

Entwicklung einer NMR- und MS-basierten Strategie zur
Identifizierung von Metaboliten aus Gemischen

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

Doctor rerum naturalium

Dr. rer. nat.

Fachbereich Chemie

Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften

Universität Hamburg

vorgelegt von

Anke Bollen

Hamburg

1. Gutachter: Dr. Thomas Hackl

2. Gutachter: Prof. Dr. Markus Fischer

Tag der Disputation: 26.06.2020

It doesn't take a lot of strength to hang on. It takes a lot of strength to let go.

(J. C. Watts)

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von November 2015 bis Mai 2019 am Institut für Organische Chemie des Fachbereichs Chemie der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Universität Hamburg unter der Anleitung von Herrn Dr. Thomas Hackl und Herrn Prof. Dr. Bernd Meyer angefertigt.

Ich danke Herrn Dr. Thomas Hackl und Herrn Prof. Dr. Bernd Meyer für die interessante Themenstellung und die stets freundliche und wertvolle Unterstützung während der gesamten Promotionszeit.

Herrn Prof. Dr. Markus Fischer danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
1 Einleitung.....	1
1.1 Grundlagen	1
1.2 Food-Profilng	6
1.2.1 Weißer Gemüsespargel (<i>Asparagus officinalis</i>)	7
1.3 Metabolomics.....	9
1.3.1 Chromatographische Methoden zur Trennung polarer Metaboliten	10
1.3.2 Massenspektrometrische Untersuchungen von Metaboliten	13
1.3.3 NMR-Spektroskopische Untersuchungen von Metaboliten.....	14
1.3.4 Three Dimensional Cross Correlation.....	17
1.3.5 Mathematisch Grundlagen zur Berechnung von Korrelationen	19
2 Zielsetzung der Arbeit	20
3 Material und Methoden	21
3.1 Chemikalien.....	21
3.2 Geräte.....	22
3.3 Software	23
3.4 Methoden.....	24
3.4.1 Vorbereitung der Spargelproben	24
Spargelproben 1	24
Spargelprobe 2	24
Spargelprobe 3	24
Extraktion der Spargelprobe 1	25
Extraktion der Spargelprobe 2	25
Extraktion der Spargelprobe 3	25
3.5 Analytische Methoden	26
3.5.1 Flüssigchromatografie	26
3.5.1.1Trennung des 8-Stoffgemisches an einer präparativen HPLC.....	26
3.5.1.2 Trennung 1 - Spargelprobe 1.....	27
3.5.1.2 Trennung 2 - Spargelprobe 2.....	28
3.5.1.3 Trennung 3 - Spargelprobe 3.....	29
3.5.1.4 Trennung 4 - Spargelprobe 3.....	30
3.5.2 NMR-Spektroskopische Analysen.....	31
3.5.2.1 Herstellung der NMR-Puffer.....	31
Puffer 1 (8-Stoffgemisch)	31

Puffer 2 (Spargelprobe 1 und 2)	31
Puffer 3 (Spargelprobe 3)	32
3.5.2.2 Analysen zur Reinheit der verwendeten Substanzen und Materialien.....	32
3 mm NMR-Röhrchen.....	32
Zentrifugenfilter	32
3.5.2.3 Erstellen der NMR-Proben	33
3.5.2.4 NMR-Datenakquise- und prozessierung.....	33
3.5.3 Massenspektrometrische Analyse.....	34
3.5.4 3DCC/ Datenprozessierung	34
3.5.6 Erstellung des 8-Stoffgemisches.....	34
4 Ergebnisse und Diskussion	36
4.1 Validierung unterschiedlicher Extraktionen aus Spargel mittels	36
NMR-Spektroskopie	36
4.2 Optimierung der mechanischen Extraktionsmethoden.....	39
4.3 3DCC-Analyse eines erstellten 8-Stoffgemisches.....	41
4.2 NMR-Analysen von polarem Spargelextrakt nach Vortrennung mittels HPLC (HPLC- Trennung 1 der Spargelprobe 1)	49
4.2.1 Identifizierung unbekannter/neuer Substanzen aus <i>Asparagus officinalis</i>	51
4.2.2 Analyse der separierten Fraktionen	55
4.2.3 Identifizierung von Valinbetain	59
4.2.4 Identifizierung von Beta-[Carboxypropyl]-L-Cystein	62
4.2.5 Zusammenfassende Analyse der Fraktion 7-11	64
4.2.7 Identifizierung einer unbekanntes Substanz I aus der HPLC-Trennung 1 der Spargelprobe 1	67
4.2.8 Identifizierungen bekannter Substanzen aus der HPLC-Trennung 1 der Spargelprobe 1 71	
4.3 Identifizierung von Metaboliten aus polaren Extrakten mittels UHPLC-MS/MS-NMR- Untersuchungen (HPLC-Trennung 2 der Spargelprobe 2).....	77
4.4 Identifizierung von Metaboliten aus polaren Extrakten mittels NMR-Spektroskopie und dem SSC-System (HPLC-Trennung 3 der Spargelprobe 3).....	81
4.4.1 Anwendung des SSC-Systems zur Identifizierung von Metaboliten aus Gemischen im Falle von Signalüberlagerungen	89
4.4.2 Identifizierung einer unbekanntes Substanz II (HPLC-Trennung 4 der Spargelprobe 3) 94	
4.4.3 Identifizierungen bekannter Substanzen aus der HPLC-Trennung 3 der Spargelprobe 3 98	
4.5 Identifizierte Metaboliten aus weißem Gemüsespargel.....	106
4.6 Konzentrationsbestimmungen	108

5	Zusammenfassung.....	112
5.1	Summary.....	115
6	Literatur.....	118
7	Toxikologische Daten.....	122
7.1	Sicherheit und Entsorgung	122
7.2	Umgang mit KMR-Stoffen.....	124
8	Anhang.....	125
	NMR-Daten.....	125
	Gradient der HPLC-Messungen der einzelnen Fraktionen	131
	Gradient des Sepacore® Flash Systems.....	132
	Danksagung	133
	Curriculum Vitae.....	135
	Erklärung	139

Abkürzungsverzeichnis

3DCC	<i>three-dimensional cross correlation</i>
ANPC	<i>Aqueous Normal Phase Chromatography</i>
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionisation</i>
BPC	<i>Base Peak Chromatogram</i>
ca.	circa
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
<i>d</i>	Dublett
<i>dd</i>	Dublett eines Dubletts
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
<i>dq</i>	Dublett eine Quartetts
dPBS	<i>deuterated Phosphate buffered saline</i>
EDC	<i>Extracted Delta Chromatogram</i>
EIC	<i>Extracted Ion Chromatogram</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FA	Ameisensäure
FT-ICR	<i>Fourier-Transform Ion Cyclotron Resonance</i>
GC	Gaschromatographie
HILIC	<i>Hydrophilic-Interaction Chromatography</i>
HPLC	<i>High performance Liquid Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IR	Infrarotspektroskopie
IR-MS	Isotopenverhältnis Massenspektrometrie
JRES	<i>J-resolved</i>
LC	<i>Liquid Chromatographie</i>
<i>m</i>	<i>Multiplett</i>
MALDI	<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>
MS	Massenspektrometrie
m/z	Masse zu Ladung- Verhältnis
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i>

NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy</i>
RIC	<i>Reduces (extracted) Ion Chromatogram</i>
RP	<i>Reversed Phase</i>
RT	Raumtemperatur
s	Singulett
SC	Säulenchromatographie
se/NOESY	selective Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy
se/TOCSY	<i>selective Total Correlation Spectroscopy</i>
S/N	Signal zu Rausch Verhältnis
SNP	Silica Nanopartikel
sog.	sogenannte/ -er / -es
SPE	<i>Solid Phase Extraction</i>
TIC	<i>Total Ion Current</i>
TLC	Thin Layer Chromatography
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
u.a.	unter anderem
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Grundlagen

Die Naturstoffchemie beschäftigt sich mit der Isolierung und Synthese von Naturstoffen sowie deren Identifizierung und Strukturaufklärung.¹

Es lassen sich drei Gruppen von Naturstoffen unterscheiden. Unter den sog. Primärmetaboliten versteht man solche Verbindungen, die in allen Zellen vertreten sind und eine zentrale Rolle beim Energiestoffwechsel, Replikation und Differenzierung der Zellen spielen. Sie üben in der Regel ihren biologischen Effekt in der Zelle aus, in der sie produziert wurden. Hierunter fallen u. a. Nukleinsäuren, Aminosäuren und Zucker.¹

Unter den Begriff der Sekundärmetaboliten fallen solche Verbindungen, die charakteristisch für bestimmte Organismen oder einen Organismus, für bestimmte Organe oder Gewebe sind. Sie sind die Produkte des Sekundärstoffwechsels, der nicht direkt an lebenswichtigen Funktionen, wie Wachstum, Entwicklung oder Reproduktion beteiligt ist.² Ihr Nutzen basiert auf ihrer jeweiligen ökologischen Funktion und ihrem biologischen Effekt auf andere Organismen. Sie dienen als Hormone für Pflanzen oder Tiere, Lockstoffe oder Antifraßmittel.³ Hierunter fallen Biomoleküle wie Alkaloide, Kohlenhydrate und Glykoside, Terpene, aromatische Verbindungen sowie farbgebende Moleküle.⁴

Eine weitere Gruppe stellen die hochmolekularen Verbindungen, wie Zellulose, Lignine und Proteine dar, welche strukturgebend für Zellen sind.²

Meilensteine der Naturstoffgeschichte im Rahmen der Isolierung und Identifizierung sind beispielsweise die Reindarstellung von Morphin aus Roh-Opium vom Paderborner Apotheker SERTÜRNER 1806 sowie die Isolierung von Strychnin und Chinin von PELLETIER und CAVENTOU in Frankreich 1820.⁵ Sie isolierten ebenfalls 1820 erstmalig das Alkaloid Colchicin, allerdings hielten sie es zu diesem Zeitpunkt noch irrtümlicherweise für das giftige Alkaloidgemisch Veratrin.⁴ Der Name Colchicin geht schließlich auf die Pharmazeuten GEIGER und HESSE (1833) zurück, die diese Substanz als neu einstufen. Der Chemiker Professor SIMON ZEISEL konnte 1883 schließlich die Summenformel auf $C_{22}H_{25}NO_6$ bestimmen.⁴

1822 wurde Morphin vom Darmstädter Apotheker E. MERCK erstmals mit einer Reinheitsgarantie dargestellt, welche zu diesem Zeitpunkt neue Normen für Arzneimittel und Feinchemikalien setzte.⁵

Dem deutschen Chemiker KONRAD JULIUS BREDT gelang es 1893 die Struktur von Campher aufzuklären, nachdem vor ihm mehr als 30 verschiedene Vorschläge von anderen Seiten gemacht wurden.⁴ Er war es auch, der formulierte, dass in kleinen bicyclischen Verbindungen keine Doppelbindungen an den Brückenkopfatomaten vorkommen (Bredtsche Regel).⁴

1928 wurde die antibiotische Wirkung von Penicillin aus dem Schimmelpilz *Penicillium notatum* durch FLEMMING in London entdeckt. Nachdem FLOREY und CHAIN einige Jahre später die Arbeiten über Penicillin wieder aufgenommen hatten, konnten sie 1940 das Penicillin G isolieren.⁶ Fünf Jahre später wurde die Struktur durch ABRAHAM und NEWTON aufgeklärt und 1966 durch WOODWARD mittels Totalsynthese bewiesen.⁷ Mittlerweile sind ca. 100 pharmazeutisch wirksame Naturstoffe für den Humanbereich auf dem Markt.⁵

Diese Beispiele zeigen, welche hohe Relevanz der Identifizierung von Naturstoffen innewohnt. Wie mühsam und zeitaufwändig die Umsetzung jedoch sein kann. Daher beschäftigen sich heute viele Arbeitsgruppen mit der Optimierung und Methodenentwicklung zur Trennung von Gemischen oder der direkten Identifizierung aus Gemischen.^{8,9}

Es gibt zahlreiche Ansätze zur Trennung von Gemischen zur Identifizierung von Substanzen mit anschließender Strukturaufklärung der Naturstoffe. Bevor Naturstoffe isoliert werden können, müssen jedoch zunächst die niedermolekularen Inhaltsstoffe vom polymeren Trägermaterial (Zellulose, Lignin, etc.) getrennt werden. Dies erfolgt durch eine Lösungsmittelextraktion, wobei das Lösungsmittel nach der Polarität der zu extrahierenden Stoffgruppe gewählt wird.¹⁰

Die gängigen Extraktionsverfahren zum Isolieren von Naturstoffen sind die Kaltextraktion, Extraktion mit heißen Lösungsmitteln, das Ausnutzen unterschiedlicher Löslichkeitseigenschaften, kontinuierliche Extraktion (Heißdampfextraktion, Soxhlet-Extraktion) oder die Extraktion mit flüssigen oder überkritischen Gasen.¹¹

Die genannten Extraktionsverfahren weisen jedoch eine geringe Selektivität auf, so dass komplexe Gemische vieler Naturstoffe unterschiedlicher Stoffklassen und Konzentrationen resultieren. Ein Schwerpunkt der Naturstoffchemie beschäftigt sich daher mit der Isolierung von Metaboliten, um im Anschluss gängige Analyseverfahren

zur Identifizierung anwenden zu können. Gängige Vertreter der verschiedenen chromatographischen Verfahren sind die Dünnschichtchromatographie (DC), die Säulenchromatographie (SC), Gaschromatographie (GC), Hochleistungsflüssigchromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC) oder die Festphasenextraktion (*solid phase extraction*, SPE).¹²

Allerdings ist eine vollständige Auftrennung der Extrakte mit nur einem Verfahren kaum möglich. Viele der derzeit angewendeten Methoden sind äußerst komplex oder erfordern Eingriffe in das System, wie beispielsweise durch eine Derivatisierung, um eine GC-Analyse durchführen zu können.¹³

In jedem Fall sind Isolierungen und Analysen in der Regel äußerst zeitaufwendig. Schwerwiegender werden derartige Hürden bei Metaboliten, die in Minorkonzentration vorliegen, wodurch sich der hierfür nötige Zeitaufwand stark erhöht. Im Bereich *Metabolomics* werden daher verstärkt Techniken entwickelt, die es ermöglichen sollen Metaboliten direkt aus Gemischen zu identifizieren, so dass eine Abtrennung einzelner Stoffe obsolet wird.

Die Standardmethoden zur Identifizierung von Metaboliten sind die NMR-Spektroskopie und die Massenspektrometrie. Beiden Methoden kann eine LC vorgeschaltet werden, wodurch eine Trennung der zu analysierenden Extrakte erreicht wird. Jedoch werden in vielen Publikationen aus dem Bereich *Metabolomics* diese Methoden unabhängig voneinander betrachtet. Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde in 8260 Publikationen MS zur Identifizierung von Metaboliten angewendet und 7557 Publikationen verwiesen auf ihre NMR-spektroskopischen Ergebnisse (Abbildung 1).

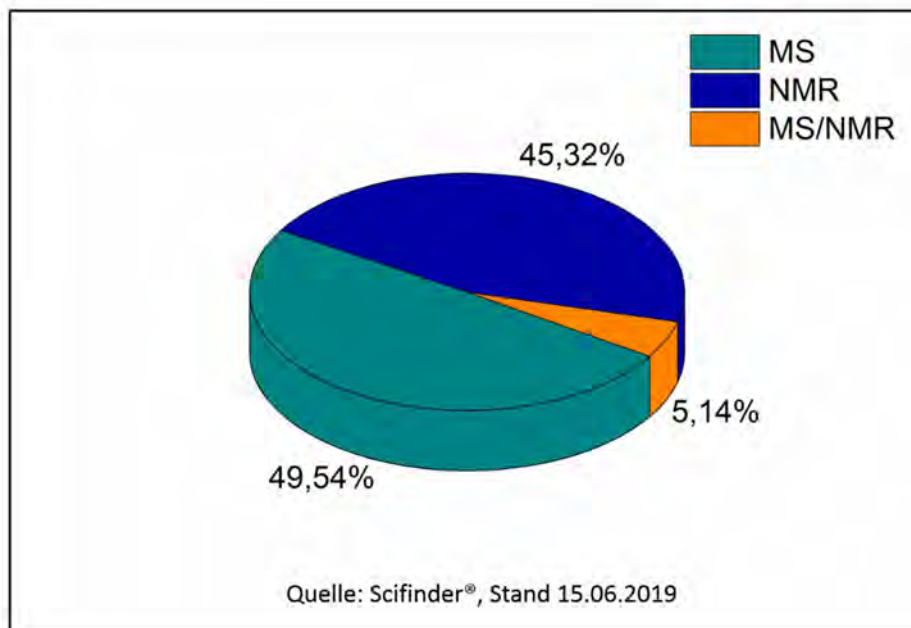


Abbildung 1: Anzahl der Veröffentlichungen, die Metabolomicsanalysen auf Basis der NMR-Spektroskopie durchgeführt haben (dunkelblau), auf Basis der Massenspektrometrie (türkis/grün) und derer, die beide Methoden angewendet haben. Es wurden die Schlagwörter „Metabolomics“, „NMR“, „MS“ verwendet. Es wurde die Suchmaschine SCIFINDER verwendet und alle jeweiligen Treffer gezählt.

Lediglich 857 und damit nur 5% der hier erfassten Publikationen haben sich beider Analysemethoden bedient. Damit ist anzunehmen, dass die Zahl derer, die diese Methode nicht nur komplementär, sondern auch kombinativ eingesetzt haben, noch geringer ist. Da die Informationen, welche aus NMR und MS erhalten werden, komplementär sind, ist eine kombinatorische Anwendung hinsichtlich einer verlässlichen und zeitsparenden Analyse von bekannten oder unbekanntem Substanzen jedoch äußerst erstrebenswert.

Bei der Identifizierung von Substanzen werden in der Regel Datenbanken zur Unterstützung verwendet. So werden chromatographische Methoden wie GC oder LC zunächst mit MS oder NMR gekoppelt und die erhaltenen Datensätze mit entsprechenden Datenbanken (z.B. HMDB – *Human Metabolome Database*) abgeglichen. Eine Validierung der Daten lässt sich anschließend mithilfe von *Spike-in* Experimenten realisieren. Hierfür wird ein bestimmter Anteil der identifizierten Substanz der analysierten Probe zugesetzt und im entsprechenden Chromatogramm oder Spektrum die Signalverstärkung beobachtet. Derartige Identifizierungen setzen jedoch einen Ein-

trag in einer Datenbank voraus und sollten als Reinsubstanz vorliegen oder darzustellen sein. Trotz der chromatographischen Methoden bleibt die Identifizierung von Metaboliten pflanzlicher Extrakte erschwert, da diese eine sehr hohe Anzahl an unterschiedlichen Sekundärmetaboliten unterschiedlichster Konzentration aufweisen.

Eine Applikation, welche die Aufreinigung von Metaboliten unnötig machen sollte wurde 2015 von R. BRÜSCHWEILER *et al.* vorgestellt, das SUMMIT MS/NMR.¹⁴ Bei dieser Methode werden zunächst zu den erhaltenen MS-Daten alle in Frage kommenden Summenformeln und anschließend alle dazu in Betracht kommenden Strukturformeln gebildet. Zu den Strukturformeln werden dann HSQC-Spektren vorhergesagt und diese mit vorab gemessenen HSQC-Spektren von Reinsubstanzen abgeglichen und auf Übereinstimmung geprüft.¹⁴

Ein weiterer Ansatz von BRÜSCHWEILER *et al.* ist die Entwicklung des sogenannten NMR/MS Translator. Dabei werden NMR-Spektren von Gemischen akquiriert und mittels Datenbankabgleich identifiziert. Anschließend werden MS-Spektren von den Reinsubstanzen erzeugt und die Muster mit den Mustern der MS-Spektren der Gemische abgeglichen.¹⁵

Beide Ansätze sind sehr komplex und lassen einen hohen zeitlichen Aufwand vermuten.

Ein anderer Ansatz von BRÜSCHWEILER *et al.* unternimmt den Versuch die Spektren zu vereinfachen. Hierbei sollen geladene Silica Nanopartikel (SNPs) zur NMR-Probe gegeben werden mit denen einige der Metaboliten interagieren sollen. Dies hat zur Folge, dass die Diffusions-Korrelationszeiten (*rotational tumbling correlation times*) dieser Metaboliten sich verlangsamen und sich so die transversale Spinrelaxationszeit beschleunigt und damit die Signale so stark verbreitern, dass sie fast vollständig verschwinden.¹⁶ Somit resultieren durchaus übersichtlichere NMR-Spektren, die die Identifizierung der verbleibenden Signale erleichtern, jedoch lassen sich weder Vorhersagen dazu machen, welche Metaboliten interagieren, noch kann darauf Einfluss genommen werden. Das bedeutet, dass die mit den Nanopartikeln interagierenden Substanzen einer Identifizierung nicht mehr zur Verfügung stehen.

NICHOLSON *et al.* illustrierten in ihrer Veröffentlichung von 2006 die Möglichkeiten der Statistischen Heterospektroskopie (SHY, *statistical heterospectroscopy*). Hierbei kamen in Metabonomics-basierten Toxikologie Studien ein 600-MHz NMR-Spektrometer sowie ein UPLC-TOF-MS zum Einsatz. Die generierten Daten wurden

nach den Messungen mithilfe der Software MATLAB korreliert, um Beziehungen zwischen einzelnen Metaboliten benennen zu können.¹⁷

Ein anderer Ansatz zur kombinativen Anwendung von MS und NMR wurde 2012 von BEHNKEN *et al.* vorgestellt. Im Rahmen dieser Methode, welche als 3DCC (*three dimensional cross correlation*) beschrieben wird, werden LC, MS und NMR kombinativ online eingesetzt. Es werden dabei mathematisch NMR-Spektren der Einzelsubstanzen berechnet und generiert ohne diese vollständig isolieren zu müssen.¹⁸

Diese Beispiele zeigen das derzeit hohe Interesse an Methoden, die der Identifizierung von Substanzen aus Gemischen dienen.

1.2 Food-Profiling

Immer wieder lassen sich Lebensmittelskandale, wie beispielsweise sogenannte Gammelfleischskandale oder der 2013 durch alle Medien gehende Pferdefleischskandal, in den Nachrichten verfolgen.¹⁹

Die Hamburg School of Food Science (HSFS) hat sich daher im Rahmen des Food-Profiling zum Ziel gesetzt, Strategien und analytische Verfahren zu entwickeln, welche es ermöglichen sollen, die Authentizität von Rohstoffen eindeutig nachzuweisen oder zuweisen zu können.¹⁹

Im Rahmen dieses ganzheitlichen Projektes, welches im Rahmen seiner Forschung alle Disziplinen der „Omics“-Kaskade abdecken soll, steht die Herkunftsanalytik von Nahrungsmitteln im Vordergrund.²⁰ Die sog. „Omics“-Kaskade umfasst dabei Untersuchungen des Genoms, des Proteoms, des Metaboloms sowie Isotopen- und Elementarmuster. All diese Bereiche sind exogen beeinflussbar und sollten daher entsprechende Informationen zur Authentizitätsbestimmung geben können.

Das Ziel ist die Erstellung eines atomaren bzw. molekularen Fingerabdrucks, welcher sowohl über die Art des Rohstoffs als auch seine Herkunft Informationen geben kann.

Idealerweise lassen sich so Bio-Marker bestimmen, welche in Standardverfahren zur Herkunftsanalyse oder Authentizitätsbestimmung herangezogen werden können. Im Zuge dieser Forschung werden derzeit unterschiedliche Lebensmittel, wie Haselnuss, Walnuss, Trüffel, Mandeln, Mais oder Spargel analysiert. Die vorliegende Arbeit verwendet Spargel als zu untersuchende Matrix. Spargel bietet sich, aufgrund

eines Wasseranteils von ca. 90 % für die Methodenentwicklung zur Analyse von hydrophilen, polaren Extrakten an.²¹

1.2.1 Weißer Gemüsespargel (*Asparagus officinalis*)

Weißer Gemüsespargel (*Asparagus officinalis*) gehört zu der Familie der *Asparagaceae*, welche den Liliengewächsen zugerechnet wird.²² Es existieren ca. 300 Arten.²³ Der Geschmack des Spargels beruht auf seinem Gehalt an Asparaginsäure. Spargel weist mit 2 % einen verhältnismäßig hohen Proteingehalt auf und zeichnet sich durch eine leicht harntreibende Wirkung aus. Dabei ist dieses Gemüse kalorienarm (Energiegehalt pro 100 g: 73 kJ = 17 kcal) und reich an Folsäure und Zink, wie der Tabelle 1 u.a. zu entnehmen.²²

Tabelle 1: Auflistung der Hauptbestandteile, Vitamine und Mineralstoffe des weißen Gemüsespargels bezogen auf 100 g.²⁴ (*Carotin = Summe aller Provitamin A-Carotinoide)²²

Hauptbestandteile	Vitamine	Mineralstoffe
Wasser: 93.6 g	Carotin*: 30 µg	Natrium: 4 mg
Proteine: 1.9 g	Vitamin E: 2000 µg	Kalium: 205 mg
Fett: 0.1 g	Vitamin B1: 110 µg	Magnesium: 20 mg
Kohlenhydrate: 2.0 g	Vitamin B2: 120 µg	Calcium: 20 mg
Ballaststoffe: 1.5 g	Folsäure: 85 µg	Eisen: 1.0 mg
Mineralien: 0.6 g	Vitamin C: 20 µg	Zink: 0.5 mg

Laut statistischem Bundesamt betrug die gesamtdeutsche Erntemenge 2018 etwa 133 000 Tonnen.²⁵ Mit deutschem Spargel lässt sich mit ein Marktwert von 10-13 €/kg, in Ausnahmen auch von mehr als 18 €/kg, erzielen.²⁶ Während im Ausland produzierter Spargel hingegen weit günstiger produziert wird und entsprechend Preise von beispielsweise 8 €/kg für griechischen Spargel erzielt werden.²⁶ Ein Verfälschen der Deklaration des Herkunftslandes führen daher zu erheblichem Schaden beim Erzeuger und nicht zuletzt auch zum Betrug am Endverbraucher. Daher ist die Entwicklung von kostengünstigen, schnellen und umfassenden Methoden zur Authentizitätsprüfung von Rohstoffen ein wichtiges Ziel zum Schutz vor derartigen Betrugsmomenten. Der weiße Gemüsespargel (*Asparagus officinalis*) eignet sich auf-

grund seines verhältnismäßig hohen Wasseranteils hervorragend zur Entwicklung einer Extraktions- und Untersuchungsmethode für die Analyse von polaren Metaboliten.

1.3 Metabolomics

Während der häufig simultan verwendete Begriff „Metabonomics“ sich mit der Antwortreaktion von Metaboliten lebender Systeme auf jeweilige biologische Stimulation oder genetischer Manipulation beschäftigt, steht der Begriff „Metabolomics“ für die Erfassung, Charakterisierung und Quantifizierung aller Metaboliten eines komplexen biologischen Systems.²⁷ Damit fügt sich Metabolomics in die Hauptdisziplinen der sogenannten Omicskaskade (Genomics, Transcriptomics, Proteomics) ein.²⁷ Diese Kaskade beschreibt alle gängigen Schritte zur Charakterisierung von biologischen Proben und ist in Abbildung 2 schematisch dargestellt.

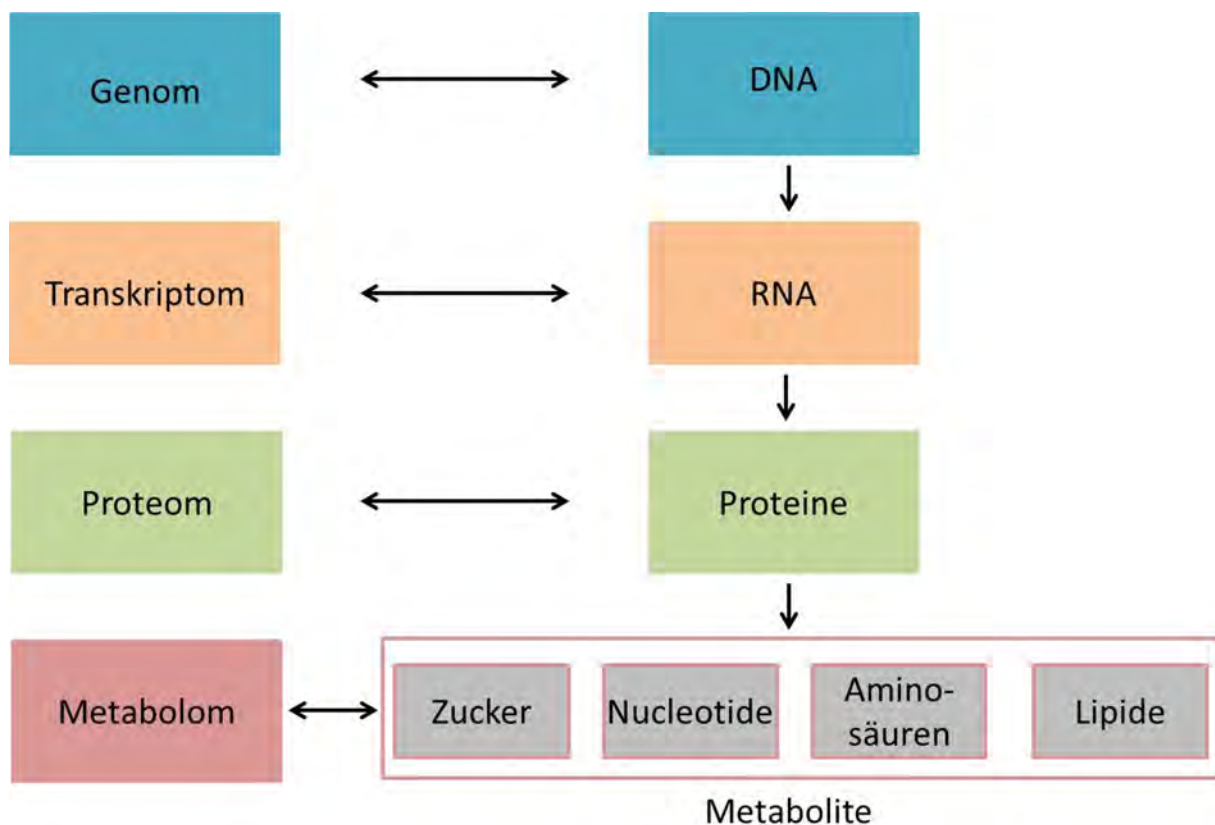


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Omics-Kaskade und ihrer Untersuchungsfelder Genomics, Transcriptomics, Proteomics und Metabolomics. Während sich Genomics mit der Untersuchung der DNA, Transcriptomics sich mit der Untersuchung von RNA und Proteomics sich mit der Untersuchung von Proteinen beschäftigt, zeichnet sich die zu untersuchende Matrix im Bereich Metabolomics durch eine höhere chemische Diversität aus, da das Metabolom verschiedene Molekülklassen beinhaltet.²⁸

Hierbei werden neben der Genom-Forschung (Genomics) die Gesamtheit der transkribierten RNAs (Transkriptomics), die Gesamtheit der produzierten Proteine mit ihren posttranslationalen Modifikationen (Proteomics) sowie die Gesamtheit der Stoffwechselprodukte (Metabolomics) untersucht.²⁸ Derartige Untersuchungen werden sowohl im Rahmen von Authentizitätsbestimmungen als auch im medizinisch/pharmazeutischen Sektor zur Bestimmung von Markern verschiedener Krankheiten angewendet.

Bereits im Mittelalter wurden Stoffwechselprodukte zur Identifizierung von Krankheiten beim Menschen genutzt. So wurden sogenannte Urintafeln verwendet, an denen sich durch Ablesen der Farbe bestimmte Krankheiten assoziieren ließen.^{29,27} Heute ist der Bereich Metabolomics verstärkt in den Fokus der aktuellen Forschung gerückt. MITCHELL *et al.* postulieren beispielsweise die Möglichkeit kleinste Änderungen im Metabolom lebendiger Organismen zu detektieren und mit Krankheit und Zellfunktion in einen Kontext zu bringen.³⁰ Sind die entsprechenden Metaboliten erst einmal identifiziert, ist ihr Einsatzgebiet vielfältig. So können sie als Biomarker Verwendung finden und damit sowohl zur Diagnose von Krankheiten als auch zur Herkunftsbestimmung von Lebensmitteln dienen.³⁰

1.3.1 Chromatographische Methoden zur Trennung polarer Metaboliten

Die Identifizierung von Naturstoffen setzt in der Regel eine Trennung der zu untersuchenden Extrakte voraus. Extrakte aus Pflanzen sind aufgrund ihrer hohen Anzahl an sekundären Metaboliten äußerst komplex. Dies lässt sich auf die hohe Diversität unterschiedlicher Substanzen sowie Substanzklassen als auch auf die starken Konzentrationsunterschiede untereinander zurückführen.

Heute gibt es verschiedene Verfahren mit denen eine Trennung oder Aufreinigung von Substanzen ermöglicht werden sollen. Diese Verfahren lassen sich je nach Applikation auf die jeweilige Fragestellung durch Variation des Lösungsmittels oder des Trägermaterials mehr oder weniger anpassen. Zu den gängigsten chromatographischen Methoden gehören die Dünnschichtchromatographie (TLC, *thin layer chromatography*), die Festphasenextraktion (SPE, *solid phase extraction*), die Säulenchromatographie (LC, *liquid chromatography*), die Hochleistungsflüssig-chromatographie (HPLC, *high performance liquid chromatography*) sowie die Gas-chromatographie (GC, *gas chromatography*).¹³

Je nach Anforderungen muss die bestmögliche Trennmethode für die jeweilige Applikation gewählt werden. Die Dünnschichtchromatographie ermöglicht einen schnellen Nachweis verschiedener Substanzen mithilfe unterschiedlicher Detektionsreagenzien. Ein großer Vorteil besteht im geringen apparativen Aufwand. Anschließende Strukturaufklärungen lassen hiermit jedoch nicht verfolgen.¹³

Mithilfe der Säulenchromatographie lassen sich komplexe Gemische, mit geringem apparativem Aufwand trennen, auffangen und mittels UV- oder Farbreaktion verfolgen.¹³ Als Sorbenz wird hierbei in der Regel Kieselgel verwendet. Wobei mit höheren Mehrkosten verbunden auch RP-Materialien zum Einsatz kommen können. Je nach Wahl der Säulengröße und -länge können unterschiedliche Trennleistungen erhalten werden und unterschiedliche mitunter sehr große Mengen, welche sich für präparative Arbeiten eignen, aufgetragen werden. Ein Fraktionieren des Eluats lässt anschließend Raum für weitere analytische Untersuchungsmethoden. Allerdings sind derartige Trennungen nicht zu reproduzieren. Der Einsatz von automatisierten Säulen ermöglicht hier bereits eine recht gute Reproduzierbarkeit der Daten. Deshalb und auch zur Optimierung der Trennleistung wird häufig auf die Verwendung einer HPLC zurückgegriffen.³¹ Zum einen lassen sich hier durch die unterschiedlichen Angebote verschiedener Säulen mit verschiedenen Trennmaterialien unterschiedlichste Anforderungen bedienen, zum anderen lassen sich die einzelnen Läufe gut reproduzierbar wiederholen und ermöglichen damit eine zielgenaue Erhöhung der Konzentration einer gewünschten Substanz.^{32,13} Zusätzlich ermöglicht der Einsatz von präparativen HPLC-Geräten das Reinigen von größeren Substanzmengen, welche spätere Strukturaufklärung mithilfe weiterer analytischer Methoden vereinfachen.³³

Da Naturstoffe eine hohe chemische Diversität aufweisen und daher unterschiedlichste Polaritäten besitzen, werden heutzutage unterschiedlichste Säulen mit modifizierten Trennmaterialien angeboten. Die übergeordneten Gruppen hierbei sind *Reversed Phase-* (RP), *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography-* (HILIC) und *Aqueous Normal Phase Chromatography-* (ANPC) Systeme.^{8,32}

RP-Systemen liegt Kieselgel als feste Matrix zugrunde, wobei die freien Hydroxylgruppen mit Kohlenstoffketten (C8 oder C18) belegt sind und so eine hydrophobe Grundmatrix bilden. Da aus sterischen Gründen nicht alle Hydroxygruppen belegt sein können, verbleibt bei diesen Säulen zusätzlich ein geringer hydrophiler Charakter. Bei RP-Säulen kommen polare Elutionsmittel wie beispielsweise Wasser, Aceto-

nitril oder Methanol zum Einsatz.^{34,35} Sie werden besonders zur Trennung von unpolaren bis mittelpolaren Substanzen eingesetzt.³⁴

Das Voranschreiten der Strukturaufklärung von Naturstoffen und das wachsende Interesse an Trennungen von polaren Gemischen führte zu einer Weiterentwicklung von RP-Säulen hin zu polaren *embedded* RP-Systemen.³⁶ Derartige Säulen verfügen über einen stärkeren hydrophilen Charakter, welcher durch funktionelle Gruppen innerhalb der Kohlenstoffkette nahe dem Kieselgel hervorgerufen wird. Das Umsetzen der freien Hydroxygruppen mit kleinen stark polaren Gruppen verstärkt diesen Effekt zusätzlich.³⁷

In einem HILIC-System werden polar-modifizierte Kieselgelpolymere als stationäre Phase verwendet.³⁸ Als mobile Phase werden hier wässrige Puffersysteme und organische Zusätze verwendet,³⁹ daher eignen sich HILIC-Systeme zur Trennung von polaren Substanzen.^{8,40}

Die ANPC-Systeme weisen als stationäre Phase eine Kieselgeloberfläche auf, die Hydridgruppen statt Hydroxylgruppen an ihrer Oberfläche präsentiert. Zusätzlich sind vereinzelt langkettige Kohlenwasserstoffketten vorhanden. Wie beim RP-System dienen Wasser und mäßig polare Lösungsmittel als Eluenten. Durch die Hydridgruppen sowie die Kohlenwasserstoffketten retardieren sowohl polare als auch unpolare Substanzen.⁸

Ein zusätzlicher Vorteil zu der unterschiedlichen Trennleistung dieser Systeme ist die Möglichkeit einer Kopplung mit einem Massenspektrometer, was eine online Verfolgung der Ionen und ihrer Masse zu Ladungs-Verhältnisse ermöglicht.⁴¹ Eine weitere chromatographische Trennmethode stellt die GC dar, welche ebenfalls eine Kopplung mit einem Massenspektrometer zur Detektion zulässt. Allerdings ist diese Anwendung auf flüchtige Substanzen beschränkt oder benötigt meist eine Derivatisierung der Analyten.

Nakabayashi et al. veröffentlichten 2015 ihre Daten zu einer schwefelhaltigen Substanz mit dem Namen Asparaptin, welche als Inhibitor gegen das Angiotensin-konvertierende Enzym (ACE) fungiert, Hierfür verwendeten sie eine Fourier-Transformierte Ionen-Zyklotron-Resonanz-Massenspektrometrie (*Fourier-transform ion cyclotron resonance mass spectrometry*, LC-FTICRMS) Analyse.⁴²

JIMÉNEZ-SANCHEZ *et al.* gelang es 2016 mittels RP-HPLC Untersuchungen 94 Metaboliten aus grünem Spargel mittels MS/MS-Analyse zu postulieren.⁴³

Im Rahmen der vorliegenden Metabolomicsarbeit kamen präparative sowie analytische RP-HPLC-Systeme mit und ohne Kopplung an Massenspektrometer zum Einsatz.

1.3.2 Massenspektrometrische Untersuchungen von Metaboliten

Nachdem bereits 1912 der erste Massenspektrograf von J. J. THOMPSON (1856-1940) entwickelt wurde gelangen zunächst die Trennung der Neonisotope 20 und 22.⁴⁴ Es folgten 1919 Massenspektrografen, welche mit Geschwindigkeitsfokussierung gekoppelt waren, wodurch 212 natürlich vorkommende Isotope unterschiedlicher Elemente entdeckt wurden. Erst in den 1960ern wurde die Massenspektrometrie aufgrund neuer Kopplung mit der Gaschromatographie zu einer starken Analysemethode zur Strukturaufklärung von Naturstoffen. In den 1980ern wurde schließlich auch die Kopplung mit der Flüssigchromatographie möglich und damit wurde die Massenspektrometrie zusammen mit der NMR-Spektroskopie zu einer der leistungsfähigsten Methoden der analytischen Chemie.⁴⁴

Die Massenspektrometrie basiert auf drei essentiellen Schritten. Zunächst wird der Analyt ionisiert, anschließend nach seinem Masse zu Ladungsverhältnis (m/z) räumlich und zeitlich getrennt und schließlich die Ionen detektiert. Durch Verstärkung der Signale bei der Detektion können niedrige Nachweisgrenzen bis in den Femtomolbereich erreicht werden.⁴⁵ Die Massenspektrometrie findet häufig in der Verifizierung von chemischen Strukturen ihren Einsatz. Allerdings lassen sich auch exakte Molekülmassen bestimmen, welche Rückschlüsse auf die Elementarzusammensetzung und damit Rückschlüsse auf die Summenformel zulassen. Diese Summenformel kann anschließend mit Strukturvorschlägen abgeglichen und verifiziert werden.⁴⁵ Im Zuge der massenspektrometrischen Analyse stehen verschiedene Ionisationsmethoden zur Verfügung. So lassen sich unter Verwendung einer Elektronenstoßionisations-Quelle (EI) Rückschlüsse auf die Struktur ziehen, da es hier zu Fragmentierungen kommt, welche spezifisch für die jeweiligen Moleküle sind. Die EI-Quelle kann aufgrund der Fragmentierung den Nachteil haben, dass die Molekülmasse sich eventuell nicht bestimmen lässt. Außerdem ist die Analyse von Gemischen durch die hohe Anzahl an resultierenden Fragmenten äußerst schwierig.⁴⁴ Weitere wichtige Ionisierungsmethoden sind u.a. die chemische Ionisierung (CI), die Matrix-Assistierte Laser-Desorptions-Ionisierung (MALDI), die Elektrosprayionisierung (ESI) oder die chemische Ionisierung unter Atmosphärendruck (APCI).⁴⁴ Bei Metabolomics Untersuchun-

gen werden insbesondere die sogenannten weichen Ionisierungsverfahren eingesetzt, wie beispielsweise ESI oder APCI, da hiermit Gemische ohne Fragmentierung der Moleküle untersucht werden können. APCI-Quellen zeigen gute Ergebnisse bei der Untersuchung von unpolaren bis leicht polaren Metaboliten während ESI-Quellen vermehrt Anwendung bei der Analyse von polaren Metaboliten finden.⁴⁶

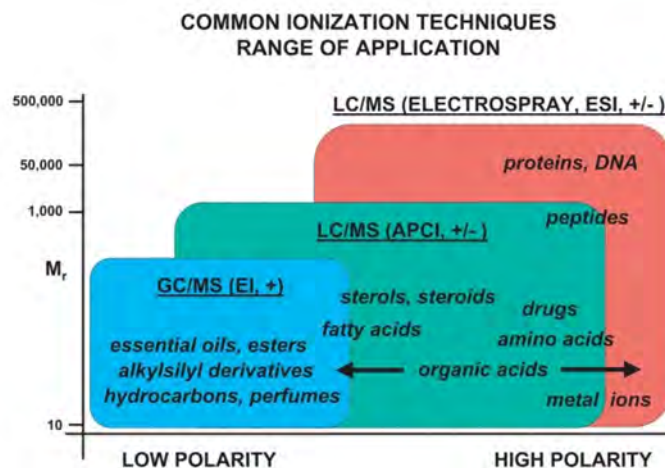


Abbildung 3: Überblick über Anwendungsbereiche gebräuchlicher GC/MS- und LC/MS-Anwendungen für unterschiedliche Substanzklassen.

1.3.3 NMR-Spektroskopische Untersuchungen von Metaboliten

Bereits 1896 wurde von P. ZEEMAN die Aufspaltung von Linien in optischen Spektren beschrieben (Zeeman-Effekt).

Weitere wichtige Erungenschaften der NMR-Spektroskopie folgten, wie 1921-1924 die Messungen von diskreten magnetischen Momenten von Atomen durch O. STERN und W. GERLACH. Im Jahre 1927 gelang ihnen zusätzlich der erste experimentelle Nachweis des Elektronenspins.⁴⁴

Die Physiker F. BLOCH und E. M. PURCELL begründeten schließlich 1946 die Methode der kernmagnetischen Resonanzspektroskopie (NMR, *nuclear magnetic resonance spectroscopy*). Zur Anwendung in der Chemie kam diese Methode ab 1949, da hier von W. D. KNIGHT der Einfluss der Umgebung auf die Resonanzfrequenz der Atomkerne erstmalig beobachtet wurde (Knight-shift).⁴⁴

Heute spielt die NMR-Spektroskopie ebenfalls eine bedeutende Rolle in der Metabolomics Forschung.⁴⁷ Sie bietet u.a. den Vorteil nicht selektiv zu sein. Das bedeutet, es können zunächst mit nur einer Messung alle NMR-aktiven organischen Verbindungen

dungen erfasst werden. Zusätzlich ist die Methode nicht destruktiv. Das bedeutet, dass eine Probe verlustfrei unterschiedlichen Experimenten unterzogen werden kann und sie bleibt somit für spätere Analysen erhalten.⁴⁸ Eine weitere Stärke der NMR-Spektroskopie liegt zusätzlich in der Strukturaufklärung. Es lassen sich Konfigurations- sowie Konformationsbestimmungen durchführen. Mithilfe von Kopplungskonstanten lassen sich dabei u.a. Diederwinkel der Bindungen in Molekülen bestimmen (Karplus-Beziehung).⁴⁹

Zusätzlich können ebenfalls Abstandsbestimmungen mittels NOE-Daten durchgeführt werden.^{50,49}

Allerdings bringt auch die NMR-Spektroskopie ein paar Nachteile mit sich. So weisen insbesondere Metabolitextrakte aufgrund der hohen Anzahl unterschiedlicher Substanzen, häufig starke Signallüberlagerungen auf, welche insbesondere die Interpretation von eindimensionalen Experimenten erschweren. Zusätzlich kann es aufgrund der starken Konzentrationsunterschiede in den Extraktgemischen, bedingt durch den dynamischen Bereich, zu Signalsuppressionen bei den Minorkomponenten kommen. Ein weiterer Nachteil ist die im Vergleich zur Massenspektrometrie geringere Sensitivität. Während in der Massenspektrometrie Konzentrationen bis in den femtomolaren Bereich gemessen werden können, lassen sich mit der NMR-Spektroskopie bis zu picomolare Konzentrationen detektieren. Dies ist insbesondere der Entwicklung von Spektrometern mit höheren Magnetfeldstärken (ab 700 MHz) und dem Einsatz von Cryotechnologie im Bereich der Probenköpfe zuzuschreiben.⁵¹

Auch im Bereich der NMR-Spektroskopie bietet sich die Nutzung von Datenbanken als Hilfsmittel zur Strukturaufklärung an. Der starke Einfluss vom Lösungsmittel und seinem pH-Wert auf die chemische Verschiebung und der hohe Anteil an noch nicht identifizierten und gelisteten Metaboliten, erfordern jedoch ein hohes Maß an Expertise bei der Auswertung sowie eine sorgfältige Prozessierung der Daten. Im Bereich Metabolomics werden immer mehr computerbasierte Analysen der NMR-Spektren durchgeführt.⁵² Hier können durch fehlerhafte Phasen- und Basislinienkorrektur schwerwiegende Fehler in der Datenauswertung auftreten, da Computerprogramme nicht zwischen starken Signalen des Rauschens, möglichen Artefakten oder relevanten basisliniennahen Signalen zu unterscheiden.⁵³

Der begrenzte dynamische Bereich macht sich auch bei Wahl des Lösungsmittels bemerkbar. Da Biomaterialien häufig im wässrigen Milieu untersucht werden, muss eine geeignete Wasserunterdrückung verwendet werden. Die gängigsten Wasserun-

terdrückungen sind u.a. *pre-saturation*, WATERGATE oder *Excitation Sculpting*. Bei der *pre-saturation* kommt es zusätzlich zur Unterdrückung der im Wasser austauschenden Protonen, wie –NH, –SH oder –OH. Um dies zu vermeiden werden WATERGATE und *Excitation Sculpting* angewendet. Die gängigsten Experimente hierbei sind 1D-NOESY, ¹³C-DEPT, JRES, TOCSY, H,H-COSY, HSQC und HMBC.²⁷ Insbesondere das 1D-NOESY Experiment wird bevorzugt als zum Messen von Protonenspektren verwendet, da hier durch den Einsatz einer Vorsättigung (*pre-saturation*) auch nahe des Lösungsmittelsignals eine korrekte Integration möglich ist.⁵⁴ Diese schmale Lösungsmittelunterdrückung wird durch zwei 90°-Pulse erzeugt, welche der Akquisition vorgeschaltet sind. Diese Art der Wasserunterdrückung basiert neben der genannten Vorsättigung vor allem auf der unterschiedlichen Spin-Gitter Relaxationen von Lösungsmittel und Analyten. Das Lösungsmittel induziert ein entgegengesetztes elektromagnetisches Feld in der Empfängerelektrode (*radiation damping*).⁵⁴ Das *radiation damping* hat einen großen Einfluss auf die Spin-Gitter-Relaxation, da die *T1*-Zeit des Lösungsmittels erheblich beschleunigt wird. Außerdem wird das sogenannte *Far-Away-Wasser* am Rand der Empfängerspulen besser unterdrückt. Zusammen werden so sehr gut reproduzierbare Spektren generiert und diese Form der Wasserunterdrückung lässt sich gut in automatisierten Messungen einsetzen.

