.); beim YCC bei RT = 33.98min. könnte es sich um einen weiteren Chl-Kataliten handeln

Das Chromatogramm des Massenspektrometers des LC-MS Laufes (Abbildung 6.6) zeigt die Massen aller Chl-Kataliten und die Zeitpunkte, zu denen sie jeweils eluieren. Durch die stattgefundenen Reaktionen 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 schnell

6 Experimente LC-MS

bildet (siehe auch Kapitel).

Auffallend ist, dass manche Verbindungen in ihren Retentionszeiten verschoben worden sind. So eluiert Verbindung mit $m/z = 631 [M+H]^+$ nun bei 39.0min. im Vergleich zu 18.9min., Verbindung mit $m/z = 629 [M+H]^+$ bei 31.8min. im Vergleich zu 21.6min. und Verbindung mit $m/z = 645 [M+H]^+$ bei 34.5min. im Vergleich zu 29.0min. (vergleiche Abbildung 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).

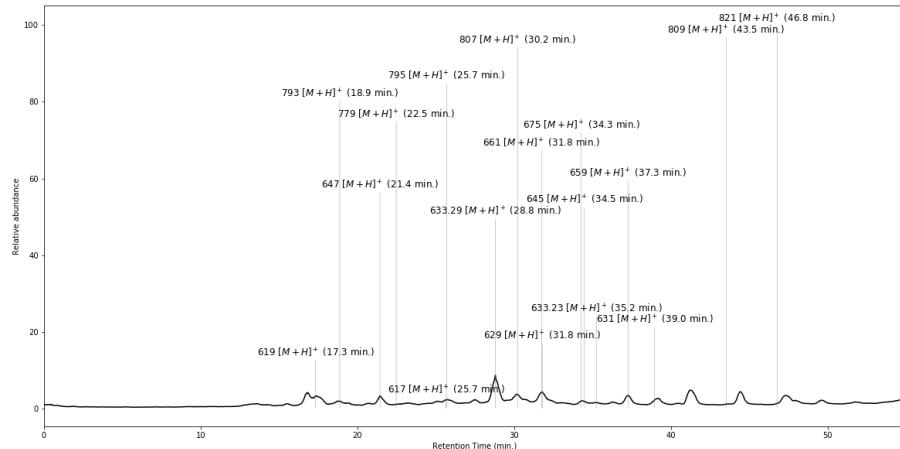


Abbildung 6.6: LC-MS Chromatogramm

In Tabelle 6.2 werden die Chl-Katabolit 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, mit einer anderen Summenformel. Wie dieses Signal zustandekommt bleibt ungeklärt. Da bei $m/z = 633 [M+H]^+$ ebenfalls zwei 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 und dem Massendefekt nicht auszugehen.

6 Experimente LC-MS

In Abbildung 6.7 wird nur unter Verwendung von Massenspektrometerdaten ersichtlich, dass die Reaktion stattgefunden hat. Es wird angenommen, dass die Peakhöhe 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.