Bei der Analyse von bekannten und unbekanntem Metaboliten ist eine Kombination unterschiedlicher NMR-Experimente ratsam, da sich aus unterschiedlichen Experimenten verschiedene Informationen zielführend zusammentragen lassen.⁵⁵ Ein Experiment, welches insbesondere bei der Identifizierung von Metaboliten aus Gemischen verschiedene Vorteile bietet, ist das selective one-dimensional total correlation spectroscopy (selTOCSY) –Experiment.^{56,57} Zusätzlich ist eine erweiterte Kombination aus sich ergänzenden NMR-Experimenten mit der Massenspektrometrie sicherlich von Vorteil, da hier u.a. Informationen über das Molekulargewicht der Substanzen erschlossen werden können.^{58,59}

Dieser kombinatorische Einsatz der zwei komplementären analytischen Methoden wird bereits erfolgreich in der Glycanalytik eingesetzt. Hier wird sich der von BEHNKEN *et al* 2012 publizierte Methode der dreidimensionalen Kreuzkorrelation (3DCC, *three-dimensional cross correlation*) bedient.¹⁸

1.3.4 Three Dimensional Cross Correlation

Die Analyse von komplexen Stoffgemischen setzt häufig eine sehr gute chromatographische Trennung, gefolgt von weiteren Isolierungs- bzw. Reinigungsschritten voraus. Dies können mitunter sehr langwierige und ressourcenkostende Prozesse in der Naturstoffanalytik sein. Im Rahmen der dreidimensionalen Kreuzkorrelation entfallen derartige Chromatographie-Schritte fast gänzlich.¹⁸ Stattdessen wird lediglich eine massenspektrometrisch detektierte Trennung mittels HPLC eingesetzt und der Lauf fraktioniert. Die so gewonnenen Fraktionen werden anschließend mittels NMR-Spektroskopie vermessen. Im Anschluss werden die erhaltenen NMR- und MS-Daten verarbeitet und korreliert. Hierbei werden aus den einzelnen NMR-Spektren sogenannte EDCs (*Extracted Delta Chromatogram*) gebildet. Dies sind Spuren entlang eines Datenpunktes auf der ppm-Skala über den Verlauf der Fraktionen hinweg. Das Analogon der MS-Daten dazu bilden die EICs (*Extracted Ion Chromatogram*). Auch hier werden die Signale über den Verlauf der Zeit/ Fraktionen betrachtet. Um diese Daten matrixgestützt miteinander korrelieren zu können, müssen die Datenpunkte auf die gleiche Anzahl gebracht werden. Dies geschieht durch reduzieren der EICs.¹⁸ Anschließend werden die Daten korreliert und zu den jeweiligen Massen die entsprechenden NMR-Spektren berechnet und erstellt. Mathematisch stehen hierfür zwei Optionen zur Verfügung. Eine ist die Optimierung der kleinsten Quadrate (*least squares optimization*, 3DCC_L). Bei dieser Variante werden Die EICs gewichtet summiert, um so eine möglichst exakte Näherung an die EDCs zu erreichen.¹⁸ In Abbildung 3 ist eine schematische Darstellung dieser Methode gezeigt.

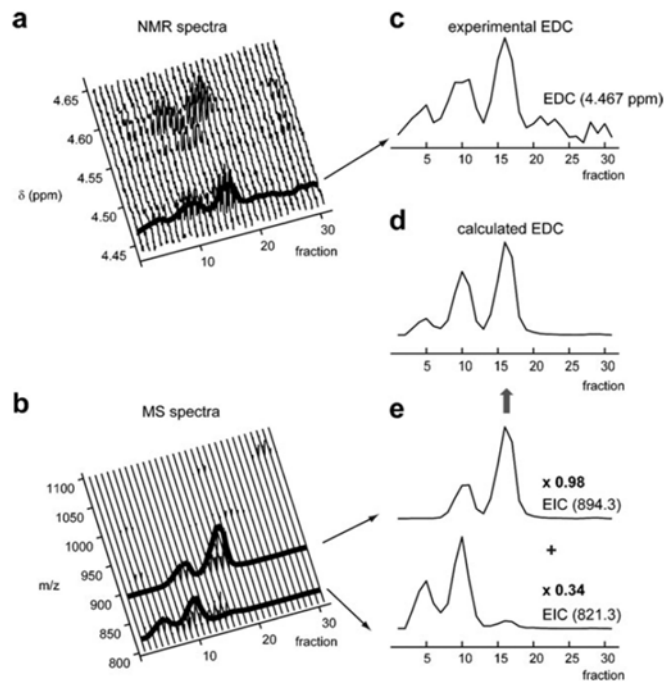


Abbildung 4: Darstellung des Schemas zur Methode 3DCC_L. (a) Betrachtung der Intensität eines NMR-Signals über den Fraktionsverlauf hinweg (EDC). (b) Gemittelte EICs unterschiedlicher m/z-Verhältnisse. (c) Auftragung eines experimentell erhaltenen EDCs. (d) Chromatogramm eines berechneten EDCs. (e) zwei EICs, welche mit dem EDC korreliert wurden. Das obere weist mit einem Korrelationskoeffizienten von 0.98 eine bessere Übereinstimmung als das untere EIC auf.¹⁸ Abbildung nach BEHNKEN *et al.*

Die Zweite Variante ist die 3DCC_C-Methode. In diesem Fall werden, durch paarweise Berechnung der Korrelationskoeffizienten, die EICs direkt mit den EDCs korreliert. Eine Multiplikation der Koeffizienten mit den aufsummierten NMR-Spektren aller Fraktionen führt zu den 3DCC_C-Spektren.¹⁸

Das Erstellen von berechneten NMR-Spektren mittels 3DCC fand bisher ausschließlich in der Glykananalytik Anwendung. Allerdings wurde bereits in der Veröffentlichung von BEHNKEN *et al.* postuliert, dass sich diese Methode auch auf weitere Stoffklassen anwenden lassen kann. Im Rahmen dieser Arbeit wird diese Methode auf ein Modellsystem unterschiedlicher Metaboliten angewendet.

1.3.5 Mathematisch Grundlagen zur Berechnung von Korrelationen

Mithilfe von Korrelationsberechnungen zweier Variablen lassen sich Übereinstimmungen von diesen einschätzen. Hierfür gibt es unterschiedliche Modelle. Im Rahmen dieser Arbeit wird die Berechnung von Korrelationskoeffizienten zweier Graphen verfolgt, um das Maß ihrer Übereinstimmung festzustellen. Im Rahmen dieser Arbeit werden die Korrelationseffizienten nach Pearson gebildet. Diese geben ein dimensionsloses Maß für die Stärke des linearen Zusammenhangs dieser beiden Graphen. Daher ist der Korrelationskoeffizient nach Pearson auch als Maßkorrelationskoeffizient beschrieben. Um den Maßkorrelationskoeffizienten berechnen zu können müssen verschiedene Voraussetzungen erfüllt sein. So müssen die zu korrelierenden Größen unabhängige Beobachtungspaare sein, die quantitativ und normalverteilt sind. Der Maßkorrelationskoeffizient (r) wird, wie in der Formel (1) beschrieben, über die Kovarianz berechnet, normiert über die Standardabweichung der Beobachtungspaare.⁶⁰

$$r = \frac{s_{xy}}{s_x \cdot s_y} = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2 \sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (1)$$

s_{xy} = empirische Kovarianz

s_x, s_y = empirische Standardabweichungen

\bar{x}, \bar{y} = Mittelwerte der zu korrelierenden Größen X und Y

n = Anzahl der Wertepaare (x_i, y_i)

Ist nun $r > 0$ liegt ein positiver Zusammenhang vor. Bei $r < 0$ liegt ein negativer Zusammenhang vor und bei $r = 0$ liegt kein linearer Zusammenhang vor.⁶⁰

Die so erhaltenen Daten werden im Rahmen dieser Arbeit dazu verwendet, festzustellen zwischen welchen EICs und EDCs ein positiver Zusammenhang besteht. Also welche NMR-Signale oder welches NMR-Signal welchem m/z -Wert zugeordnet werden kann.

2 Zielsetzung der Arbeit

Die eindeutige Identifizierung von Naturstoffen aus Gemischen stellt seit je her eine große Herausforderung dar. Die üblichen Vorgehensweisen sehen hierfür eine vollständige Isolierung der Substanzen vor, um eine genaue Charakterisierung vornehmen zu können. Heutzutage wird sich jedoch vermehrt der direkten Identifizierung aus Gemischen gewidmet. Dies soll möglichst zeit- und ressourcensparend sein, weswegen auf individuelle Trennverfahren verzichtet werden soll. Mithilfe von LC-MS und MS/MS Techniken lassen sich mittlerweile Gemische in kurzer Zeit screenen und datenbankgestützt zuordnen. Allerdings lassen derartige Techniken eine Verifizierung der Daten missen und auch die Identifizierung von noch unbekanntem und nicht gelisteten Metaboliten ist hiermit kaum möglich. Mithilfe von NMR-Experimenten lässt sich hingegen eine Strukturaufklärung unbekannter Substanzen durchführen, jedoch stellt die hohe Anzahl an unterschiedlich konzentrierten Metaboliten in einem Extrakt eine große Hürde dar. Eine kombinatorische Methode, welche sich die Stärken dieser beiden analytischen Methoden zunutze macht, könnte hier der Schlüssel zur eindeutigen Identifizierung von Metaboliten aus komplexen Extrakten darstellen. Daher sollte im Rahmen dieser Dissertation zunächst die publizierte Methode der 3DCC, welche bereits erfolgreich zur Identifizierung von Glykanen aus Gemischen Anwendung findet, auf ihre Anwendbarkeit im Hinblick auf Identifizierung von Metaboliten geprüft werden. Analog dazu soll eine angepasste Strategie zur Identifizierung von Metaboliten aus Extrakten entwickelt werden. Hierbei sollen folgende Faktoren besonders berücksichtigt werden: Die Methode soll unabhängig von der Stoffklasse auf alle Metaboliten anwendbar sein, sie soll zeit- und ressourcensparend sein und in ihrer Anwendung so simpel wie möglich. Abschließend sollen, wenn möglich die erhaltenen Daten verifiziert werden, z.B. über Spike in Experimente. Zukunftsweisend soll eine Strategie entwickelt werden, welche es ermöglichen soll im Rahmen der Herkunftsanalytik identifizierte Biomarker eindeutig strukturell zu identifizieren. Damit sollen Wege zu neuen Applikationen im Rahmen der Herkunftsanalytik eröffnet werden.

3 Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Tabelle 1: Liste der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller.

Chemikalie	Hersteller
2-Hydroxyacetophenon	Fluka BioChemika
2,3-Dihydroxybenzoesäure	Merck
2,3,4-Trimethylpyrazin	Fluka BioChemika
2,3,5,6-Tetramethylpyrazin	Fluka BioChemika
2,6-Dimethylpyrazin	Fluka BioChemika
3-Aminobuttersäure	Merck
4-Methylpyrimidin	Fluka BioChemika
Acetonitril, HPLC grade, $\geq 99.9\%$	Sigma Aldrich
Ameisensäure, $\sim 98\%$, p.a.	Grüssing, Diagnostika Analytika
Deuteriumoxid	Deutero GmbH
Deuteriumchlorid (1M)	Merck
L-Alanin	Fluka BioChemika
L-Glutamin	Fluka BioChemika
L-Glutaminsäure	Fluka BioChemika
L-Histidin	Fluka BioChemika
L-Lysin	Fluka BioChemika
L-Phenylalanin	Fluka BioChemika
L-Prolin	Merck
L-Threonin	Merck
L-Tyrosin	Merck

L-Valin	Fluka BioChemika
Natriumazid	Merck
Niacin	Fluka BioChemika
Nicotinamid	Fluka BioChemika
TMSP	Deutero GmbH

3.2 Geräte

Tabelle 2: Liste der verwendeten Geräte und Materialien und deren Hersteller.

Geräte/Materialien	Hersteller
Amicon [®] Ultra-0.5 Zentrifugenfilter	Merck
Analysenwaage	Sartorius Analytic
Avance III HD NMR-Konsole	Bruker
ESI-Q-TOF 6224 TOF LC/MS 1200 Series	Agilent Technologies
ESI-q/TOF „maXis“	Bruker Daltonics
Fractions Collector	Advantec, SF-3120, Toyo Kaisha, Ltd.
HPLC (präperativ), Agilent 1200 series	Agilent Technologies
Gefriertrocknungsanlage	CHRIST [®] , Typ: 101541
NMR-Röhrchen 5 mm	Deutero GmbH
NMR-Röhrchen 3 mm	Deutero GmbH
NMR-Spektrometer 600 MHz	Bruker
Pipetten	Research (variabel), Eppendorf Deutschland
Pipettenspitzen	e.T.I.P.P.S Eppendorf

RP (NUCLEOSHELL [®])	Macherey-Nagel
RP (NUCLEODUR ISIS [®])	Macherey-Nagel
RP (NUCLEODUR PYRAMIDE [®])	Macherey-Nagel
RP (CHROMABOND [®])	Macherey-Nagel
Sepacore [®] Flash Systems (Control Unit C-620, Fraction Collector C-660, UV Photometer C-640)	Büchi
SpeedVac	Savant, SPD121P
Spin-X [®] , 0.22 µM Zentrifungenfilter	Costar
Spin-Tubes, 2 mL	SafeLock [®] , Eppendorf
UHPLC „Dionex 3000“	Thermo Scientific
Zentrifuge	5417 R Eppendorf AG

3.3 Software

Tabelle 3: Liste der verwendeten Software.

Software	Firma
Agilent Mass Hunter	Agilent Technologies
ChemDraw Pro 18.1	CambridgeSoft
ChemStation B.04.03	Agilent Technologies
Compass Data Analysis, Version 4.0 SP 4	Agilent Technologies
MATLAB R2011b	MathWorks
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation
OriginPro 8.5.0G SR1	OriginLab Corporation
TopSpin [®] 3.1, 4.0	Bruker BioSpin GmbH

3.4 Methoden

3.4.1 Vorbereitung der Spargelproben

Als Matrix diente im Rahmen dieser Arbeit weißer Gemüsespargel. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde bei der Vorbereitung besonderer Wert auf die Konservierung der Proben gelegt, falls diese nicht umgehend Verwendung fanden. Bei allen Spargelproben wurde ausschließlich frischer Spargel, welcher direkt an Spargelhöfen erworben wurde, verwendet. Bereits bei der Lieferung des Spargels wurde dieser auf Eis gekühlt.

Spargelproben 1

Zur Lagerung und Konservierung der Metaboliten wurde der Spargel vor seiner Weiterverarbeitung bei -20 °C gelagert. Anschließend wurde der Spargel unter Zugabe von Trockeneis mithilfe einer Messermühle zerkleinert und homogenisiert und 24 Stunden an einer Gefriertrocknungsanlage getrocknet. Anschließend wurden die Spargelproben gerührt und weitere 24 Stunden gefriergetrocknet. Für die Untersuchung wurden aufgrund der benötigten Probenmengen Lyophilisate verschiedener Spargelproben unterschiedlicher Herkunft vereinigt und anschließend verwendet. Alle Proben wurden bis zur Verwendung bei -20 °C gelagert.

Spargelprobe 2

Für die Spargelprobe 2 wurden 15 cm lange Stangen frischen Spargels des Hofes Schäfer, Schleswig Holstein, Jahrgang 2017, im gefrorenen Zustand mit einem Messer zerkleinert und anschließend gefriergetrocknet. Der getrocknete Spargel wurde anschließend mithilfe eines Mörsers homogenisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Spargelprobe 3

Für die Spargelprobe 3 wurden 15 cm lange Stangen frischen Spargels des Hofes Bohrer, Schleswig Holstein, Jahrgang 2018, im gefrorenem Zustand mit einem Mes-

ser zerkleinert und anschließend gefriergetrocknet. Der getrocknete Spargel wurde anschließend mithilfe eines Mörsers homogenisiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Extraktion der Spargelprobe 1

Zur Extraktion der Spargelprobe 1 wurden jeweils 100 mg des getrockneten, homogenisierten Spargels eingewogen und mit 1 mL Methanol versetzt. Es wurden zusätzlich drei entfettete Stahlkugeln ($\varnothing = 2$ mm) hinzugegeben und die Proben mittels Kugelmühle bei 3.1 m/s zur Proteinfällung dreimal je fünf Minuten extrahiert. Zwischen den Extraktionsschritten wurden jeweils fünf Minuten Inkubationszeit eingehalten. Anschließend wurde das Methanol im Stickstoffstrom entfernt und den Proben 1.5 mL Millipore Wasser hinzugefügt. Die Proben wurden erneut mittels Kugelmühle dreimal je fünf Minuten extrahiert mit jeweils fünf minütigen Inkubationspausen. Anschließend wurden die Proben 30 Minuten bei 4 °C und 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen, in Vials überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Extraktion der Spargelprobe 2

Zur Extraktion der Spargelprobe 2 wurden jeweils 1.0 g getrockneter und homogenisierter Spargel in einen Kolben eingewogen und mit 10 mL Methanol versetzt. Es wurde 90 Minuten zur Proteinfällung bei Raumtemperatur (RT) gerührt und das Lösungsmittel anschließend unter vermindertem Druck entfernt. Es wurden weitere 15 mL Millipore Wasser hinzugefügt und weitere 90 Minuten zur Extraktion bei RT gerührt. Die Mischung wurde für 30 Minuten bei 4 °C und 15000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in 1.5 mL Aliquots eingeteilt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

Extraktion der Spargelprobe 3

Zur Fällung der Proteine bei Spargelprobe 3 wurden 12.4 g Spargelhomogenisat in 124 mL Methanol aufgenommen und 60 Minuten gerührt. Nachdem das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt wurde, wurden erneut 124 mL Methanol hinzu-

gefügt und weitere 60 Minuten gerührt. Nach erneutem Entfernen des Lösungsmittels unter vermindertem Druck wurden 103 mL Methanol und 103 mL Millipore Wasser hinzugefügt und weitere 90 Minuten zur Extraktion gerührt. Anschließend wurde das Gemisch 30 Minuten bei 4 °C und 11000 g zentrifugiert und der Überstand gefriergetrocknet in Milliporewasser aufgenommen und mittels *Cut-off*-Filter gereinigt. Anschließend wurden die Überstände aliquotiert. Es wurden 26 Aliquots mit je 1 mL erhalten.

Die restlichen Überstände wurden erneut bei 4 °C und 11000 g zentrifugiert und der Überstand in einen Rundkolben überführt. Nach Gefriertrocknung des Extraktes, wurde der Rückstand in 6 mL Milliporewasser aufgenommen und ebenfalls mittels *Cut-off*-Filtration gereinigt. Der Überstand wurde erneut gefriergetrocknet und anschließend in 4 mL Milliporewasser mit einem Zusatz von 0.1 % FA aufgenommen.

3.5 Analytische Methoden

3.5.1 Flüssigchromatografie

3.5.1.1 Trennung des 8-Stoffgemisches an einer präparativen HPLC

Das erstellte 8-Stoffgemisch wurde mittels präparativer HPLC der Firma Agilent Technologies an einer RP C18 (NUCLEODUR® ISIS, semipräparativ) Säule getrennt. Die Säulenlänge betrug 250 mm, der Säulendurchmesser 21 mm bei einer Partikelgröße von 5 µm. Der verwendete Gradient ist in Abbildung 5 graphisch dargestellt. Der Flow betrug während des gesamten Laufs 10 mL/min.

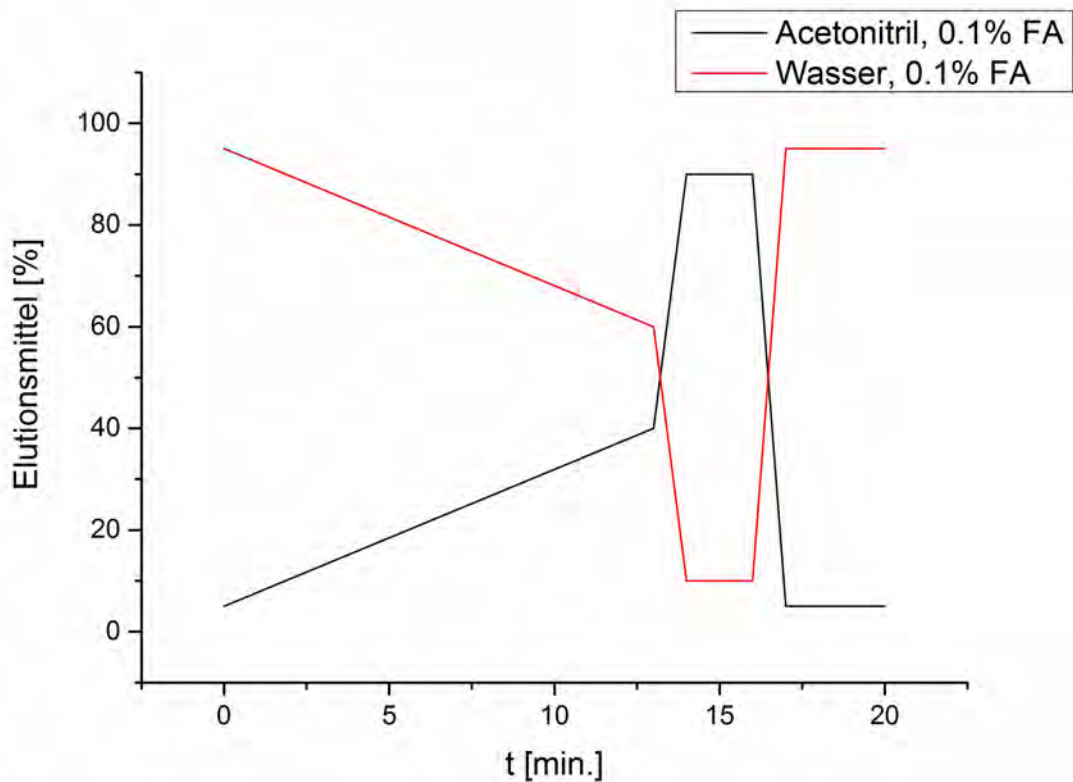


Abbildung 5: Graphische Darstellung des Gradienten der HPLC-Trennung des 8-Stoffgemisches. Min. 0: 5% Eluent B, Min. 13: 40% Eluent B, Min. 14: 90% Eluent B, Min. 16: 90% Eluent B, Min. 17: 5% Eluent B, Min. 20: 5% Eluent B.

Der Lauf wurde alle 10 Sekunden fraktioniert, die einzelnen Fraktionen aufgefangen und das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt (SpeedVac). Anschließend wurden die Fraktionen jeweils in 600 μL deuteriertem PBS-Puffer aufgenommen in 5 mm NMR-Röhrchen überführt und NMR-spektroskopisch vermessen.

3.5.1.2 Trennung 1 - Spargelprobe 1

Zur Trennung der Spargelprobe 1 wurde eine präparative HPLC verwendet. Als stationäre Phase diente eine NUCLEODUR® C18 PYRAMIDE von Macherey-Nagel (250 mm Länge, 10 mm Durchmesser, 5 μm Porengröße). Als Eluent A diente Milliporewasser mit einem Zusatz von 0.5% (v:v) Essigsäure (pH 2.9). Als Eluent B wurde Methanol mit einem Zusatz von 0.5% (v:v) Essigsäure (pH 2.7) eingesetzt. Es wurden je Lauf 400 μL des Extraktes injiziert. Die eingestellte Flussrate betrug während des gesam-

ten Laufs 4 mL/min. Der verwendete Gradient ist in Abbildung 6 graphisch dargestellt.

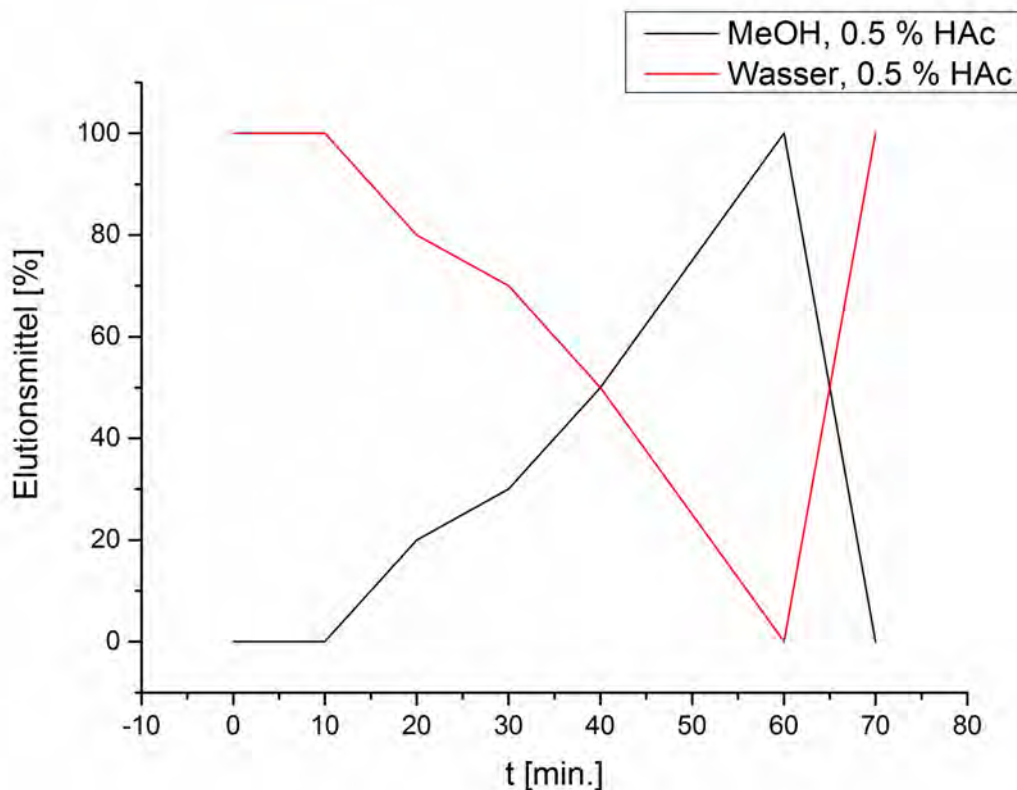


Abbildung 5: Graphische Darstellung des Gradienten der HPLC-Trennung 1 der Spargelprobe 1. Min. 0: 0% Eluent B, Min. 10: 0% Eluent B, Min. 20: 20 % Eluent B, Min. 30: 25% Eluent B, Min. 60: 100% Eluent B, Min. 70: 0% Eluent B.

3.5.1.2 Trennung 2 - Spargelprobe 2

Die Trennung der Spargelprobe 2 wurde an einer analytischen HPLC der Firma Dionex durchgeführt und mittels ESI-q/TOF Detektor verfolgt. Als stationäre Phase diente eine NUCLEODUR[®] C18 PYRAMIDE Säule von der Firma Macherey-Nagel (250 mm Länge, 2 mm Durchmesser, 5 µm Porengröße). Als Eluent A diente Milliporewasser mit einem Zusatz von 0.1% (v:v) Ameisensäure (pH 3). Als Eluent B wurde Acetonitril mit einem Zusatz von 0.1% (v:v) Ameisensäure (pH 2.9) eingesetzt. Der Lauf wurde 65 mal wiederholt. Die Fraktionen von 10 Läufen wurden für erneute Messungen an dem HPLC-MS System vereint. Die Fraktionen der übrigen 55 Läufe wurden jeweils vereint, das Lösungsmittel unter vermindertem Druck entfernt (SpeedVac), anschließend in 600 µL dPBS-Puffer aufgenommen und NMR-spektroskopisch vermessen. Es wurden je Lauf 10 µL des Extraktes injiziert. Die eingestellte Flussrate betrug

während des gesamten Laufs 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. Der verwendete Gradient ist in Abbildung 7 graphisch dargestellt.

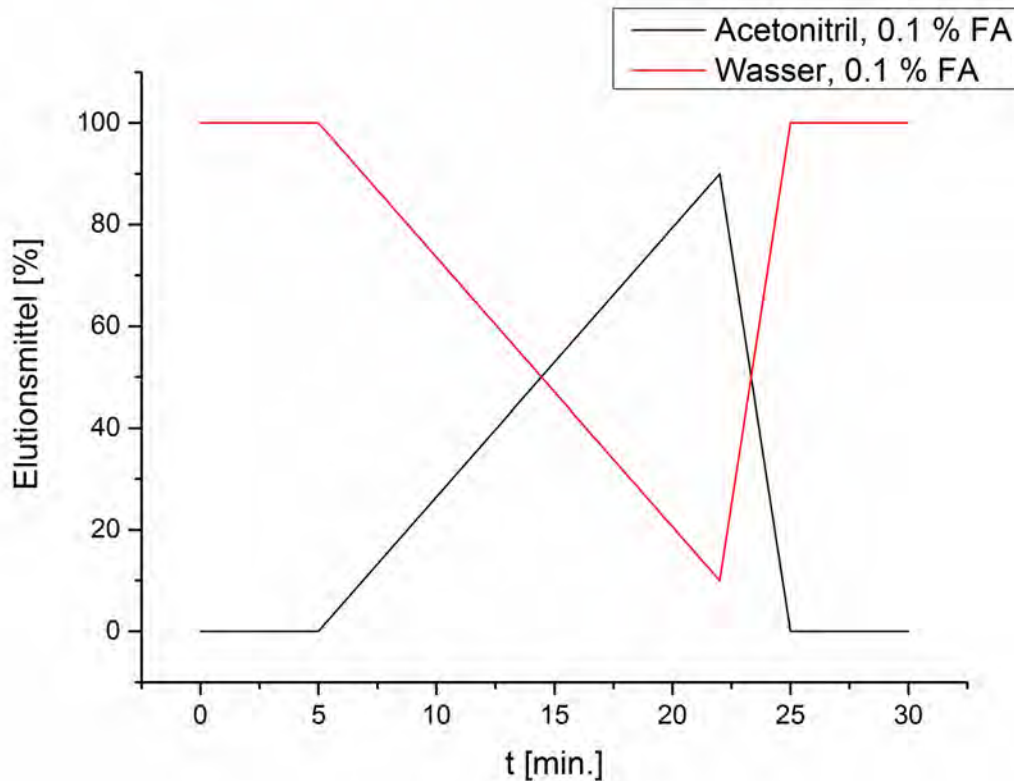


Abbildung 7: Graphische Darstellung des Gradienten der HPLC-Trennung 2 der Spargelprobe 2. Min. 0: 0% Eluent B, Min. 5: 0% Eluent B, Min. 20: 90% Eluent B, Min. 25: 0% Eluent B, Min. 30: 0% Eluent B.

3.5.1.3 Trennung 3 - Spargelprobe 3

Zur Trennung der Spargelprobe 3 wurde erneut eine präparative HPLC der Firma Agilent Technologies verwendet. Als stationäre Phase diente eine NUCLEODUR® C18 PYRAMIDE von Macherey-Nagel (250 mm Länge, 10 mm Durchmesser, 5 μm Porengröße). Als Eluent A diente Milliporewasser mit einem Zusatz von 0.1% (v:v) Ameisensäure (pH 3). Als Eluent B wurde Acetonitril mit einem Zusatz von 0.1% (v:v) Ameisensäure (pH 2.9) eingesetzt. Es wurden je Lauf 400 μL des Extraktes injiziert. Die eingestellte Flussrate betrug während des gesamten Laufs 4 mL/min . Der verwendete Gradient ist in Abbildung 8 grafisch dargestellt.

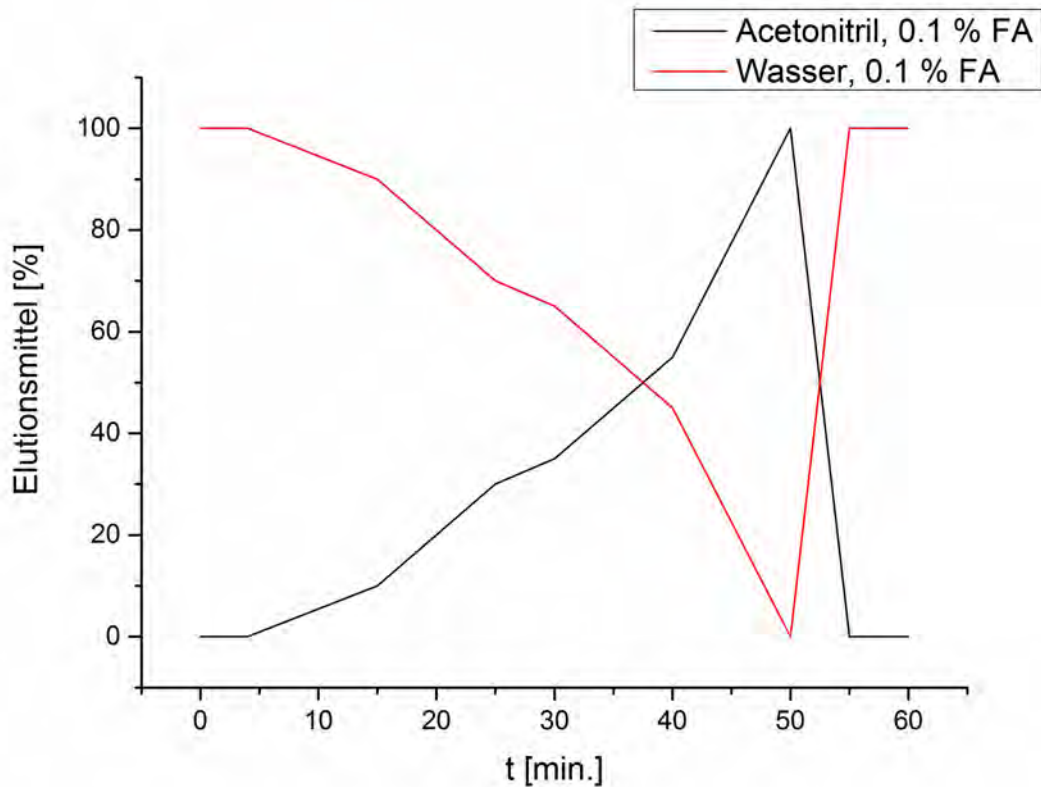


Abbildung 6: Graphische Veranschaulichung des Gradienten der HPLC-Trennung 3 der Spargelprobe 3. Min. 0: 0% Eluent B, Min. 4: 0% Eluent B, Min. 15: 10% Eluent B, Min. 25: 30% Eluent B, Min. 30: 35% Eluent B, Min. 40: 55% Eluent B, Min. 50: 100% Eluent B, Min. 55: 0% Eluent B, Min. 60: 0% Eluent B.

3.5.1.4 Trennung 4 - Spargelprobe 3

Zur Trennung 4 der Spargelprobe 3 wurde eine präparative HPLC der Firma Büchi verwendet. Als stationäre Phase diente eine C18 Phase. Als Eluent A wurde Milliporewasser mit einem Zusatz von 0.1% (v:v) Ameisensäure (pH 3) verwendet. Als Eluent B wurde Acetonitril mit einem Zusatz von 0.1 % (v:v) Ameisensäure (pH 2.9) eingesetzt. Die Flowrate betrug 35 mL/min. Es wurden für den HPLC-Lauf 2 mL des Extraktes injiziert. Der verwendete Gradient ist in Abbildung 9 graphisch dargestellt.

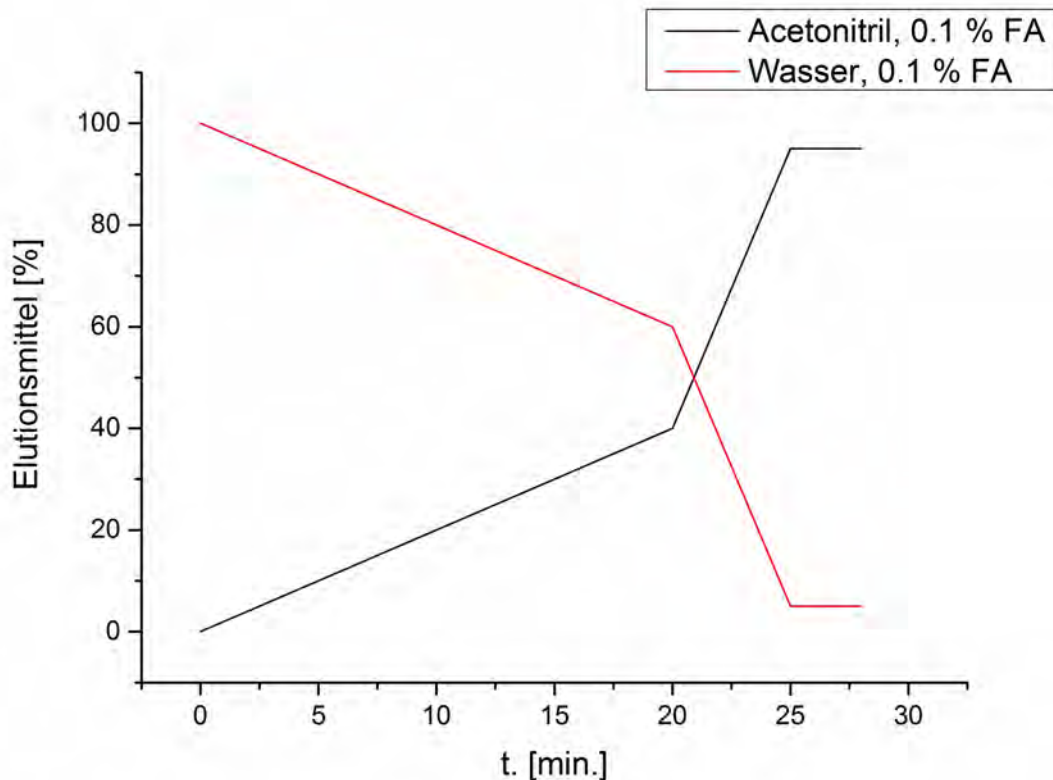


Abbildung 9: Graphische Darstellung des Gradienten der HPLC-Trennung 4 der Spargelprobe 3. Min. 0: 0% Eluent B, Min. 20: 40% Eluent B, Min. 25: 95% Eluent B, Min. 28: 95% Eluent B.

3.5.2 NMR-Spektroskopische Analysen

3.5.2.1 Herstellung der NMR-Puffer

Puffer 1 (8-Stoffgemisch)

Zur Herstellung des Puffers 1 wurden 2.25 g (13 mmol) Dikaliumhydrogenphosphat sowie 4.18 g (30 mmol) Kaliumdihydrogenphosphat eingewogen, Natriumazid hinzugegeben und anschließend in 200 mL D₂O gelöst. Anschließend wurden 28 mg TMSP (1.5 mmol) hinzugegeben und der pH-Wert mit 1 mL einer gesättigten NaOD-Lösung auf 7.8 eingestellt.

Puffer 2 (Spargelprobe 1 und 2)

Zur Herstellung des Puffers 2 wurden 1.13 g (6 mmol) Dikaliumhydrogenphosphat sowie 2.09 g (15 mmol) Kaliumdihydrogenphosphat eingewogen, eine Spatelspitze Natriumazid hinzugegeben und anschließend in 100 mL D₂O gelöst. Anschließend

wurde 1 mL einer 200 M TMSP-Stammlösung (2 mM) hinzugegeben und der pH-Wert mit 1 mL einer 4 M NaOD-Lösung auf 7.8 eingestellt.

Puffer 3 (Spargelprobe 3)

Zur Herstellung des Puffers 3 wurden 3.49 g (20 mmol) Dikaliumhydrogenphosphat und 2.73 g (20 mmol) Kaliumdihydrogenphosphat eingewogen und eine Spatelspitze Natriumazid hinzugegeben und anschließend in 190 mL D₂O gelöst. Anschließend wurden 200 µL einer 0.2 molaren TMSP-Lösung hinzugegeben und der pH-Wert mit 1.4 mL einer gesättigten NaOD-Lösung auf 7.79 eingestellt. Anschließend wurden weitere 8.6 mL D₂O hinzugegeben und der pH-Wert erneut geprüft. Die Konzentration des TMSP wurde nachträglich mithilfe von Eretic auf 0.18 mM berechnet.

3.5.2.2 Analysen zur Reinheit der verwendeten Substanzen und Materialien

3 mm NMR-Röhrchen

Um die Konzentration der NMR-Proben zu maximieren, wurden 3 mm NMR-Röhrchen verwendet (Abschnitt 4.2.2). Die 3 mm NMR-Röhrchen wurden zunächst im Plasmaofen von möglichen produktionsbedingten Rückständen befreit. Hierfür wurden die Röhrchen zwei Minuten im Plasmaofen bei der Stufe Hi gelagert.

Zentrifugenfilter

Die Membran der verwendeten Zentrifugenfilter beinhaltet Glycerin. Um dies nicht als Verunreinigung im Extrakt zu erhalten, wurden die Filter mit 0.1 M NaOH-Lösung gewaschen. Dafür wurden 400 µL der NaOH-Lösung aufgegeben und 15 Minuten bei 15000 g zentrifugiert. Anschließend wurde das Filtrat entfernt. Der Schritt wurde sechsmal wiederholt. Anschließend wurden 400 µL Puffer 2 aufgegeben und nach 15 minütiger Zentrifugation wurde das Filtrat ebenfalls entsorgt. Zuletzt wurde dieser Schritt zweimalig wiederholt, das Filtrat jedoch behalten und NMR-spektroskopisch vermessen. Das Waschen wurde solange wiederholt bis keine Glycerinspuren mehr im NMR-Spektrum ersichtlich waren.

3.5.2.3 Erstellen der NMR-Proben

Die Proben des Mehrstoffgemisches sowie alle NMR-Proben der Spargelprobe 1 wurden in 650 μL des entsprechenden deuterierten PBS-Puffers (Abschnitt 3.5.4.1) aufgenommen und 30 Sekunden mittels Vortexer homogenisiert. Mögliche Schwebstoffe wurden mithilfe von Zentrifugenfiltern (Spin-X[®]) entfernt und die Proben anschließend in 5 mm NMR-Röhrchen überführt.

Für spätere Analysen wurden die Fraktionen der Spargelprobe 1 nachträglich mittels Gefriertrocknung getrocknet, in 200 μL deuterierten PBS-Puffer (dPBS) wieder aufgenommen und in 3 mm NMR-Röhrchen überführt.

Die NMR-Proben der Spargelproben 2 und 3 wurden in 600 μL dPBS-Puffer aufgenommen und in 5 mm NMR-Röhrchen überführt.

3.5.2.4 NMR-Datenakquise- und prozessierung

Alle NMR-spektroskopischen Messungen der vorliegenden Arbeit wurden an einem Avance III HD 600 MHz Spektrometer der Firma BRUKER durchgeführt. Die Protonenspektren wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, mit der Pulssequenz *zgpgp* aufgenommen. Die Spektren wurden, wenn nicht anders gekennzeichnet, mit 32 *scans* (NS) und je 2 *dummy scans* (DS) aufgezeichnet. Die spektrale Weite betrug 9615 Hz bei einem O1 von 2815.48 Hz (4.691 ppm) und einer Akquisitionszeit von 1.70 s. Der Relaxationsdelay (D1) lag bei 1 s und der *Digitization mode* war bei allen Messungen auf digital eingestellt. Nach der Akquisition wurden die Spektren folgendermaßen prozessiert: Fourier-Transformation (ft), Phasenkorrektur (apk), Basislinienkorrektur ohne automatische Integration (absn), Glättung (efp, LB = 0.3 Hz) und anschließende manuelle Phasenkorrektur aller einzelnen Spektren.

Bei den *se*/TOCSY- und *se*/NOESY-Spektren wurde der GPZ0-Wert des z-Filters für alle Messungen auf 9% eingestellt. Der LB wurde auf 3 prozessiert. Die Signale der sechs identifizierten Substanzen des Mehrstoffgemisches aus Kapitel 4.1 sind im Anhang aufgeführt. Die NMR-Daten der identifizierten Metaboliten sowie die NMR-Daten der gemessenen Fraktionen sind im Ergebnisteil aufgeführt.

3.5.3 Massenspektrometrische Analyse

Die durchgeführten Arbeiten erfolgten entweder an einem ESI-Q-TOF 6224 TOF LC/MS 1200 Series der Firma Agilent Technologies, welches an die präparative HPLC gekoppelt war oder an einem ESI-q/TOF „maXis“ der Firma BRUKER DALTONICS, welches an die analytische UHPLC „Dionex 300“ der Firma *THERMO SCIENTIFIC* gekoppelt ist. Es wurde immer sowohl im positiven als auch im negativen Ionenmodus gemessen. Die *Massrange* wurde auf 80 bis 1200 *m/z* eingestellt. Abweichende Messparameter sind an den entsprechenden Stellen aufgeführt.

3.5.4 3DCC/ Datenprozessierung

Im Rahmen der dreidimensionalen Kreuzkorrelationsanalyse in Kapitel 4.1 wurden Daten aus einem LC-MS Lauf und die der NMR-spektroskopisch vermessenen Fraktionen miteinander korreliert. Dafür mussten zunächst die *Extracted Ion Chromatograms* (EIC) der einzelnen Substanzen extrahiert werden. Außerdem wurden die aus dem LC-Lauf erhaltenen Fraktionen gefriergetrocknet, in dPBS aufgenommen und Protonenspektren mittels NMR-Spektroskopie gemessen. Die Verfolgung der Signalintensität entlang einer chemischen Verschiebung entspricht einem *Extracted Delta Chromatogram* (EDC). Die Korrelation der EICs und EDC basiert auf Matrizenrechnung, daher mussten die Datenpunkte der EICs zunächst auf die Anzahl der gemessenen NMR-Fraktionen reduziert werden. Dies geschah mithilfe der Software Matlab. Die NMR-Daten wurden, wie im Abschnitt 3.5.4.4 beschrieben, prozessiert und anschließend in Matlab importiert.

3.5.6 Erstellung des 8-Stoffgemisches

Für eine reproduzierbare Methodenentwicklung zur Untersuchung von Metaboliten mittels 3DCC wurde ein Mehrstoffgemisch erstellt und untersucht.

Hierfür wurden zunächst 13 Stammlösungen einzelner Substanzen in Elutionsmittel A (Wasser, 0.1% FA) hergestellt. Anschließend wurde aus je 100 μL Stammlösung ein 8-Stoff-Gemisch erstellt und in ein Vial überführt. Die verwendeten Substanzen und ihre Konzentrationen sind in Tabelle 4 aufgeführt.

Tabelle 4: Verwendete Substanzen für die Erstellung eines Mehrstoffgemisches. Substanzen von denen eine Stammlösung erstellt wurde sind mit entsprechender Konzentration angegeben. Substanzen ohne Angabe (-) zeigten keine Löslichkeit im Elutionsmittel A und standen zur Erstellung des Mehrstoffgemisches nicht zur Verfügung.

Substanzname	Molare Masse [g/mol]	Konzentration der Stammlö- sung [mM]	Konzentration im Gemisch [mM]
3-Aminobuttersäure	104.06	153.6	9.6
2,3-Dihydroxybenzoesäure	154.03	103.9	6.5
2,6-Dimethylpyrazin	108.07	-	-
L-Glutamin	146.14	109.5	6.8
2-Hydroxyacetophenon	136.05	-	-
L-Isoleucin	132.09	121.2	7.6
L-Lysin	146.19	109.4	6.8
4-Methylpyrimidin	94.05	-	-
Niacin	124.03	129.0	8.0
Nicotinamid	123.04	130.0	5.4
2,3,5,6-Tetramethylpyrazin	136.10	-	-
2,3,4-Trimethylpyrazin	122.08	-	-
L-Tryptophan	204.09	78.4	4.9

4 Ergebnisse und Diskussion

Im folgenden Abschnitt werden alle im Rahmen dieser Promotionsarbeit entwickelten Strategien sowie erhaltenen Daten aufgeführt und näher erläutert.

4.1 Validierung unterschiedlicher Extraktionen aus Spargel mittels

NMR-Spektroskopie

Teile des folgenden Abschnitts wurden im Rahmen der von mir betreuten Bachelorarbeit von Simon Sander (2016) erstellt.⁶¹

Zunächst wurden verschiedene Extraktionen mit unterschiedlichen Lösungsmitteln durchgeführt (Abbildung 4). Die Extraktionen erfolgten nach dem Protokoll aus Abschnitt 3.4.1 (Extraktion der Spargelprobe 1), wobei das Lösungsmittel Wasser je nach Kennzeichnung durch Methanol oder Acetonitril ersetzt wurde. Die unterschiedlichen Extraktionen wurden im Hinblick auf ihre Signalstärke, Signalintensität sowie Überlagerungen der Signale geprüft. Für die vorliegende Arbeit sollten möglichst viele Signale mit einer Extraktion erfasst werden. Daher wurde mit Lösungsmitteln unterschiedlicher Polarität gearbeitet. Es kamen dafür Wasser, Methanol und Acetonitril als Extraktionsmittel zum Einsatz. Die NMR-Spektren der einzelnen Extrakte sind im Folgenden aufgeführt.

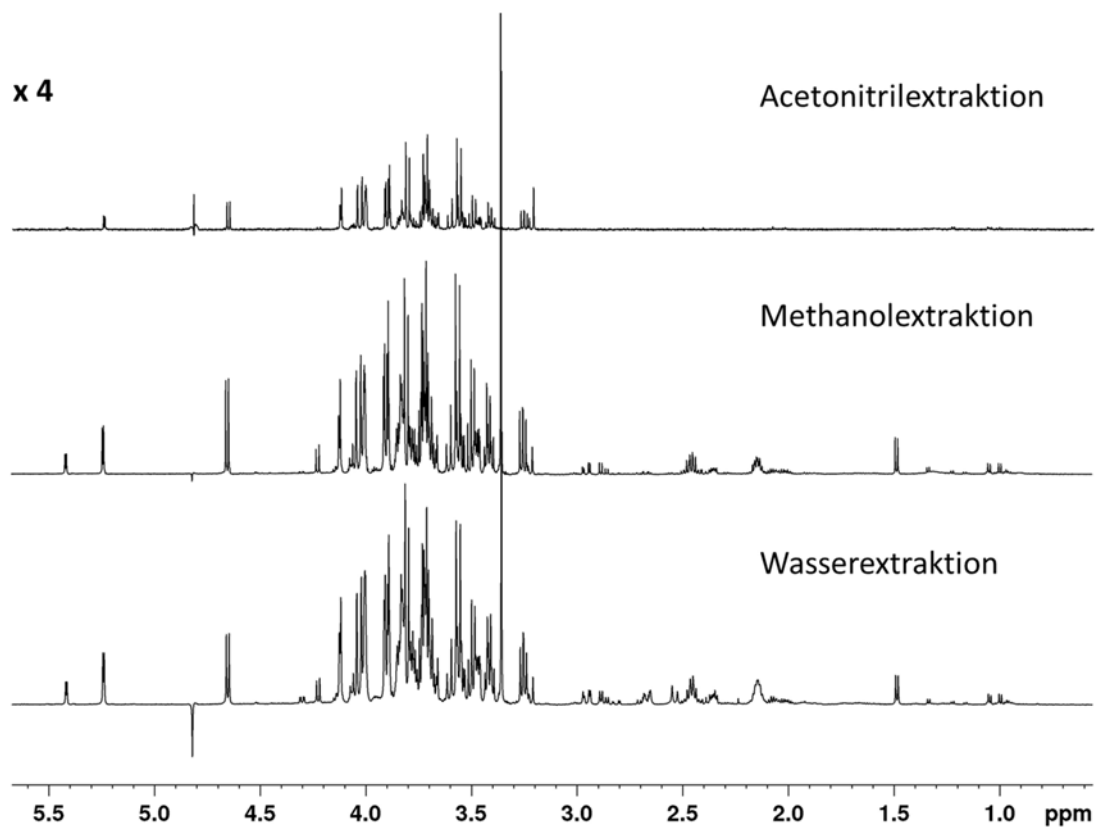


Abbildung 10: Wasserextraktion, Methanolextraktion sowie Acetonitrilextraktion von Spargel (von unten nach oben). Wasser- und Methanolextraktion weisen beide eine hohe Signaldichte sowie starke Signalküberlagerungen auf. Die Acetonitrilextraktion zeigt weniger Signalüberlagerungen, verfügt aber generell über weit weniger Signale als die Wasser- bzw. Methanolextraktion.

Wie in Abbildung 10 dargestellt, weist die Acetonitrilextraktion einen sehr geringen Kohlenhydratanteil im Vergleich zur Methanol- und Wasserextraktion auf. Es zeigt sich, dass die sonst dominant vertretene Sucrose hier ebenfalls eine sehr geringe Konzentration aufweist.

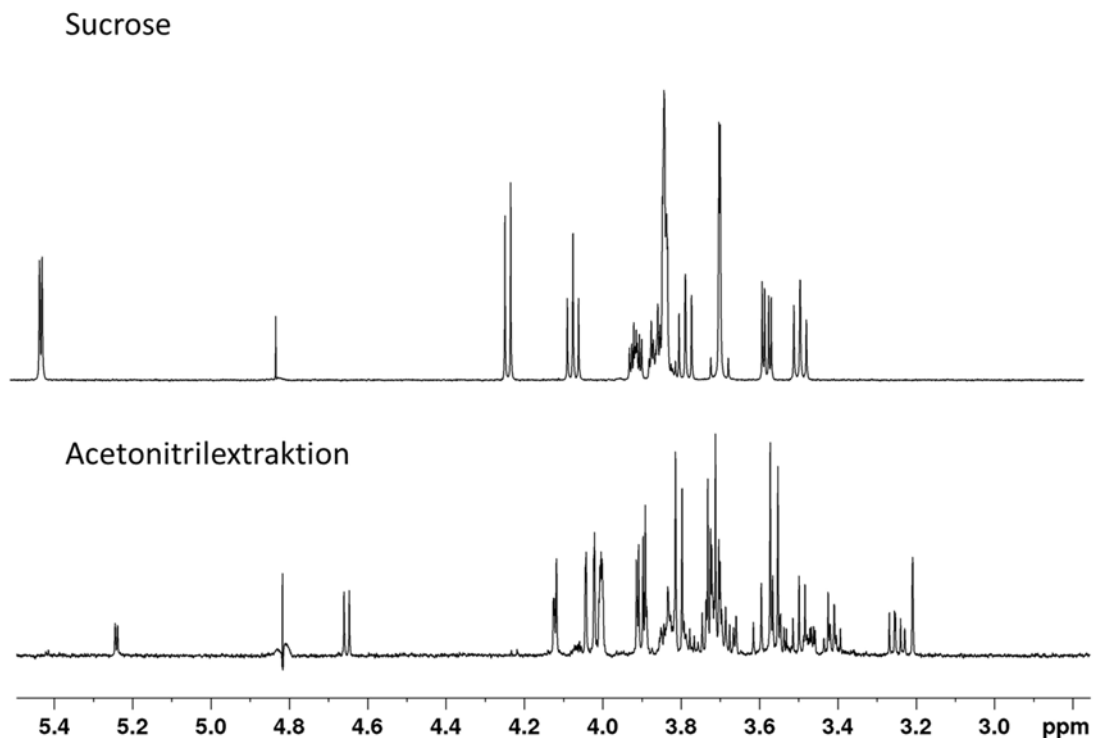


Abbildung 11: Acetonitrilextraktion von Spargel. Sucrose im Vergleich. Beim direkten Vergleich der Spektren fällt auf, dass eine Acetonitrilextraktion den Anteil an Sucrose stark minimiert.

Allerdings führt diese Extraktion zu einem starken Signalverlust im Hochfeldbereich von 1-3 ppm im Vergleich mit der Wasserextraktion. Da möglichst viele Metaboliten simultan identifiziert werden sollen, stellt diese Extraktion daher zu diesem Zeitpunkt keine Option dar.

Wie in Abbildung 10 bereits gezeigt, ähnelt das Protonenspektrum der Methanolextraktion stark dem der Wasserextraktion, jedoch sind in der Wasserextraktion im Bereich von 2-3 ppm weitere zusätzliche Signale zu erkennen. Daher wurde sich für die weitere Analyse für die Wasserextraktion entschieden. Die Wasserextraktion führt jedoch zu einer starken Extraktion der im Spargel vorkommenden Zucker, wie beispielsweise der Sucrose. In Abbildung 12 ist ein Sucrosespektrum im Vergleich zur Wasserextraktion abgebildet. Es zeigt sich, dass im Spektrum der Wasserextraktion Sucrosesignale deutlich zu erkennen sind.

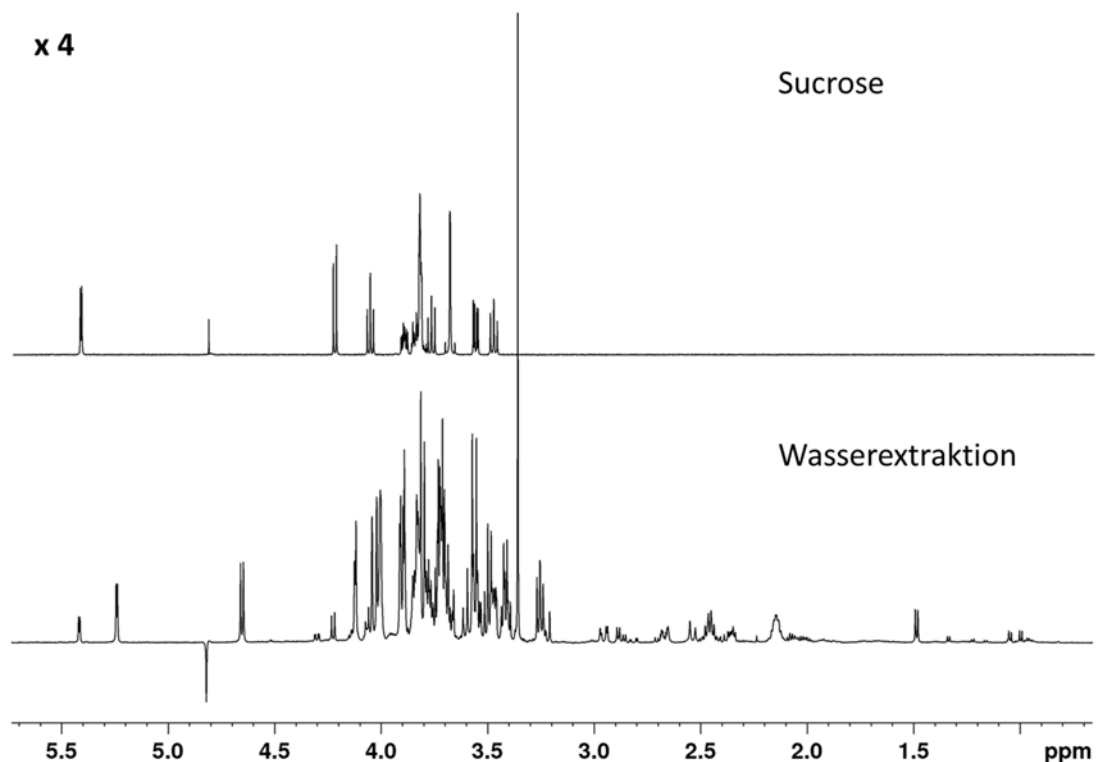


Abbildung 12: Dargestellt sind eine Wasserextraktion von Spargel (unten) sowie Sucrose zum Vergleich (oben). In der wässrigen Extraktion ist ein großer Anteil der Hauptkomponente Sucrose zu erkennen.

Da Spargel ein stark kohlenhydrathaltiges Lebensmittel ist, können diese Signale, bedingt durch den dynamischen Bereich, zu Signalsuppressionen anderer Metaboliten führen. Daher muss sich im Rahmen dieser Arbeit der Fragestellung, wie dies umgangen werden und der Kohlenhydratanteil reduziert werden kann, näher gewidmet werden.

4.2 Optimierung der mechanischen Extraktionsmethoden

Anschließend wurde eine zusätzliche mechanische Extraktionsmethode untersucht. Hierfür wurde die im Rahmen der Herkunftsanalyse von JULIANE KLARE entwickelte standardisierte Extraktionsmethode mithilfe einer Kugelmühle im 1.5 mL-Maßstab einem *Up-scale* unterzogen. Die Extraktionsmethode nach JULIANE KLARE basierte auf einer Einwaage von 100 mg Spargellyophilisat, welches in 1000 μ L Methanol aufgenommen wurde. Nach Hinzufügen von drei entfetteten Stahlkugeln wurde fünf

Minuten mithilfe einer Kugelmühle bei 30 Hz extrahiert und anschließend fünf Minuten bei RT inkubiert. Zur weiteren Extraktion wurden 500 μL deionisiertes Wasser hinzugegeben und die Extraktions- sowie Inkubationsschritte je zweimal wiederholt. Anschließend wurden die Extrakte bei 4 °C und 15000 g für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde entnommen, gefriergetrocknet und entsprechend der anschließenden Analysen aufbereitet.

Diese Extraktion wurde im Rahmen dieser Arbeit zugrundeliegenden Promotion zusätzlich in einem Kolben durchgeführt. Statt der Verwendung einer Kugelmühle wurde im Kolben zur Extraktion mit einem Rührfisch gerührt. Zur Entfernung des Methanol wurde statt eines Stickstoffstroms unter vermindertem Druck gearbeitet.

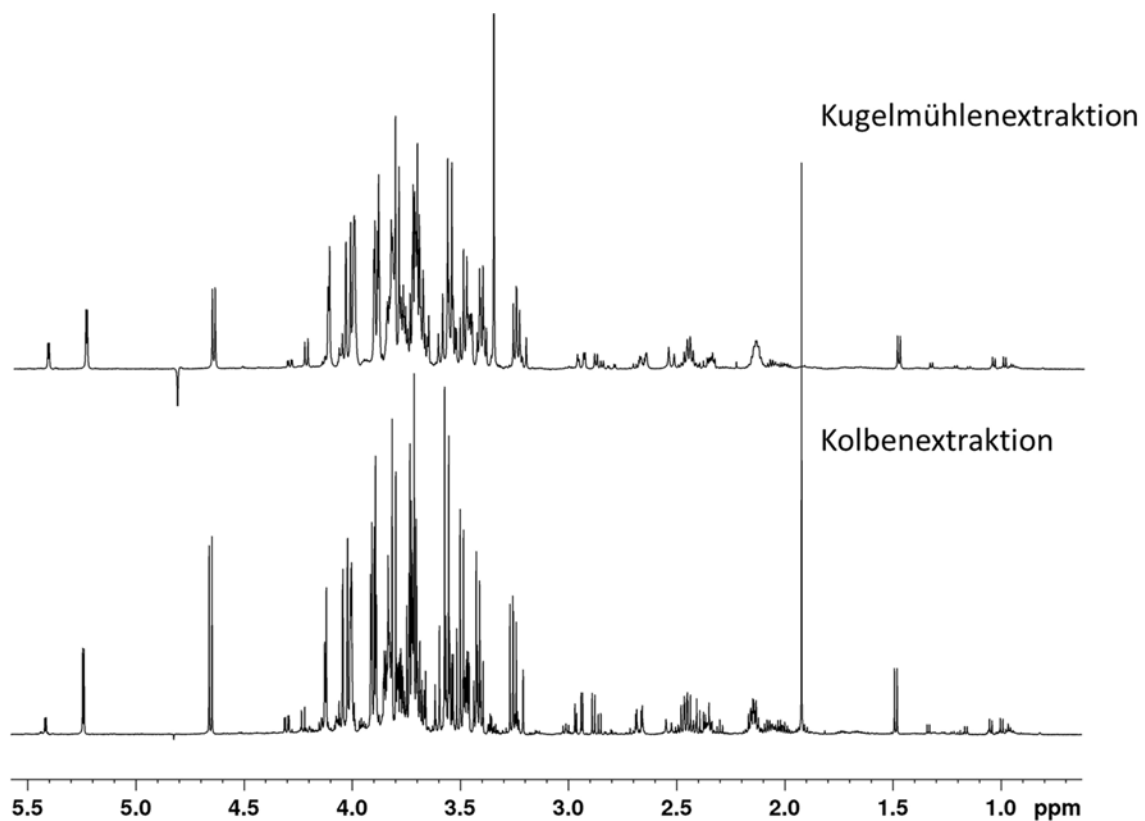


Abbildung 13: Kolbenextraktion (unten) und Kugelmühlenextraktion (oben) von weißem Gemüsespargel. Es wurde in beiden Fällen eine Wasserextraktion durchgeführt. Durch die Kolbenextraktion wurde die Gesamtkonzentration des Extrakts signifikant erhöht.

Wie in Abbildung 13 zu sehen, ließ sich die Konzentration an extrahierten Metaboliten durch die Methode im vergrößerten Maßstab signifikant erhöhen. Daher wurde

sich im weiteren Verlauf der Arbeit ausschließlich der Methode im vergrößerten Maßstab gewidmet.

4.3 3DCC-Analyse eines erstellten 8-Stoffgemisches

Die dreidimensionale Kreuzkorrelation ist eine Methode zur Identifizierung von Substanzen aus Gemischen. Bis zum jetzigen Kenntnisstand wurde die Methode lediglich zur Identifizierung von Glykanen aus Gemischen angewendet.^{18,62}

In der Veröffentlichung von BEHNKEN *et. al* wurde jedoch bereits die Möglichkeit postuliert, dass sich diese Methode auf die Identifizierung anderer Substanzklassen anwenden lässt.¹⁸ Daher wurde zunächst ein Mehrstoffgemisch erstellt, welches auf Substanzen basiert, die natürlich vorkommenden Metaboliten entsprechen. Dazu wurden zunächst 13 Stammlösungen angesetzt. Hierfür wurden die Substanzen (3-Aminobuttersäure, 2,3-Dihydroxybenzoesäure, 2,6-Dimethylpyrazin, L-Glutamin, 2-Hydroxyacetophenon, L-Isoleucin, L-Lysin, 4-Methylpyrimidin, Niacin, Nicotinamid, 2,3,5,6-Tetramethylpyrazin, 2,3,4-Trimethylpyrazin und Tryptophan) zunächst in Milliporewasser gelöst. Die genaue Zusammensetzung und Konzentrationen sind der Tabelle 4 im Abschnitt 3.5.7 zu entnehmen. Es zeigte sich, dass die Löslichkeit von fünf der gewählten Substanzen (2-Hydroxyacetophenon, 2,3,5,6-Tetramethylpyrazin, 2,3,4-Trimethylpyrazin, 2,6-Dimethylpyrazin und 4-Methylpyrimidin) nicht ausreichend war.

Das Mehrstoffgemisch, bestehend aus acht verschiedenen Substanzen, wurde anschließend mittels Flüssigkeitschromatographie an einer semipräparativen RP-C18 Säule (NUCLEODUR[®] ISIS, Tabelle 2) vorgetrennt und dabei online massenspektrometrisch detektiert. Das Chromatogramm des HPLC-Laufs ist in Abbildung 13 gezeigt.

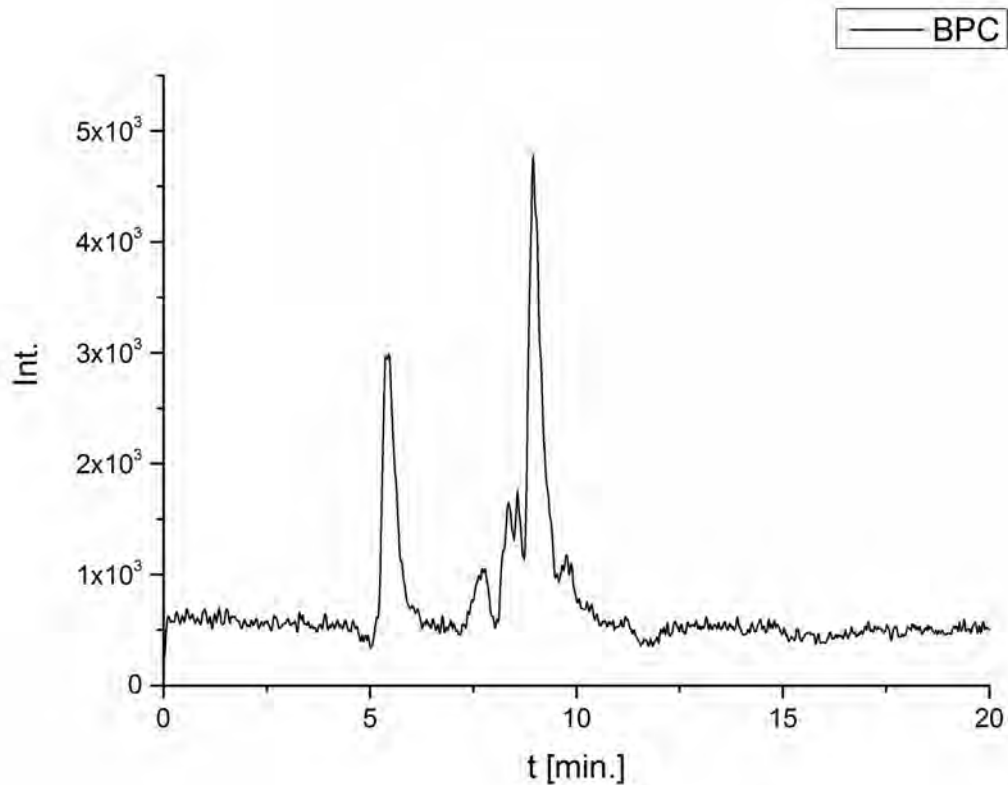


Abbildung 7: *Basepeakchromatogram* (BPC) der HPLC-Trennung des 8-Stoffgemisches. Eluierende Substanzen wurden zwischen Minute 5 und 10 detektiert. Es zeigt sich, dass keine vollständige Trennung der Eluenten vorliegt.

Nach dem Basepeakchromatogram (BPC) in Abbildung 14 ist eine grobe, jedoch nicht vollständige Trennung der Substanzen im Bereich von Minute 5-10 zu erkennen. Anschließend wurden die EICs aus dem Chromatogramm extrahiert und aufgetragen. Die Auftragung ist in Abbildung 15 zu sehen. Es wurden lediglich die EICs der Substanzen 3-Aminobuttersäure, Nicotinamid, Niacin, Isoleucin, L-Lysin und L-Glutamin detektiert. L-Tryptophan und 2,3-Dihydroxybenzoesäure ließen sich mittels Massenspektrometrie nicht nachweisen, da im Rahmen der Messung der positive Ionenmodus verwendet wurde. Diese Substanzen wären möglicherweise im negativen Ionenmodus detektierbar.

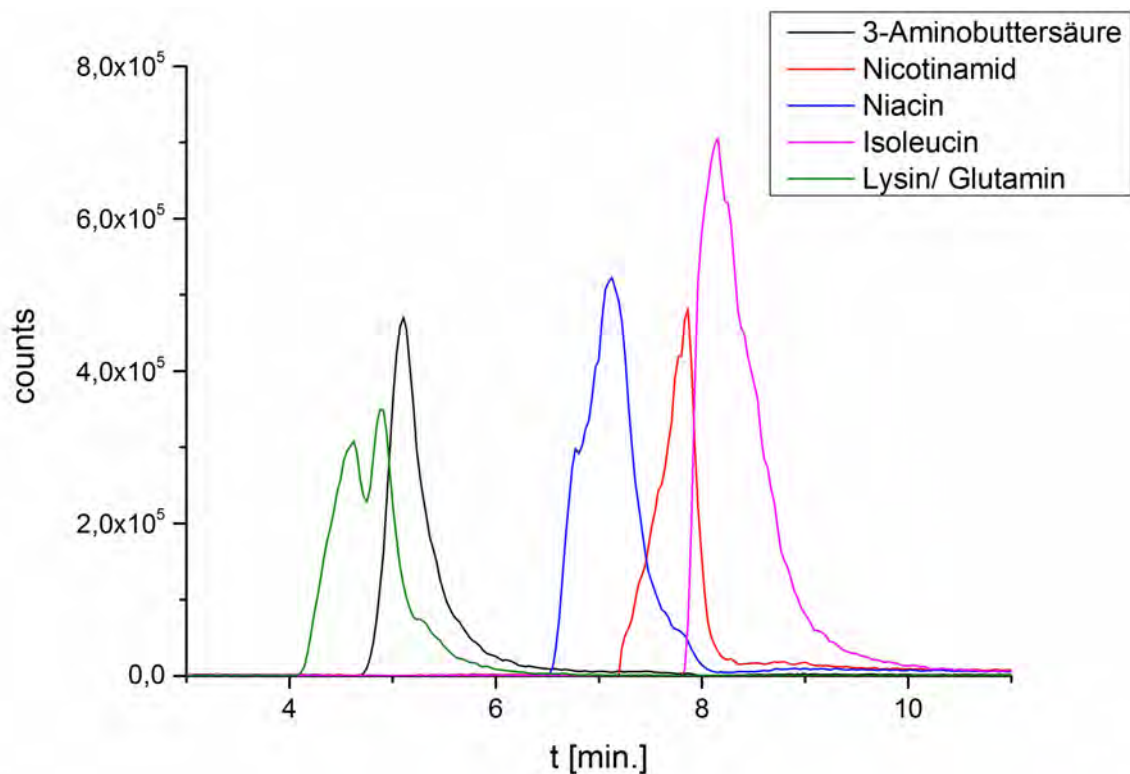


Abbildung 8: Gezeigt sind fünf *Extracted Ion Chromatograms* (EICs), des HPLC-Laufs des 8-Stoffgemisches, die zwischen Minute 5 und 10 eluiert sind. Das EIC von L-Lysin und L-Glutamin lässt sich aufgrund der gleichen Masse nicht trennen, weist allerdings eine Doppelspitze auf, welche eindeutig auf ein versetztes Eluieren der beiden Substanzen hinweist. Die übrigen Substanzen zeigen ebenfalls keine vollständige Trennung.

Dem in Abbildung 15 gezeigten Chromatogramm sind deutliche Überlagerungen der einzelnen EICs zu entnehmen. Insbesondere das EIC mit dem $m/z = 147.1 (\pm 0.5)$ weist eine Doppelspitze auf. Dies spricht dafür, dass sich zwei Substanzen derselben Masse überlagern. In diesem Fall sind es die Aminosäuren L-Lysin und L-Glutamin. Im Falle einer solchen unvollständigen Trennung der Substanzen kann nun die Separierung der NMR-Signale mittels dreidimensionaler Kreuzkorrelation (3DCC) erfolgen. Hierfür wurde der Lauf in Einheiten von 10 Sekunden fraktioniert. Die Fraktionen wurden aufgefangen, mittels Speedvac unter Vakuum getrocknet und in deuteriertem PBS-Puffer aufgenommen. Die gelösten Fraktionen wurden in 5 mm NMR-Röhrchen überführt und NMR-spektroskopisch vermessen. Eine dreidimensionale Darstellung der gemessenen NMR-Spektren aller Fraktionen ist in Abbildung 16 gezeigt. Für jede detektierbare Substanz wurde ein Signal stellvertretend zur Visualisierung des jeweiligen *Extracted Delta Chromatogram* (EDC) über den Fraktionsverlauf hinweg markiert.

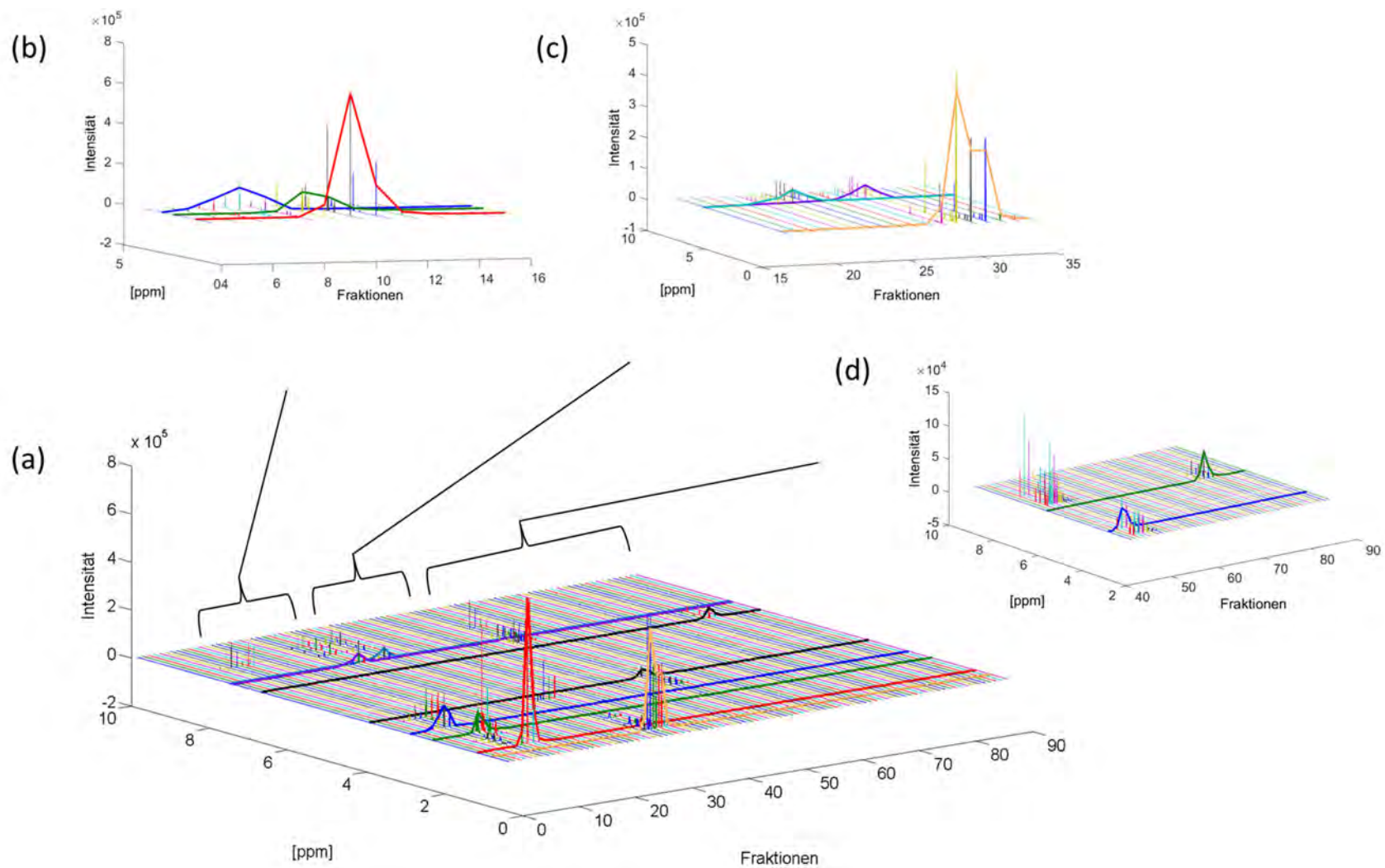


Abbildung 9: Dreidimensionale Darstellung der NMR-Spektren der 90 Fraktionen, welche im Zuge der HPLC-Trennung des 8-Stoffgemisches erzeugt wurden. (d): Übersicht aller 90 Fraktionen, (a)/(b)/(c): Ausschnitte aus der Voldarstellung (d). Die Intensitätsverläufe von jeweils einem Signal der einzelnen Substanzen ist farblich markiert worden. (a)/(d): rot: 3-Aminobuttersäure, blau: L-Lysin, grün: L-Glutamin, (b)/(d) gelb: L-Isoleucin, türkis: Nicotinamid, lila: Niacin, (c)/(d) lila: Tryptophan, grün: 2,3-Dihydroxybenzoesäure. L-Tryptophan und 2,3-Dihydroxybenzoesäure sind in der Voldarstellung schwarz gekennzeichnet, da diese Substanzen keine Überlagerungen aufzeigen und damit für den Modellversuch entfallen.

Wie in Abbildung 16 zu sehen zeigen sechs der acht Substanzen ein Elutionsprofil, welches die Anwendung von 3DCC zulässt. L-Tryptophan und 2,3-Dihydroxybenzoesäure eluieren vollständig separiert, sodass hier auf die erneute massenspektrometrische Messung im negativen Ionenmodus und auf die Anwendung einer Korrelationsanalyse verzichtet wurde.

Die Aufreihung aller Fraktionen zeigt im 3D-Plot sehr gut den Konzentrationsverlauf der Signale über den zeitlichen Verlauf aufgelöst nach Fraktionen (EDCs).

In Abbildung 17 sind erneut die EICs der einzelnen Substanzen gezeigt. Der durch L-Lysin und L-Glutamin hervorgerufene Doppelpeak wurde jedoch mithilfe der Software Matlab dekonvolviert, sodass die einzelnen EICs der jeweiligen Substanzen für eine mathematische Korrelation mit den jeweiligen EDCs zur Verfügung stehen. Zusätzlich wurden mit Matlab die Datenpunkte der EICs auf die Anzahl der Fraktionen reduziert, um eine matrizenbasierte Korrelation zu gewährleisten.

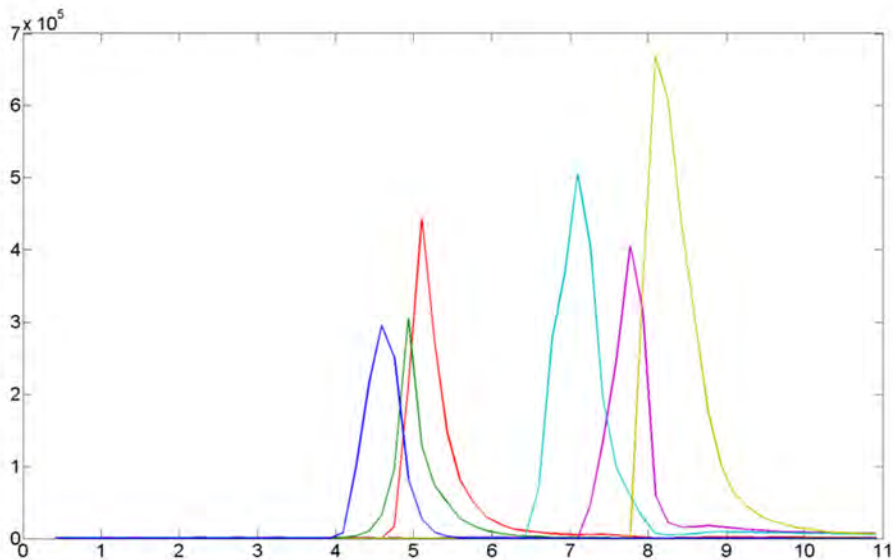


Abbildung 10: Dargestellt sind sechs *Extracted Ion Chromatograms* (EICs), des HPLC-Laufs des 8-Stoffgemisches, die zwischen Minute 5 und 10 eluieren. Das EIC von L-Lysin und L-Glutamin wurde mithilfe der Software Matlab mathematisch dekonvolviert. Alle Substanzen zeigen Überlagerungen mit mindestens einer anderen Substanz.

Anschließend wurden die NMR-Spektren mithilfe des *least square* Logarithmus nach 3DCC_L mit den dekonvolvierten und reduzierten EICs korreliert und separierte NMR-Spektren berechnet.¹⁸ Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 18 und 19 gezeigt.

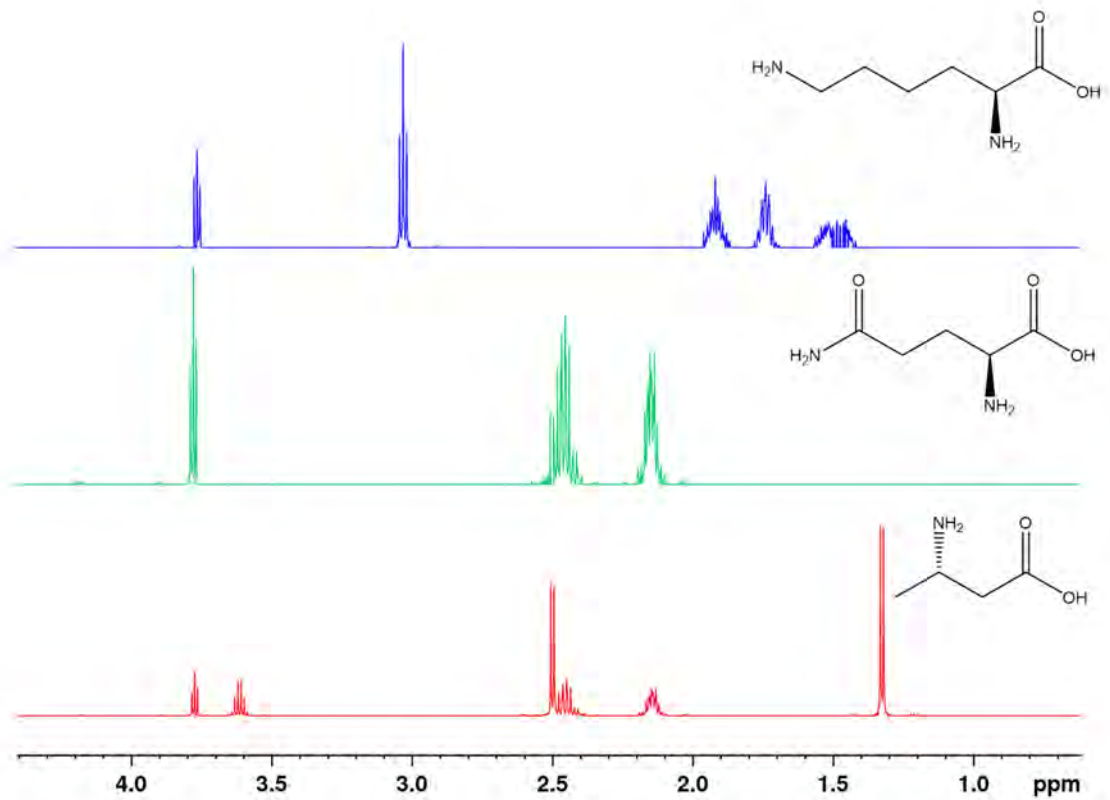


Abbildung 11: Nach der Methode 3DCC_L berechnete NMR-Spektren der verwendeten Substanzen. Die verwendeten Farben entsprechen denen aus der Abbildung 16. Blau: L-Lysin, grün: L-Glutamin, rot: 3-Aminobuttersäure.

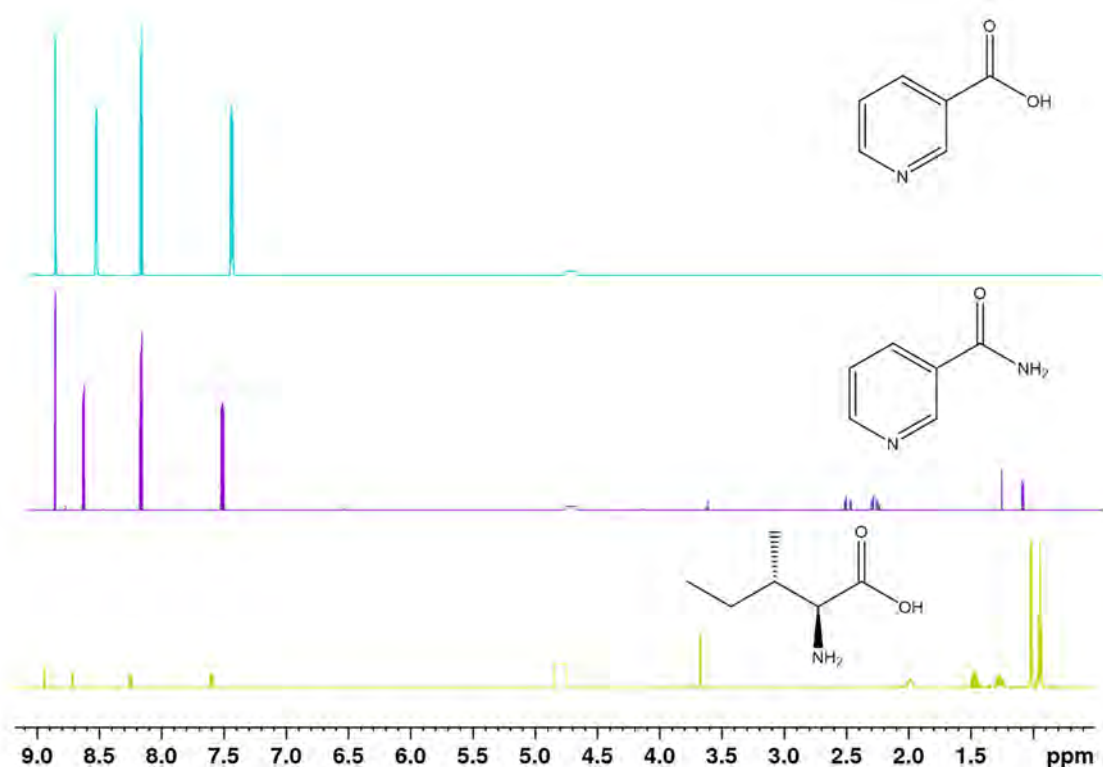


Abbildung 12: Nach der Methode 3DCC_L berechnete NMR-Spektren der einzelnen verwendeten Substanzen. Die verwendeten Farben entsprechen denen der Abbildung 16. Türkis: Niacin, lila: Nicotinamid, gelb: L-Isoleucin.

Dem hier gezeigten Modellversuch ist deutlich zu entnehmen, dass die Methode 3DCC eine Berechnung der einzelnen NMR-Spektren der verwendeten Substanzen ermöglicht.

Alle Zielmoleküle ließen sich eindeutig zuordnen und identifizieren. Es konnten von allen sechs Zielmolekülen reine NMR-Spektren berechnet werden. Die teilweise vertretenen Restsignale waren von schwacher Intensität und konnten damit von denen der Zielmoleküle deutlich unterschieden werden. Damit konnte die Methode der dreidimensionalen Kreuzkorrelation auf ein Metabolitengemisch erstmalig erfolgreich angewendet werden.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit werden zusätzlich natürliche Extrakte näher untersucht und diese stellen andere Herausforderungen an die Analyse. In Extrakten organischen Materials befindet sich eine undefiniert hohe Anzahl unterschiedlichster Metaboliten mit wiederum unterschiedlichen Konzentrationen. Hauptkomponenten im Extrakt überlagern Signale der Minorkomponenten und führen aufgrund ihrer hohen

Konzentration zu Signalsuppressionen, welche eine Identifizierung stark einschränken oder sogar verhindern. Zudem stellt die Anzahl der Metaboliten ein Hindernis dar, denn die Anzahl der voneinander trennbaren Substanzen wird in der 3DCC-Anwendung durch die Anzahl der Fraktionen limitiert. Bedingt durch die zur Verfügung stehenden Geräte ist es technisch möglich 60-120 Fraktionen im Rahmen eines HPLC-Laufs zu trennen. In natürlichen Extrakten sind jedoch weit mehr Metaboliten vertreten. Mittels NMR lassen sich geschätzt 100-200 Metaboliten pro Spektrum detektieren. Hierbei alle zu identifizieren ist jedoch zu diesem Zeitpunkt unmöglich. Es wäre nun erstrebenswert das Extrakt in möglichst viele Fraktionen zu trennen. Eine hohe Anzahl Einzelfraktionen führen jedoch zu einer Verringerung der Substanzmengen innerhalb der Fraktionen, da sich der Elutionsverläufe der Substanzen über mehr Fraktionen verteilen würde. Dies hat wiederum zur Folge, dass die Konzentration durch Wiederholung vieler Läufe erhöht werden muss, um eine statistisch relevante Detektierbarkeit der Signale im NMR zu erzielen. An dieser Stelle ist eine sichere und exakte Reproduzierbarkeit der LC-Läufe relevant. Generell ist das Elutionsverhalten der Metaboliten entscheidend für eine gute Korrelation. Ein breites Eluieren führt zu vielen Datenpunkten, welche wiederum zu einem guten Korrelationsergebnis führen. Einige Metaboliten eluieren jedoch scharf und bieten, selbst bei Fraktionierung mit kurzen Einheiten, z. T. nur einen, bzw. drei Datenpunkte. Zusätzlich können durch Präsenz und Absenz von natürlichen Säuren und Basen in den einzelnen Fraktionen pH-Änderungen in einzelnen Fraktionen erfolgen, welche zu minimalen Signalshifts im NMR-Spektrum führen. Dies würde die Korrelationen verfälschen, da die EDCs der Signalintensität entlang eines Datenpunktes der ppm-Skala entsprechen. Zum Erhalt von wichtigen Partialinformationen stellt 3DCC damit immer noch ein wichtiges Instrument zur Analyse von unbekanntem Metaboliten dar. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wird jedoch eine auf die Gegebenheiten der natürlichen Extrakte angepasste Strategie zur Identifizierung unbekannter Metaboliten aus Gemischen vorgestellt werden.

Daher wurde sich im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit zunächst darauf konzentriert, eine eindeutige Strukturaufklärung unbekannter Substanzen zu ermöglichen. Hierfür wurde zunächst der Schritt der groben Vortrennung mittels Flüssigchromatographie beibehalten.

4.2 NMR-Analysen von polarem Spargelextrakt nach Vortrennung mittels HPLC (HPLC-Trennung 1 der Spargelprobe 1)

Teile des folgenden Abschnitts wurden im Rahmen der von mir betreuten Bachelorarbeit von Simon Sander (2016) erstellt.⁶¹

Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte sich der Analyse eines polaren Extrakts von weißem Gemüsespargel gewidmet werden. Hierfür wurden polare Extrakte hergestellt. Dafür wurden 100 mg getrocknetes Spargelhomogenisat mit 1 mL Methanol versetzt und unter Verwendung von drei entfetteten Stahlkugeln bei 3.1m/s dreimal je fünf Minuten extrahiert. Nach Entfernung des Methanols unter Stickstoff wurden 1.5 mL Millipore Wasser hinzugegeben und es wurde erneut dreimal je fünf Minuten mittels Kugelmühle extrahiert. Anschließend wurden die Proben 30 Minuten zentrifugiert (Abschnitt 3.4.1; Extraktion der Spargelprobe 1) Der Überstand wurde zunächst mittels präparativer HPLC getrennt. Die Vortrennung mittels präparativer HPLC wurde mit unterschiedlichen Lösungsmitteln bei gleicher Säule (Nucleodur[®] C18 Pyramid) und gleichem Gradienten (Abschnitt 3.5.1.2; Abbildung 6) durchgeführt. Die erhaltenen Chromatogramme der MS-Detektion sind in Abbildung 20 dargestellt.

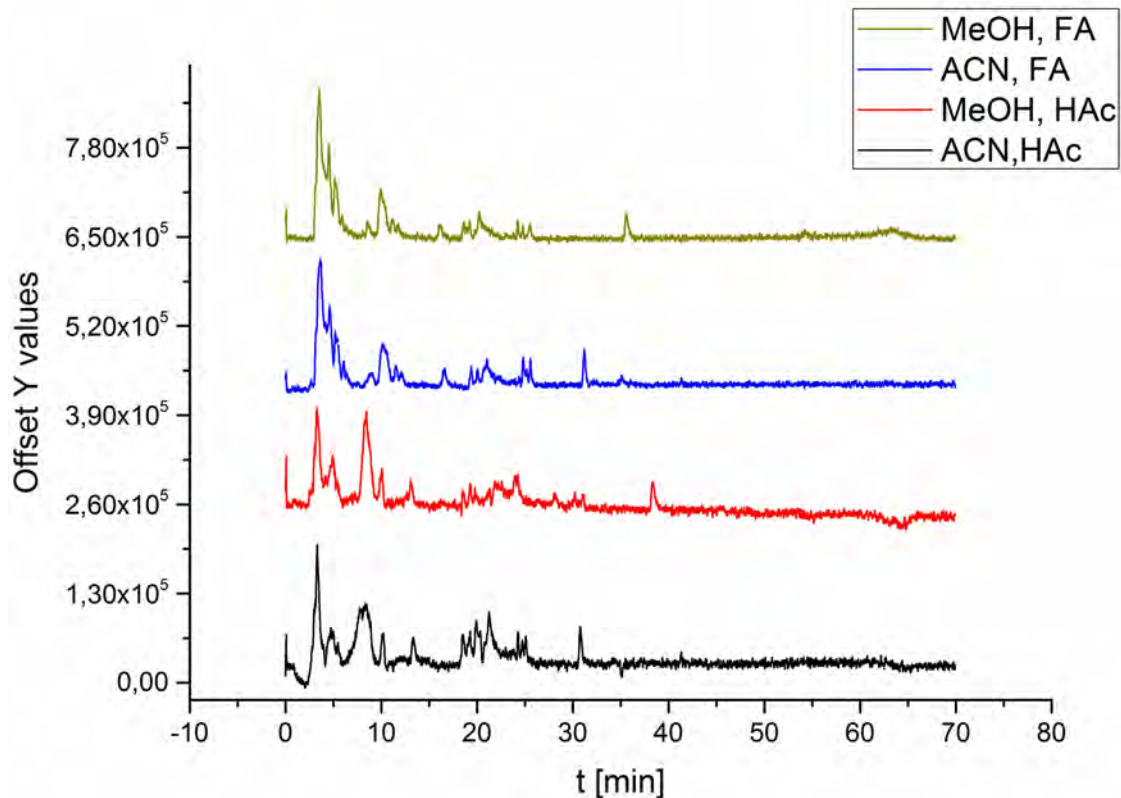


Abbildung 13: MS-detektierte Chromatogramme von vier verschiedenen HPLC-Trennungen von polarem Spargelextrakt. Es wurden jeweils unterschiedliche Elutionsmittel mit verschiedenen Additiven verwendet. Als Elutionsmittel A diente immer Wasser mit 0.1 % FA oder 0.5 % HAc als Säurezusatz. Der Säurezusatz wurde immer konsistent zum Elutionsmittel B gewählt. Schwarz: Elutionsmittel B: Acetonitril mit 0.5 % (v:v) Essigsäure, rot: Elutionsmittel B: Methanol mit 0.5 % (v:v) Essigsäure, blau: Acetonitril mit 0.1 % (v:v) Ameisensäure, grün: Methanol mit 0.1 % (v:v) Ameisensäure.

Es zeigte sich, in allen Fällen eine grobe Trennung der Substanzen. Für eine weitere Analyse wurde sich für Methanol als Eluent B und 0.5 % (v:v) Essigsäure als Zusatz entschieden. Entsprechend diente Milliporewasser mit 0.5 % (v:v) Essigsäure als Eluent A. Anschließend wurde dieser Lauf 9-fach wiederholt und minutenweise fraktioniert, aufgefangen und die zugehörigen Fraktionen vereinigt. Das *Total Ion Chromatogram* (TIC) sowie die UV-Detektion bei 280 nm sind in Abbildung 21 dargestellt.

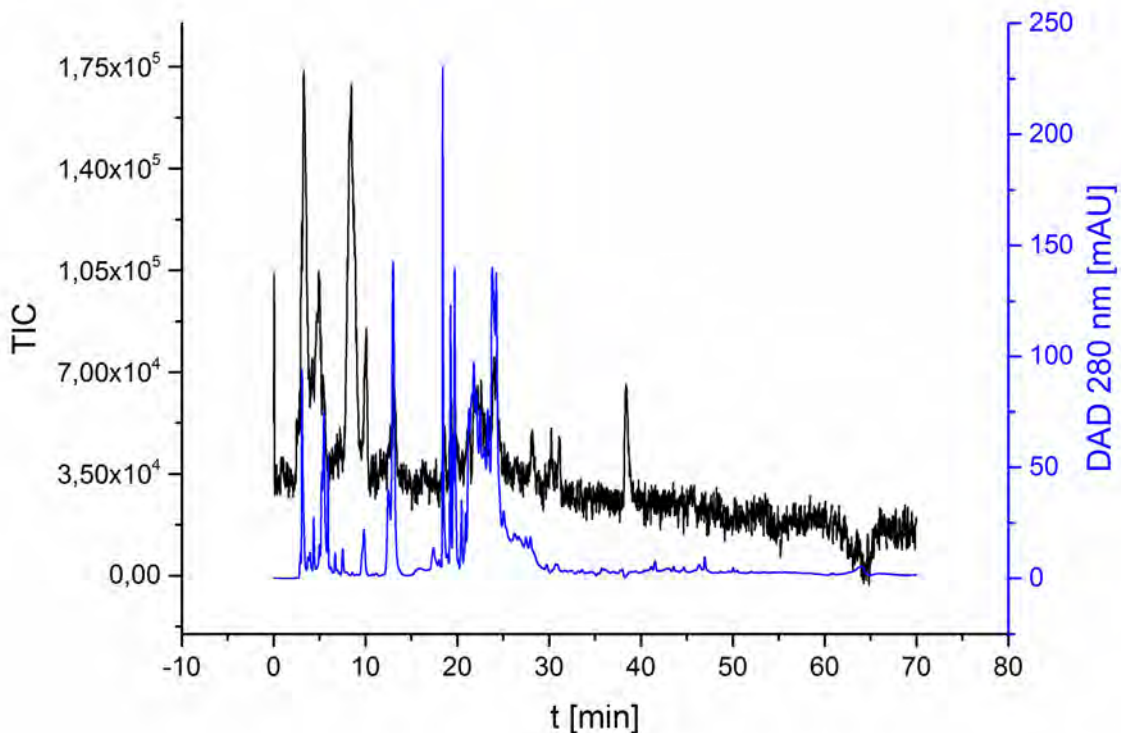


Abbildung 14: schwarz: *Total Ion Chromatogram* (TIC) der fraktionierten HPLC-Trennung des polaren Spargelextrakts. Elutionsmittel A: Wasser mit 0,5 % (v:v) Essigsäure, Elutionsmittel B: Methanol mit 0,5 % (v:v) Essigsäure. Blau: UV/VIS-Chromatogramm des HPLC-Laufs bei der Wellenlänge 280 nm.

Wie in Abbildung 21 zu sehen, zeigt sich eine gute Vortrennung der Metaboliten. Es sind einige deutlich separierte Peaks zwischen Minute 1 und 40 sichtbar. Zusätzlich lassen sich ebenfalls gut aufgelöste UV-detektierte Signale erkennen. Die UV-Signale bei 280 nm weisen u.a. auf aromatische Systeme bzw. Doppelbindungssysteme hin.

Der Lauf wurde minutenweise fraktioniert, aufgefangen und die entsprechenden Fraktionen vereinigt, sodass unterschiedliche Gemische zur weiteren Analyse zur Verfügung standen.

4.2.1 Identifizierung unbekannter/neuer Substanzen aus *Asparagus officinalis*

Im weiteren Verlauf wurde das Signal bei Minuten 12-13 der HPLC-Trennung 1 der Spargelprobe 1 näher betrachtet. Hierfür wurden die Fraktionen 12 und 13 für einen weiteren Reinigungsschritt zunächst zusammengeführt, unter Stickstoffstrom einge-

engt und anschließend gefriergetrocknet. Das Lyophilisat wurde in 450 mL Eluent A (Milliporewasser, 0.5% HAc) aufgenommen und erneut mittels präoperativer HPLC untersucht. Hierfür wurde ein 20-minütiger Gradient eingesetzt (Abschnitt 3.5.1.1, Abbildung 5) und alle 10 Sekunden fraktioniert. Nach massenspektrometrischer Detektion des Laufs konnte die Masse $243.06 (\pm 0.05) [M-H]^-$ in den Unterfraktionen 64-67 bei Minute 12-13 identifiziert werden (Abbildung 22).