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

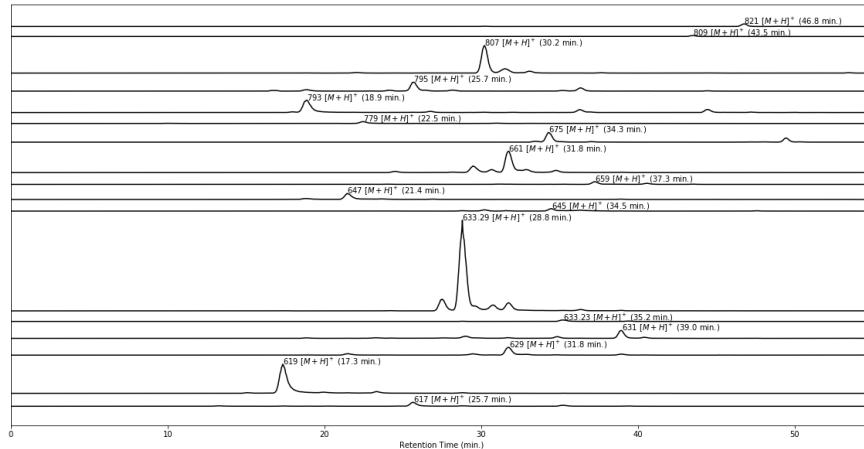


Abbildung 6.7: LC-MS Chromatogramm

6 Experimente LC-MS

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

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

6 Experimente LC-MS

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

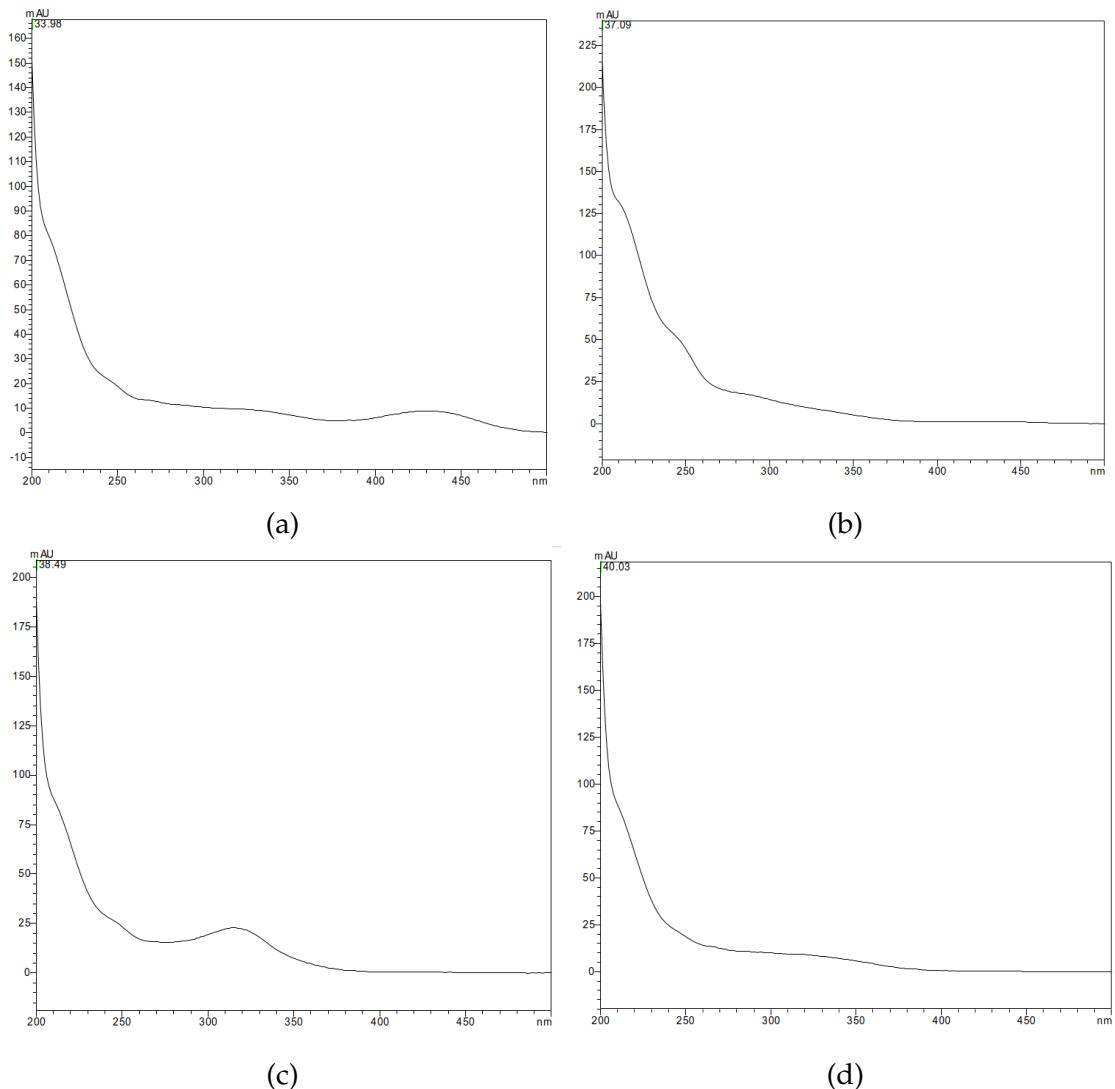


Abbildung 6.8: Online-UV/Vis Spektren: charakteristisch für (a) YCC - RT = 33.98min., (b) DNCC - RT = 37.09min., (c) NCC - RT = 38.94min., (d) DNCC - RT = 40.03min., (e) YCC - RT = 47.28min.