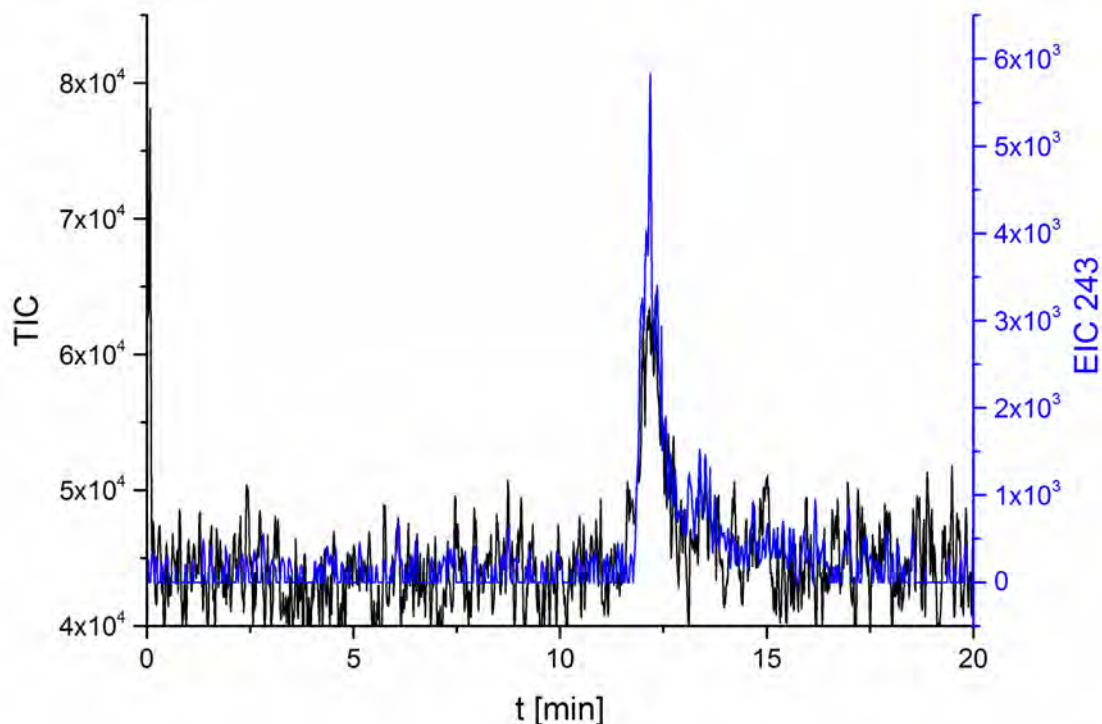


Abbildung 15: schwarz: TIC des verkürzten HPLC-Laufs, zur Reinigung der Fraktion Minute 12-13. Bei Minute 12 ist ein eindeutiges Signal im TIC zu erkennen, welches dem EIC 243.06 (± 0.05) $[M-H]^-$ (blau) entspricht.

Diese Fraktionen wurden entsprechend zusammengeführt und für eine weitere NMR-spektroskopische Untersuchung zunächst gefriergetrocknet und anschließend in deuteriertem PBS-Puffer aufgenommen und in ein NMR-Röhrchen überführt. Das Protonenspektrum ist in Abbildung 23 zu sehen. Die dominanten Signale des Spektrums lassen sich eindeutig dem Metaboliten Uridin zuordnen. Uridin ist eine Nucleosideinheit der RNA. Es setzt sich aus der Nucleinbase Uracil und dem Zucker β -D-Ribose zusammen. Nucleoside resultieren aus der hydrolytischen Spaltung von Nucleotiden durch Nucleotidasen während des Nucleotidstoffwechsels.⁶³

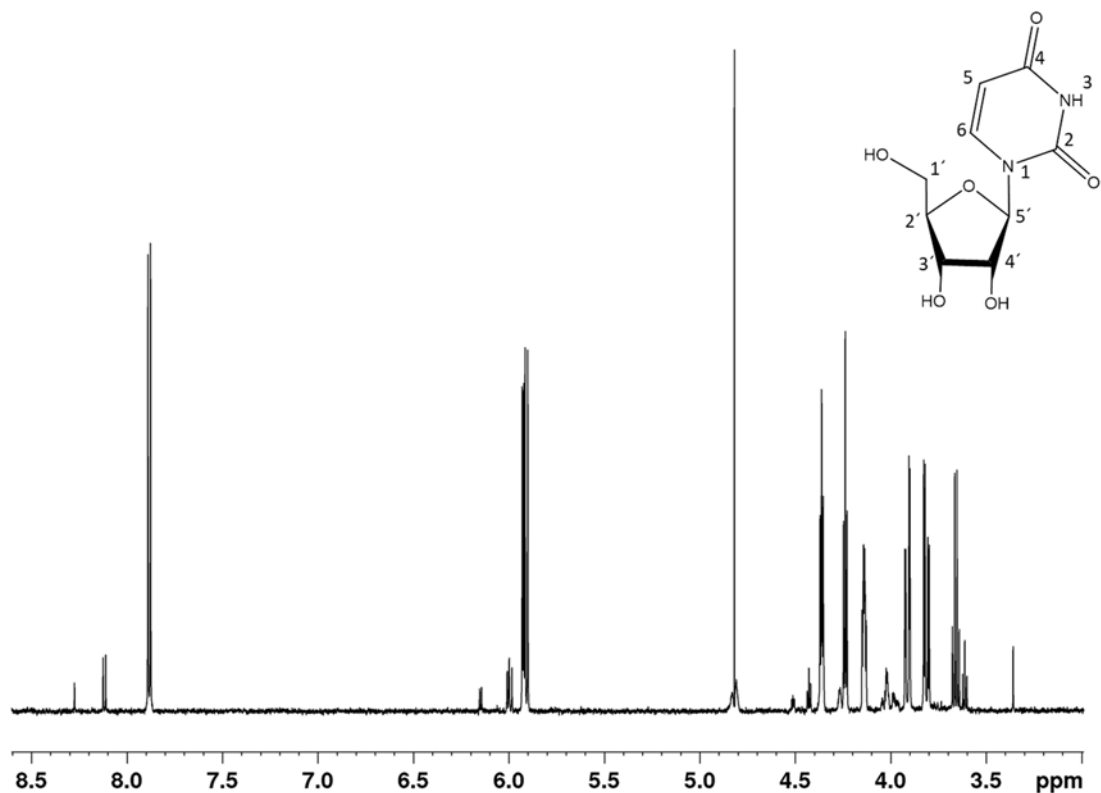


Abbildung 16: Protonenspektrum der Unterfraktionen 64-67. Die dominanten Signale entsprechen denen von Uridin. Im aromatischen Bereich sind die Dubletts der Nukleinbase und das Dublett des H-1 der Ribose deutlich zu erkennen. Weiter im Hochfeldbereich (4.5-3.5 ppm) sind die übrigen Signale der Ribose deutlich zu erkennen.

Die beiden Dubletts der Protonen 5 und 6 der Nukleinbase sind bei 7.88 (H-5) und 5.90 ppm (H-6) zu erkennen. Das H-1 der Ribose zeigt ein Dublett bei 5.93 ppm. Das H-2 gibt im Protonenspektrum ein Dublett eines Dubletts bei 4.36 ppm wieder, welches als Pseudotriplett erscheint. Ebenso erscheint das dd des H-3 bei 4.24 ppm als Pseudotriplett. Das H-4 zeigt ein dd bei 4.14 ppm und die beiden H-5 Protonen a und b geben jeweils ein dd bei 3.91 und 3.81 ppm. Die Daten stimmen mit den Daten von Uridin aus der *Biological Magnetic Resonance Data Bank* überein.⁶³ Die Auflistung der NMR-Daten mit den Kopplungskonstanten sind im Anhang aufgeführt.

Die Detektion des Metaboliten Uridin deckt sich zusätzlich mit dem UV/VIS-Signal bei der Wellenlänge 280 nm, was auf das Vorhandensein der Doppelbindungen zurückzuführen ist.

Nach erstmaliger erfolgreicher Identifizierung des Metaboliten Uridin aus weißem Gemüsespargel mittels NMR-Spektroskopie wurde dieser zusätzlich mithilfe des Overlay Modus im Vollextrakt identifiziert.

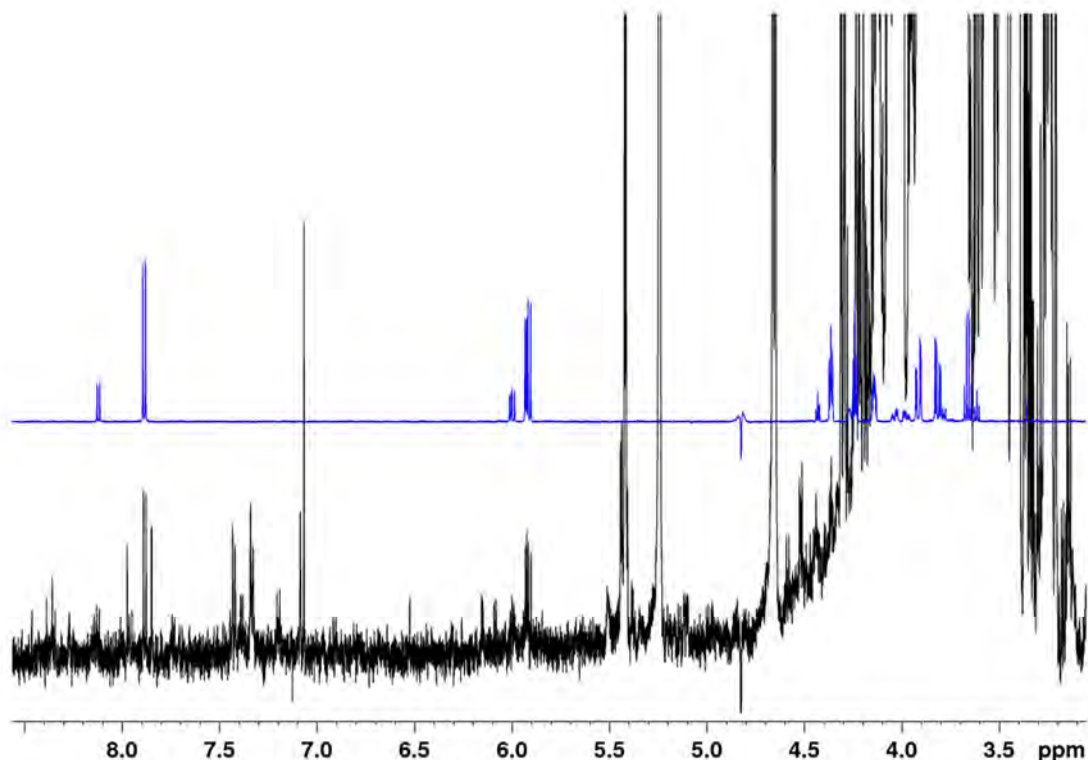


Abbildung 17: Overlay eines Protonenspektrums des polaren Spargelextrakts ohne Vortrennung (schwarz) und dem Protonenspektrum des identifizierten Metaboliten Uridin (blau). Das Protonenspektrum wurde um den Faktor 50 vergrößert, um die Uridin-Signale in gleicher Intensität wie im blauen Spektrum gezeigt, darstellen zu können.

Wie in Abbildung 24 zu sehen, liegt der Metabolit im Vollextrakt sehr schwach konzentriert vor. Somit konnte erstmalig erfolgreich Uridin aus weißem Gemüsespargel eindeutig zugeordnet werden. Uridin gehört zwar zu den Primärmetaboliten, wurde jedoch zum jetzigen Kenntnisstand in keiner bisherigen Arbeit aus weißem Gemüsespargel eindeutig identifiziert.

Die Strategie einer erneuten Aufreinigung der Fraktionen ermöglicht zum einen nur die Identifizierung einzelner Metaboliten. Zum anderen ist sie sehr zeitaufwändig, da sich der Aufwand mit jedem Lauf und damit einhergehendem Fraktionieren multipliziert. Daher wurde sich im Rahmen dieser Arbeit einer neuen Strategie gewidmet, die die simultane Identifizierung mehrerer Metaboliten einer Fraktion ermöglichen und damit Zeit und Ressourcen sparen soll.

4.2.2 Analyse der separierten Fraktionen

Die verbliebenen Fraktionen der HPLC-Trennung 1 der Spargelprobe 1 wurden zunächst getrocknet und mittels NMR-Spektroskopie vermessen. Hierfür wurden zunächst die Fraktionen 7-11 zusammengeführt, da das dominante Signal der massenspektrometrischen Detektion, welches ebenfalls vom DAD erfasst wurde, in höchstmöglicher Konzentration untersucht werden sollte. Alle Proben wurden nach Einnengung mittels Rotationsverdampfer und anschließender Gefriertrocknung in 200 µL deuteriertem PBS-Puffer aufgenommen und in 3 mm NMR-Röhrchen überführt. Um ein bestmögliches Messergebnis zu erreichen, wurden die NMR-Röhrchen wie in Abschnitt 3.5.2.2 beschrieben vorab gereinigt.

Die Protonenspektren der Fraktionen zeigten eine deutliche Separierung verschiedener Signale, insbesondere im aliphatischen Bereich (0-3 ppm) als auch im aromatischen Bereich (5-9 ppm) während andere weiter starke Überlagerungen aufwiesen (3-5 ppm) (Abbildung 25).

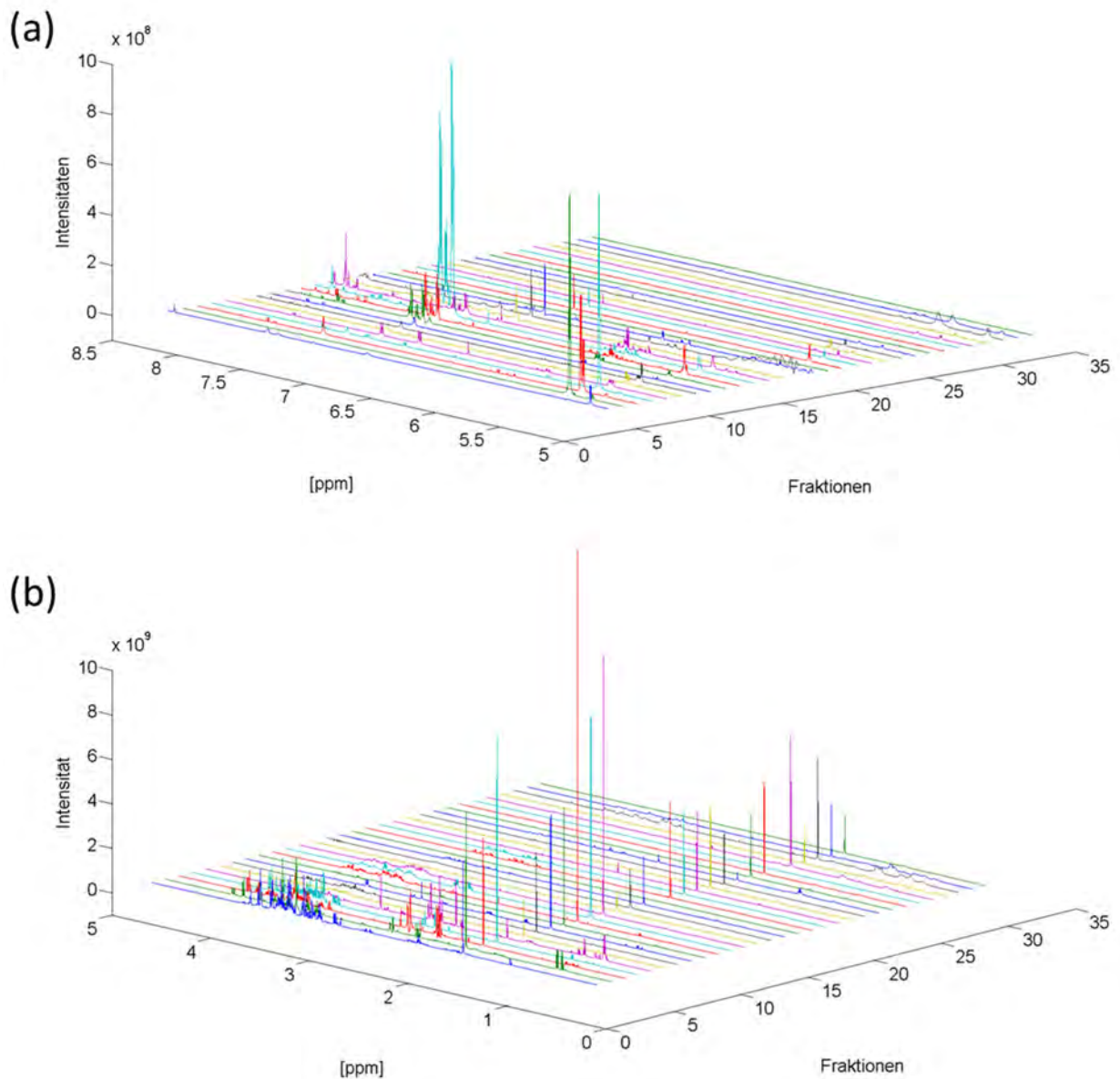


Abbildung 18: Dreidimensionale Darstellung der Protonenspektren der HPLC-Trennung 1 der Spargelprobe 1. (a) Ausschnitt des Bereichs von 5-8.5 ppm (b) Ausschnitt des Bereichs von 0-5 ppm. In den vorderen Fraktionen sind viele isolierte Signale zu erkennen. In den späteren Fraktionen ab ca. Fraktion 25 werden die NMR-Signale breiter, was auf das Vorhandensein von Proteinen zurückzuführen ist.

Im Bereich der späteren Fraktionen (ab 25) zeigt sich, dass das Eluieren der Proteine zu breiten Signalen im NMR-Spektrum führt und diese für eine Identifizierung nicht mehr zur Verfügung stehen. Dies zeigt, dass das Fällen der Proteine durch Methanol nicht vollständig war.

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden daher, zusätzlich zur Methanolfällung, Zentrifugenfilter bei der Extraktion eingesetzt, welche einen *Cut-off* bei 3 kDa aufwei-

sen. Dieser lässt lediglich alle Substanzen mit einem Molekulargewicht unter 3 kDa passieren, sodass ein Großteil der Proteine im Filter zurückgehalten wird.

Die einzelnen Signale, welche in den NMR-Spektren erkennbar sind, eignen sich für eine separate Anregung unter Verwendung des *selective*TOCSY- (*se*/TOCSY) Experiments. Um dies weiter zu verfolgen, wurden speziell die Fraktionen der Minuten 7-11 analysiert. Diese Fraktionen wurden vereint, um so alle Substanzen des detektierten Signals, welches im UV/VIS-Chromatogramm zu erkennen ist, mit der höchstmöglichen Konzentration zu erfassen und analysieren zu können. In Abbildung 26 ist die Fraktion 7-11 im Vergleich zum Wasserextrakt gezeigt. Es ist eine deutliche Verringerung der Zuckersignale im Bulkbereich zu erkennen sowie eine deutliche Separierung vieler Signale im Hochfeldbereich. Im Tieffeld sind zusätzlich Signale erkennbar, welche im Wasserextrakt durch die Anwesenheit der Hauptkomponenten wie beispielsweise Zucker, supprimiert wurden.

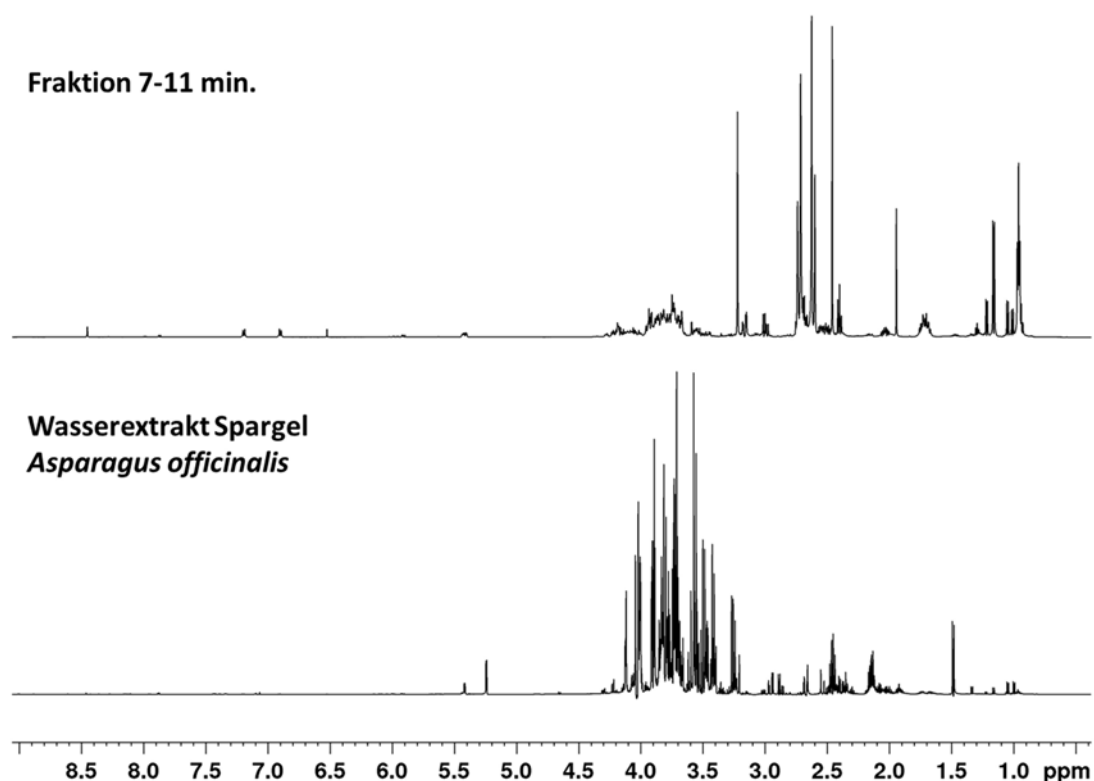


Abbildung 19: Vergleich des Wasserextrakts (unten) mit der Teilfraktion Minute 7-11 (oben). Im Wasserextrakt treten viele Signale auf. Besonders im Bereich zwischen 3 und 4 ppm sind typische Zuckersignale zu erkennen. Die Fraktion der Minuten 7-11 zeigt deutlich weniger Signale im Bereich 3-4 ppm, welche auch weit weniger intensiv sind. Es sind viele separierte Signale in dem gesamten Fraktionsspektrum zu erkennen.

Nun wurden alle separierten Signale bestimmt und mittels *se*/TOCSY-Experiment mit Z-Filter angeregt. Hierfür wurde zunächst die optimale Einstellung im NMR-Experiment für den Z-Filter bestimmt, um störende Artefakte auszuschließen und die bestmögliche Sensitivität zu erreichen. Die resultierenden *se*/TOCSY-Experimente sowie das Protonenspektrum der Fraktion 7-11 sind in Abbildung 27 zu sehen. Die orangefarbenen Sterne kennzeichnen die jeweilige Anregung mittels selektivem TOCSY-Experiment.

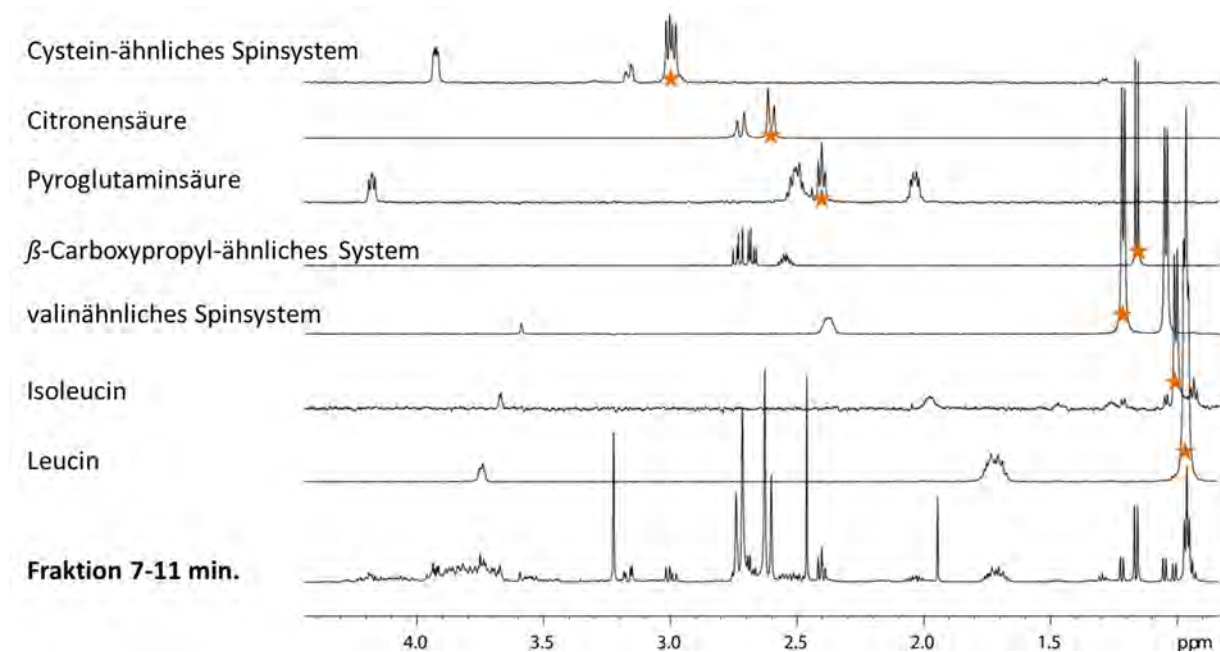


Abbildung 20: Overlay des Protonenspektrums der Fraktion 7-11 und der aufgenommenen *se*/TOCSY Experimente. Die angeregten Signale der *se*/TOCSY Experimente sind mit einem Stern gekennzeichnet. Es sind insgesamt sieben unterschiedliche Spinsysteme gezeigt.

Der Vorteil der *se*/TOCSY Experimente wird speziell im Bereich von 3.5-4.2 ppm sichtbar, da das Protonenspektrum, trotz vorheriger Trennung mittels HPLC, in diesem Bereich eine starke Überlagerung von Signalen zeigt, während diese in den einzelnen *se*/TOCSY-Experimenten einzeln aufgelöst vorliegen und teilweise zusätzlich klare Kopplungsmuster aufweisen. Das *se*/TOCSY-Spektrum des β -Carboxypropyl-ähnlichen Spinsystems zeigt beispielsweise sehr gut aufgelöste Kopplungsmuster zwischen 2.5 und 2.7 ppm, welche durch Anregung eines einzelnen separiert vorlie-

genden Signals bei 1.16 ppm erhalten werden konnten. Im Protonenspektrum der Fraktion ist dieser Bereich durch Signale der Citronensäure überlagert.

Eine andere Möglichkeit derartige Überlagerungen zum Teil zu umgehen, wäre die Aufnahme von 2D-NMR-Spektren. Allerdings würde sich hier durch die Erstellung der zweiten Domäne der zeitliche Aufwand stark erhöhen. Im Gegenzug dazu lassen sich die *se*/TOCSY-Spektren, ähnlich wie die Protonenspektren, aufgrund der guten Empfindlichkeit der Protonen mit dem gleichen geringen Zeitaufwand generieren. Ein weiterer Vorteil ist die bereits erwähnte Möglichkeit durch gezielte Anregung Kopplungsmuster aus überlagerten Regionen sichtbar zu machen.

Nachdem mithilfe der *se*/TOCSY-Experimente verschiedene Spin-Systeme identifiziert werden konnten, wurden zusätzliche *selective* NOESY Experimente durchgeführt, um eventuelle Konnektivitäten zu identifizieren.

4.2.3 Identifizierung von Valinbetain

Bei eingehender Betrachtung des valinähnlichen Spinsystems, welches in Abbildung 27 gezeigt ist, musste zunächst geprüft werden, ob es sich nicht um reines Valin handeln kann. Die NMR-Daten zeigten starke Abweichungen zum Vergleichsspektrum (BMRB) von Valin. Das Vergleichsspektrum wurde bei einem pH-Wert von 7.4 gemessen, während die hier verwendeten Puffer auf den pH-Wert 7.8 eingestellt wurden. Dies könnte ebenfalls zu der Vermutung führen, dass es sich um einen pH-Shift der Signale handelt. So zeigen die diastereotopen Methylgruppen, im Vergleich zum Valinspektrum, bei 1.05 (*d*) und 1.22 ppm (*d*) und das Dublett eines Quartetts eines Quartetts (*dqq*) des H- β bei 2.37 ppm einen Shift in Richtung Tieffeld, wie in Abbildung 28 zu sehen. Das H- α erscheint im gezeigten *se*/TOCSY Spektrum als *d* bei 3.59 ppm und ist damit etwas stärker hochfeldverschoben als bei Valin.

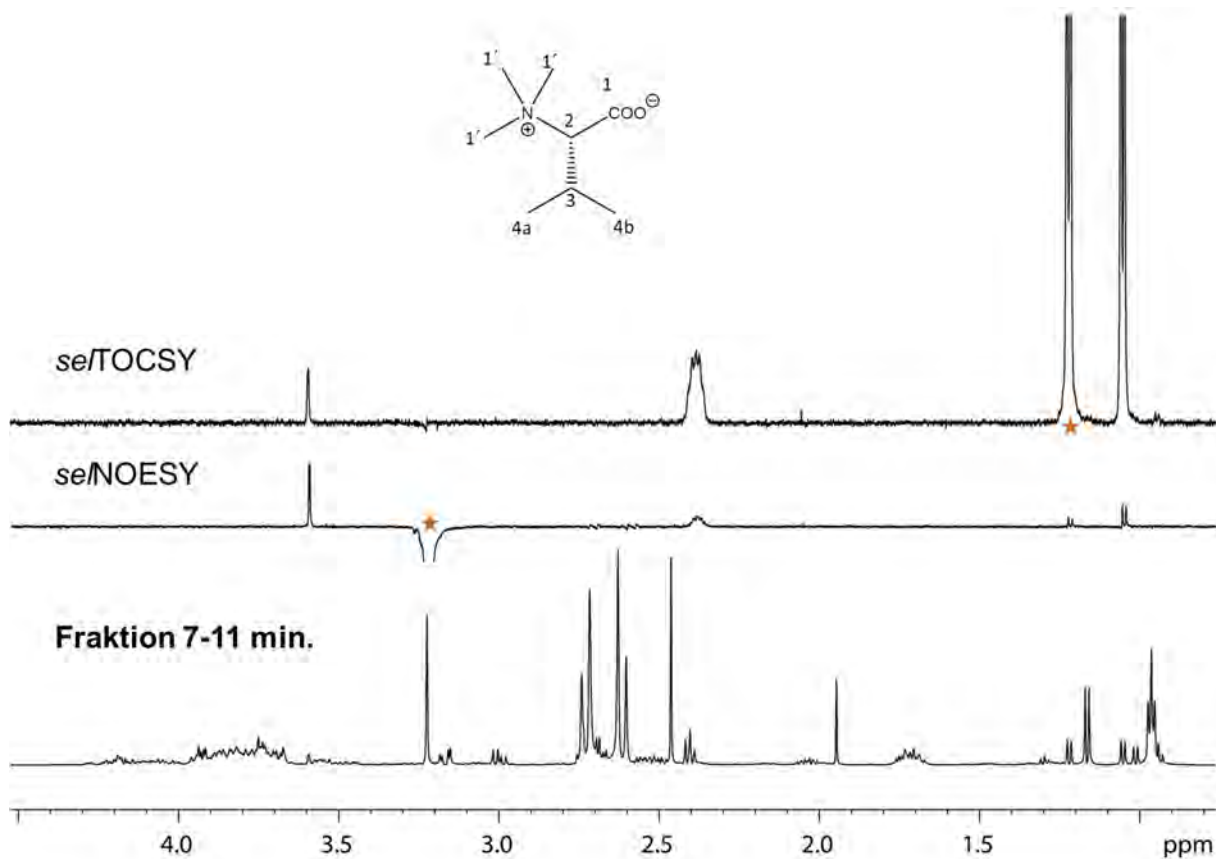


Abbildung 21: Overlay des Fraktionsspektrums der Minuten 7-11 (unten) und dem *se*/TOCSY Spektrum des valinähnlichen Spinsystems (oben) und dem *se*/NOESY Spektrum mit selektiver Anregung auf dem Singulett bei 3.22 ppm.

Das *se*/NOESY Spektrum mit einer Anregung des Singuletts bei 3.22 ppm zeigt jedoch eine eindeutige Kopplung zu den übrigen valinähnlichen Signalen. Damit ließ sich zeigen, dass die Verschiebungen nicht allein auf dem pH-Wert basieren, sondern es sich um ein anderes Molekül handelt. Das Integral des Singuletts von 9H deckt sich mit der Annahme einer N,N,N-trimethylierten Struktur des Valinbetain. Außerdem ist die chemische Verschiebung charakteristisch für Methylgruppen von Betainen bzw. N⁺-Ionenverbindungen. In Abbildung 28 sind die entsprechenden *se*/TOCSY und *se*/NOESY Experimente ergänzend zur Gesamtfraktion gezeigt, welche eindeutig dem Metaboliten Valinbetain zugeordnet werden können.

Damit konnte im Rahmen dieser Arbeit der Metabolit Valinbetain erstmalig in weißem Gemüsespargel nachgewiesen werden.

Zur Validierung des Ergebnisses wurde von CHRISTIAN CZASCHKE das Valinbetain mit Methyljodid unter basischen Bedingungen dargestellt und zu Verfügung gestellt. Anschließend wurde das dargestellte Valinbetain der Fraktion 7-11 min. hinzugegeben

(Abbildung 29). Das Spike-in Experiment war zusätzlich erfolgreich und bestätigte damit die eindeutige Identifizierung des Metaboliten Valinbetain.

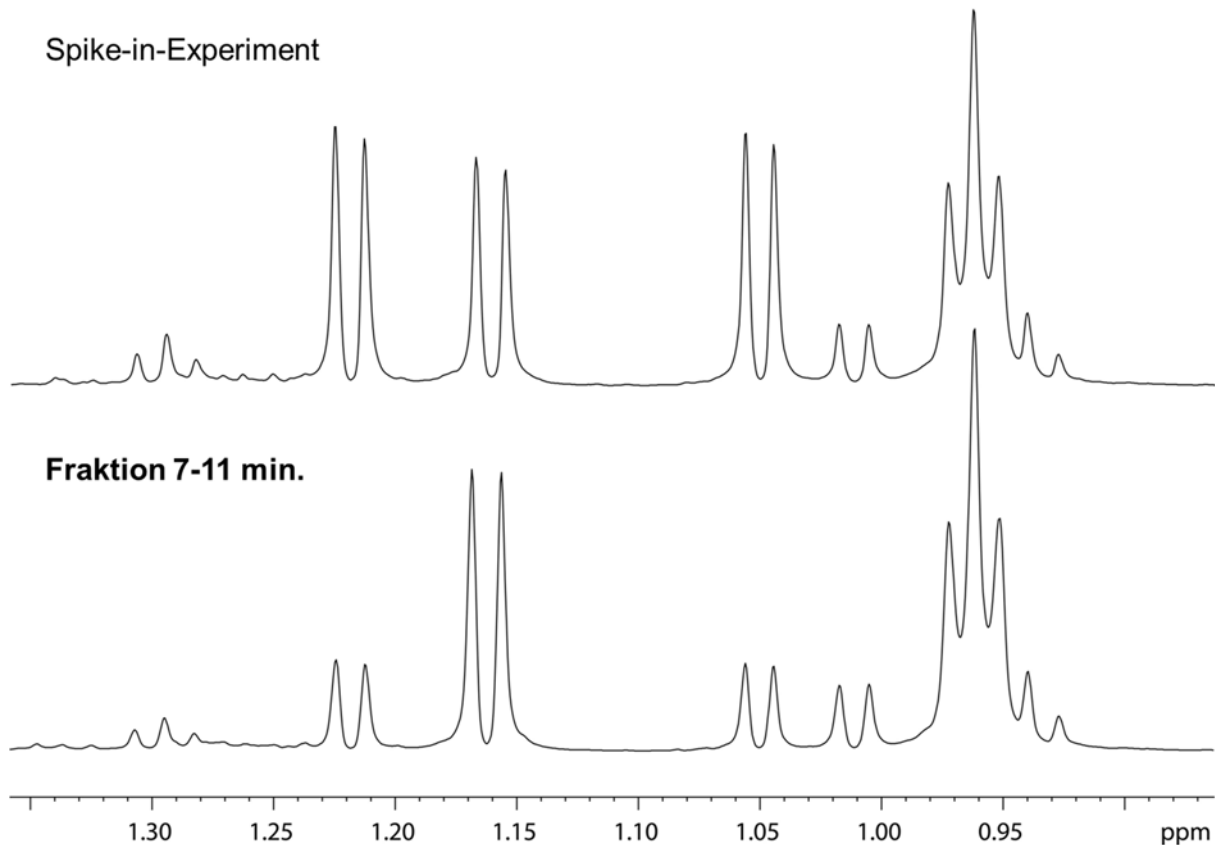


Abbildung 22: Spike-in Experiment. Dargestellt ist die Fraktion 7-11 vor (unten) und nach (oben) der Zugabe des dargestellten Valinbetains. Es ist der Bereich zwischen 0.90 und 1.45 ppm gezeigt. Im oberen Spektrum ist deutlich eine Konzentrationserhöhung der beiden Dubletts von Valinbetain zu erkennen.

Die genaue Funktion von Betainen in biologischen Systemen ist nach aktuellem Kenntnisstand noch nicht vollständig aufgeklärt. Studien zeigten jedoch, dass sie Anteil an osmoseregulierenden Funktionen in Organismen wie *Escherichia coli* und *Staphylococcus aureus* haben.^{64,65} Da Spargel ein stark wasserhaltiger Organismus ist, ließe sich das Vorkommen von Valinbetain als Osmoseregulant erklären.⁶⁶

PEKKINEN *et al.* konnten mithilfe von HILIC-HPLC-MS Analysen zusätzlich zeigen, dass sich der Anteil verschiedener Betaine, darunter auch Valinbetain, im Mäuseurin stark erhöht, wenn diese einer Roggendiät unterzogen werden.⁶⁷ Zum derzeitigen

Kenntnisstand wurde Valinbetain jedoch im Rahmen dieser Arbeit erstmalig in Pflanzen nachgewiesen.

4.2.4 Identifizierung von Beta-[Carboxypropyl]-L-Cystein

Im folgenden Abschnitt wird die Identifizierung des Metaboliten β -[Carboxypropyl]-L-cystein aus weißem Gemüsespargel im Rahmen der Analyse der Fraktion 7-11 beschrieben.

Abbildung 27 zeigt zusätzlich ein cysteinähnliches Spinsystem, welches drei *dds* bei 2.99, 3.16 und 3.92 ppm aufweist und ein β -Carboxypropyl-ähnliches Spinsystem mit einem *d* bei 1.15 ppm, welches einer Methylgruppe in Nachbarschaft zu einem Methinproton zugeordnet werden kann. Drei weitere Signale konnten im *se*/TOCSY Spektrum identifiziert werden, ein Dublett eines Dubletts eines Quartetts (*ddq*) bei 2.55 und zwei *dds* jeweils bei 2.68 und 2.73 ppm. Hier zeigt sich der Vorteil der *se*/TOCSY-Messungen. Während im Fraktionsspektrum diese drei Signale von denen der Zitronensäure überlagert werden, lassen sich in dem *se*/TOCSY Spektrum die Kopplungsmuster sehr gut erkennen (Abbildung 30).

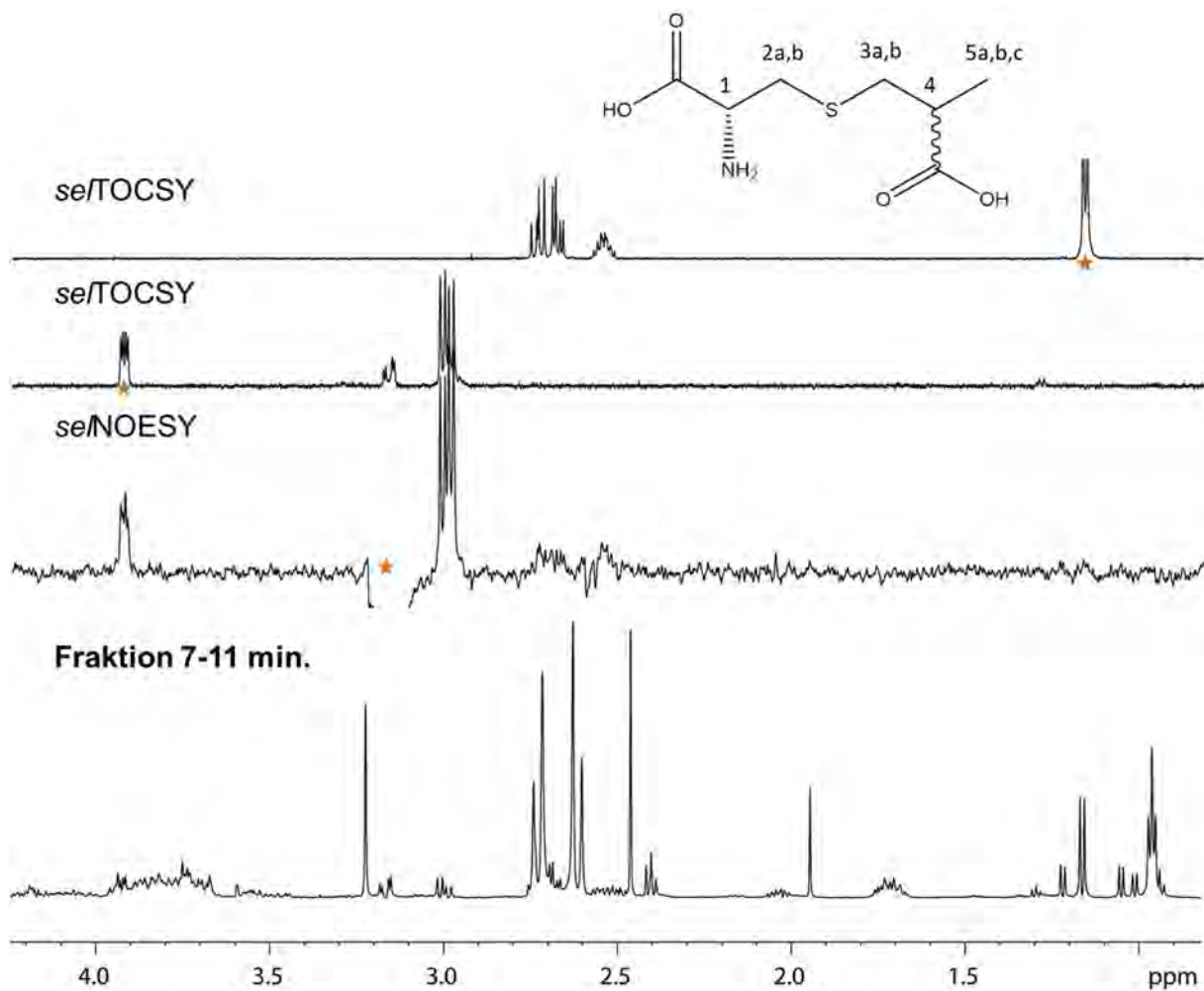


Abbildung 23: Overlay des Fraktionsspektrums der Minuten 7-11 (unten) und den *se*/TOCSY Spektren der β -Carboxypropylstruktur (oben) und der Cysteinstruktur (2. von oben) sowie dem *se*/NOESY Spektrum mit selektiver Anregung auf dem Singulett bei 3.22 ppm, welches eine Konnektivität der einzelnen Spinsysteme belegt.

Ein *se*/NOESY Spektrum mit einer Anregung auf das *dd* der Cysteinstruktur bei 3.16 ppm zeigt eine Kopplung zur $-\text{CH}_2$ und $-\text{CH}$ -Gruppe der β -Carboxypropylstruktur. Dies zeigt deutlich, dass die Substrukturen über das Schwefelatom verknüpft sind.

Zur Validierung des Ergebnisses wurde von CAROLINE SCHMITT die Darstellung des Metaboliten folgendermaßen durchgeführt.

400 mg Cysteinmethylester wurde in 3 mL trockenem Methanol suspendiert. Anschließend wurde 1 mL Crotonsäuremethylester und 120 mg Natriummethanolat hinzugegeben und bei RT für 5 Tage gerührt. Das Lösungsmittel wurde unter Vakuum entfernt.⁶⁹

Das so entstandene Rohprodukt ist ein Diastereomerengemisch, da sich im Carboxypropylrest ein Stereozentrum befindet.⁶⁹

Eine Trennung der Diastereomere soll durch Umkristallisation ermöglicht werden. Dies ist zum Zeitpunkt der Zusammenfassung dieser Arbeit noch nicht abschließend geschehen.

β -[Carboxypropyl]-L-cystein wurde bereits 1981 von KASAI *et al.* aus weißem Gemüsespargel identifiziert.^{70,71} Hierfür wurde eine aminosäurehaltige Fraktion mittels Iodplatinat-Reagenz und Ninhydrin zunächst positiv auf schwefelhaltige Substanzen getestet. Anschließend wurden diese Substanzen mittels Ionenaustauschchromatographie isoliert und identifiziert. Neben dem β -[Carboxypropyl]-L-cystein wurden u.a. zusätzlich S-[2-Carboxy-n-propyl]-L-cystein und S-[1,2-Dicarboxyethyl]-L-cystein identifiziert.

4.2.5 Zusammenfassende Analyse der Fraktion 7-11

Zusätzlich konnten mithilfe der *se*/TOCSY-Messungen der Fraktion 7-11 Citronensäure, Pyroglutaminsäure sowie die Aminosäuren L-Tyrosin, L-Leucin und L-Isoleucin als Metaboliten von *Asparagus officinalis* identifiziert werden. Weiter konnte in der untersuchten Fraktion Uridin identifiziert werden. Außerdem ließen sich die Dubletts, welche leicht tieffeldverschoben zu den Uridin-Signalen der Nukleinbase vorliegen, durch Datenbankabgleich (BMRB), dem Uridinmonophosphat zuordnen. Ein Überblick aller identifizierten Metaboliten der Fraktion 7-11 min. ist in den Abbildungen 31-33 gezeigt. Solche Substanzen, die im Rahmen dieser Arbeit erstmalig in weißem Gemüsespargel identifiziert worden sind, wurden mit einer blauen Raute markiert.

Fraktion 7-11 min.

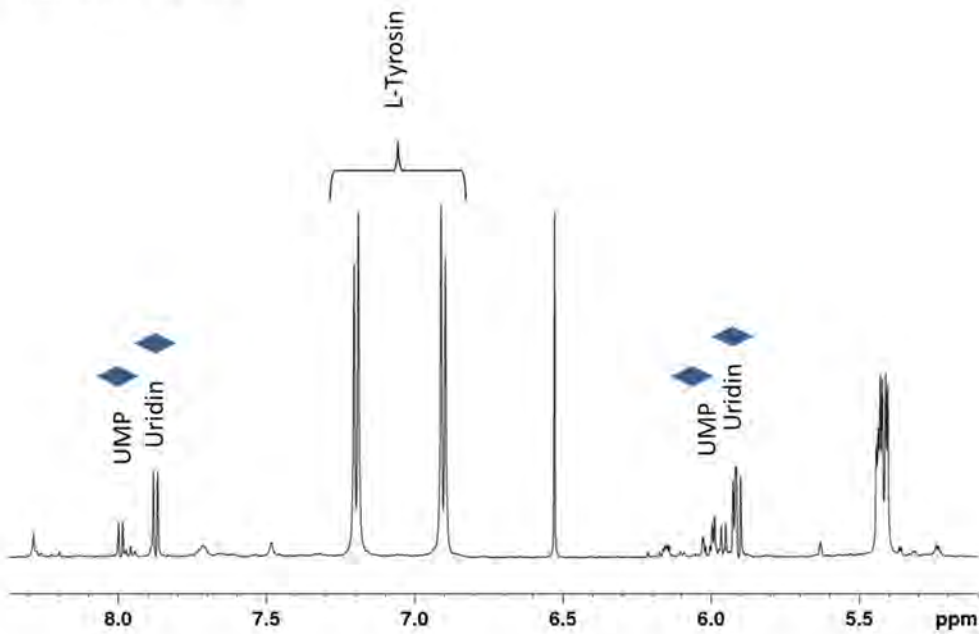


Abbildung 24: Überblick der identifizierten Signale der Fraktion 7-11 im Bereich 5.0-8.5 ppm. Zu sehen sind Signale der Metaboliten UMP, Uridin und L-Tyrosin.

Fraktion 7-11 min.

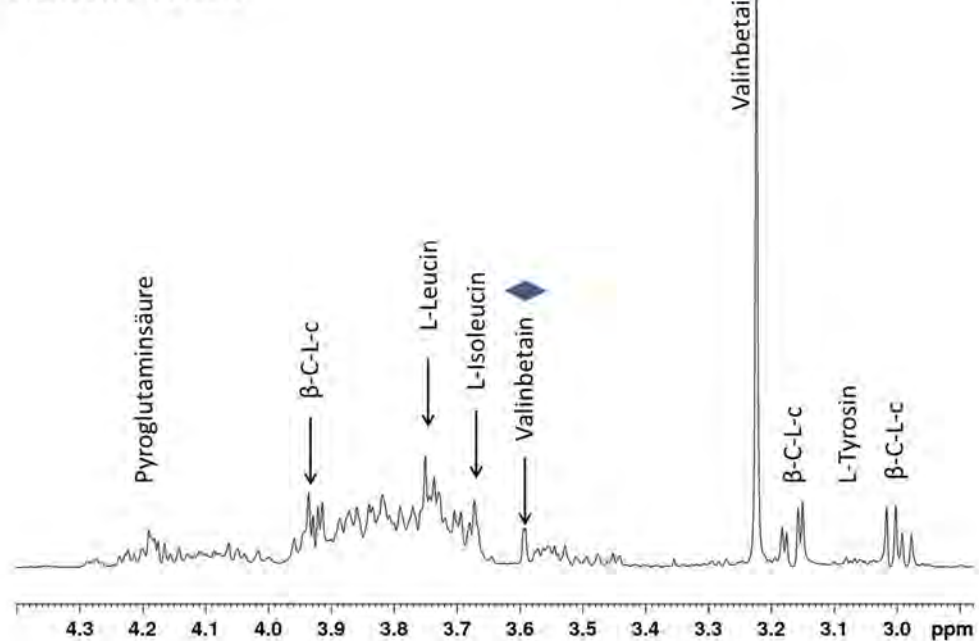


Abbildung 25: Überblick der identifizierten Signale der Fraktion 7-11 im Bereich 2.9-4.4 ppm. Zu sehen sind Signale der Metaboliten Pyroglutaminsäure, β -[Carboxypropyl]-L-cystein (β -C-L-c), L-Leucin, L-Isoleucin, Valinbetain und L-Tyrosin.

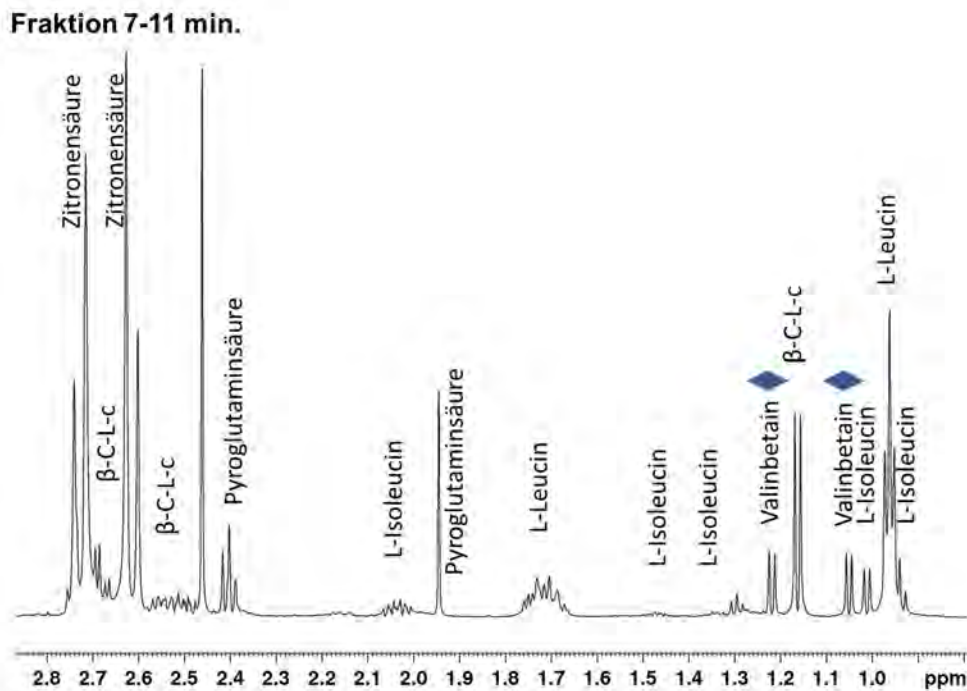


Abbildung 26: Überblick der identifizierten Signale der Fraktion 7-11 im Bereich 0.8-2.8 ppm. Zu sehen sind Signale der Metaboliten Zitronensäure, β -[Carboxypropyl]-L-cystein (β -C-L-c), Pyroglutaminsäure, L-Isoleucin, L-Leucin und Valinbetain.

Mithilfe der Vortrennung mittels präoperativer HPLC war es möglich Fraktionen zu erhalten, die eine hohe Anzahl separierter NMR-Signale enthalten. Dies ermöglichte die selektive Anregung von Protonen definierter Frequenzen, sodass mithilfe der *se*/TOCSY-Experimente einzelne Spinsysteme identifiziert und weiter bestimmt werden konnten. Zusätzlich ließen sich weitere selektive NMR-Experimente, wie das *se*/NOESY durchführen. Hierdurch konnten gezielt Konnektivitäten der einzelnen Spinsysteme identifiziert werden.

Außerdem ließen sich die Metaboliten Valinbetain und β -[Carboxyisopropyl]-L-cystein in Vollextrakt des weißen Gemüsespargels wiederfinden. Was ein deutlicher Hinweis darauf ist, dass diese Substanzen in Spargel vorhanden sind und eine biologische Funktion einnehmen und nicht im Verlauf der Analysen erzeugt wurden.

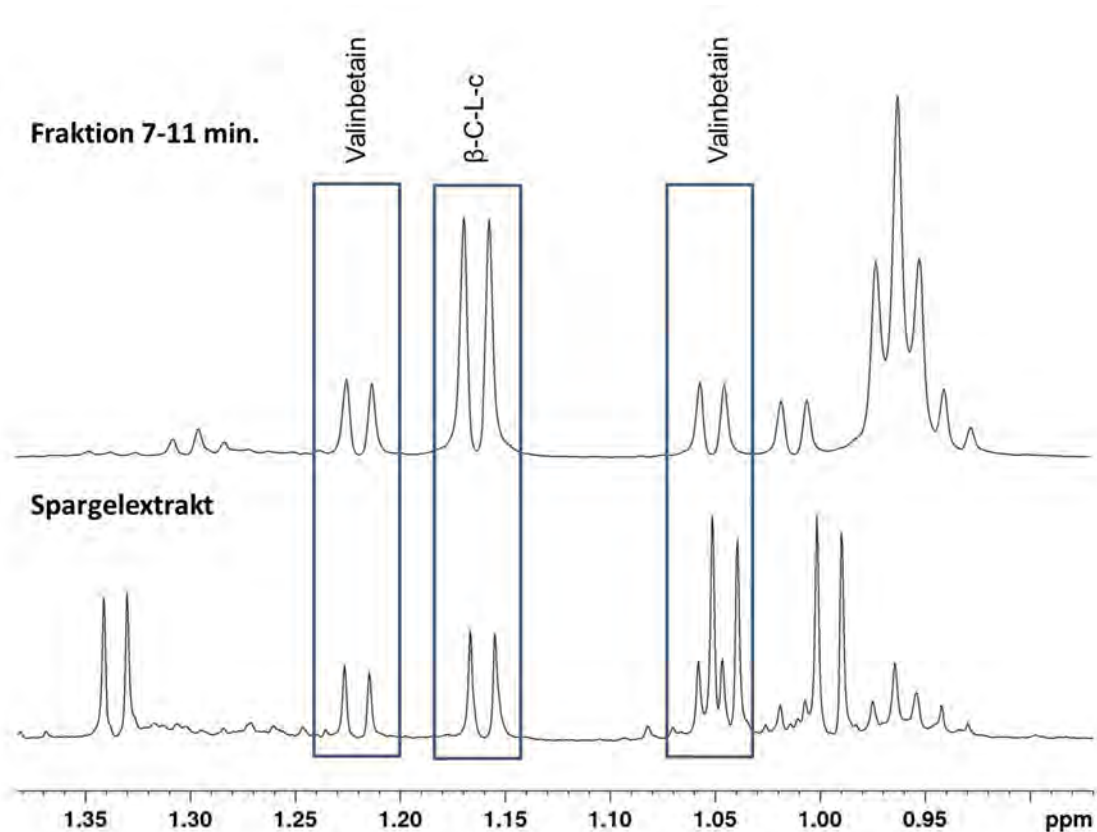


Abbildung 27: Overlaymodus des Gesamtextrakts der wässrigen Extraktion aus weißem Gemüsespargel (unten) und der Fraktion 7-11 (oben). Die Signale der Metaboliten Valinbetain und β -[Carboxyisopropyl]-L-cystein sind zur besseren Übersicht in blaue Kästen eingefasst.

Nach der erfolgreichen Identifizierung verschiedener Metaboliten aus der Fraktion 7-11 und der ebenso erfolgreichen Wiederfindung der Metaboliten Valinbetain und β -[Carboxypropyl]-L-cystein in polaren Gesamtextrakt des weißen Gemüsespargels wurden die verbliebenen Fraktionen ebenfalls analysiert.

4.2.7 Identifizierung einer unbekannt Substanz I aus der HPLC-Trennung 1 der Spargelprobe 1

Fraktion 16 der Trennung 1 der Spargelprobe 1 enthält ebenfalls eine Reihe separierter NMR-Signale, welche sich im Rahmen selektiver NMR-Experimente anregen ließen. In Abbildung 35 sind einzelne *se*/TOCSY-Spektren und die Fraktion 16 gezeigt.

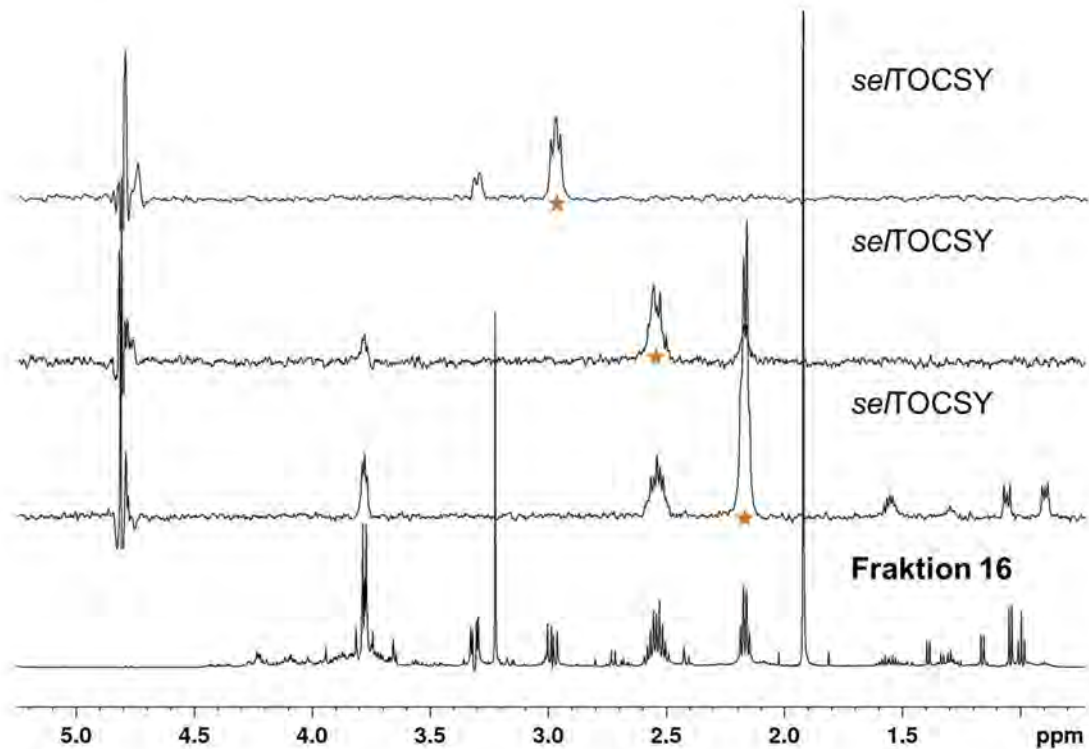


Abbildung 28: Overlay des Protonenspektrums der Fraktion 16 mit drei *se*/TOCSY Spektren. Zu erkennen ist ein Spektrum mit cysteinähnlichen Signalen (oben) und zwei weiterer *se*/TOCSYs (mitte).

Die Interpretation der Daten ist an dieser Stelle nicht eindeutig, da noch nicht abschließend gesagt werden kann, welche Signale zum gesuchten Metaboliten I gehören. Insbesondere der Bereich von 1.61-0.84 ppm erschwert eine eindeutige Interpretation. Basierend auf den dominanten NMR-Signalen, welche mittels *se*/TOCSY erfasst wurden (Abbildung 35, *se*/TOCSY-Spektren), wurde zunächst postuliert, dass es sich um ein Tripeptid bestehend aus L-Cystein, L-Glutamin und L-Isoleucin handelt. Dies konnte jedoch aufgrund der in Frage kommenden identifizierten Molekülmassen nicht bestätigt werden. Allerdings konnte dem Metaboliten I zu diesem Zeitpunkt keine eindeutige Molekülmasse zugeordnet werden. Es wurden bei der massenspektrometrischen Untersuchung der Probe die Werte mit einem m/z von 194.95, 216.91 und 232.88 $[M-H]^-$ identifiziert.

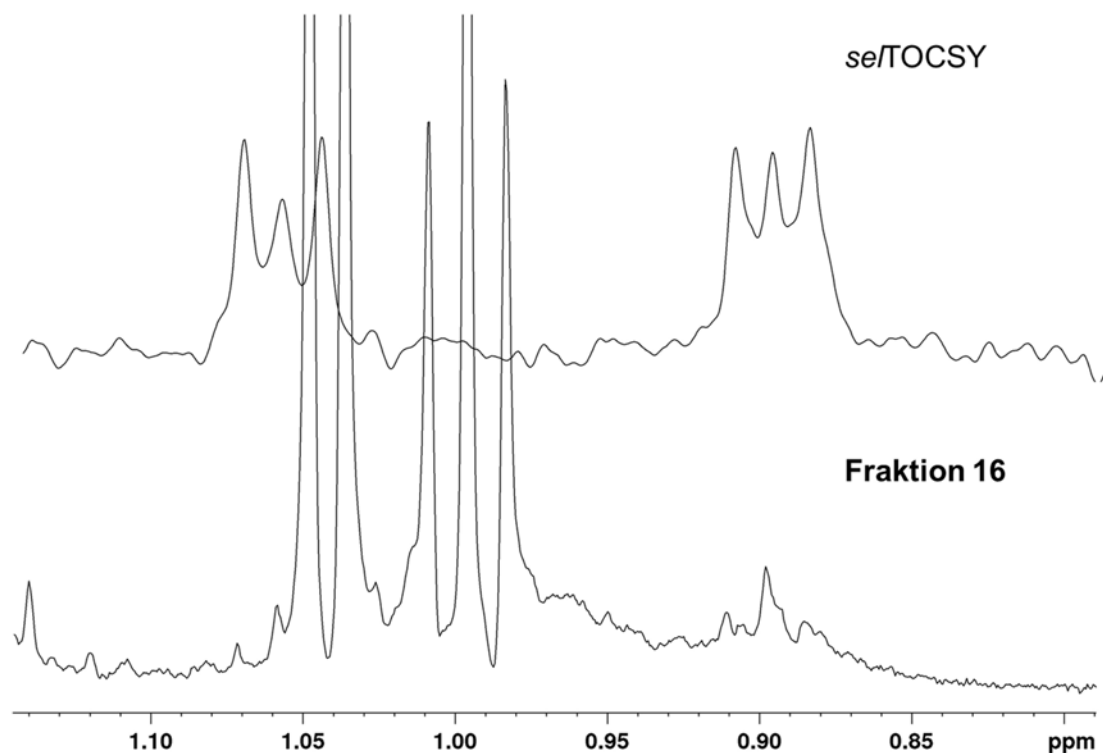


Abbildung 29: Vergrößerung des Overlays vom Protonenspektrum der Fraktion 16 (unten) und dem *se*/TOCSY (oben) mit Anregung bei 2.16 ppm (nicht gezeigt). Das *se*/TOCSY zeigt ein Aufspaltungsmuster, welches zwei Triplets bei 1.06 und 0.89 ppm entsprechen könnte.

Wie in Abbildung 36 zu erkennen, besteht die Möglichkeit, dass eventuell nicht das Dublett und das Triplett bei 1.04 und 0.99 ppm zum Spinsystem gehören, sondern zwei mögliche Triplets, die davon überlagert sind. Damit würde die Annahme, dass L-Isoleucin ein Teil des Moleküls ist nicht bestätigt werden können. Es besteht jedoch ebenso die Möglichkeit, dass ein anderes Spinsystem bei der Anregung des *dds* bei 2.16 ppm zusätzlich angeregt wurde und diese Signale nicht zum Metaboliten I gehören. Die Integrale aller Signale des aliphatischen Bereichs zeigten Werte von 0.5 und wurden auf 1 gerundet. Dies könnte ein weiterer Hinweis darauf sein, dass sie nicht zum Metaboliten I gehören.

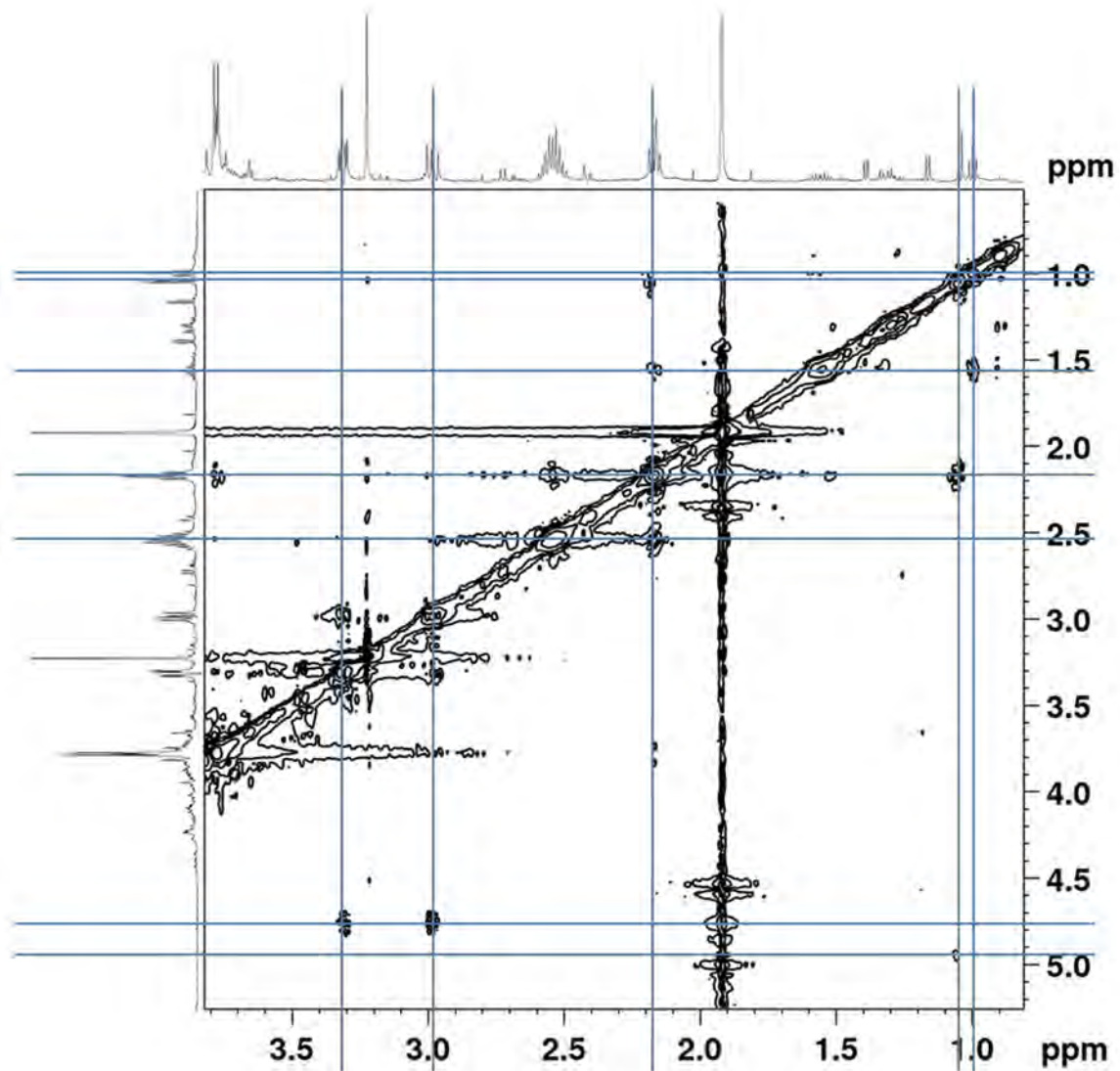


Abbildung 30: 2D-TOCSY der Fraktion 16. In blau wurden Hilfslinien eingezeichnet, die Hinweise auf die einzelnen Spinsysteme geben.

Im 2D-TOCSY (Abbildung 37) lassen sich verschiedene Spinsysteme erkennen. Zunächst ist der Cystein-Teil des Moleküls eindeutig den α s bei 3.31 sowie 2.98 ppm zuzuordnen und auch das H- α wird bei 4.76 ppm ersichtlich. Im Protonenspektrum befand sich das H- α in der Wasserunterdrückung und war damit nicht eindeutig identifizierbar. Auch das 2D-TOCSY lässt vermuten, dass die Signale im aliphatischen Bereich zu dem Spinsystem der Signale bei 2.16 und 2.54 ppm gehören. Es ist jedoch auch hier schwer zu interpretieren, ob es sich um das Dublett und das Triplet handelt oder die zwei Triplets darunter. Ein se /NOESY mit einer Anregung auf dem Signal bei 2.16 ppm könnte Aufschluss darüber bringen.

Da die Datenlage noch nicht eindeutig ist, lässt sich an dieser Stelle zusammenfassen, dass es sich um ein Molekül mit der Untereinheit Cystein handelt, was drei Möglichkeiten der Verknüpfung bietet: Über den Schwefel, die Carboxylgruppe oder das Amid. Die verhältnismäßig geringen Massen, die identifiziert wurden, geben Aufschluss darüber, dass es sich mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht um ein Tripeptid handelt, sondern Überlagerungen der Signale zu fehlerhaften Interpretationen führen konnten. Dies zeigt, wie wichtig die eindeutige Zuordnung der Molekülmasse zu den Metaboliten ist.

Zur weiteren Identifizierung wurden zusätzliche zweidimensionale NMR Experimente aufgesetzt (HSQC, HMBC). Allerdings reichte die Konzentration der Substanz in der Fraktion nicht aus, um statistisch relevante Signale detektieren zu können.

4.2.8 Identifizierungen bekannter Substanzen aus der HPLC-Trennung 1 der Spargelprobe 1

Zusätzlich konnten die Metaboliten Glucose, Fructose, Sucrose, L-Alanin, L-Phenylalanin, L-Valin sowie Äpfelsäure identifiziert werden. Die Fraktionen mit den jeweiligen gekennzeichneten Signalen sind den Abbildungen 38-42 zu entnehmen.

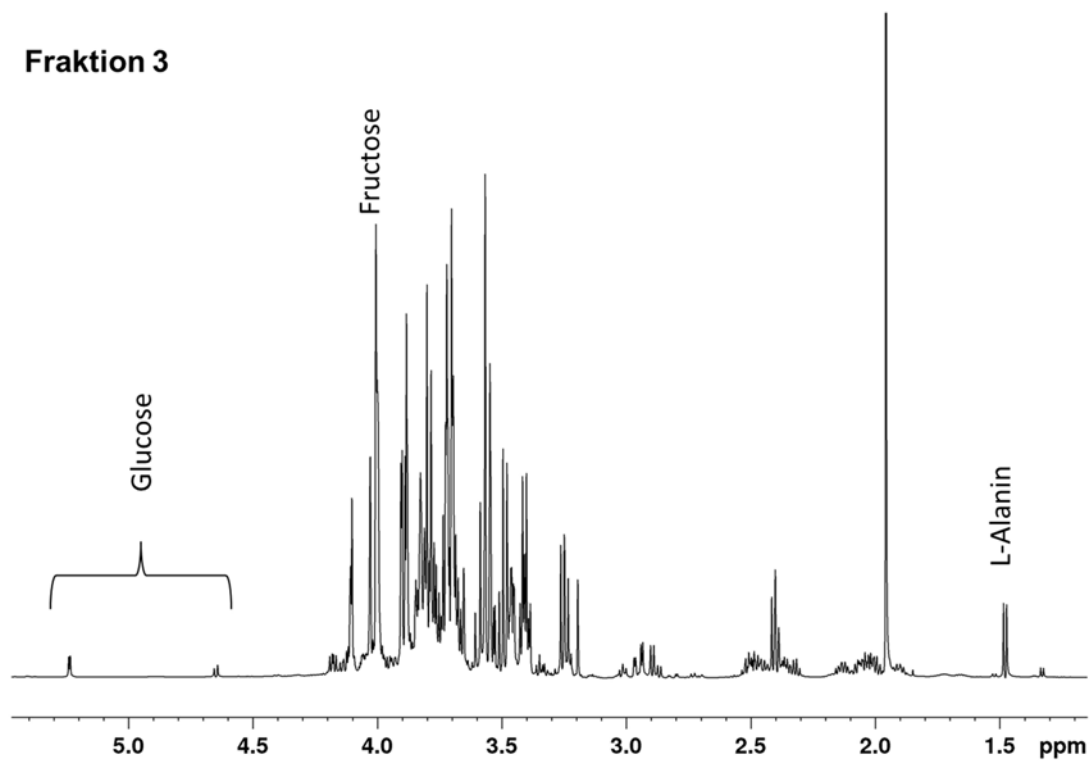


Abbildung 31: Protonenspektrum der Fraktion 3 der Trennung 1 der Spargelprobe 1. Es konnten einzelne Signale verschiedenen Metaboliten zugeordnet werden. Glucose (5.24 ppm, 4.65 ppm), Fructose (4.00 ppm), Alanin (1.47 ppm).

Bei Betrachtung der Fraktion 3 der Trennung 1 der Spargelprobe 1 konnten weitere separierte Signale einzelner Metaboliten identifiziert werden. Es konnten die alpha- und beta-ständigen H-1-Protonen der Glucose bei 5.24 ppm und 4.65 ppm identifiziert werden. Außerdem konnte das H-3 der Fructose bei 4.00 ppm und das Dublett der Methylgruppe von Alanin bei 1.47 ppm eindeutig identifiziert werden.

Fraktion 4

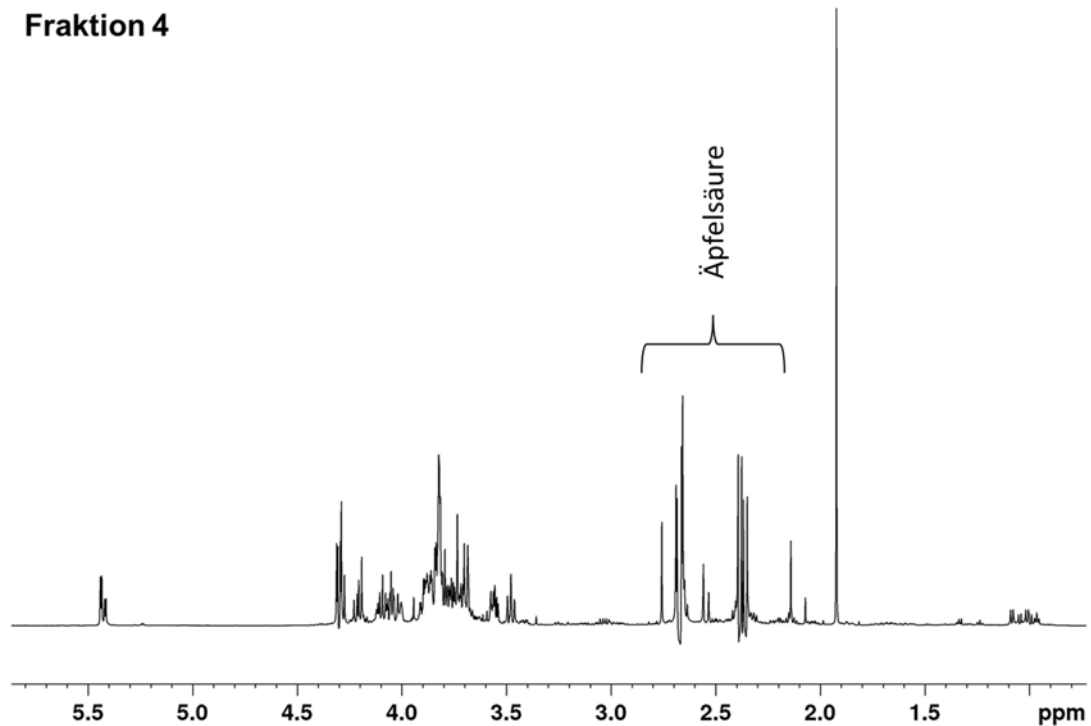


Abbildung 32: Protonenspektrum der Fraktion 4 der Trennung 1 der Spargelprobe 1. Es konnten einzelne Signale einem Metaboliten zugeordnet werden. Äpfelsäure (2.71 ppm, 2.44 ppm).

Eine eingehende Betrachtung der Fraktion 4 der Trennung 1 der Spargelprobe 1 führte zur eindeutigen Identifizierung der diastereotopen CH_2 -Gruppe der Äpfelsäuresäure bei 2.71 ppm (*dd*) und 2.44 ppm (*dd*).

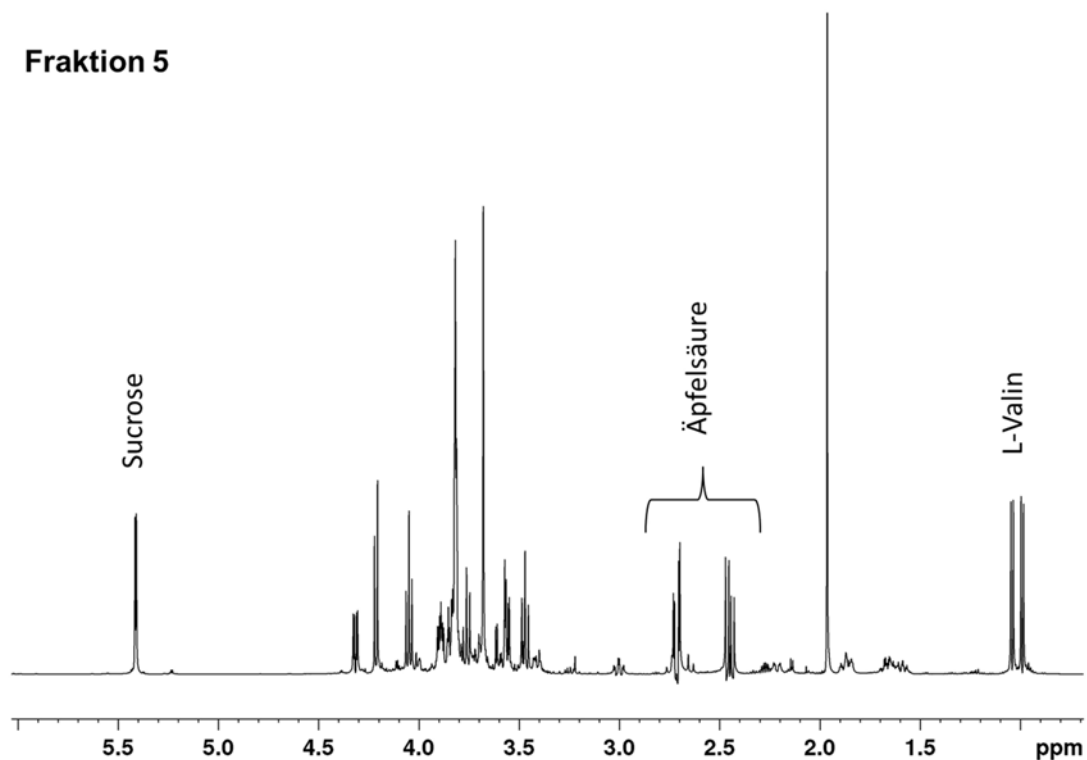


Abbildung 33: Protonenspektrum der Fraktion 5 der Trennung 1 der Spargelprobe 1. Es konnten einzelne Signale verschiedenen Metaboliten zugeordnet werden. Sucrose (5.43 ppm), Äpfelsäure (2.71 ppm, 2.44 ppm) und Valin (1.04 ppm, 0.99 ppm).

Eine nähere Betrachtung der Fraktion 5 der Trennung 1 der Spargelprobe 1 zeigte ein Signal bei 5.43 ppm, welches sich eindeutig dem H-1 der Sucrose zuordnen ließ. Außerdem konnten die *dds* der diastereotopen Protonen der CH₂-Gruppe der Äpfelsäure bei (2.71 ppm, 2.44 ppm) identifiziert werden. Zusätzlich ließen sich die beiden Dubletts der diastereotopen Methylgruppen von Valin bei 1.04 ppm und 0.99 ppm zuordnen.

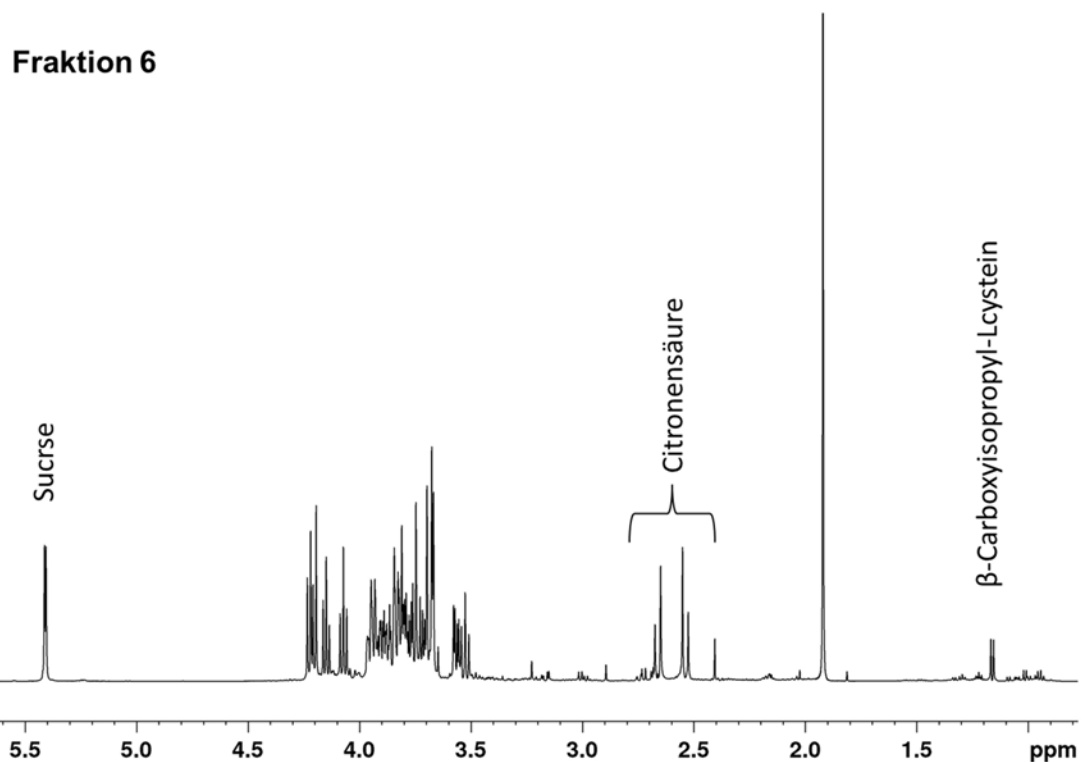


Abbildung 34: Protonenspektrum der Fraktion 6 der Trennung 1 von der Spargelprobe 1. Es konnten einzelne Signale verschiedenen Metaboliten zugeordnet werden. Sucrose (5.43 ppm), Citronensäure (2.66 ppm, 2.53 ppm) und β -[Carboxyisopropyl]-L-cystein (1.16 ppm).

In Fraktion 6 der Trennung 1 der Spargelprobe 1 konnte bei 5.43 ppm das Signal des H-1 der Sucrose identifiziert werden, sowie die Dubletts der Citronensäure (2.66 und 2.53 ppm). Außerdem konnte in dieser Fraktion bereits das Dublett der Methylgruppe des β -[Carboxyisopropyl]-L-cysteins bei 1.16 ppm identifiziert werden.

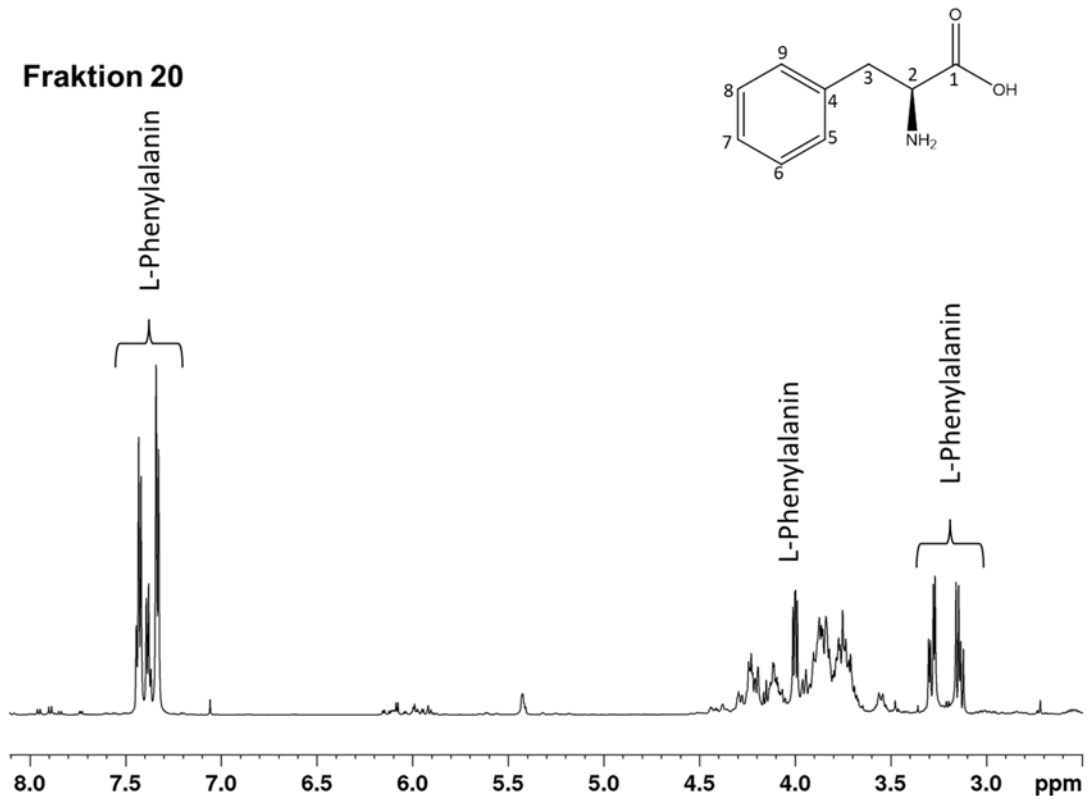


Abbildung 35: Protonenspektrum der Fraktion 20 der Trennung 1 der Spargelprobe 1. Es konnten einzelne Signale der Aminosäure L-Phenylalanin zugeordnet werden.

In dem Protonenspektrum der Fraktion 20 der Trennung 1 von der Spargelprobe 1 ließen sich eindeutig und vollständig die Signale der Aminosäure Phenylalanin zuzuordnen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es mithilfe der *se*/TOCSY und *se*/NOESY Experimente möglich war fast alle Signale der Fraktion 7-11 eindeutig zu identifizieren. Ebenso zeigten sich eindeutige Vorteile der Experimente bei der Analyse der Fraktion 16. Allerdings zeigte sich besonders bei der Interpretation der Daten der Fraktion 16, dass die Molekülmasse eine äußerst wichtige Information bei der Identifizierung von unbekannt Substanzen darstellt. Um diese Anwendung weiterhin auch für die Identifizierung von gänzlich unbekannt Metaboliten nutzen zu können, soll geprüft werden, wie MS-Daten mit den NMR-Daten korreliert werden können, um so eine weitere Informationsquelle zu erschließen und in die Analysen mit einzubinden. Basierend auf der Verwendung dieser NMR Experimente wird die Korrelation

der MS-Daten mit nur einem separierten NMR-Signal ausreichend sein. Um dies näher zu prüfen wurde eine Trennung an einer UHPLC durchgeführt.

4.3 Identifizierung von Metaboliten aus polaren Extrakten mittels UH-PLC-MS/MS-NMR-Untersuchungen (HPLC-Trennung 2 der Spargelprobe 2)

Bei der Fraktion 7-11 handelte es sich um eine aus fünf Fraktionen zusammengefügte Fraktion, so dass Metaboliten vereint sind, die über einen Zeitraum von fünf Minuten eluierten. Um Elutionsprofile aus den NMR- oder den MS-Messungen erstellen zu können, werden im weiteren Verlauf der Arbeit kürzere Fraktionsabstände gewählt. Wie bereits aus vorangegangenen Arbeiten zur dreidimensionalen Kreuzkorrelation (3DCC) sowie Anderen (z.B. Nicholson) zu entnehmen ist, lassen sich die Verläufe der NMR-Signale (EDCs) mit den EICs der MS-Messung korrelieren. Hierfür müssen die MS-Daten reduziert werden. Das bedeutet, dass tausende Datenpunkte gemittelt werden, um die gleiche Anzahl Datenpunkte pro EIC zu erhalten, wie NMR-Fraktionen vorliegen. Für die Identifizierung von Metaboliten mittels *se*/TOCSY und *se*/NOESY Experimenten ist es jedoch notwendig die Fraktionen mithilfe einer präparativen HPLC zu erstellen, andernfalls lassen sich nicht die nötigen Konzentrationen erreichen. Häufig sind präparative oder semi-präparative HPLCs jedoch lediglich mit einem DAD UV-Detektor ausgestattet. Somit entfällt die Möglichkeit EICs zu reduzieren und die Massen mit den NMR-Signalen zu korrelieren. Um dennoch eine Korrelation zu ermöglichen, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein alternativer Schritt eingeführt. Hierfür werden die einzelnen Fraktionen erneut mittels verkürztem LC-Lauf massendetektiert untersucht. Der LC-Lauf ermöglicht eine relative Quantifizierung der Substanzmengen der detektierten Moleküle ohne Verwendung eines externen Standards. Dafür werden die EICs der Läufe extrahiert, integriert und gegen die Fraktion aufgetragen. Durch dieses Verfahren wird das mathematische Reduzieren der Daten redundant und die Daten können direkt miteinander korreliert werden.

Zusätzlich zeigte sich, dass eine Berechnung aller Signale der Metaboliten nicht erreicht werden kann, da es auch bei den Fraktionen noch zu Überlagerungen der Signale kommt und dies eine eindeutige Zuordnung erschwert.

Eine Korrelation eines einzelnen NMR-Signals mit einem EIC sollte im Rahmen dieser Strategie für eine eindeutige Zuordnung der Masse ausreichen, da mithilfe der

se/TOCSY und se/NOESY Experimente Spin-Systeme und deren Konnektivität identifiziert werden können. Daher bietet sich in diesem Fall die Entwicklung eines Single Signal Correlation (SSC) Systems, zur Korrelation von NMR und MS-Daten an.

In Abbildung 43 sind die NMR-Spektren der einzelnen Fraktionen gezeigt. Einzelne NMR-Signale wurden exemplarisch entlang der chemischen Verschiebung über den Verlauf der Fraktionen hinweg farblich markiert (EDCs).

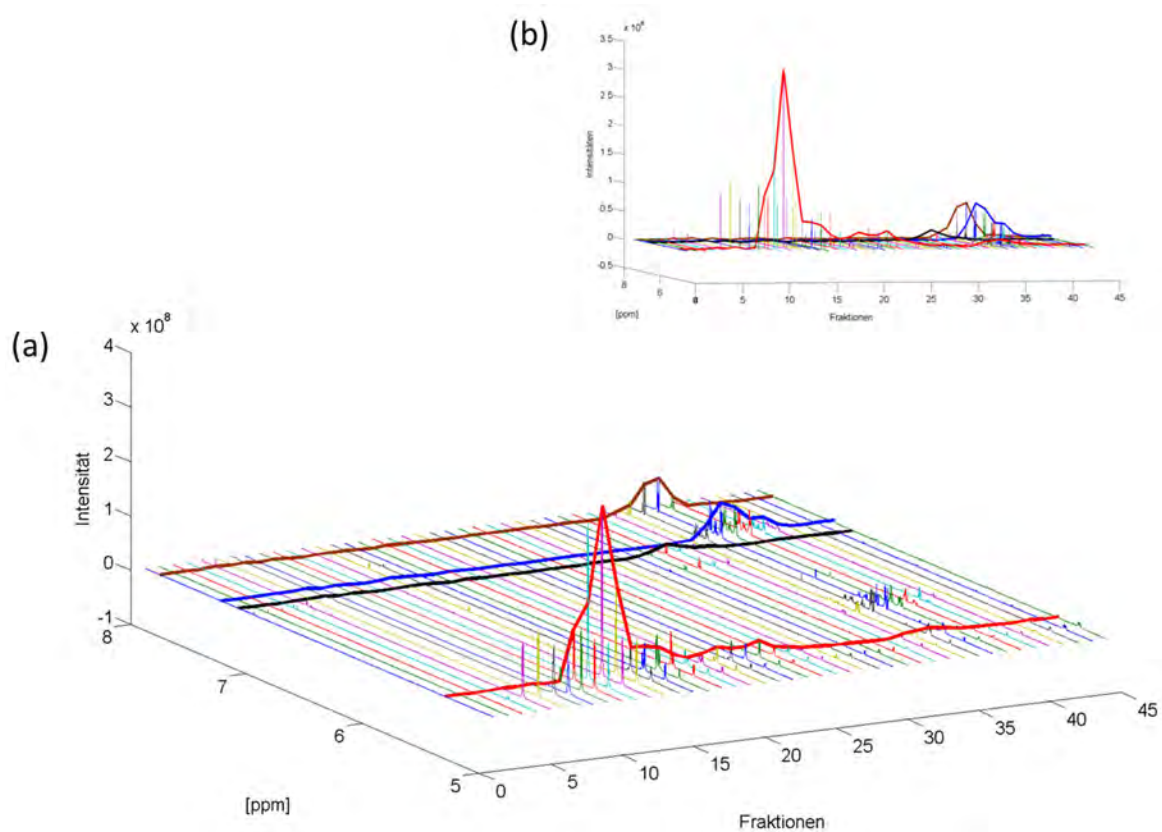


Abbildung 36: Dreidimensionale Darstellung der NMR-Spektren aus der HPLC-Trennung 2 der Spargelprobe 2. Einzelne chemische Verschiebungen wurden zur Verfolgung von Konzentrationen über den Fraktionsverlauf hinweg farblich kenntlich gemacht (EDCs). (a): rot: Sucrose (5.41 ppm), schwarz: Tyrosin (7.19 ppm), blau: Phenylalanin (7.34 ppm), braun: Uridin (7.88 ppm) (b): seitlicher Blick auf den Verlauf der EDCs.

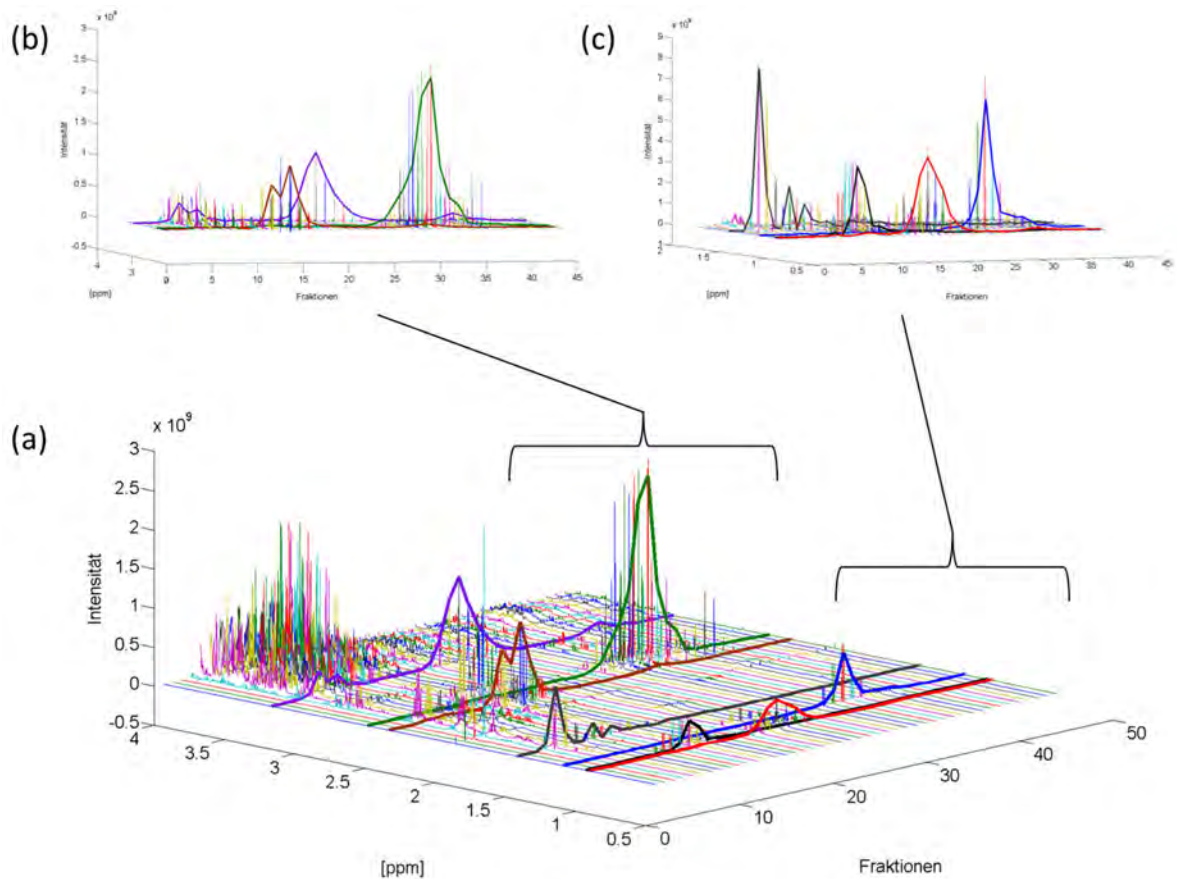
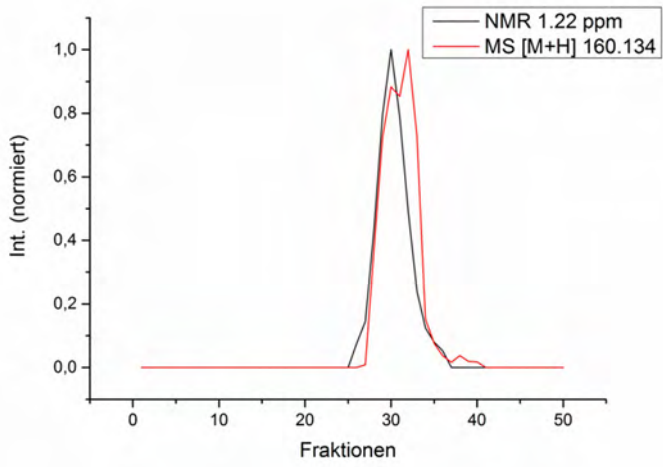
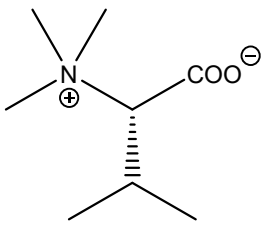
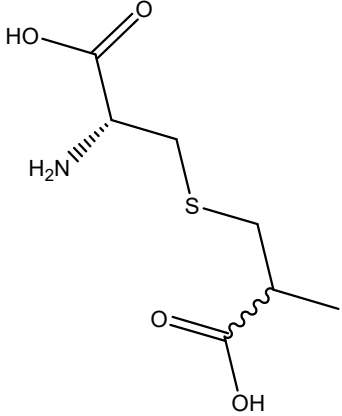
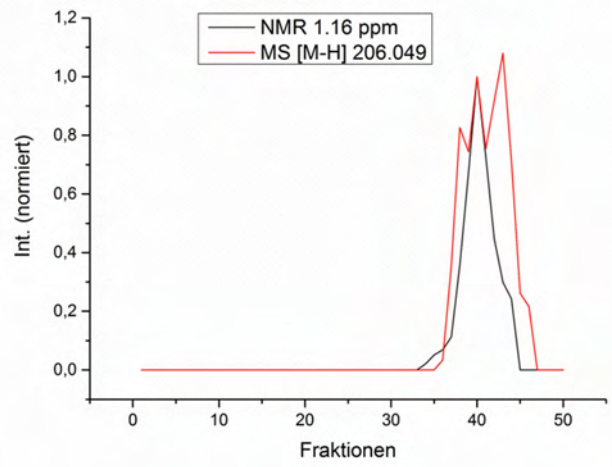


Abbildung 37: (a) Dreidimensionale Darstellung der NMR-Spektren aus der HPLC-Trennung 2 der Spargelprobe 2. Einzelne chemische Verschiebungen wurden zur Verfolgung von Konzentrationen über den Fraktionsverlauf hinweg farblich kenntlich gemacht (EDCs). (a): lila: Valinbetain (3.22 ppm), grün: Citronensäure (2.54 ppm), braun: Äpfelsäure (2.39 ppm), taupe: Alanin (1.49 ppm), blau: β -[Carboxyisopropyl]-L-cystein (1.15 ppm), schwarz: Valin (1.05 ppm), rot: Leucin (0.96 ppm). (b)/(c): seitlicher Blick auf den Verlauf der EDCs.