6 Experimente LC-MS

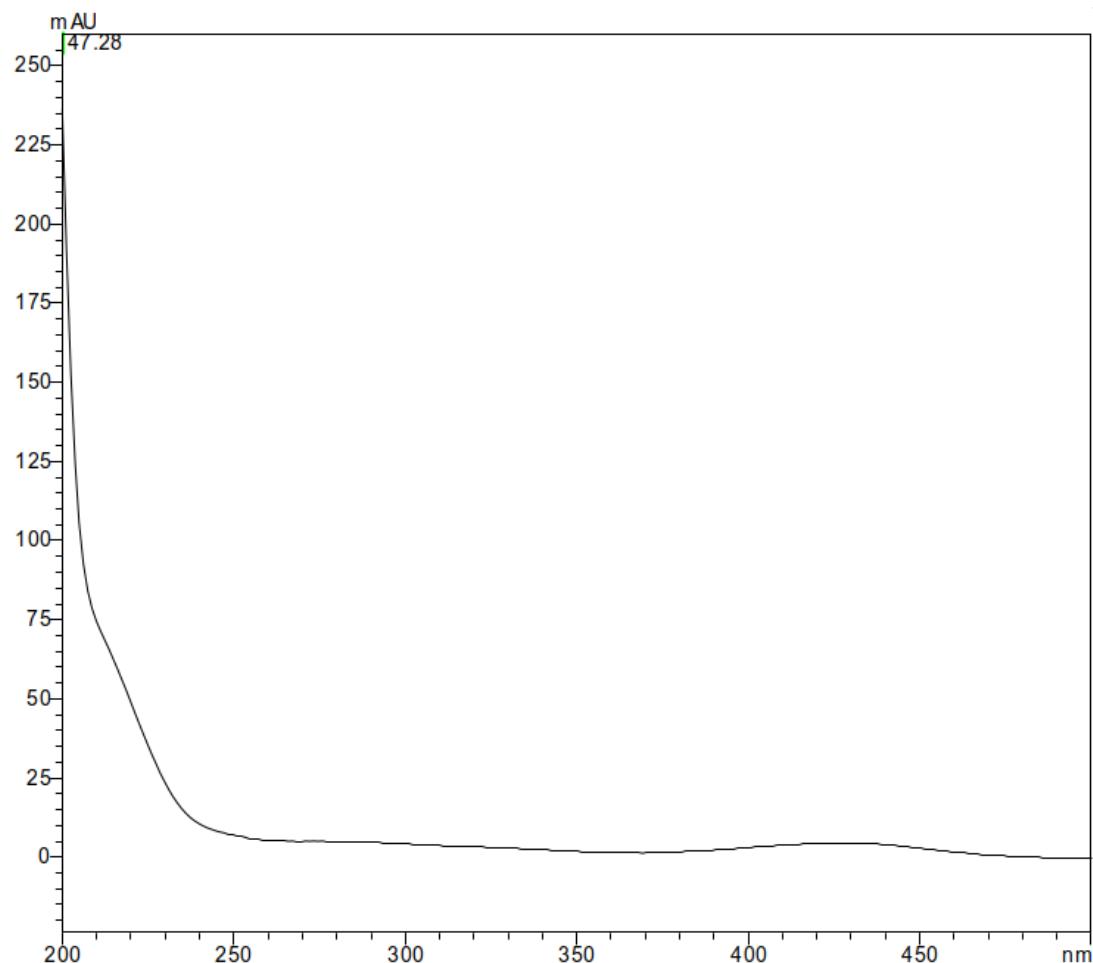


Abbildung 6.9

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

Ergebnisse und Diskussion

Verweise

Literaturverzeichnis

- [1] Thomas Müller, Sheran Oradu, Demian R. Ifa, R. Graham Cooks und Bernhard Kräutler. „Direct Plant Tissue Analysis and Imprint Imaging by Desorption Electrospray Ionization Mass Spectrometry“. In: *analytical chemistry* 83 (2011), S. 5754–5761 (siehe S. 2).
- [2] 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. 2, 9).
- [3] 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. 4).
- [4] 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. 4).
- [5] 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. 4).
- [6] 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. 4).
- [7] Bernhard Kräutler. „Der Chlorophyllabbau in höheren Pflanzen – Phyllobiline 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. 4).
- [8] 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. 5).

Literaturverzeichnis

- [9] 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. 5).
- [10] 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. 5).
- [11] Jürgen Böcker. *Chromatographie*. 1. Auflage. Würzburg: Vogel, 1997. ISBN: 3-8023-1582-0 (siehe S. 6).
- [12] Edmond de Hoffmann und Vincent Stroobant. *Mass Spectrometry*. 3. Auflage. West Sussex: John Wiley und Sons, Ltd., 2007 (siehe S. 7, 8).
- [13] R. Graham Cooks, Zheng Ouyang, Zoltan Takats und Justin M. Wiseman. „Ambient Mass Spectrometry“. In: *Science* 311 (5767 2006), S. 1566–1570 (siehe S. 8).
- [14] 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. 8).
- [15] Thomas Müller und R. Graham Cooks. „Differential Rapid Screening of Phytochemicals by Leaf Spray Mass Spectrometry“. In: *Analytische Methods* 35 (3 2014), S. 919–924 (siehe S. 9, 17).
- [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. 17, 19, 21).
- [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. 19, 24).