Anschließend wurden alle Fraktionen mit einem 15-minütigen analytischen HPLC-Lauf erneut vermessen und massenspektrometrisch detektiert. Aus den so erhaltenen TICs der Fraktionen wurden die EICs von Valinbetain und β -[Carboxyisopropyl]-L-cystein extrahiert, integriert und gegen die Fraktionen aufgetragen (*Reduced extracted Ion Chromatogram*, RIC). Die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefasst. Für eine bessere graphische Darstellung wurden die Werte der RICs und EDCs normiert.

Tabelle 5: Zusammenfassung der Ergebnisse der Entwicklung des *single signal correlation systems* am Beispiel von Valinbetain und β -[Carboxyisopropyl]-L-cystein.

	
<p>Valinbetain</p> <p>Korr. (Pearson): 0.91371162</p>	
	<p>β-Carboxisopropyl-L-cystein</p> <p>Korr. (Pearson): 0.86853569</p>

Zusätzlich wurden die Korrelationskoeffizienten der RICs mit den EDCs, welche nach Integral erstellt wurden, nach Pearson berechnet. Beide zeigten hohe Werte und damit eine erfolgreiche positive Korrelation an. Die Grafen der Tabelle 5 weisen bei den MS-Messungen Mehrfachspitzen auf. Diese können auf leichte Unterschiede in der Probeninjektion zurückzuführen sein. Ebenso können minimale Temperaturschwankungen im Säulenbereich zu einer Änderung des Retentionsverhaltens führen. Dennoch sind die Werte der Korrelationen eindeutig positiv.

Die Ergebnisse der entwickelten SSC zeigen, dass eine Korrelation der massenspektrometrischen Daten mit den NMR-Daten möglich ist. Damit lassen sich die Molekülmassen der Metaboliten den NMR-Signalen zuordnen, was insbesondere einer Identifizierung von unbekannt Substanzen erheblich entgegenkommt. Hierbei reicht ein isoliertes NMR-Signal aus, welches sich einem EIC zuordnen lässt. Ist die zugehörige Molekülmasse ermittelt, kann dies insbesondere bei der Identifizierung unbekannter Substanzen äußerst hilfreich sein. Zum einen, da sie erste Hinweise auf Verknüpfungen zu anderen Spinsystemen geben können und zum anderen können sie auf das Vorhandensein von Heteroatomen oder funktionellen Gruppen, welche sich nicht im Protonenspektrum abbilden, hinweisen. Es zeigte sich jedoch, dass die Konzentration der Metaboliten für eine zusätzliche Untersuchung mittels *se*/TOCSY und *se*/NOESY Experimenten nicht ausreichte, weshalb im weiteren Verlauf wieder auf die Verwendung von präparativer Trennverfahren zurückgegriffen wurde.

4.4 Identifizierung von Metaboliten aus polaren Extrakten mittels NMR-Spektroskopie und dem SSC-System (HPLC-Trennung 3 der Spargelprobe 3)

Nachdem sich zunächst im ersten Versuch die Kombination aus *se*/TOCSY und *se*/NOESY Experimenten als vorteilhaft erwiesen hatte und im Rahmen des zweiten Versuchs das Prinzip der Single Signal Correlation (SSC) entwickelt wurde, sollen nun beide Strategien zusammengeführt werden. Hierfür wurde sich einer präparativen HPLC bedient und die Spargelprobe 3 wie in Abschnitt 3.5.1.3 beschrieben mithilfe einer RP-C18-Säule (NUCLEODUR[®] PYRAMIDE) grob getrennt.

Die Vortrennung wurde mittels DAD-detektiert. Es wurden 105 Fraktionen, jeweils 20 Sekunden lang, aufgefangen. In Abbildung 44 ist der Bereich von Minute 1 bis 30 des UV/VIS-Chromatogramms zu sehen. Der zugehörige Gradient ist in Abbildung 7, Abschnitt 3.5.1.3 dargestellt. Um eine möglichst hohe Konzentration der Minorkomponenten zu erhalten, wurde der Lauf insgesamt 25-mal wiederholt.

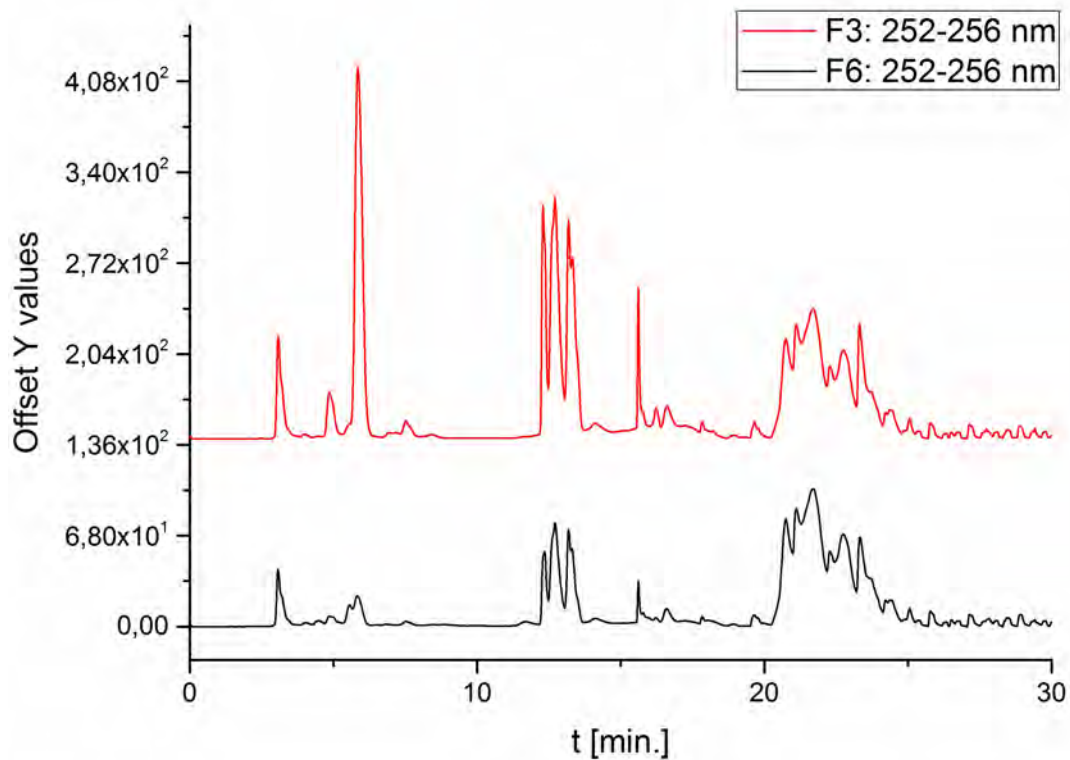


Abbildung 44: Vergleich der UV/VIS-Chromatogramme der präparativen HPLC-Trennung 3 der Spargelprobe 3. Im Vergleich sind der dritte (rot) und der sechste (schwarz) Lauf dargestellt. Es lassen sich Unterschiede in den Intensitäten, jedoch keine Verschiebungen der Signale erkennen.

Es wurden jeweils exemplarisch der dritte und der sechste HPLC-Lauf verglichen. In Abbildung 44 zeigen sich keine starken Unterschiede im Elutionsverhalten der Substanzen, die bei einer Wellenlänge von 252-256 nm detektiert wurden. Für diese Metaboliten lässt sich von einer guten Reproduzierbarkeit der Daten sprechen.

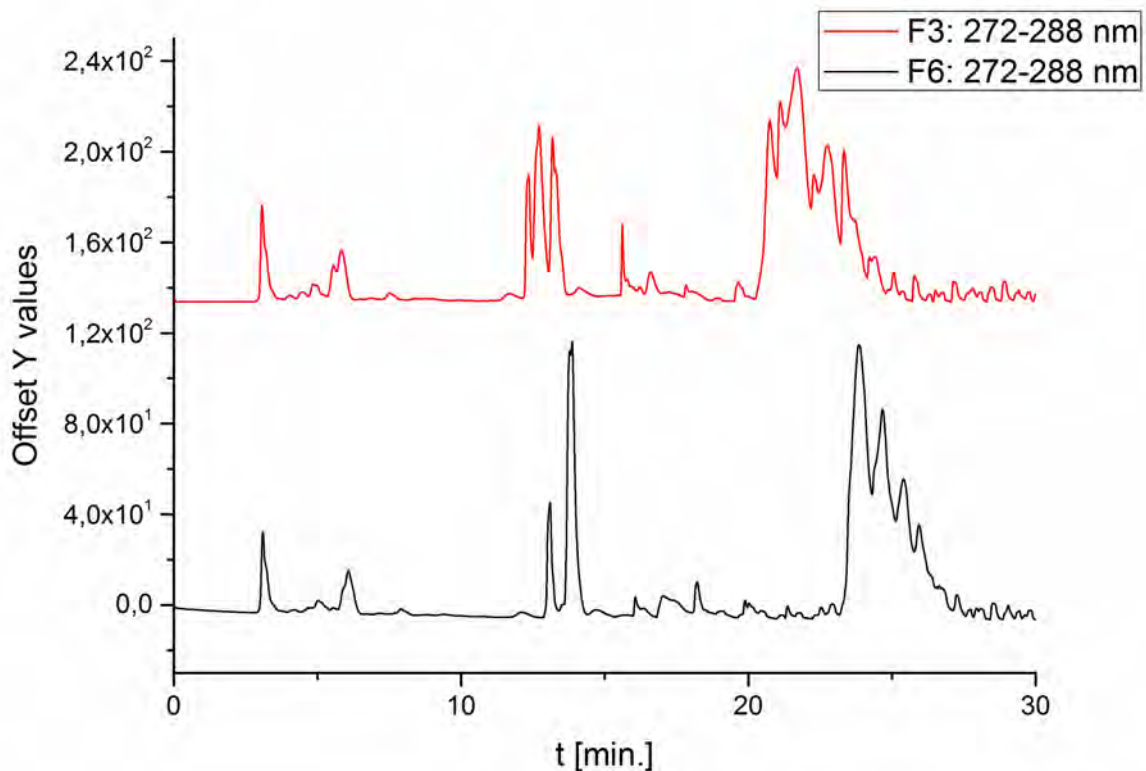


Abbildung 38: Vergleich der UV/VIS-Chromatogramme der präparativen HPLC-Trennung 3 der Spargelprobe 3. Im Vergleich stehen der dritte (rot) und der sechste (schwarz) Lauf. Es lassen sich Unterschiede in den Intensitäten sowie den Positionen der Signale erkennen.

Das Elutinationsverhalten der Substanzen, die sich bei einer Wellenlänge von 272-288 nm detektieren lassen, zeigt starke Unterschiede (Abbildung 45). Damit kann in diesem Fall nicht von reproduzierbaren Ergebnissen gesprochen werden. Die Gründe hierfür können unterschiedlich sein. Zum einen lässt sich bei der HPLC-Untersuchung von polaren Substanzen nicht ausschließen, dass diese reagieren oder unterschiedlich aggregieren. Zusätzlich können technische Probleme, wie leichte Druckveränderungen im System oder Temperaturschwankungen in der Säule zu derartigen Veränderungen führen.

Nach dem 10. HPLC-Lauf stand aus technischen Gründen keine UV-Detektion mehr zur Verfügung. Daher wurden die übrigen 15 HPLC-Trennungen ohne Detektion durchgeführt. Da bereits beim Vergleich der beiden HPLC-Trennungen 3 und 6 Diskrepanzen zu erkennen waren, muss davon ausgegangen werden, dass die weiteren Trennungen nicht vollständig reproduzierbar waren. Da für das weitere Verfahren

jedoch eine grobe Trennung der Substanzen des polaren Spargelextrakts ausreicht, konnte mit diesen Proben weitergearbeitet werden.

Anschließend wurden die Fraktionen mittels unter vermindertem Druck eingeeengt, danach gefriergetrocknet und in 800 μL dPBS (Puffer 4) aufgenommen. 600 μL der jeweiligen Probe wurden in 5 mm NMR-Röhrchen und 100 μL in Vials für weitere MS-Messungen überführt.

Von den NMR-Proben wurden zunächst Protonenspektren mit 32 *scans* aufgenommen. Der Hochfeldbereich in Abbildung 46 und der Tieffeldbereich der Fraktionen 1-60 ist in Abbildung 47 gezeigt.

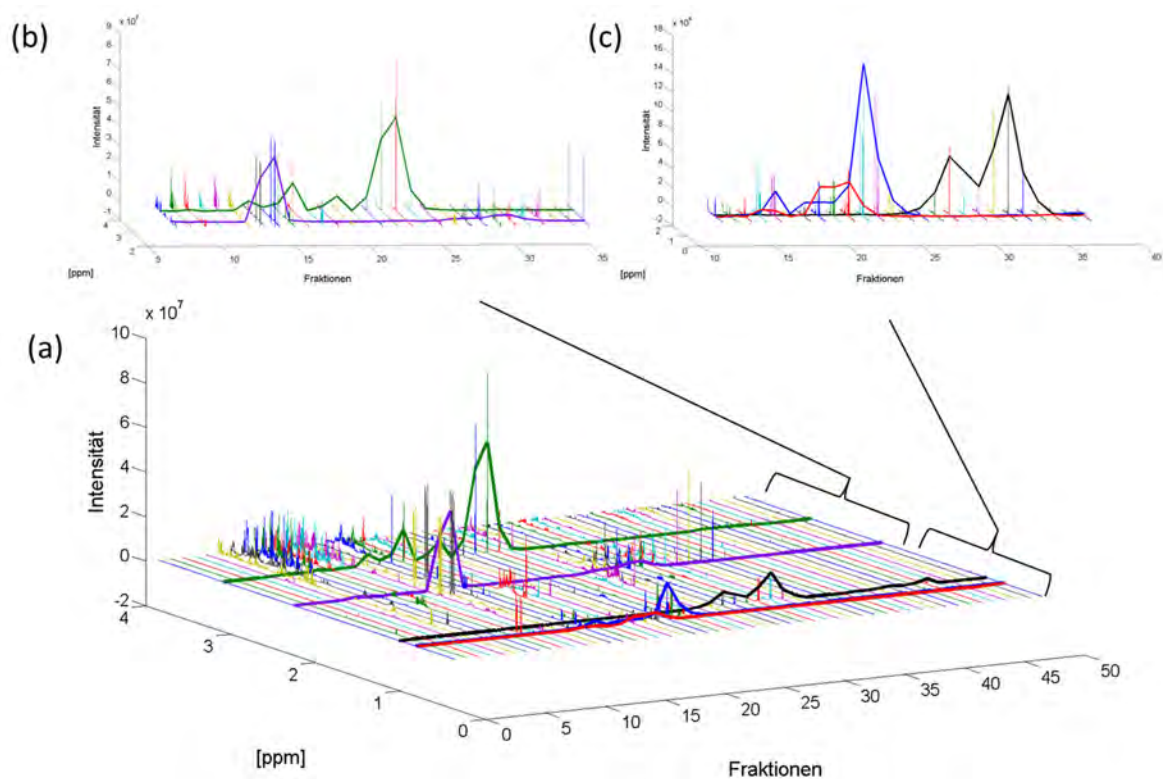


Abbildung 39: (a) Dreidimensionale Darstellung der NMR-Spektren aus der HPLC-Trennung 3 der Spargelprobe 3. Einzelne chemische Verschiebungen wurden zur Verfolgung von Konzentrationen über den Fraktionsverlauf hinweg farblich kenntlich gemacht (EDCs); grün: Valinbetain (3.28 ppm), lila: Äpfelsäure (2.36 ppm), schwarz: β -[Carboxyisopropyl]-L-cystein (1.16 ppm), blau: L-Leucin (0.96 ppm), rot: L-Isoleucin (0.94 ppm). (b)/(c): seitlicher Blick auf den Verlauf der EDCs.

Es zeigt sich eine hohe Anzahl gut separierter Signale, welche in ihrer Intensität über den Verlauf der Fraktionen schwanken (EDCs). In der Abbildungen 46 sind die EDCs

von L-Isoleucin (rot), L-Leucin (blau), β -[Carboxyisopropyl]-L-cystein (schwarz), Äpfelsäure (lila), Valinbetain (grün) eingezeichnet.

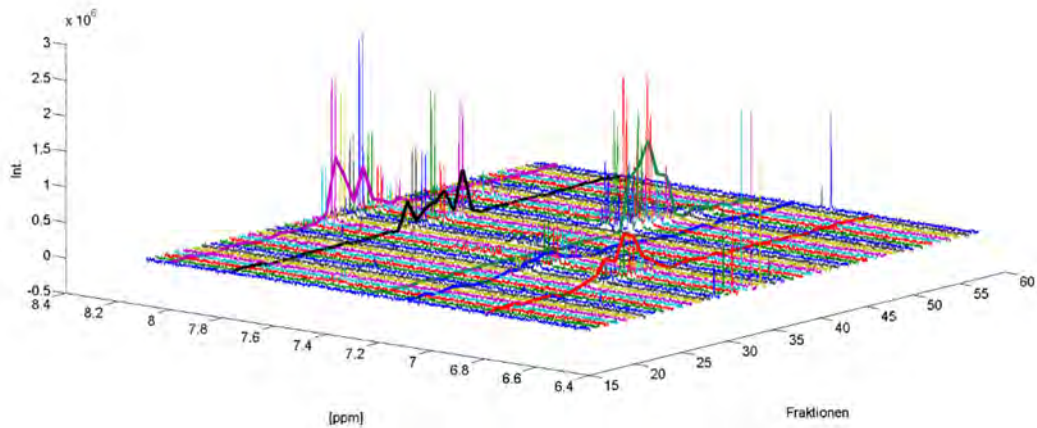


Abbildung 40: Dreidimensionale Darstellung der NMR-Spektren aus der HPLC-Trennung 3 der Spargelprobe 3. Einzelne chemische Verschiebungen wurden zur Verfolgung von Konzentrationen über den Fraktionsverlauf hinweg farblich kenntlich gemacht (EDCs); lila: UMP (8.11 ppm), schwarz: Uridin (7.87 ppm), grün: L-Tryptophan (7.74 ppm), blau: L-Phenylalanin (7.33 ppm), rot: L-Tyrosin (6.90 ppm).

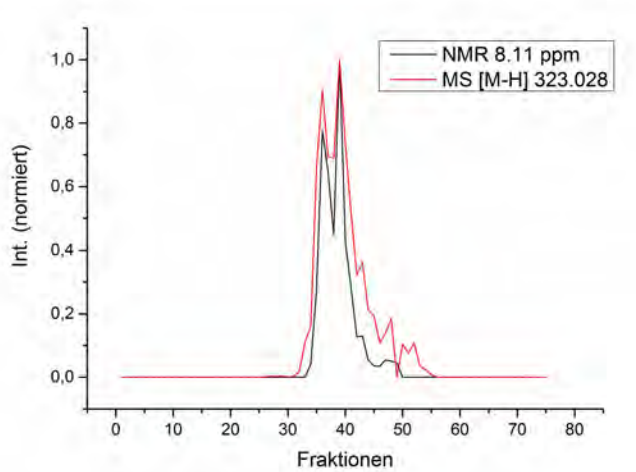
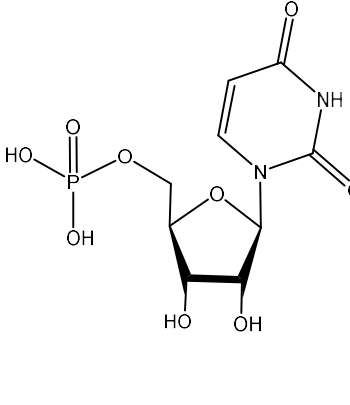
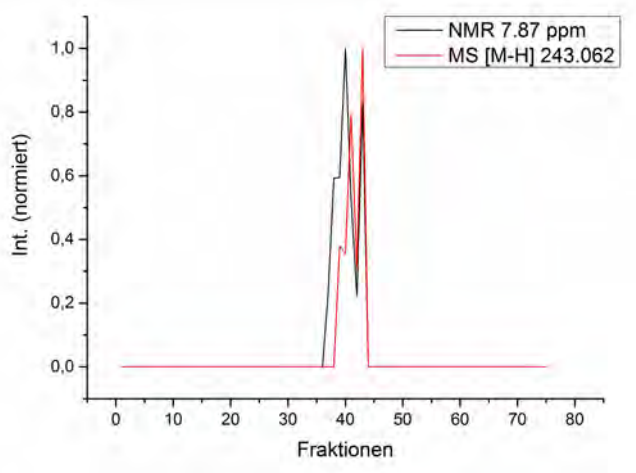
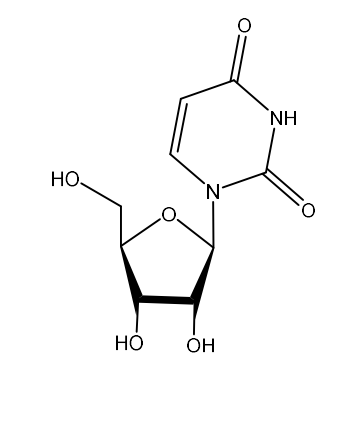
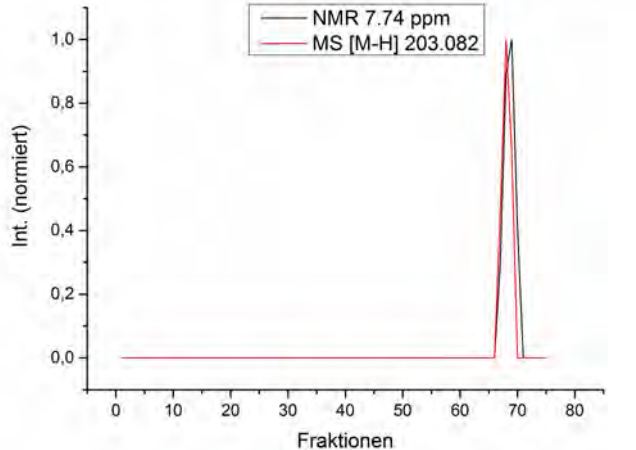
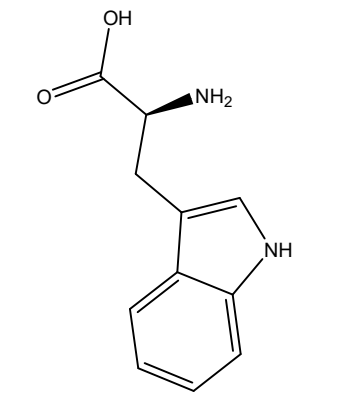
In der Abbildung 47 sind die EDCs von L-Tyrosin (rot), L-Phenylalanin (blau), L-Tryptophan (grün), Uridin (schwarz), Uridinmonophosphat (lila) eingezeichnet. Bereits in den Abbildungen 46 und 47 zeigen sich Doppel- und Mehrfachspitzen bei den Konzentrationsverläufen der einzelnen Substanzen. Diese sind auf die nicht ganz optimalen Bedingungen während der HPLC-Läufe zurückzuführen. Allerdings haben diese Verläufe zwei Vorteile zum Erproben des neuen Konzepts. Zum einen sind die Konzentrationsprofile über mehrere Fraktionen verteilt. Dies führt zu einer höheren Anzahl an Datenpunkten, was einer exakten Korrelation entgegen kommt. Zum anderen sind die Verläufe für die einzelnen Substanzen unterschiedlich und charakteristisch. Damit lassen sich die Korrelationen zusätzlich validieren. Aus diesen Gründen wurde mit den Fraktionen, trotz ursprünglich nicht optimalen Bedingungen, weitergearbeitet.

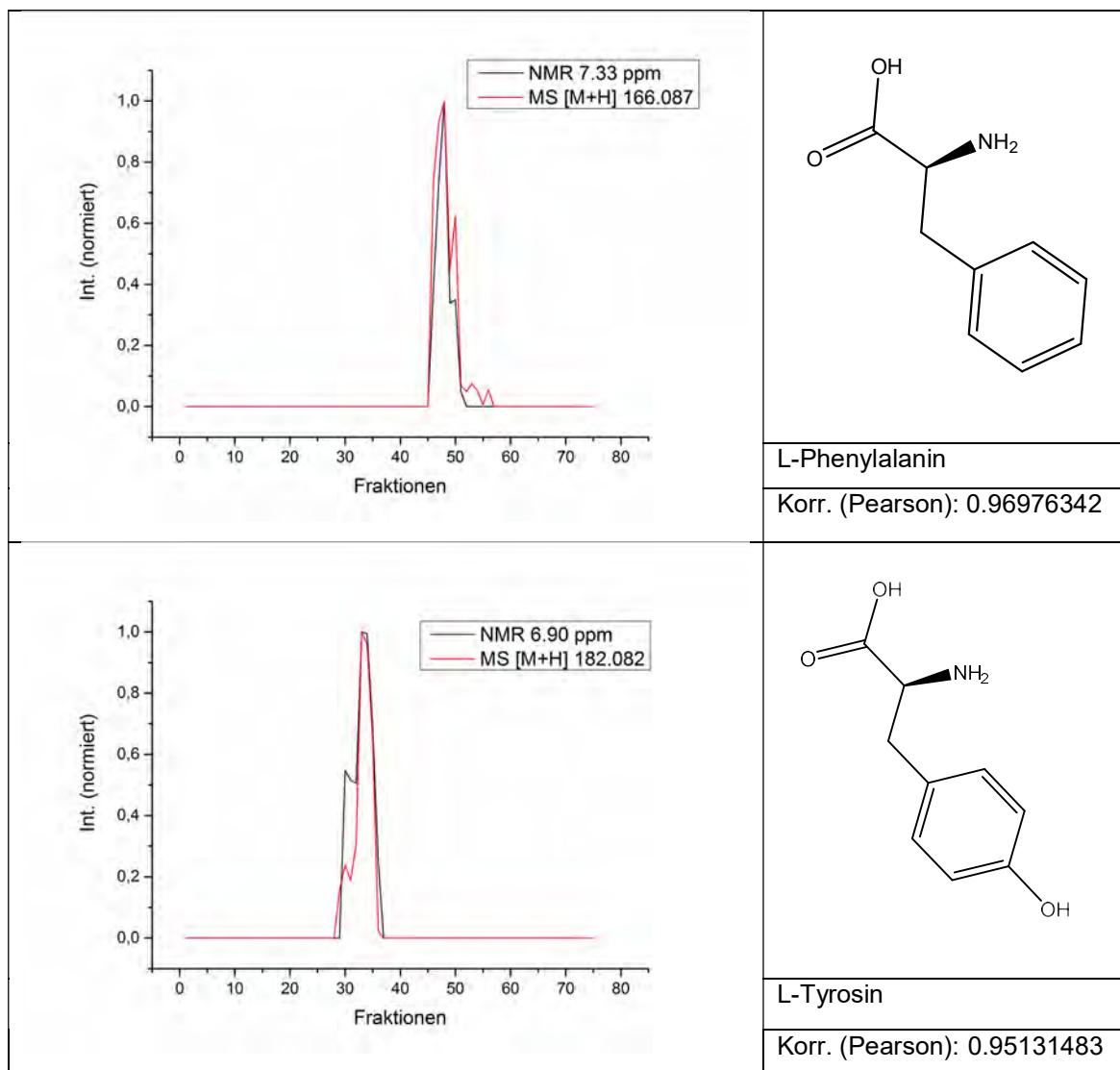
Die MS-Proben wurden zusätzlich mithilfe eines 15-minütigen Gradienten massenspektrometrisch vermessen. Anschließend wurden die einzelnen EICs aller HPLC-Läufe extrahiert, integriert und gegen die Fraktionen aufgetragen, sodass reduzierte extra-

hierte Ionenchromatogramme (*Reduced extracted Ion Chromatogram*, RIC) erhalten werden. Die EDCs wurden daraufhin normiert und zusammen mit den jeweiligen ebenfalls normierten RICs zur Visualisierung aufgetragen. Anschließend wurden beispielhaft von sieben Metaboliten die Korrelationskoeffizienten der jeweiligen Kurven nach Pearson gebildet.

Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse der Anwendung des SSC-Systems auf ein präparativ fraktioniertes Spargelextrakt.

<p>β-Carboxyisopropyl-L-cystein</p>	
<p>Korr. (Pearson): 0.94861994</p>	
<p>Valinbetain</p>	
<p>Korr. (Pearson): 0.92274285</p>	

 <p>Int. (normiert)</p> <p>— NMR 8.11 ppm — MS [M-H] 323.028</p> <p>Fraktionen</p>	 <p>Uridinmonophosphat</p>
 <p>Int. (normiert)</p> <p>— NMR 7.87 ppm — MS [M-H] 243.062</p> <p>Fraktionen</p>	 <p>Uridin</p>
 <p>Int. (normiert)</p> <p>— NMR 7.74 ppm — MS [M-H] 203.082</p> <p>Fraktionen</p>	 <p>L-Tryptophan</p>



Die Korrelationskoeffizienten zeigen gute Werte von 0.79-0.97, die auf gelungene Korrelationen der jeweiligen Molekülmassen mit den NMR-Signalen hinweisen. Da die Fraktionen einzeln mittels HPLC-MS Analyse vermessen wurden und nicht online verfolgt werden konnten, kann es zu kleinen Messschwankungen kommen. Daher lässt sich der *threshold* für derartige Korrelationen auf 0.75 setzen. Werte, die darüber hinausgehen, zeigen eine eindeutig positive Korrelation an. Dies zeigt, dass mithilfe des SSC-Systems Molekülmassen einem ihnen zugehörigen NMR-Signal eindeutig zugeordnet werden können.

4.4.1 Anwendung des SSC-Systems zur Identifizierung von Metaboliten aus Gemischen im Falle von Signalüberlagerungen

Es konnten zunächst Korrelationen bestimmt werden, die auf separat vorliegenden NMR-Signalen basieren. Das bedeutet, dass alle zur Korrelation verwendeten NMR-Signale, aller Fraktionen separat vorlagen. Im Rahmen einer Fraktionierung von natürlichen Extrakten, können jedoch jederzeit Signale in einzelnen Fraktionen Überlagerungen aufweisen. Dies würde das Erstellen eines EDCs als Verlauf über die Fraktionen erschweren. Die EDCs werden im Rahmen dieser Arbeit anhand von Integralen gebildet. Bei starken Überlagerungen lassen sich diese jedoch in manchen Fällen auch mithilfe von Dekonvolierung nicht erstellen. Signale, die über den Verlauf der Fraktionen hinweg in einigen Fraktionen Überlagerungen aufweisen, lassen sich mithilfe der *se*/TOCSY-Experimente dennoch isoliert darstellen. Hierfür können solche Signale, die selber nicht für eine optimale Integration zur Verfügung stehen angeregt werden. Das bedeutet, es können auch Signale mittels *se*/TOCSY-Experimenten angeregt werden, die nicht vollständig separat vorliegen, da lediglich die gezielte Isolierung bestimmter Signale gewünscht ist. Alle weiteren Signale, die dadurch eventuell mit angeregt werden, können in dem Fall ignoriert werden. Dies zeigt einen Vorteil des SSC-Systems, da lediglich ein Signal für die Korrelation der NMR- und MS-Daten relevant ist. Im folgenden wird die Freilegung der zur Korrelation beitragenden Signale mittels *se*/TOCSY an den Beispielen Pyroglutamat, L-Leucin und L-Isoleucin veranschaulicht.

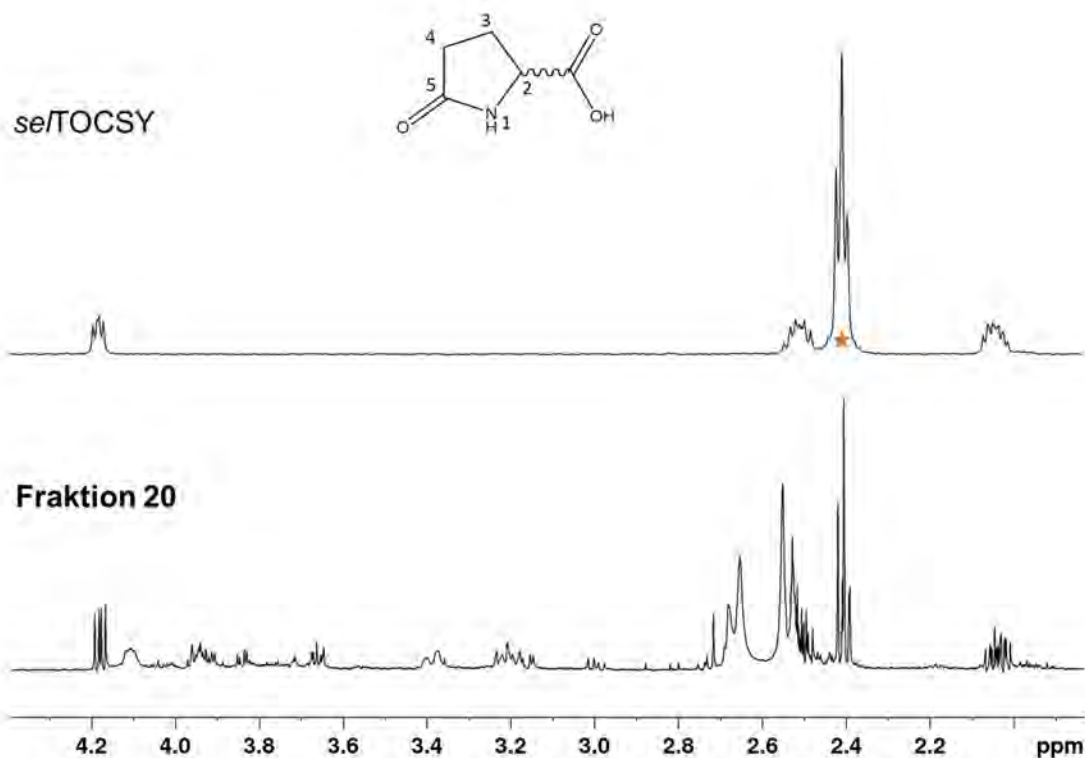


Abbildung 41: Overlayspektrum der Fraktion 29 der Trennung 3 von der Spargelprobe 3 und dem *se*/TOCSY-Spektrum mit einer Anregung auf dem Triplett bei 2.40 ppm zur Isolierung der Signale der Pyroglutaminsäure.

In Fraktion 29 der Trennung 3 der Spargelprobe 3 (Abbildung 48) können die Signale eindeutig der Pyroglutaminsäure zugeordnet werden. Allerdings sind diese für eine korrekte Integration nicht optimal aufgelöst. Für ein korrektes Erstellen des EDCs der Pyroglutaminsäure bietet sich nun folgendes Vorgehen an.

Es werden alle Fraktionen in denen die Pyroglutaminsäure vorkommt identifiziert. Anschließend werden alle Fraktionen bei gleicher Frequenz, im Rahmen eines *se*/TOCSY-Experiments, angeregt und eines der antwortenden *se*/TOCSY Signale (hier das H- α bei 4.10 ppm), integriert und diese Integrale gegen die Fraktionen aufgetragen. Bei TOCSY-Experimenten sind die Signale in der Regel nicht integrierbar, da die Intensität von dem Magnetisierungstransfer abhängt. Wird jedoch wie hier beschrieben, mit allen Fraktionen in denen die überlagerte Substanz vorkommt gleich verfahren, können die Integrale relativ zueinander analysiert werden. Eine Auftragung der Integrale gegen die Fraktionen führt entsprechend ebenfalls zu EDCs, welche sich mit den RICs korrelieren lassen.

Auch die NMR Signale von L-Leucin und L-Isoleucin wiesen Überlagerungen auf, welche sich nicht durch Dekonvolierung umgehen ließen. Daher wurden auch von den entsprechenden Fraktionen, welche die Substanzen enthielten, *se*/TOCSY Experimente aufgenommen und in diesen Spektren die entsprechenden Signale integriert und gegen die Fraktionen aufgetragen.

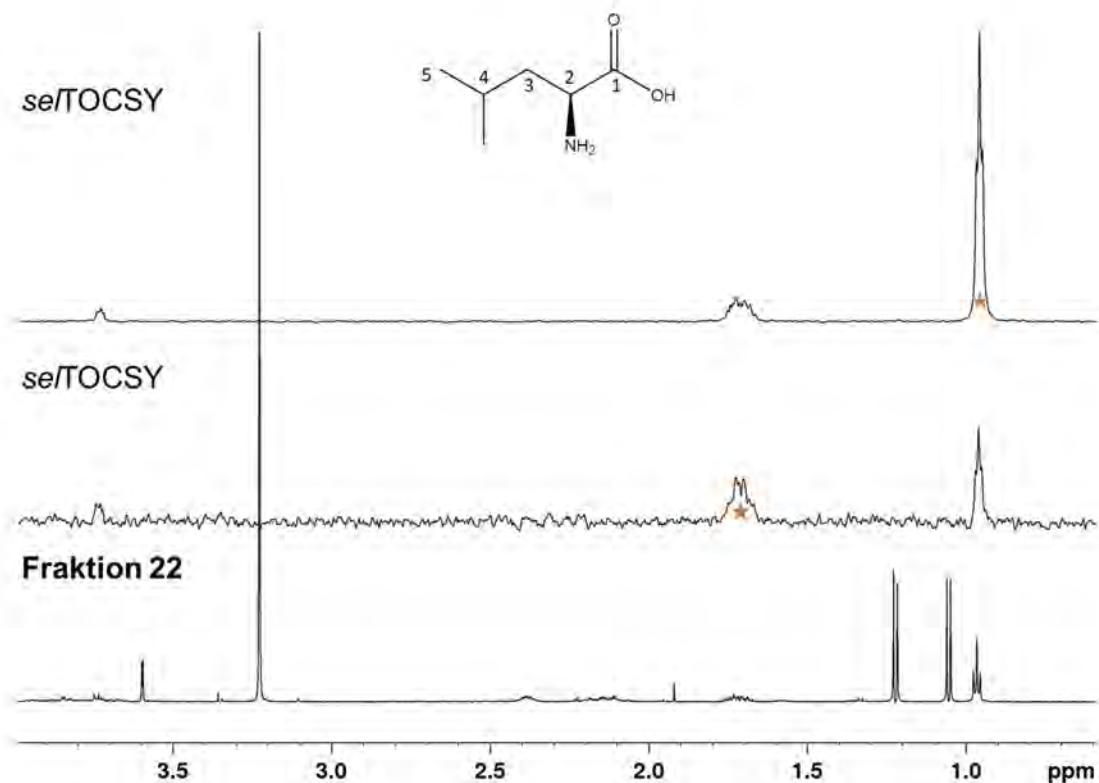


Abbildung 49: Overlayspektrum der Fraktion 22 der Trennung 3 der Spargelprobe 3 sowie zwei *se*/TOCSY-Spektren mit einer Anregung bei 1.72 ppm und 0.97 ppm von L-Leucin. Zu sehen sind starke Schwankungen im S/N-Verhältnis.

In Abbildung 49 ist zu erkennen, dass sich je nach Anregung das Signal zu Rausch Verhältnis (S/N) stark verschlechtern kann, allerdings ermöglicht eine Anregung des Protons bei 1.72 ppm eine Separierung des Triplets bei 0.97 ppm, im Falle einer Überlagerung wie in Abbildung 49 zu sehen. So stehen sowohl das Triplett als auch

das Signal des H- α von L-Leucin für eine Integration zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit wurde das H- α für die Integration herangezogen.

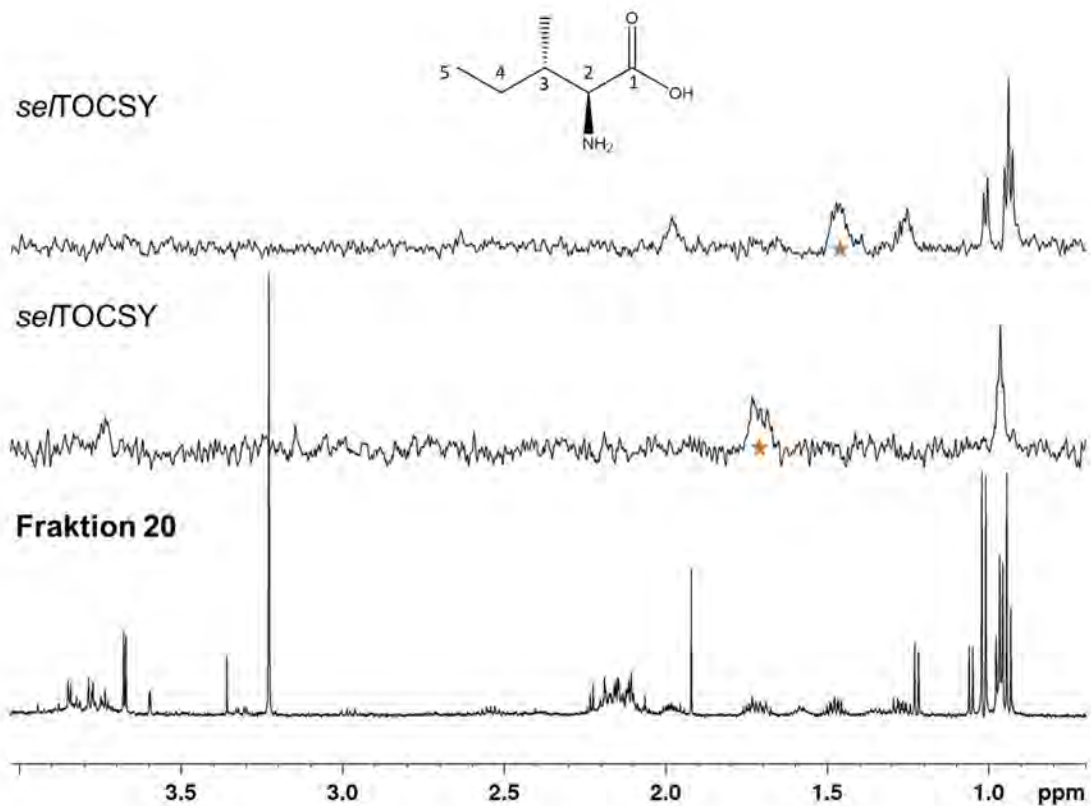


Abbildung 42: Overlayspektrum der Fraktion 20 der Trennung 3 der Spargelprobe 3 und der selTOCSY-Spektren mit einer Anregung auf dem Multiplett bei 1.71 ppm (mitte) und 1.47 ppm (oben) zur Isolierung der Signale des L-Isoleucins.

Für eine Integration zur Erstellung des EDCs von L-Isoleucin wurde sich für das Signal bei 0.86 ppm entschieden. Auch hier konnten die se/TOCSY-Spektren den Zugang zu separierten Signalen bieten (Abbildung 50).

Tabelle 6: Zusammenfassung der Ergebnisse des SSC-Systems, welches über *se*/TOCSY-Experimente erstellt wurde.

	<p>Pyroglutaminsäure</p> <p>Korr. (Pearson): 0.89146666</p>
	<p>L-Leucin</p> <p>Korr. (Pearson): 0.84516995</p>
	<p>L-Isoleucin</p> <p>Korr. (Pearson): 0.94709730</p>

Auch die Erstellung von Korrelationen zwischen den EICs und den aus *se*/TOCSY-Messungen gewonnenen Spektren zeigen gute Werte, die dieses Vorgehen stützen. Nachdem die Anwendung des SSC-Systems erfolgreich sowohl auf nicht überlagerte Signale als auch auf überlagerte Signale angewendet wurde, wurden die verbliebenen Fraktionen der HPLC-Trennung 3 und 4 der Spargelprobe 3 ebenfalls hinsichtlich ihrer Metaboliten analysiert.

4.4.2 Identifizierung einer unbekanntes Substanz II (HPLC-Trennung 4 der Spargelprobe 3)

Da die Fraktion 59 eine verhältnismäßig schwache Konzentration eines noch zu identifizierenden Metaboliten enthielt, wurde ein erneuter Lauf an einem Sepacore® Flash System (Tabelle 2, Abschnitt 3.2) fraktioniert aufgefangen. Zur Trennung wurde ein RP-C18-System verwendet. Anschließend wurden alle Fraktionen auf Anwesenheit der Masse 307.092 $[M+H]^+$ mittels LC-ESI-TOF-MS geprüft. Es wurden 10 Fraktionen identifiziert, die diesen Metaboliten enthielten. Diese wurden vereint, unter vermindertem Druck wurde das Lösungsmittel entfernt und die Probe wurde 24 Std. gefriergetrocknet. Anschließend wurde die Probe in 600 μ L dPBS-Puffer aufgenommen und NMR-spektroskopisch vermessen.

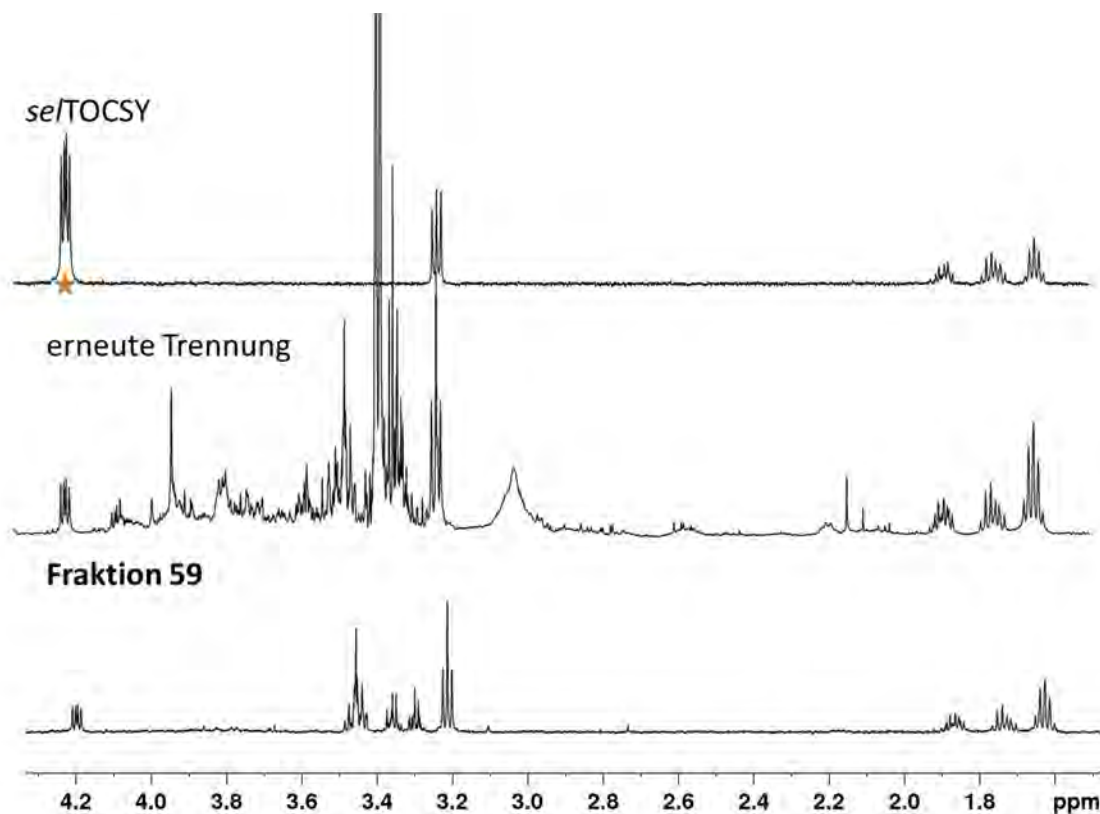


Abbildung 43: Overlaymodus des Protonenspektrums der Fraktion 59 (unten) der vereinten Fraktionen der neuen Trennung 4 (mittel) und dem *se*/TOCSY der Fraktion 59 mit Anregung auf dem *dd* bei 4.20 ppm.

In Abbildung 51 lässt sich ein Spinsystem erkennen, welches auf ein verknüpftes Prolin hindeutet (Abbildung 51, oben). Dies zeigt sich ebenfalls im 2D TOCSY, welches in Abbildung 52 zu sehen ist. Es war bisher noch nicht möglich mithilfe eines NMR-Experiments die Verknüpfung zu den drei Multipletts bei 3.50-3.25 ppm eindeutig zu zeigen. Allerdings konnte mithilfe des SSC die Masse 307.09 [M+H] eindeutig mit dem Tripletts bei 3.21 ppm korreliert werden. Da in der Fraktion 59 keine weiteren dominanten Signale zu erkennen sind, wird hier die Annahme postuliert, dass diese Signale ebenfalls zu dem Metaboliten gehören.

Die vereinten Fraktionen der LC-Trennung 4 weisen im Bereich 3.00-4.00 ppm starke Singalüberlagerungen auf. Diese erschweren die Identifizierung der Signale erheblich.

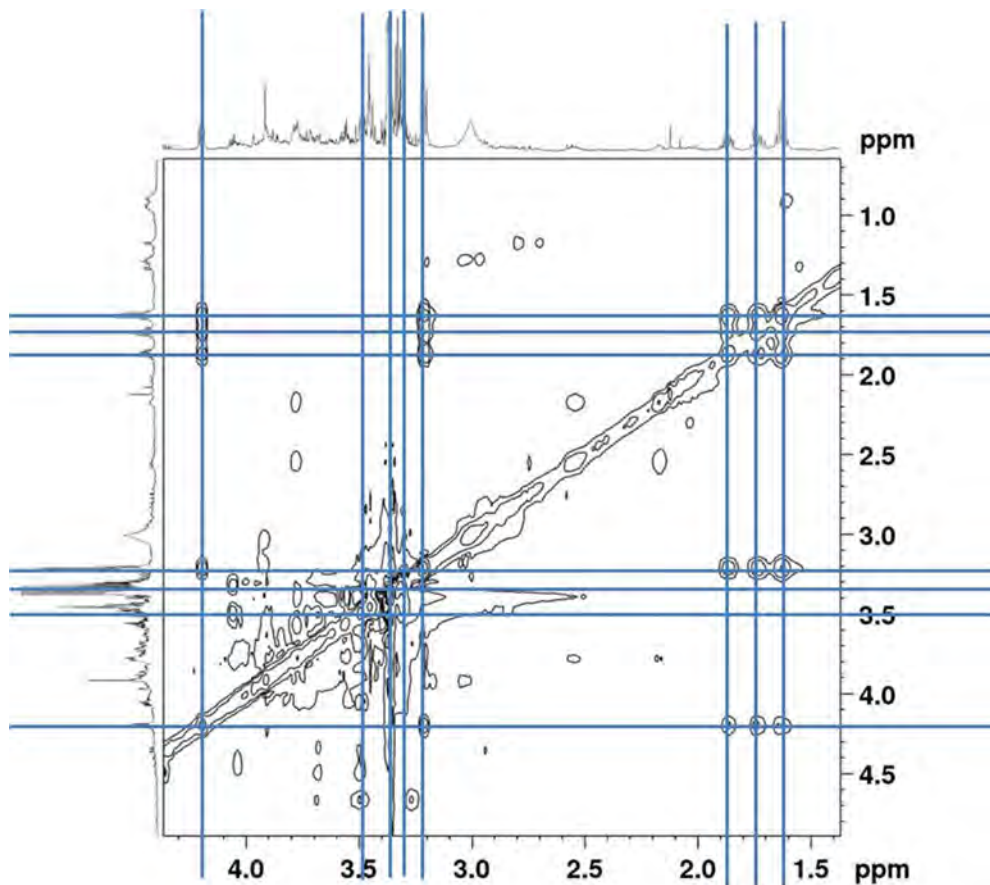


Abbildung 44: 2D-TOCSY Spektrum der vereinten Fraktionen der LC-Trennung 4. Zu erkennen ist das typische TOCSY-Muster von L-Prolin. Die noch nicht zugeordneten Signale des Metaboliten sind stark überlagert durch ein weiteres Signal.

Allerdings wies die Probe der vereinten Fraktionen der LC-Trennung 4 eine höher Konzentration des Metaboliten mit dem m/z -Verhältnis 307.09 $[M+H]$, sodass hier erneut ein 2D-NOESY aufgenommen werden konnte (Abbildung 52). Angelegte Hilfslinien zeigen, dass ein möglicher NOE zwischen dem H- α des L-Prolins und dem Multipllett bei 3.45 ppm vorliegen könnte. Ein se /NOESY auf das H- α des L-Prolins kann hier eindeutige Ergebnisse zeigen.

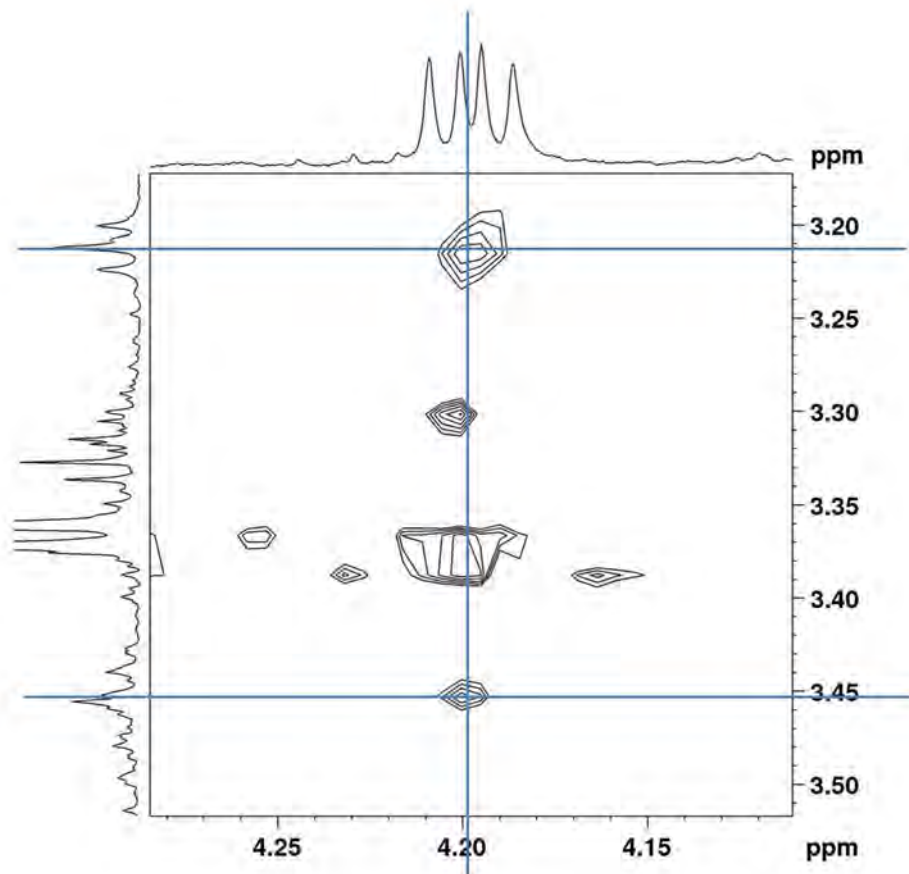
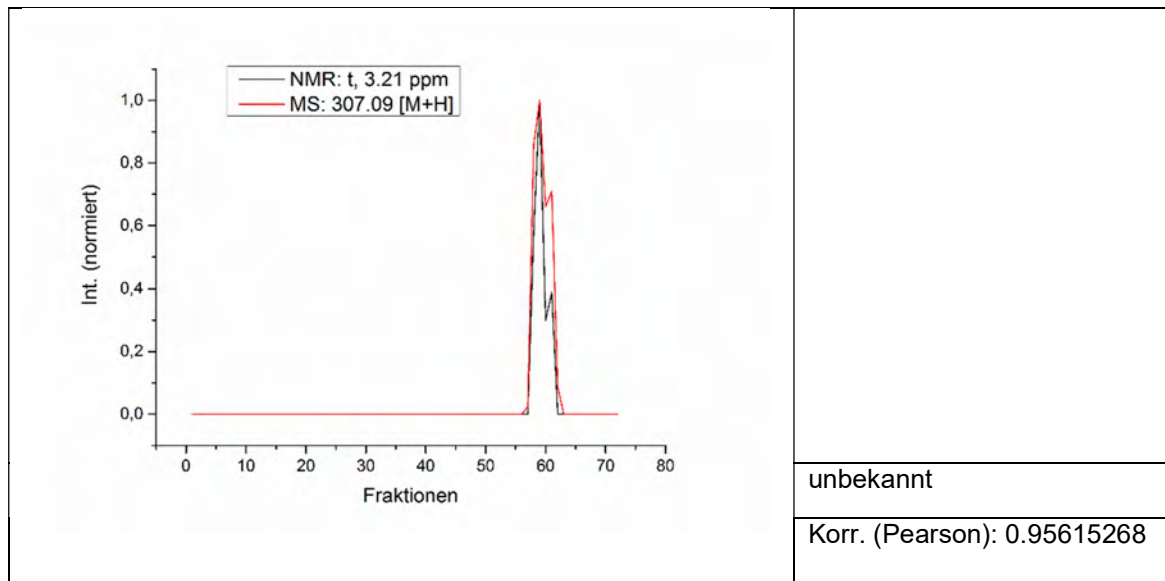


Abbildung 45: Ausschnitt des 2D-NOESY der vereinten Fraktionen der LC-Trennung 4. Gezeigt ist der Bereich in dem das H- α des Prolins NOEs aufweist. Eindeutig ist ein NOE zum Triplet bei 3.21 ppm zu erkennen und möglicherweise ebenfalls zum Multipllett bei 3.45 ppm.

Eine Korrelation des EDCs bei 3.21 ppm mit dem RIC von 307.09 [M+H] ergab einen sehr guten Korrelationskoeffizienten von über 0.95. Dies lässt eindeutig darauf schließen, dass das zu identifizierende Molekül eine Molekülmasse von 306.09 g/mol aufweist.

Tabelle 7: Übersicht der vorläufigen SSC-System Ergebnisse zum Metaboliten II.



Der Metabolit II konnte noch nicht vollständig identifiziert werden. Jedoch konnte herausgestellt werden, dass ein Teil des Metaboliten eine Prolinstruktur aufweist ist. Da es möglich war im Protonenspektrum alle Ringprotonen von Prolin zu identifizieren, muss die Verknüpfung mit dem Rest über die Carboxylgruppe oder den Stickstoff erfolgen. Dass es sich nicht um ein Dipeptid handeln kann, wurde durch Abgleich mit Vergleichspektren der Aminosäuren ausgeschlossen. Außerdem würde kein Dipeptid mit der Formel Prolin-X die Masse 306.09 g/mol ergeben. Die Multipletts, welche noch nicht zugeordnet werden konnten, zeigen durch das Integral, dass dort fünf Protonen zugrunde liegen. Daher liegt die Vermutung nahe, dass noch weitere funktionelle Gruppen, bzw. Heteroatome im zweiten Rest des Metaboliten vorkommen. Zur Identifizierung würden sich daher weitere IR-Messungen oder 2D-¹⁵N-NMR-Messungen anbieten.

4.4.3 Identifizierungen bekannter Substanzen aus der HPLC-Trennung 3 der Spargelprobe 3

Ergänzend zu den vorherigen Untersuchungen wurden ebenfalls von diesem HPLC-Lauf der Trennung 3 der Spargelprobe 3 von einigen Fraktionen *se*/TOCSY-Spektren und deren verknüpfende *se*/NOESY-Spektren aufgenommen. Diese sind in den Abbildungen 54-57 gezeigt.

Valinbetain

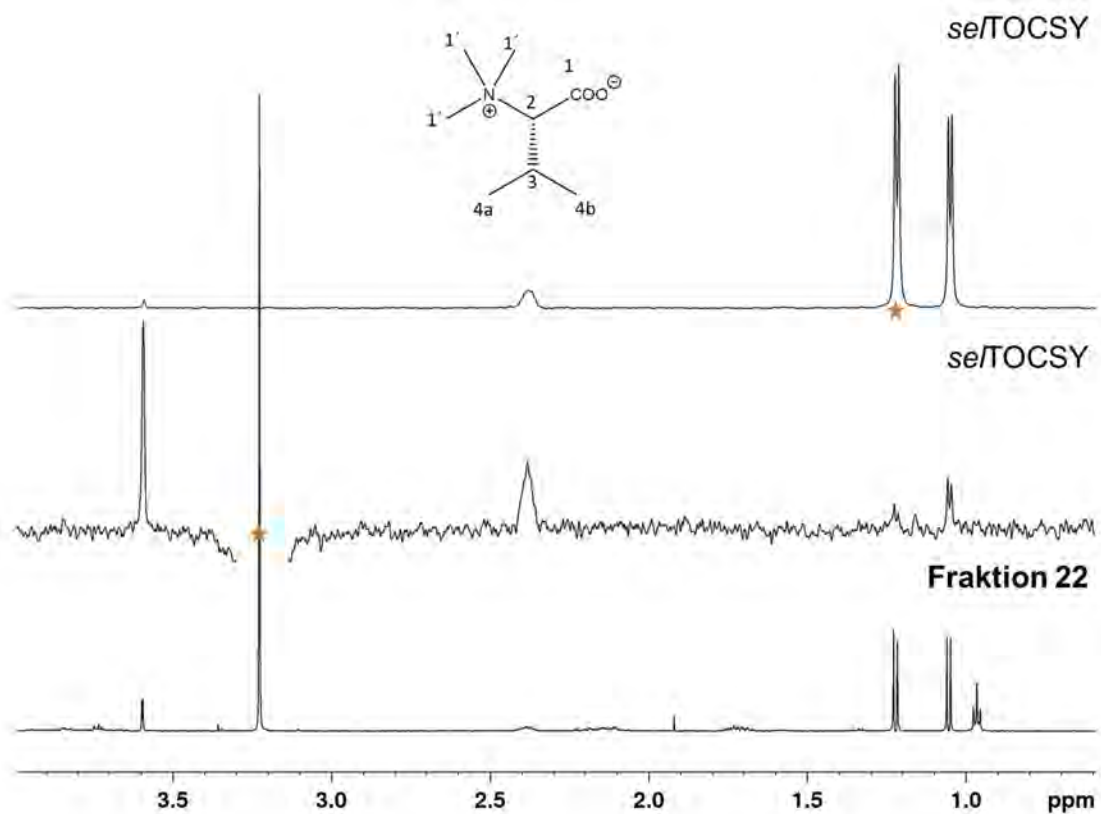


Abbildung 46: Overlay des Fraktionsspektrums 22 der Trennung 3 der Spargelprobe 3 (unten) und dem *se*/TOCSY-Spektrum des valinähnlichen Spinsystems (Anregung bei 1.22 ppm) (oben) und dem *se*/NOESY Spektrum mit selektiver Anregung auf dem Singulett bei 3.22 ppm.

Wie in Abbildung 54 zu sehen, konnte analog zum Abschnitt 4.2.3 auch bei der Trennung 3 der Spargelprobe 3 mithilfe der *se*/TOCSY und *se*/NOESY-Messungen eindeutig der Metabolit Valinbetain nachgewiesen werden. Auch hier waren die diastereotopen Methylgruppen bei 1.05 (*d*) und 1.22 ppm (*d*) und das Dublett eines Quartetts eines Quartetts (*dqq*) des H- β bei 2.37 ppm sowie das *d* des H- α bei 3.59 ppm zu erkennen.

Das *se*/NOESY-Spektrum mit einer Anregung auf dem Singulett bei 3.22 ppm zeigt erneut die eindeutige Kopplung zu den übrigen valinähnlichen Signalen.

Uridinmonophosphat

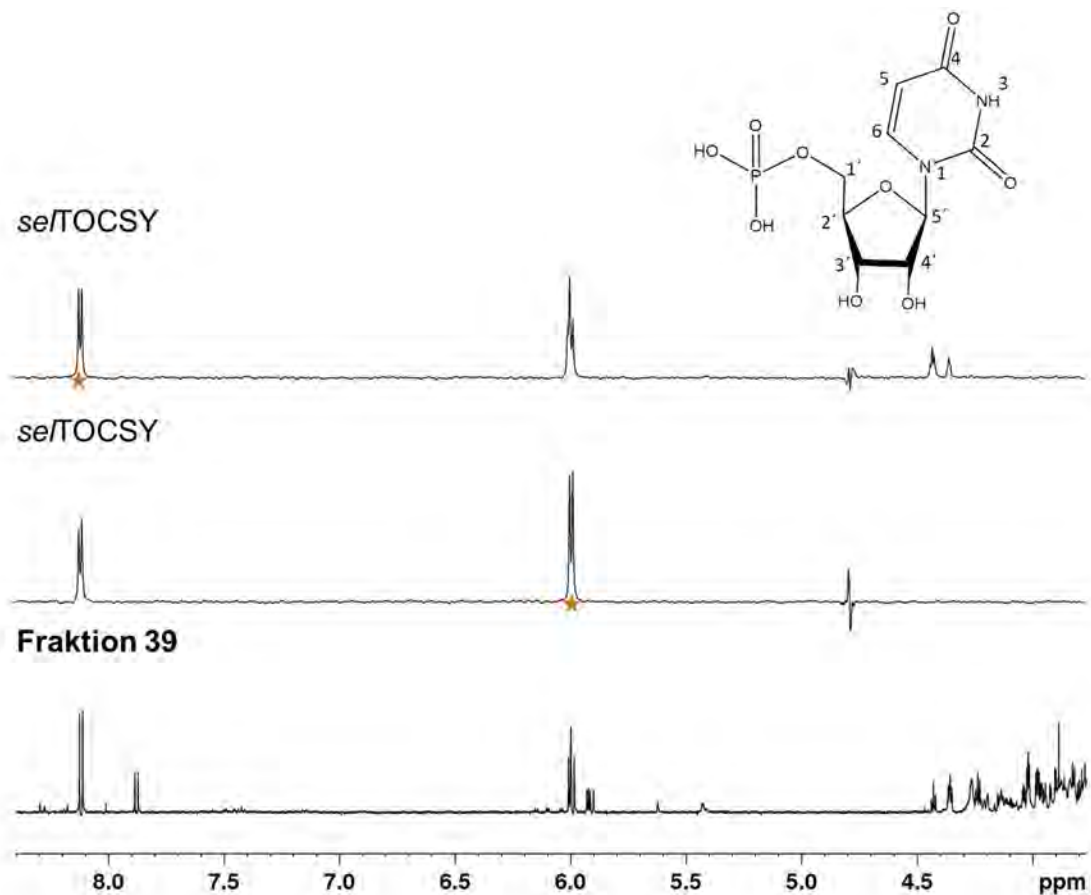


Abbildung 47: Overlay des Fraktionsspektrums 39 der Trennung 3 der Spargelprobe 3 (unten) und den zwei *se*/TOCSY Spektren mit jeweils Anregung auf den Protonen der Nukleinbase bei 8.12 ppm und 5.99 ppm .

Wie in Abbildung 55 zu sehen, waren in Fraktion 39 Signale zu erkennen, welche denen von Uridin ähnelten, jedoch leicht tieffeldverschoben zu ihnen erschienen. Eine selektive Anregung mittels *se*/TOCSY der Protonen bei 8.12 ppm und 5.99 ppm zeigte, dass diese Signale zu einem Spinsystem gehören. Die Signale konnten dem Metaboliten Uridinmonophosphat (UMP) zugeordnet werden.

Die Dubletts bei 7.87 ppm und 5.92 ppm sind die Signale der Protonen der Nukleinbase von Uridin.

L-Tryptophan

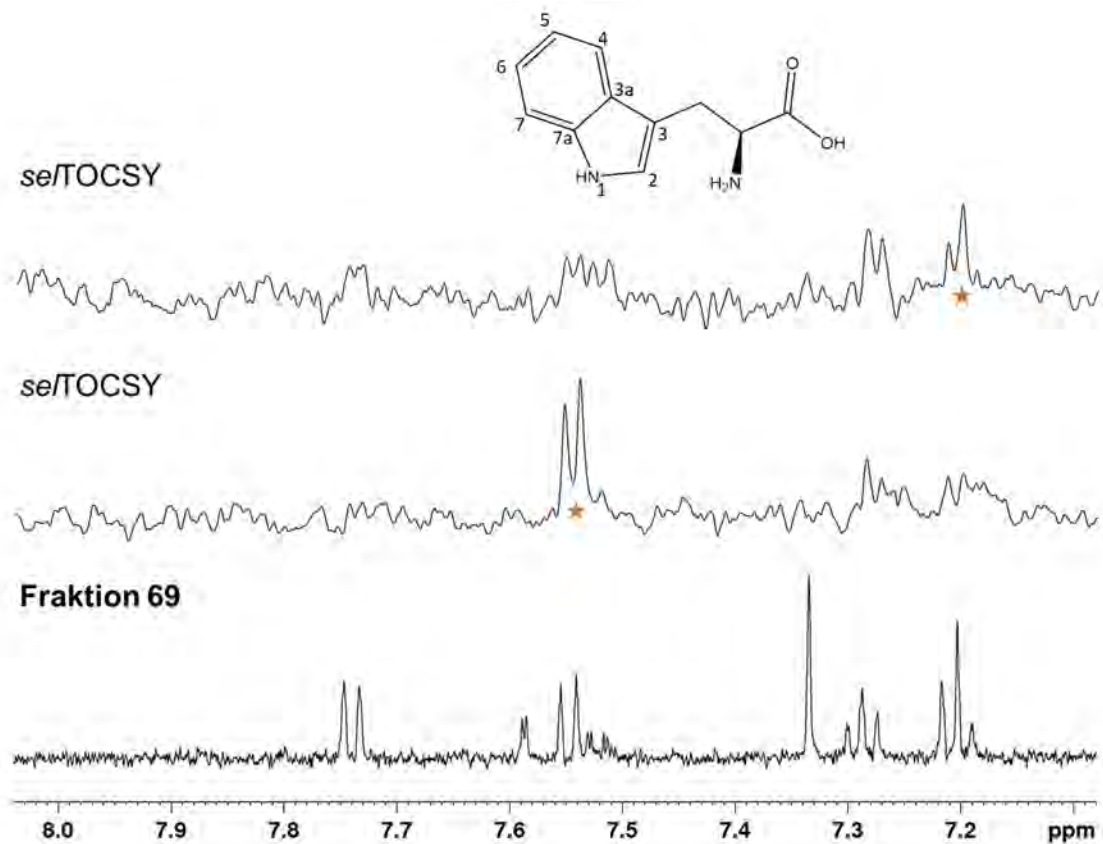


Abbildung 48: Overlay des Fraktionsspektrums 69 der Trennung 3 der Spargelprobe 3 (unten) und zwei *se*/TOCSY-Spektren mit jeweils Anregung auf den Protonen des aromatischen Bereichs von Tryptophan bei 7.54 ppm und 7.20 ppm (oben).

In Abbildung 55 ist der aromatische Bereich des Protonenspektrums der Fraktion 69 der Trennung 3 der Spargelprobe 3 (unten) und zwei *se*/TOCSY-Spektren dargestellt. In dem oberen *se*/TOCSY-Spektrum wurde einer der beiden para-ständigen Protonen bei 7.54 ppm angeregt (mitte). Im Falle des zweiten *se*/TOCSY-Spektrums wurde bei 7.21 ppm eingestrahlt.

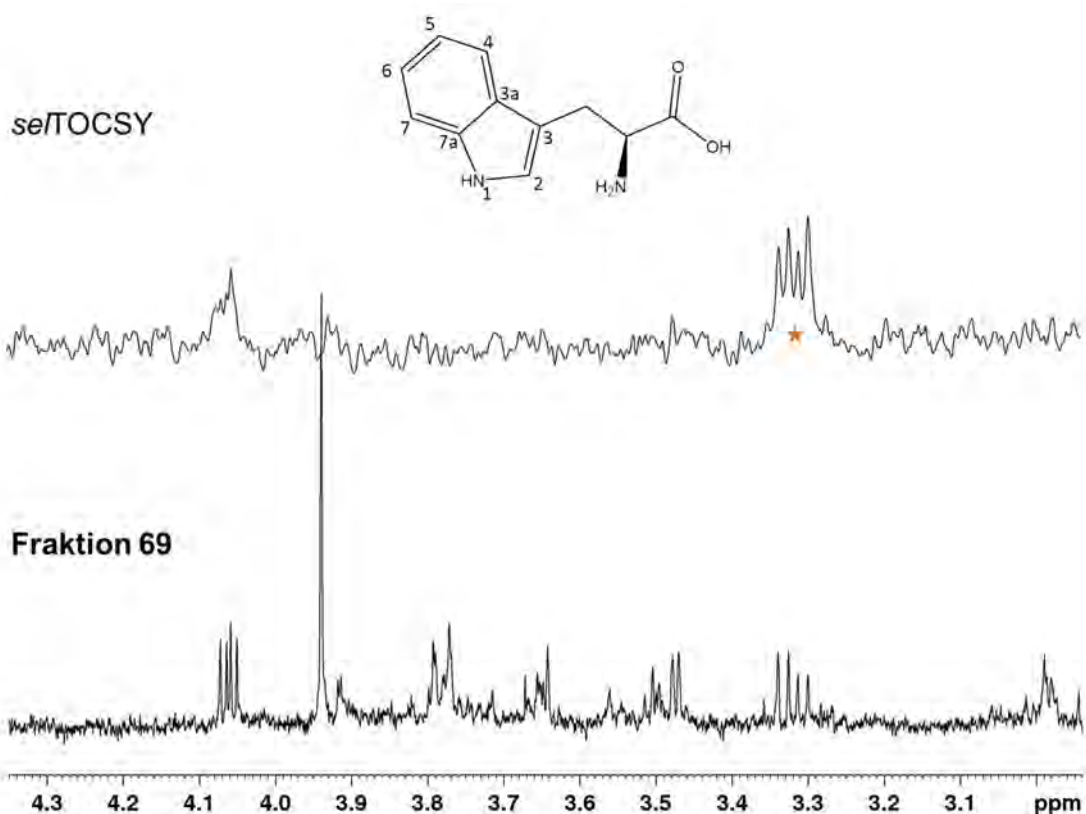


Abbildung 49: Overlay des Fraktionsspektrums 69 der Trennung 3 der Spargelprobe 3 (unten) und dem *se/TOCSY*-Spektrum mit Anregung auf dem Dublett der diastereotopen Protonen von Tryptophan bei 3.32 ppm.

In Abbildung 56 ist zusätzlich zu dem Fraktionsspektrum der Fraktion 69 ein *se/TOCSY*-Spektrum gezeigt, welches bei 3.32 ppm selektiv angeregt wurde. Zu erkennen ist die Verteilung der Magnetisierung über das Spinsystem eines H- β -Protons und dem H- α -Proton (Signal bei 4.06 ppm). Für eine statistisch relevante Detektion des zweiten H- β -Protons mittels *se/TOCSY* war in diesem Fall die Konzentration des Metaboliten nicht ausreichend. Hierbei handelt es sich um den Metaboliten L-Tryptophan und das Signal des zweiten H- β -Protons wäre bei 3.5 ppm zu erwarten.

Zusätzlich zu den vorhergegangenen Identifizierungen konnten verschiedene Aminosäuren mittels Spike-in-Experimenten identifiziert werden. Diese sind in den folgenden Abbildungen gezeigt.

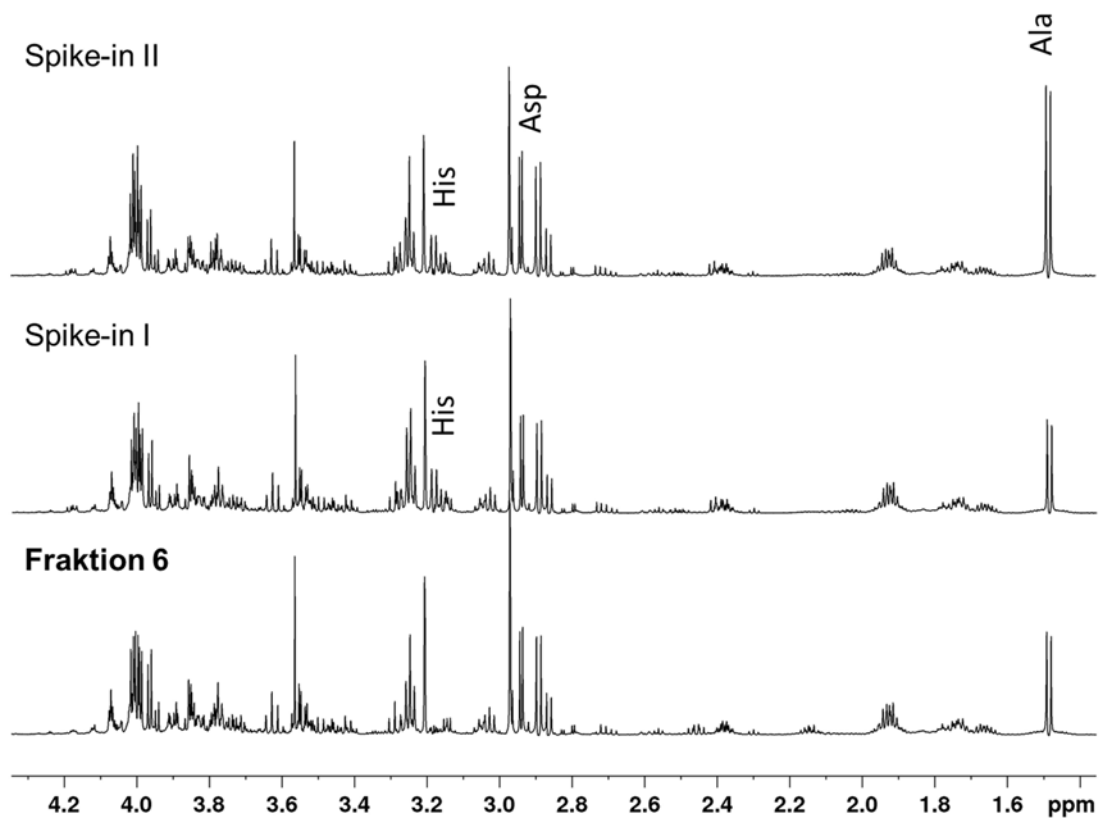


Abbildung 50: Overlay des Fraktionsspektrums 6 der Trennung 3 der Spargelprobe 3 (unten) und einem Spike-in-Spektrum mit zusätzlichem Histidin (mitte) und einem weiteren Spike-in Spektrum mit zusätzlicher Asparaginsäure sowie Alanin (oben).

In der Fraktion 6 ließen sich die Aminosäuren Histidin, Asparaginsäure und Alanin eindeutig mittels Spike-in Experimenten nachweisen. Es ist in den oberen Spektren des Overlaymodus in Abbildung 58 eine eindeutige Zunahme der Signalintensitäten zuerkennen.

Spike-in
Fraktion 9

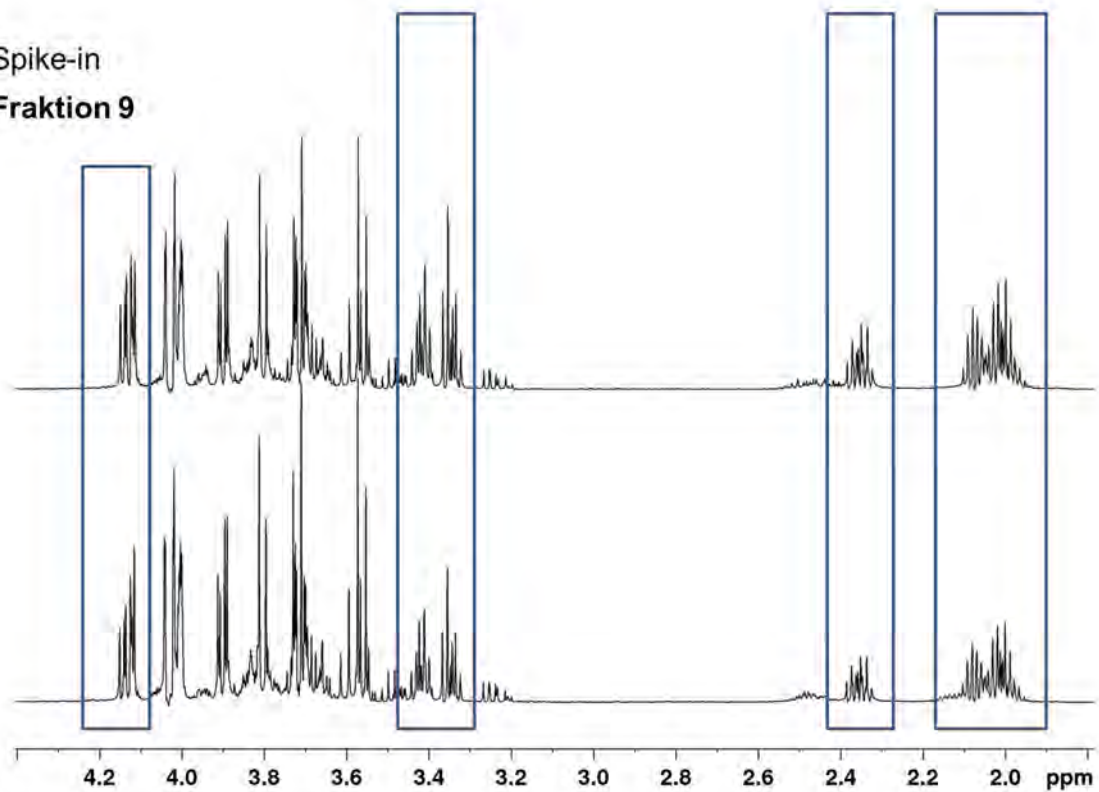


Abbildung 5951: Overlay des Fraktionsspektrums 9 der Trennung 3 der Spargelprobe 3 (unten) und dem Spike-in Spektrum mit hinzugefügtem Prolin (oben).

In Abbildung 59 ist nach Zugabe von Prolin eine eindeutige Zunahme der Signalintensitäten von Prolin zu erkennen. Die Signale sind zur besseren Übersicht in blaue Kästen eingefasst.

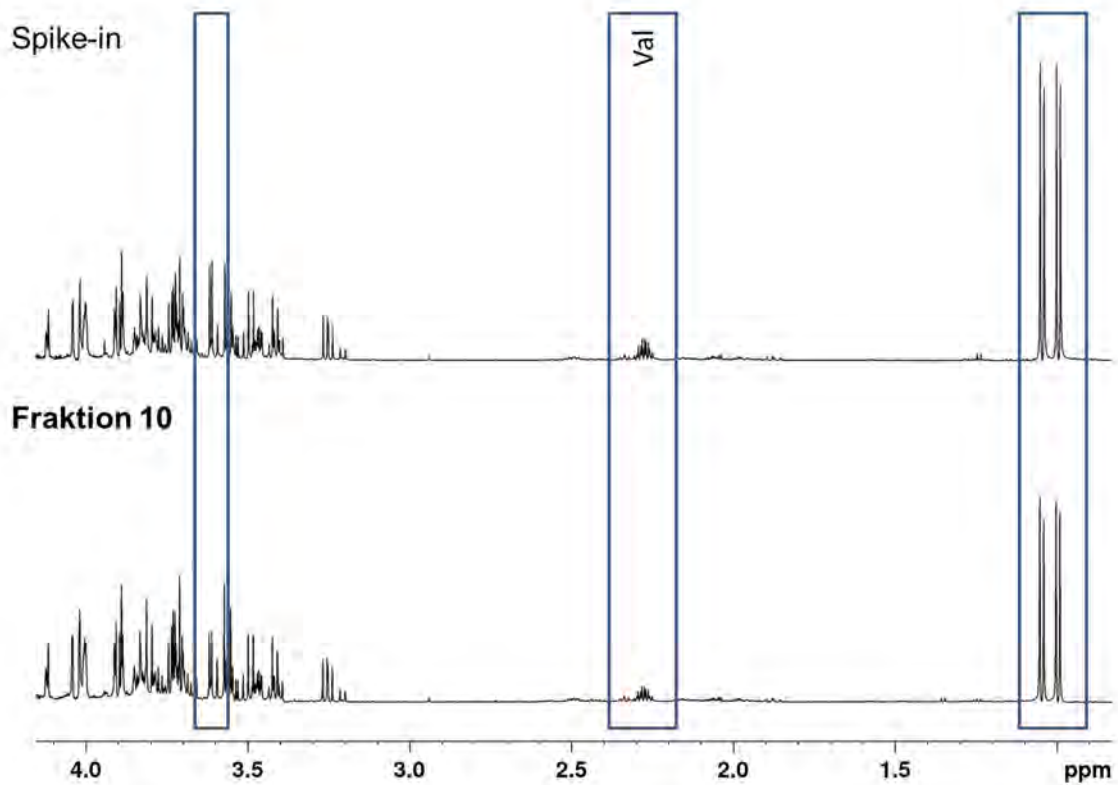


Abbildung 52: Overlay des Fraktionsspektrums 10 der Trennung 3 der Spargelprobe 3 (unten) und dem Spike-in Spektrum von Valin (oben).

In Abbildung 60 ist nach Zugabe von Valin eine eindeutige Zunahme der Signalintensitäten von Valin zu erkennen. Die Signale sind zur besseren Übersicht in blaue Kästen eingefasst.

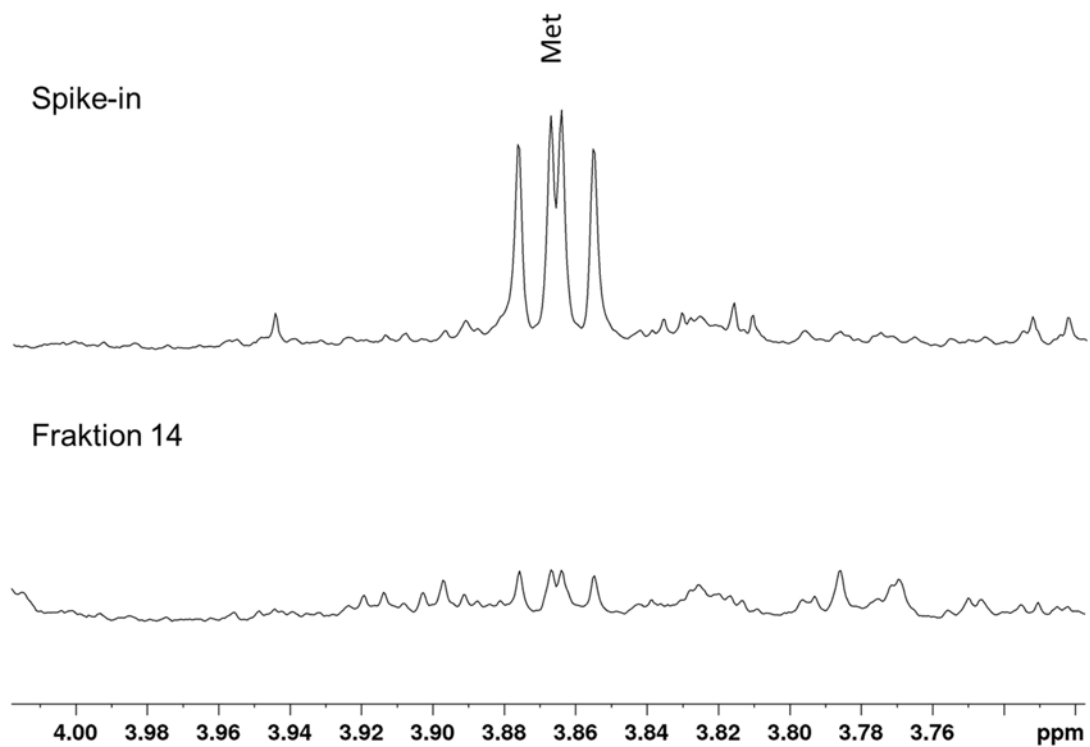


Abbildung 53: Overlay des Fraktionsspektrums 14 der Trennung 3 der Spargelprobe 3 (unten) und dem Spike-in Spektrum von Methionin (oben).

In Abbildung 61 ist nach Zugabe von Methionin eine eindeutige Zunahme der Signalintensitäten von Methionin zu erkennen. Hier ist das *dd* des H- α bei 3.85 ppm gezeigt.

4.5 Identifizierte Metaboliten aus weißem Gemüsespargel

Im folgenden Abschnitt ist eine Übersicht aller im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Metaboliten erstellt worden. Die Metaboliten wurden tabellarisch inklusive ihrer Summenformel, theoretischen Molekülmasse und den *m/z*-Verhältnissen im positiven sowie negativen Ionenmodus angegeben.

Tab. 9: Auflistung aller eindeutig identifizierten Metaboliten aus weißem Gemüsespargel mit den entsprechenden Molekülmassen und m/z-Verhältnissen. Die theoretischen Molekülmassen wurden mittels Masse Isotopen-Muster Rechner nach PFEILSTICKER berechnet.

Metabolit	Summenformel	Theoretische Molekülmasse	[M+H]⁺	[M-H]⁻
Alanin	C ₃ H ₇ NO ₂	89.0477	90.0555	88.0399
Äpfelsäure	C ₄ H ₆ O ₅	134.0215	135.0293	133.0137
Citronensäure	C ₆ H ₈ O ₇	192.0270	193.0348	191.0192
β-[Carboxy-isopropyl]-L-cystein	C ₇ H ₁₃ NO ₄ S	207.0565	208.0644	206.0487
Fructose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.0634	181.0712	179.0555
Glucose	C ₆ H ₁₂ O ₆	180.0634	181.0712	179.0555
Isoleucin	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.0946	132.1025	130.0868
Leucin	C ₆ H ₁₃ NO ₂	131.0946	132.1025	130.0868
Methionin	C ₅ H ₁₁ NO ₂ S	149.0510	150.0589	148.0432
Phenylalanin	C ₉ H ₁₁ NO ₂	165.0790	166.0868	164.0712
Pyroglutaminsäure	C ₅ H ₇ NO ₃	129.0426	130.0504	128.0348
Sucrose	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	342.1162	343.1240	341.1084
Tryptophan	C ₁₁ H ₁₂ N ₂ O ₂	204.0899	205.0977	203.0820
Tyrosin	C ₉ H ₁₁ NO ₃	181.0739	182.0817	180.0661
UMP	C ₉ H ₁₃ N ₂ O ₉ P	324.0359	325.0437	323.0280
Uridin	C ₉ H ₁₂ N ₂ O ₆	244.0695	245.0774	243.0617
Valin	C ₅ H ₁₁ NO ₂	117.0790	118.0868	116.0712
Valinbetain	C ₈ H ₁₇ NO ₂	159.1259	160.1338	158.1181

4.6 Konzentrationsbestimmungen

Der folgende Abschnitt wurde gemeinschaftlich im Rahmen der Bachelorarbeit von Henrike Wagler erstellt.

Da die *se*/TOCSY- und *se*/NOESY-Experimente erst ab einer bestimmten Konzentration eine statistisch relevante Detektion der entsprechenden Signale gewährleisten, muss zunächst die Metabolitkonzentration ermittelt werden, welche noch eine verlässliche Detektion der zu identifizierenden Signale ermöglicht. Hierfür wurde zunächst ein Modellversuch mit Sucrose erstellt. Es wurden zunächst Sucroslösungen unterschiedlicher Konzentration (20, 10, 5, 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2, 0.1 mM) angesetzt und diese mittels NMR-Spektroskopie vermessen. Zunächst wurden Protonenspektren aufgenommen, um anschließend die Frequenzen zu ermitteln auf die mittels *se*/TOCSY- oder *se*/NOESY-Experiment eingestrahlt werden sollte. In Abbildung 62 sind die *se*/TOCSY-Spektren bei einer Einstrahlung auf das H-1 (5.41 ppm, nicht gezeigt) des Glucoserests der Sucrose gezeigt. Hierbei sollte geprüft werden bis zu welcher Konzentration, bei den in dieser Arbeit verwendeten Standardeinstellungen des Experiments (Abschnitt 3.5.4.4), das gesamte Spinsystem des Rings noch statistisch relevant erfasst werden kann.

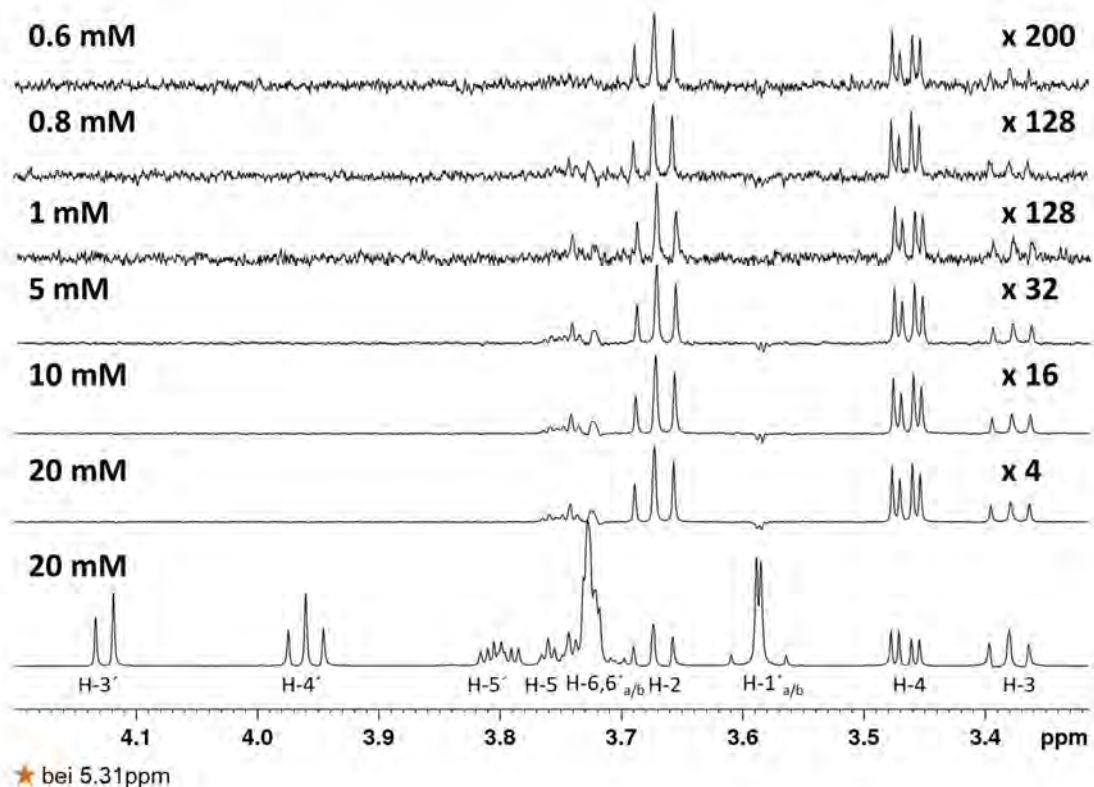


Abbildung 54: Overlaymodus verschiedener NMR-Spektren von Sucrose. Unten: Protonenspektrum, Oben: *se*/TOCSY-Spektren mit einer Einstrahlung bei 5.31 ppm (nicht gezeigt) von Sucroslösungen unterschiedlicher Konzentration (20, 10, 5, 1, 0.8, 0.6 mM).

In Abbildung 62 ist die Verteilung des Magnetisierungstransfers über den Glucosering der Sucrose mittels *se*/TOCSY gezeigt. Es zeigt sich, dass eine für diese Untersuchung eine Konzentration von 0.8 mM die Untergrenze darstellt, da bereits bei 0.6 mM die Signale der H-5 und H-6_{a,b} nicht mehr statistisch relevant detektierbar sind. Dies würde insbesondere bei unbekanntem Substanzen zu Problemen in der Interpretation der Daten und schlussendlich zu möglicherweise fehlerhaften Identifizierungen führen. Eine Möglichkeit dies noch zu optimieren, wäre eine Änderung der *Mixingtime*, eine weitere die Erhöhung der Anzahl *scans*. Da in dieser Arbeit jedoch immer mit den gleichen Einstellungen gearbeitet wurde, um die Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten und dabei die Acquisitionszeit so gering wie möglich zu halten, wurde dies nicht weiter untersucht.

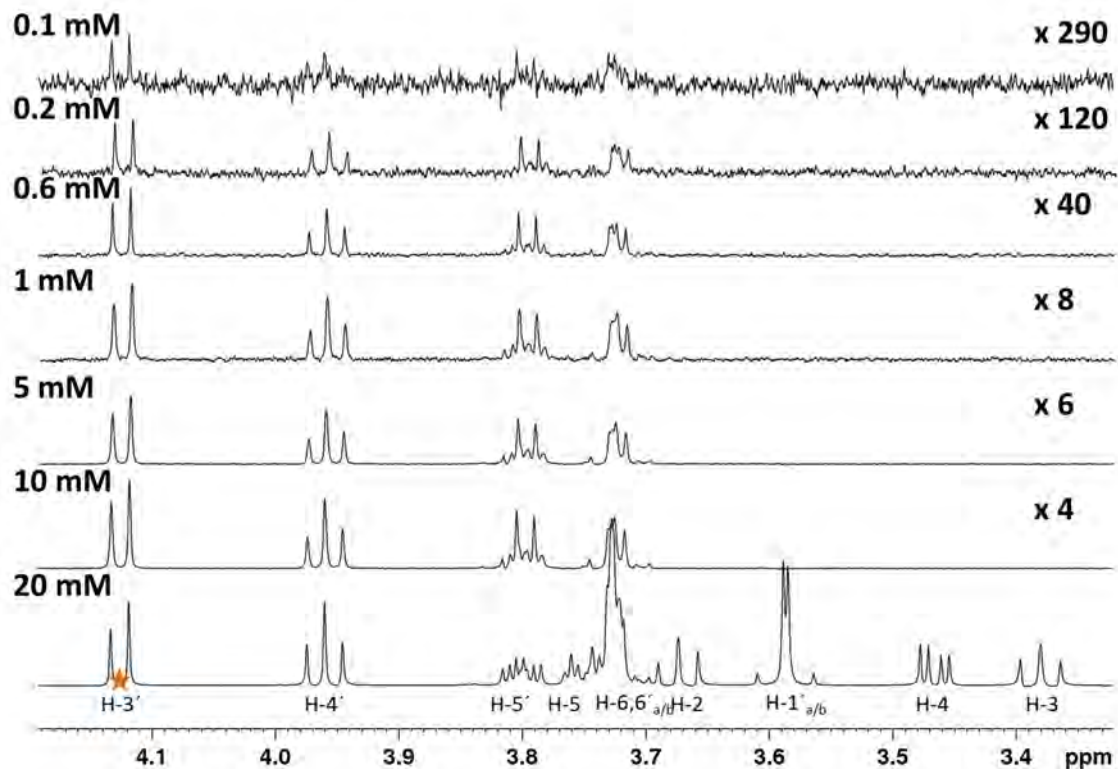


Abbildung 55: Overlaymodus verschiedener NMR-Spektren von Sucrose. Unten: Protonenspektrum, Oben: *se*/TOCSY-Spektren mit einer Einstrahlung bei 4.12 ppm (Stern) von Sucroslösungen unterschiedlicher Konzentration (10, 5, 1, 0,6, 0,2, 0,1 mM).

In Abbildung 63 zeigt sich die Verteilung der Magnetisierung über den Fructosering der Sucrose mittels *se*/TOCSY Experiment. Hier lassen sich die Signale der Fructose noch vollständig im 0,1 mM Bereich zuordnen.

Zusätzlich sollte die Möglichkeit der Identifizierung von Konnektivitäten mittels *se*/NOESY Spektren geprüft werden. Hierfür wurde bei den einzelnen Konzentrationen auf die Frequenz des H-1 des Glucoserings eingestrahlt und geprüft bis zu welcher Konzentration das H-1' Signal des Fructoserings noch statistisch relevant detektierbar ist.

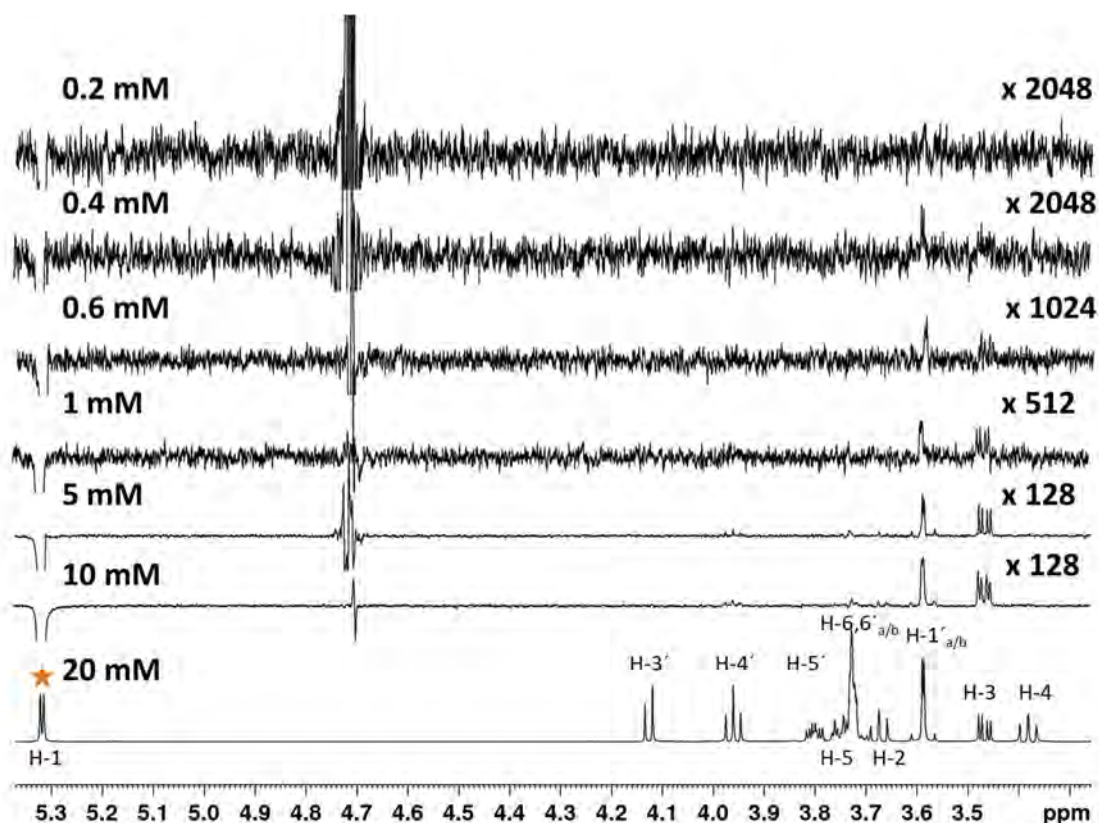


Abbildung 56: Overlaymodus verschiedener NMR-Spektren von Sucrose. Unten: Protonenspektrum, Oben: *se*/NOESY-Spektren mit einer Einstrahlung bei 5.31 ppm (Stern) von Sucroslösungen unterschiedlicher Konzentration (10, 5, 1, 0.6, 0.4, 0.2 mM).