Abbildungsverzeichnis

2.1	Abbauprozess des Chlorophylls, Quelle: http://www.organische-chemie.ch/chemie/2007nov/antioxidantien.shtml (Zugegriffen am: 05.11.2017)	5
5.1	MS-Leafspray Versuchsaufbau, Quelle: Autor	14
5.2	MS-Leafspray Versuchsaufbau Detailfotos, Quelle: Autor	15
5.3	MS-Leafspray Blattvorbereitung, Quelle: Autor	16
5.4	ESI-MS Spektrum von Bo-NCC-1, Quelle: Autor	18
5.5	Strukturvorschlag von Bo-NCC-1 und Fragmentierungsdiagramm, Quelle: Author	19
5.6	ESI-MS von Bo-NCC-3, Quelle: Autor	20
5.7	Strukturvorschlag von Bo-NCC-3 und Fragmentierungsdiagramm, Quelle: Autor	21
5.8	ESI-MS von Bo-DNCC, Quelle: Autor	22
5.9	ESI-MS von Bo-DNCC, Quelle: Autor	23
5.10	Strukturvorschlag von Bo-DNCC mit Fragmentierungsdiagramm, Quelle: Author	23
5.11	Strukturvorschlag des Reaktionsproduktes von Bo-DNCC, Quelle: Autor	24
5.12	ESI-MS Spektrum des Reaktionsproduktes von Bo-DNCC, Quelle: Autor	25
5.13	Fragmentierungsdiagramme des Reaktionsproduktes von Bo-DNCC, Quelle: Autor	26
5.14	Vorschlag des Mechanismus der CH ₃ COOH Abspaltung, Quelle: Autor	27
5.15	ESI-MS des Reaktionsproduktes von Bo-NCC-3, Quelle: Autor . .	28
5.16	Strukturvorschlag des Reaktionsproduktes von Bo-NCC-3, Quelle: Autor	28
5.17	Fragmentierungsdiagramm des Reaktionsproduktes von Bo-DNCC, Quelle: Autor	29
5.18	ESI-MS des Reaktionsproduktes von Bo-NCC-1, Quelle: Autor . .	30
5.19	Strukturvorschlag des Reaktionsproduktes von Bo-NCC-1, Quelle: Autor	30

Abbildungsverzeichnis

5.20 Fragmentierungsdiagramm des Reaktionsproduktes von Bo-NCC-1, Quelle: Autor	31
6.1 HPLC Chromatogramm vor der Reaktion, Quelle: Author	35
6.2 LC-MS Chromatogramm vor der Reaktion, Quelle: Author	35
6.3 LC-MS Chromatogramm vor der Reaktion Aufspaltung, Quelle: Autor	37
6.4 Online-UV/Vis Spektren mit der Charakteristik eines NCC bei 27.10min., eines DNCC bei 29.75min. sowie eines YCC bei 30.94min., Quelle: Autor	38
6.5 HPLC Chromatogramm nach 3h Reaktionsdauer, Quelle: Author	39
6.6 LC-MS Chromatogramm nach 3h Reaktionsdauer, Quelle: Autor	40
6.7 LC-MS Chromatogramm nach 3h Reaktionsdauer - Aufspaltung, Quelle: Autor	41
6.8 Online-UV/Vis Spektren mit der Charakteristik eines YCC bei 33.98min., eines DNCC bei 37.09min. eines NCC bei 38.94min. sowie eines DNCC bei 40.03min., Quelle: Autor	43
6.9	44
6.10 Online-UV/Vis Spektren mit der Charakteristik eines YCC bei 47.28min., Quelle: Autor	44

Abkürzungsverzeichnis

bzw. beziehungsweise. 7

ca. circa. 12, 32

Chl-Katabolit Chlorophyll Kataboliten. 2, 11, 12, 33–37, 39, 40

CI Chemical Ionization. 7

CID Collision induced Dissociation. 2, 12, 13

DNCC Decarboxylated-Non fluorescent Chlorophylllic Catabolite. 8, 33, 36–38, 43

EI Electron Ionization. 7

ESI Electrosprayionisation. 7, 8

FI Field Ionization. 7

HPLC High performance liquid chromatography. 2, 6–8, 12, 32–37, 39

LC-MS Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. 2, 6, 8, 32, 34, 35, 37, 39–41

LM Lösungsmittel. 6, 7, 14–16, 24

m/z Masse pro Ladung. 7, 17

MeOH Methanol. 16, 18–21, 24, 29, 32, 36, 39, 42

N2 Stickstoff. 7

nAb. noch Aufklärungsbedarf. 18–21, 25–27

NCC Non fluorescent Chlorophylllic Catabolite. 4, 5, 8, 33, 35, 36, 38, 43

NKE normalisierten Kollisionsenergie (in %). 12, 18, 20–22, 25–27, 29

PQD PQD. 12

RP Reversed-phase. 6

u.a. unter anderem. 24

YCC Flourescent Chlorophylllic Catabolite. 8, 21, 33, 37, 38, 43, 44

z.B. zum Beispiel. 4, 5, 7, 8, 24

Anhang

Eidesstattliche Erklärung

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

Telfs, am

Datum

Unterschrift