Der Abbildung 64 ist zu entnehmen, dass eine Konzentration von 0.4 mM die Untergrenze für die verwendeten Standardeinstellungen (Abschnitt 3.5.4.4) darstellt.

Ausgehend von der Annahme, dass keine Spinsysteme untersucht werden, die größer sind als die der Glucose, kann an dieser Stelle gesagt werden, dass für die verwendeten Standardeinstellungen eine Mindestkonzentration von 0.8 mM vom jeweiligen Metaboliten vorliegen sollte. Ab 0.8 mM lassen sich valide Aussagen über die Spinsysteme und ihrer Verbindungen untereinander machen.

5 Zusammenfassung

Seit jeher ist eine der größten Herausforderungen der Naturstoffchemie die Identifizierung unbekannter Substanzen. Lange Zeit wurde der aufwendige Weg des Isolierens zum Identifizieren und Charakterisieren gegangen. Durch technische Weiterentwicklungen, insbesondere im Bereich der Massenspektrometrie und der NMR-Spektroskopie, rückt heutzutage mehr und mehr die Idee, Substanzen direkt aus Gemischen identifizieren zu können, in den Fokus der Wissenschaft.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation wurde ein bestehender Ansatz zur Identifizierung von Glykanen aus Gemischen validiert und auf eine Fragestellung aus dem Metabolomicsbereich angepasst. Die vorangegangene Arbeit wurde 2012 von BEHNKEN *et al.* entwickelt. Die Methode der 3DCC wurde seither immer wieder erfolgreich zur Identifizierung von Glykanen aus Glycangemischen eingesetzt. Da sich im Zuge der vorliegenden Arbeit der Analyse von polaren Extrakten aus weißem Gemüsespargel gewidmet wurde, wurde die Methode zunächst auf ihre Möglichkeit hin untersucht, Metaboliten unterschiedlicher Stoffklassen aus Gemischen eindeutig identifizieren zu können. Hierfür wurde ein Modellversuch mit 8 verschiedenen Substanzen, die den Metaboliten in Größe und Polarität ähneln sollten, aufgesetzt. Der Modellversuch veranschaulichte sehr gut, dass eine solche Identifizierung möglich ist. Es war möglich von sechs überlagernden Metaboliten reine NMR-Spektren mithilfe der Methode 3DCC zu berechnen. Die übrigen zwei Substanzen eluierten separiert und wurden daher nicht näher betrachtet. Damit war dieser Modellversuch erfolgreich. Allerdings sollten im Laufe dieser Arbeit polare Extrakte aus weißem Gemüsespargel auf ihre Metaboliten hin untersucht und analysiert werden. Daher wurden neue Fragestellungen hinsichtlich der Strukturvielfalt, der Konzentrationsunterschiede unter den Metaboliten und deren strukturelle und chemische Vielfalt aufgeworfen. Diese machten ein Anpassen der Methode nötig. Natürliche Extrakte stellen zum einen durch ihre hohe Vielfalt unterschiedlichster Substanzen verschiedener Stoffklassen eine große Herausforderung dar, zum anderen zeichnen sie sich durch sehr starke Konzentrationsunterschiede aus. Um all diesen unterschiedlichen Bedingungen gerecht zu werden, wurde zunächst mit einer groben Vortrennung gearbeitet, da sich dies bereits in der Methode 3DCC bewährt hatte. Die grobe Vortrennung über eine präparative oder semi-präparative Säule führt zu Fraktionen, die sich durch eine sehr viel geringer Konzentration an Kohlenhydraten auszeichnen. Da Zucker, wie bei-

spielsweise Sucrose, einer der Hauptkomponenten im Spargel ist, konnten so starke Signalüberlagerungen in den NMR-Spektren umgangen werden. Außerdem konnte festgestellt werden, dass die grobe Vortrennung Vorteile im Rahmen des dynamischen Bereichs aufweist, da Hauptkomponenten nur noch auf wenige Fraktionen verteilt vorlagen. So war es mithilfe dieser Vortrennung u.a. möglich eine, im Rahmen dieser Extraktion eindeutige Minorkomponente, wie Uridin erstmalig aus weißem Gemüsespargel zu identifizieren. Im NMR-Spektrum des Vollextrakts ist Uridin ebenfalls identifiziert worden. Bei weiterer Analyse der erhaltenen Fraktionen stellten sich die NMR-Experimente *se*/TOCSY und *se*/NOESY als vorteilhaft heraus. Zum einen sind insbesondere die *se*/TOCSY-Experimente mit dem zeitlichen Aufwand eines Protonenspektrums vergleichbar, was sich bei größeren Analysen mehrerer Metaboliten als äußerst zeitsparend erweist. Zum anderen bieten die *se*/TOCSY Experimente die Möglichkeit Kopplungsmuster, die im Protonenspektrum überlagert sind, aufzulösen. So war es mithilfe dieser Experimente möglich den Metaboliten Valinbetain als neuen Metaboliten aus weißem Gemüsespargel zu identifizieren und damit diesen Metaboliten erstmalig in Pflanzen nachzuweisen. Im Zuge dessen wurde die Konnektivität der drei Methylgruppen mit dem Valinrest mithilfe des *se*/NOESY Experiments identifiziert. Ebenso war es möglich mithilfe der *se*/TOCSY und *se*/NOSY Experimente den Metaboliten β -[Carboxyiospropyl]-L-cystein aus weißem Gemüsespargel zu identifizieren. Beide Metaboliten ließen sich zusätzlich im Vollextrakt erfolgreich nachweisen. Bei der Identifizierung von unbekanntem und möglicherweise noch ungelisteten Metaboliten wäre zusätzlich die Identifizierung der zugehörigen Molekülmasse vorteilhaft. Daher wurde die Idee MS und NMR kombinativ einzusetzen analog zu 3DCC weiterentwickelt. Hierfür wurden kurze Fraktionszeiten verwendet, um eine möglichst hohe Anzahl Datenpunkte zu generieren. Die Integration eines NMR-Signals über den Fraktionsverlauf ergibt hierbei ein EDC. Mit kurzen Fraktionszeiten lassen sich feine Konzentrationsentwicklungen abbilden. Die einzelnen Fraktionen wurden zusätzlich mit einem 15-minütigen HPLC-MS Lauf vermessen und die einzelnen EICs der Fraktionen extrahiert, integriert und die Integrale gegen die Fraktionen zu sog. RICs aufgetragen. Auch hier führen kurze Fraktionszeiten zu feineren Abstufungen im Konzentrationsverlauf. Anschließend wurden die EDCs mit den RICs nach Pearson korreliert. Wurde eine gute Korrelation, mit einem Korrelationskoeffizienten von über 0.75, festgestellt, konnte davon ausgegangen werden, dass die entsprechende Masse zu einem bestimmten NMR-Signal gehört. Es genügt hierbei die Kor-

relation eines einzelnen NMR-Signals einer Substanz mit einer Masse (SSC), da die übrigen NMR-Signale mittels *se*/TOCSY und *se*/NOESY Experimenten identifiziert werden können. Bei der Identifizierung des unbekanntes Metaboliten 2 zeigte sich der Vorteil der SSC, da hier ein Korrelationskoeffizient von über 0.95 zeigte, dass die Masse 307.09 [M+H] zu dem gesuchten Molekül gehört. Damit wurde die SSC Methode nicht nur erfolgreich entwickelt, sie konnte schon im Rahmen dieser Dissertation einen wichtigen Beitrag bei der Identifizierung eines noch unbekanntes Metaboliten leisten. In Abbildung 65 ist die im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Strategie zur Identifizierung von Metaboliten aus Gemischen schematisch zusammengefasst.

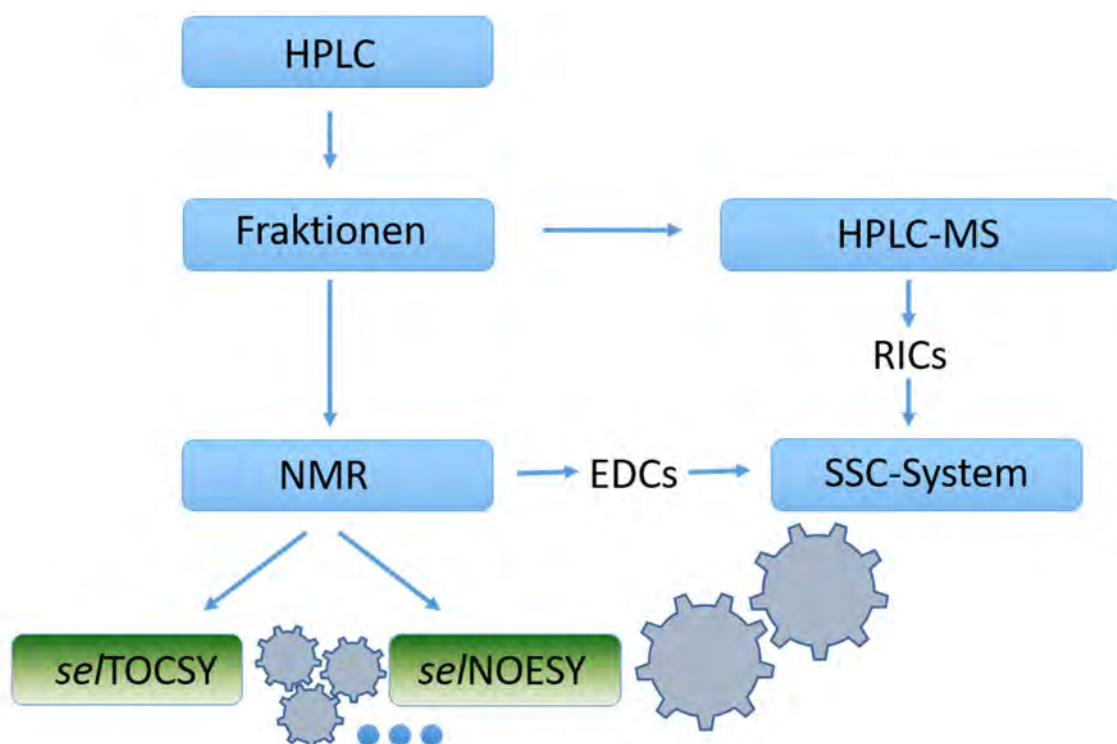


Abbildung 57: Schematische Zusammenfassung der im Rahmen dieser Promotionsarbeit entwickelten Strategie zur Identifizierung von Metaboliten aus Gemischen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden ebenfalls weitere Metaboliten aus *Asparagus Officinalis* identifiziert. Diese sind in der Tabelle 9 aufgeführt. Zusätzlich wurden die Grenzen der Methode validiert. Hierfür wurde anhand von Sucroslösungen unterschiedlicher Konzentrationen die Effizienz der *se*/TOCSY und *se*/NOESY Experimente ermittelt. Es zeigte sich, dass bei Molekülen ähnlicher Größe und Spinsystem die minimale Konzentration 600 μM betragen sollte, damit alle strukturelevanten Signale statistisch relevant abgebildet werden können.

5.1 Summary

The identification of unknown substances has always been one of the greatest challenges in natural product chemistry. Historically, the time-consuming process of isolation was employed to identify and characterize unknown substances. With technological advancements, especially in the field of mass spectrometry and NMR spectroscopy, the approach of identifying substances directly from mixtures has garnered increased attention.

In context of the present dissertation, an existing approach for the identification of glycans from mixtures was validated and adapted with the intent of identifying metabolites untargeted from polar asparagus extract. The previous work was developed in 2012 by BEHNKEN et al. Since then, the method 3DCC has been successfully used for the identification of glycans from glycan mixtures. Since the present work was aimed at the analysis of polar extracts from white asparagus, the method was first examined for its possibility of unambiguously identifying metabolites of different substance classes from mixtures. For this purpose, a model experiment was designed utilizing 8 different substances, resembling the metabolites in size and polarity. This experiment proved successful and it was subsequently possible to calculate pure NMR spectra of all overlapping metabolites using the 3DCC method.

Nevertheless, in the context of this work, polar extracts from white asparagus should be examined and analyzed with regard to their metabolites. New questions were raised regarding the concentration differences among the metabolites and their structural and chemical diversity. Adapting the method to answer these questions was prudent, if not necessary. Not only do natural extracts provide a substantial challenge due to their great diversity over substance types and classes, but their mixtures are characterized by very strong concentration differences. Given this combination of conditions, a crude pre-separation was used, as this had been previously validated in the 3DCC method. The pre-separation utilizing a preparative or semi-preparative column produces fractions which are characterized by a much lower concentration of carbohydrates. Since sugar, such as sucrose, is one of the main components in asparagus, strong signal overlaps in the NMR spectra can subsequently be avoided. In addition, it was found that the crude pre-separation had advantages with regard to the dynamic range, since the main components were distributed over only a few fractions. Among other things, this pre-separation enabled the identification of a unique

minor component, uridine, from white asparagus for the first time. Uridine has also been identified in the NMR spectrum of the full extract. It appeared that the signals in the full extract were very close to the baseline and thus uridine represents a minor component of the extracted metabolites. In further analysis of the fractions, the NMR experiments *se*/TOCSY and *se*/NOESY demonstrated promise. In particular, the time required for the *se*/TOCSY experiments is comparable to that required for a proton spectrum, this results in extreme and valuable time savings for larger analyses of several metabolites. Furthermore, the *se*/TOCSY experiments offer the possibility of resolving coupling patterns that are overlaid in the proton spectrum. These experiments enabled the identification of the metabolite valinbetain as a new metabolite from white vegetable asparagus. The connectivity of the three methyl groups with the valine residue was revealed by using the *se*/NOESY experiment. Additionally, the *se*/TOCSY and *se*/NOESY experiments enabled the identification of the metabolite β -[Carboxyiospropyl]-L-cysteine from white asparagus. Both metabolites were also successfully detected in the full extract. In the case of the identification of unknown and possibly still unlisted metabolites, the determination of the corresponding molecular mass would also be advantageous. Therefore the idea of combining MS and NMR was further developed analogous to 3DCC. For this purpose, short fraction collection times were used to generate a large number of data points. The integration of an NMR signal over the fraction progression results in an EDC reflecting fine concentration developments. In addition, the individual fractions were further resolved with a 15-minute HPLC-MS run. The individual EICs of the fractions were extracted, integrated and all integrals were plotted against the fractions of so-called RICs. Here, too, short fraction collection times lead to finer increments in the concentration process. Subsequently, the EDCs were correlated with the RICs according to Pearson. A high correlation with a correlation coefficient of more than 0.75, indicated that the corresponding mass belongs to a particular NMR signal. The correlation of a single NMR signal of a substance with a *m/z* (SSC) is sufficient, since the remaining NMR signals can be identified by *se*ITOCYSY and *se*INOESY experiments. The identification of the unknown metabolite 2 showed the advantage of the SSC, since a correlation coefficient of more than 0.95 revealed that the *m/z* 307.09 [M+H]⁺ belongs to the molecule. Thus, the SSC method was not only successfully developed, it was also able to make an important contribution to the identification of an unknown metabolite

within this dissertation. Figure 66 shows a schematic summary of the strategy for identifying metabolites from mixtures developed in this thesis.

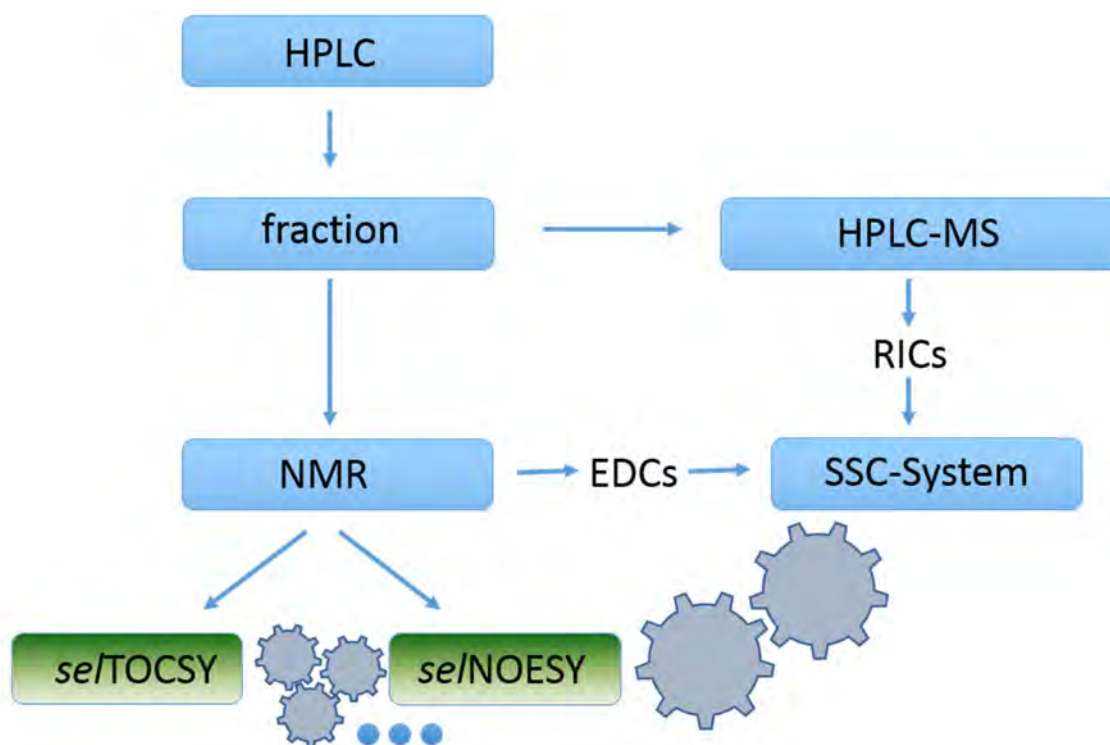


Figure 58: Schematic summary of the strategy for the identification of metabolites from mixtures developed as part of this doctoral thesis.

Further metabolites from *Asparagus Officinalis* were additionally identified in the present work. These are listed in Table 9. In addition, the limitations of the method were assessed. The efficiency of the *se*/TOCSY and *se*/NOESY experiments was determined using sucrose solutions of different concentrations. It emerged that for molecules of similar size and spin systems, the minimum concentration should be approximately 600 μM in order to map all structure-relevant signals.

6 Literatur

- (1) Hanson, J. R., Ed. *Natural Products*; The Royal Society of Chemistry: Cambridge UK, **2003**.
- (2) Karlovsky, P. *Secondary Metabolites in Soil Ecology*, 1st edn.; Springer, **2008**.
- (3) *Lexikon der Biochemie*,
<https://www.spektrum.de/lexikon/biochemie/sekundaermetabolite/5650>.
- (4) Sicker, D.; Zeller, K.-P.; Siehl, H. U.; Berger, S. *Natural Products*, 1st edn.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2019**.
- (5) Habermehl, Hammann, Krebs, Ed. *Naturstoffchemie*, 2nd edn.; Springer-Verlag: Berlin Heidelberg, **2002**.
- (6) Woodward, R. B. *Noble Lecture 1965* (1), 100–121.
- (7) List, P. H.; Hörhammer, L. *Wirkstoffgruppen I*, 4th edn.; Springer, **2013**.
- (8) Callahan, D. L.; Souza, D. d.; Bacic, A.; Roessner, U. *Journal of separation science* **2009**, DOI: 10.1002/jssc.200900171.
- (9) Nakabayashi, R.; Saito, K. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2013**, DOI: 10.1007/s00216-013-6869-2.
- (10) Stahl E., S. W., Ed. *Isolierung und Charakterisierung von Naturstoffen*; Gustav Fischer Verlag: Stuttgart New York, **1986**.
- (11) Kreitmeier, P. *Tutorial zum Praktikum OC1 für Studierende der Lehrämter*,
http://www-oc.chemie.uni-regensburg.de/img_/docs/Mechnismen_8.pdf.
- (12) Do, T. K. T.; Hadji-Minaglou, F.; Antoniotti, S.; Fernandez, X. *Journal of chromatography. A* **2014**, DOI: 10.1016/j.chroma.2013.11.046.
- (13) Dominik, A.; Steinhilber, D.; Wurglics, M. *Instrumentelle Analytik kompakt*, 3rd edn.; Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart: Stuttgart, **2013**.
- (14) Bingol, K.; Brüscheiler-Li, K.; Yu, C.; Somogyi, A.; Zhang, F.; Brüscheiler, R. *Anal. Chem.* **2015** (87), 3864–3870.
- (15) Bingol, K.; Brüscheiler, R. *Journal of proteome research* **2015**, DOI: 10.1021/acs.jproteome.5b00184.
- (16) Zhang, B.; Xie, M.; Bruscheiler-Li, L.; Bingol, K.; Brüscheiler, R. *Analytical chemistry* **2015**, DOI: 10.1021/acs.analchem.5b01142.
- (17) Crockford, D. J.; Holmes, E.; Lindon, J. C.; Plumb, R. S.; Bruce, S. J.; Rainville, P.; Stumpf, C. L.; Nicholson, J. K. *Analytical chemistry* **2006**, DOI: 10.1021/ac051444m.
- (18) Behnken, H. N.; Fellenberg, M.; Koetzler, M. P.; Jirmann, R.; Nagel, T.; Meyer, B. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2012**, DOI: 10.1007/s00216-012-6241-y.

- (19) Fischer, M.; Creydt, M.; Felbinger, C.; Fischer, C.; Klockmann, S.; Werner P.; Klara, J.; Hünninger, T.; Hackl, T. *Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit* **2014** (9), 400–404.
- (20) Fischer, M.; Creydt, M.; Felbinger, C.; Fischer, C.; Klockmann, S.; Werner, P.; Klare, J.; Hünninger, T.; Hackl, T. *Foodscience Dialog* **2014**, 400–404.
- (21) Werner, P.; Hünninger, T.; Creydt, M.; Klare, J.; Hackl, T.; Fischer, M. *FOOD Lab* **2014** (1), 36–39.
- (22) Pflanzenlexikon. *Die Pflanzen der Welt von A bis Z*, <http://pflanzenlexikon.com/Box/Asparagus.html>.
- (23) Planet Wissen. *Spargel*, <https://www.planetwissen.de/gesellschaft/lebensmittel/spargel/index.html>.
- (24) *Spektrum*, <https://www.spektrum.de/lexikon/biologie/spargel/62343>.
- (25) Bundeszentrum für Ernährung. *Spargel: Erzeugung*, <https://www.bzfe.de/inhalt/spargel-erzeugung-5862.html>.
- (26) <https://www.tagesspiegel.de/berlin/saison-nicht-nur-in-beelitz-eroeffnet-der-spargel-ist-da-und-hier-sind-die-besten-hoefe/11646810.html>.
- (27) Nicholson J. K.; Connelly, J.; Lindon, J. C.; Holmes, E. *Macmillian Magazines Ltd.* **2002** (1), 153–161.
- (28) Rochfort, S. *Journal of natural products* **2005**, DOI: 10.1021/np050255w.
- (29) J. K. Nicholson, J. C. Lindon. *Nature* **2008** (455), 1054–1056.
- (30) S. Mitchell, E. Holmes, P. Carmichael. *Biologist (London)* **2002** (49), 217–221.
- (31) Jin, Y.; Wu, C.; Zhang, J.; Li, Y. *Analytica chimica acta* **2013**, DOI: 10.1016/j.aca.2013.01.012.
- (32) Challal, S.; Queiroz, E. F.; Debrus, B.; Kloeti, W.; Guillarme, D.; Gupta, M. P.; Wolfender, J.-L. *Planta medica* **2015**, DOI: 10.1055/s-0035-1545912.
- (33) Chen, W.; Li, S.; Chen, L.; Fang, M.; Chen, Q.; Wu, Z.; Wu, Y.; Qiu, Y. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2015**, DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.06.011.
- (34) Karch, K.; Sebastian, I. *Journal of chromatography* **1979** (122), 3–16.
- (35) Liang, J.; Meng, J.; Wu, D.; Guo, M.; Wu, S. *Journal of chromatography. A* **2015**, DOI: 10.1016/j.chroma.2015.04.043.
- (36) Restek. *Pure Chromatography*, <https://www.restekgmbh.de/produkte/saeulen/hplc-uhplc>.
- (37) J. Layne. *Journal of chromatography* **2002** (957), 149–164.
- (38) Alpert, A. J.; Shukla, M.; Shukla, A. K.; Zeske, L. R.; Yuen, S. W.; Ferguson, M. A. J.; Mehlert, A.; Pauly, M.; Orlando, R. *Journal of chromatography* **1994** (676), 191–202.

- (39) Bhadrare, P.; Madhavan, P.; Roa, B. M.; Someswar, N. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research* **2010** (2), 372–380.
- (40) Dettmer, K.; Aronov, P. A.; Hammock, B. D. *Mass spectrometry reviews* **2007**, DOI: 10.1002/mas.20108.
- (41) Naseer, S.; Lone, S. H.; Lone, J. A.; Khuroo, M. A.; Bhat, K. A. *Journal of chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences* **2015**, DOI: 10.1016/j.jchromb.2015.02.046.
- (42) Nakabayashi, R.; Yang, Z.; Nishizawa, T.; Mori, T.; Saito, K. *Journal of natural products* **2015**, DOI: 10.1021/acs.jnatprod.5b00092.
- (43) Jiménez-Sánchez, C.; Lozano-Sánchez, J.; Rodríguez-Pérez, C.; Segura-Carretero, A.; Fernández-Gutiérrez, A. *Journal of Food Composition and Analysis* **2016**, DOI: 10.1016/j.jfca.2015.11.004.
- (44) Schwedt, G.; Schmidt, T. C.; Schmitz, O. J. *Analytische Chemie*, 3rd edn.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, **2016**.
- (45) Lambert, J. B.; Gronert, S.; Shurvell, H. F.; Lightner, D. A. *Spektroskopie*, 2nd edn.; Pearson, **2012**.
- (46) Halket, J. M.; Waterman, D.; Przyborowska, A. M.; Patel, R. K. P.; Fraser, P. D.; Bramley, P. M. *Journal of experimental botany* **2005**, DOI: 10.1093/jxb/eri069.
- (47) Gowda, G. A. N.; Raftery, D. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **2015**, DOI: 10.1016/j.jmr.2015.07.014.
- (48) Sheedy, J. R. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2013**, DOI: 10.1007/978-1-62703-577-4_7.
- (49) Kolmer, A. *Aufklärung von Struktur-Reaktivitäts-Beziehungen komplexer organischer Moleküle mit moderner NMR- Spektroskopie*: Darmstadt, November **2015**.
- (50) Fioroni, M.; Diaz, M. D.; Burger, K.; Berger, S. *Journal of American Chemical Society* **2002** (124), 7737–7744.
- (51) Fellenberg, M.; Coksezen, A.; B. Meyer **2010** (49), 2630–2633.
- (52) Bingol, K.; Brüscheiler, R. *Current opinion in clinical nutrition and metabolic care* **2015**, DOI: 10.1097/MCO.0000000000000206.
- (53) Liland, L.; Hovde, K. **2011** (30), 827–841.
- (54) Mckay, R. T. *Concepts Magn. Reson.* **2011**, DOI: 10.1002/cmr.a.20223.
- (55) Santosh K. B., Raja R. *Current Metabolomics* **2014** (2), 163–173.
- (56) MacKinnon, N.; While, P. T.; Korvink, J. G. *Journal of magnetic resonance (San Diego, Calif. : 1997)* **2016**, DOI: 10.1016/j.jmr.2016.09.011.
- (57) Papaemmanouil, C.; Tsiafoulis, C. G.; Alivertis, D.; Tzamaloukas, O.; Miltiadou, D.; Tzakos, A. G.; Gerothanassis, I. P. *Journal of agricultural and food chemistry* **2015**, DOI: 10.1021/acs.jafc.5b01335.











- (58) Shockcor, J. P.; Unger, S. E.; Wilson, I. D.; Foxall, P. J. D.; Nicholson, J. K.; Lindon, J. C. *Anal. Chem.* **1996**, DOI: 10.1021/ac9606463.
- (59) Spraul, M.; Freund, A. S.; Nast, R. E.; Withers, R. S.; Maas, W. E.; Corcoran, O. *Anal. Chem.* **2003**, DOI: 10.1021/ac026203i.
- (60) *Korrelationskoeffizient nach Pearson*, <https://www.medistat.de/glossar/korrelation-assoziation/korrelationskoeffizient-nach-pearson/>.
- (61) Sander, S. *NMR-spektroskopische Verfolgung der NMR-spektroskopische Verfolgung der chromatographischen Auftrennung von Extrakten aus Asparagus Officinalis*: Universität Hamburg, MIN, Organische Chemie, **2016**.
- (62) Fellenberg, M.; Behnken, H. N.; Nagel, T.; Wiegandt, A.; Baerenfaenger, M.; Meyer, B. *Analytical and bioanalytical chemistry* **2013**, DOI: 10.1007/s00216-013-7164-y.
- (63) Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L. *Biochemie*, 6th edn.; Spektrum Akademischer Verlag: Heidelberg, **2010**.
- (64) Biological Magnetic Resonance Data Bank. *A Repository for Data from NMR Spectroscopy on Proteins, Peptides, Nucleic Acids, and other Biomolecules*, http://www.bmrb.wisc.edu/metabolomics/mol_summary/show_data.php?id=bmse000158&whichTab=1.
- (65) Peddie, B. A.; Lever, M.; Randall, K.; Chambers, S. T. **1999**, *75* (3), 183–189.
- (66) Randall, K.; Lever, M.; Peddie, B. A.; Chambers, S. T. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1996**, DOI: 10.1016/S0304-4165(96)00057-8.
- (67) Peddie, B. *FEMS Microbiology Letters* **1998**, DOI: 10.1016/S0378-1097(98)00004-4.
- (68) Pekkinen, J.; Rosa-Sibakov, N.; Micard, V.; Keski-Rahkonen, P.; Lehtonen, M. Poutanen, K.; Mykkänen, H.; Hanhineva, K. *Molecular nutrition & food research* **2015**, DOI: 10.1002/mnfr.201500066.
- (69) Khandelwal, G. D.; Wedzicha, B. L. *Food Chemistry* **1990** (37), 159–169.
- (70) Kasai, Takanori, Hirakuri, Yohihiro, Sakamura, Sadao. *Agricultural and Biological Chemistry* **1981** (45), 433–437.
- (71) Kasai, Takanori, Hirakuri, Yohihiro, Sakamura, Sadao. *Phytochemistry* **1981** (9), 2209–2211.
















7 Toxikologische Daten





7.1 Sicherheit und Entsorgung

Tabelle 8 zeigt eine Übersicht aller verwendeten Chemikalien mit Sicherheitsangaben. Die Entsorgung erfolgte fachgerecht.

Tab. 10: Liste der verwendeten Chemikalien mit Sicherheitsangaben.

Substanz	GHS-Symbol	H-Sätze	P-Sätze
2-Hydroxyacetophenon		H315, H319, H335	P261, P305+P351+P338
2,3-Dihydroxybenzoesäure		H315, H319, H335	P261, P305+P351+P338
2,3,4-Trimethylpyrazin		H228, H315, H319, H335	P210, P261, P305+P351+P338
2,3,5,6-Tetramethylpyrazin		H228, H315, H319, H335	P210, P261, P305+P351+P338
2,6-Dimethylpyrazin		H228, H315, H319, H335	P210, P261, P305+P351+P338
3-Aminobuttersäure		H226, H315, H319, H335	P261, P305+P351+P338
4-Methylpyrimidin		H226, H318	P210, P280, P305+P351+P338, P310
Acetonitril, HPLC grade		H225, H302+H312+H332, H319	P210, P280, P305+P351+P338
Ameisensäure 99%		H226, H302, H314, H331	P210, P280, P303+P361+P353, P304+P340+P310, P305+P351+P338, P403+P233
Deuteriumoxid	-	-	-
Deuteriumchlorid (1 M)		H290, H314, H335	P260, P280, P303+P361+P353, P304+P340+P310, P305+P351+P338
Dikaliumhydrogen- phosphat	-	-	-

Essigsäure 99%	 	H226, H314	P210, P260, P280, P303+P361+P353, P305+P351+P338, P370+P378
Ethanol, MS grade	 	H225, H319	P210, P403+P235, P305+P351+P338, P370+P378,
Ethylacetat	 	H225, H319, H336	P210, P240, P305+P351+P338
Kaliumdihydrogenphosphat	-	-	-
L-Alanin	-	-	-
L-Glutamin	-	-	-
L-Glutaminsäure	-	-	-
L-Histidin	-	-	-
L-Lysin	-	-	-
L-Phenylalanin	-	-	-
L-Prolin	-	-	-
L-Threonin	-	-	-
L-Tyrosin	-	-	-
L-Valin	-	-	-
Methanol, HPLC grade	  	H225, H301, H311, H331, H370	P210, P260, P280, P301+P310, P311
Natriumazid	  	H300+H310+H330, H373, H410 EUH032	P262, P273, P280, P301+P310+P330, P302+P352+P310, P304+P340+P310
Natriumhydroxid-Pellets		H290, H314	P280, P308+P310, P301+P330+P331, P305+P351+P338,
Natriumtrimethylsilylpropionat (TMSP)		H315, H319, H335	P261, P305+P351+P338
Niacin		H319	P305+P351+P338

Nicotinamid		H319	P305+P351+P338
Salzsäure 1 M	 	H290, H314, H335	P260, P280, P303+P361+P353, P304+P340+P310, P305+P351+P338
Schwefelsäure 96%		H290, H314	<u>P260, P280, P303+</u> <u>P361+P353, P304+</u> <u>P340+P310, P305+</u> <u>P351+P338</u>

7.2 Umgang mit KMR-Stoffen

Es wurden keine KMR-Stoffe der Kategorie I oder II (EG) bzw. Ia oder Ib (GHS) verwendet.

8 Anhang

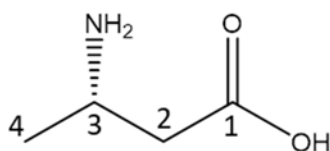
NMR-Daten

Detektierte Signale des NMR-Spektrums der Wasserextraktion von weißem Gemüsespargel (Abschnitt 4.1, Abbildung 10):

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, dPBS pH = 7.8, 300 K): δ [ppm]: 7.86 *d* (8.4 Hz), 7.79 *dd* (8.4 Hz, 1.4 Hz), 7.75 *s*, 7.48 *t* (7.5 Hz), 7.41 *t* (7.7 Hz), 7.00 *s*, 6.99 *s*, 5.92-5.89 *m*, 5.54-5.51 *m*, 5.34 *d* (3.78 Hz), 5.17 *d* (3.82 Hz), 4.58 *d* (7.8 Hz), 4.22 *dd* (3.1 Hz, 9.8 Hz), 4.15 *d* (8.8 Hz), 4.08-4.02 *m*, 4.00-3.90 *m*, 3.84-3.79 *m*, 3.78-3.57 *m*, 3.54 *s*, 3.52 *s*, 3.50-3.47 *m*, 3.46 *d* (3.78 Hz), 3.44 *s*, 3.43 *s*, 3.42-3.38 *m*, 3.35 *s*, 3.434 *t* (9.5 Hz), 3.33 *s*, 3.32 *s*, 3.29-3.24 *m*, 3.18 *dd* (9.3 Hz, 1.3 Hz), 3.13 *s*, 2.89 *d* (1.1 Hz), 2.88 *d* (4.5 Hz), 2.85 *d* (4.4 Hz), 2.8 *d* (7.3 Hz), 2.78 *d* (7.4 Hz), 2.75 *d* (3.9 Hz), 2.72 *d* (3.8 Hz), 2.63 *d* (8.1 Hz), 2.62-2.57 *m*, 2.46 *s*, 2.44 *s*, 2.39 *ddd* (6.9 Hz, 8.2 Hz, 15.5 Hz), 2.36 *ddd* (6.8 Hz, 8.1 Hz, 15.3 Hz), 2.32 *s*, 2.30 *s*, 2.92 *s*, 2.28-2.25), 2.12-2.02 *m*, 2.02-1.88 *m*, 1.86-1.75 *m*, 1.71-1.46 *m*, 1.40 *d* (7.3 Hz), 1.25 *d* (6.6 Hz), 1.14 *d* (6.8 Hz), 1.08 *d* (7.0 Hz), 0.98-0.95 *m*, 0.94-0.84 *m*.

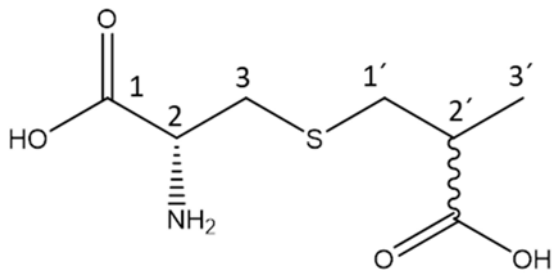
Alle NMR-Daten des Mehrstoffgemisches wurden den berechneten NMR-Spektren nach der 3DCC_L-Methode entnommen.

3-Aminobuttersäure



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, dPBS pH = 7.8, 300 K): δ [ppm]: 3.61 (1H, *ddq*, $^3J = 6.3$ Hz, 6.7 Hz, 6.7 Hz, H-3), 2.49 (2H, *d*, $^3J = 6.7$ Hz, H-2_{a,b}), 1.32 (3H, *d*, $^3J = 6.3$ Hz, H-4_{a,b,c}).

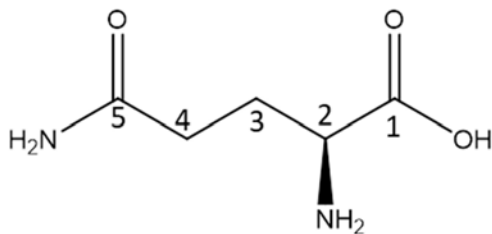
β -[Carboxypropyl]-L-cystein



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz dPBS pH = 7.8, 300 K: δ [ppm]): 3.92 (1H, dd^* , $^3J = 3.8 \text{ Hz}^*$, 8.1 Hz*, H-2), 3.16 (1H, dd , $^3J = 4.0 \text{ Hz}$, 14.8 Hz, H-3a), 2.99 (1H, dd , $^3J = 8.1 \text{ Hz}$, 14.8 Hz, H-3b), 2.73* (1H, dd^* , $^3J = 9.3 \text{ Hz}^*$, 12.8 Hz*, H-1'a), 2.67* (1H, dd^* , $^3J = 5.3 \text{ Hz}^*$, 12.8 Hz*, H-1'b) 2.54* (1H, ddq^* , $^3J = 5.3^* \text{ Hz}$, 6.8* Hz, NA, H-2'), 1.15 (1H, d , $^3J = 6.9 \text{ Hz}$, H-3').

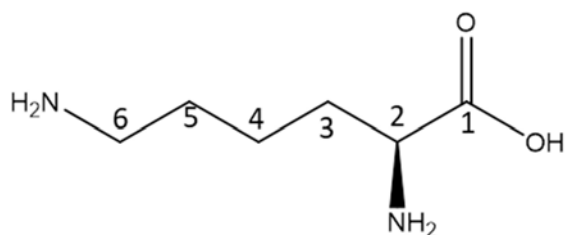
* Daten aus dem se /TOCSY Spektrum entnommen

L-Glutamin



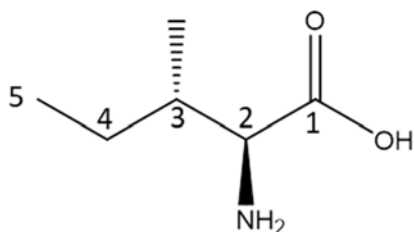
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, dPBS pH = 7.8, 300 K): δ [ppm]: 3.77 (1H, t , $^3J = 6.2 \text{ Hz}$, H-2), 2.53-2.39 (2H, m , H-4_{a,b}), 2.19-2.09 (2H, m , H-3_{a,b}).

L-Lysin



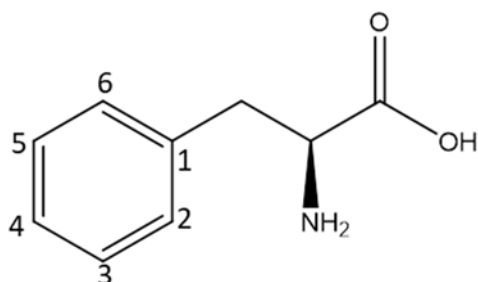
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, dPBS pH = 7.8, 300 K): δ [ppm]: 3.76 (1H, *t*, $^3J = 5.7$ Hz, H-2), 3.02 (2H, *t*, $^3J = 7.4$ Hz, H-6_{a,b}), 1.95-1.86 (2H, *m*, H-5_{a,b}), 1.78-1.69 (2H, *m*, H-3_{a,b}), 1.56-1.41 (2H, *m*, H-4_{a,b}).

L-Isoleucin



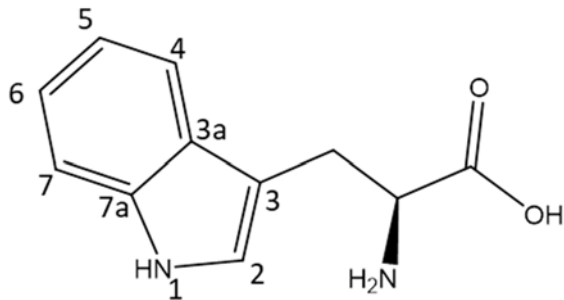
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, dPBS pH = 7.8, 300 K): δ [ppm]: 3.67 (1H, *d*, $^3J = 3.9$ Hz, H-2), 1.50-1.41 (1H, *m*, H-3), 1.30-1.23 (2H, *m*, H-4_{a,b}), 1.01 (3H, *d*, $^3J = 7.0$ Hz, Me), 0.94 (3H, *t*, $^3J = 7.0$ Hz, H-5_{a,b,c}).

Phenylalanin



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz dPBS pH = 7.8, 300 K): δ [ppm]: 7.43 (2H, *dd*, $^3J = 7.3$ Hz, 7.3 Hz, H-6, H-8), 7.38 (1H, *dd*, $^3J = 7.3$ Hz, 7.3 Hz, H-7), 7.33 (2H, *d*, $^3J = 7.6$ Hz H-5, H-9), 4.00 (1H, *dd*, $^3J = 8.0$ Hz, 5.6 Hz, H-2), 3.28 (1H, *dd*, $^3J = 5.6$ Hz, 14.5 Hz, H-3_a), 3.13 (1H, *dd*, $^3J = 8.0$ Hz, 14.5 Hz, H-3_b).

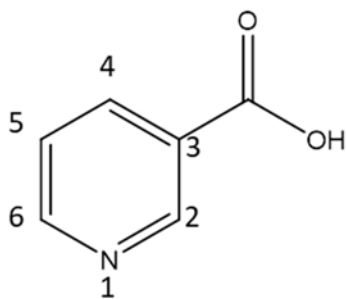
L-Tryptophan



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz dPBS pH = 7.8, 300 K): δ [ppm]: 7.74 (1H, *d*, $^3J = 8.1$ Hz, H-11), 7.54 (1H, *d*, $^3J = 8.1$ Hz, H-8), 7.28 (1H, *t*, $^3J = 7.9$ Hz, H-9), 7.22-7.18 (2H, *m*, H-5, H-10), 4.06 (1H, *dd*, $^3J = 5.0, 8.0$ Hz, H- α), 3.32 (2H, *dd*, $^3J = 8.0, 15.6$ Hz, H- β_1).

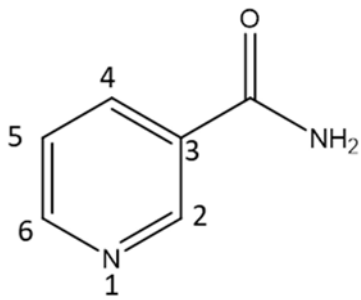
H- β_2 nicht detektiert.

Niacin



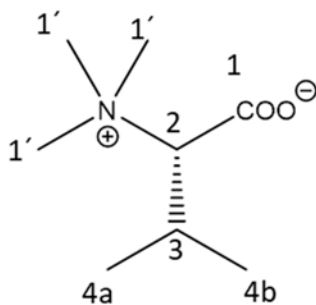
$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, dPBS pH = 7.8, 300 K): δ [ppm]: 8.94 (1H, *d*, $^3J = 1.4$ Hz, H-2), 8.61 (1H, *dd*, $^3J = 1.4$ Hz, 5.0 Hz, H-6), 8.26-8.24 (1H, *m*, H-5), 7.52 (1H, *dd*, $^3J = 5.0$ Hz, 8.1 Hz, H-4).

Nicotinamid



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, dPBS pH = 7.8, 300 K): δ [ppm]: 8.94 (1H, *d*, $^3J = 1.7$ Hz, H-2), 8.71 (1H, *dd*, $^3J = 1.7$ Hz, 4.8 Hz, H-6), 7.61-7.58 (1H, *m*, H-5), 8.26-8.24 (1H, *m*, H-4).

Valinbetain ([*(S)*-1-Carboxy-2-methylpropyl]trimethylaminium)



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz dPBS pH = 7.8, 300 K: δ [ppm]): 3.59 (1H, *d*, $^3J = 1.9$ Hz, H-2), 3.22 (9H, *s*, 3Me), 2.42-2.32* (1H, *m*, H-3), 1.21 (3H, *d*, $^3J = 7.1$ Hz, 4a), 1.05 (3H, *d*, $^3J = 7.1$ Hz, 4b).

* Daten aus dem *se*/TOCSY Spektrum entnommen

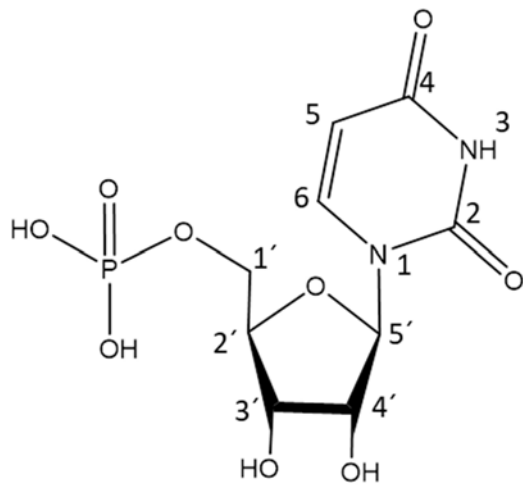
Unbekannte Substanz 1

$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz, dPBS, pH = 7.8, 300 K: δ [ppm]): 3.78 (nicht eindeutig, *t**, $^3J = 6.1$ Hz*), 3.31 (1H, *dd*, $^3J = 4.4$ Hz, 14.5 Hz), 2.98 (1H, *dd*, $^3J = 9.4$ Hz, 14.5 Hz), 2.54 (2H, *ddd*, $^3J = 7.3$ Hz, 8.0 Hz, 14.9 Hz), 2.16 (2H, *dd*, $^3J = 7.5$ Hz, 14.9 Hz), 1.61-1.49 (1H, *m*) ‡ , 1.36-1.24 (1H, *m*) ‡ , 1.04 (1H, *d*, $^3J = 6.9$ Hz) ‡ , 0.99 (1H, *t*, $^3J = 7.5$ Hz) ‡ , 0.93-0.84 (1H, *m*) ‡ .

* Daten aus dem *se*/TOCSY Spektrum entnommen

‡ Daten noch nicht eindeutig

Uridinmonophosphat



$^1\text{H-NMR}$ (600 MHz dPBS pH = 7.8, 300 K: δ [ppm]: 8.12 (1H, *d*, $^3J = 8.1$ Hz, H-5), 5.99 ppm (1H, *d*, $^3J = 8.8$ Hz, H-6), weitere Signale überlagert.

Gradient der HPLC-Messungen der einzelnen Fraktionen

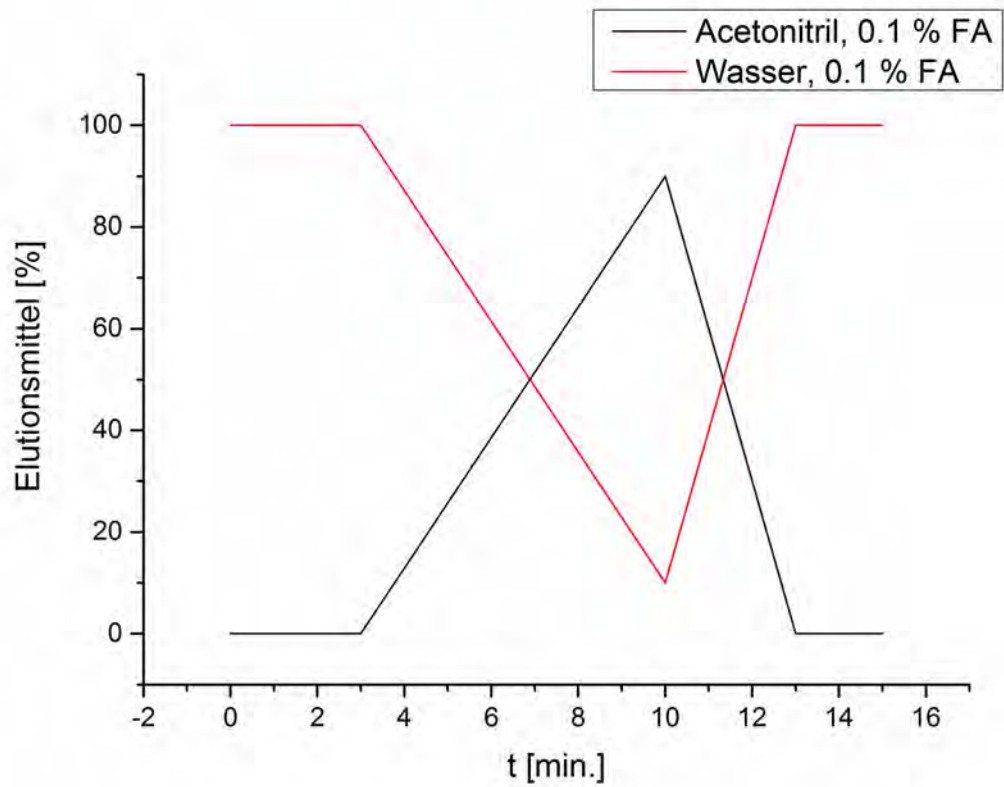


Abbildung 59: Graphische Darstellung des Gradienten der HPLC-Trennungen der einzelnen Fraktionen. Min. 0: 0% Eluent B, Min. 3: 0% Eluent B, Min. 10: 90% Eluent B, Min. 13: 0% Eluent B, Min. 15: 0% Eluent B.

Gradient des Sepacore® Flash Systems

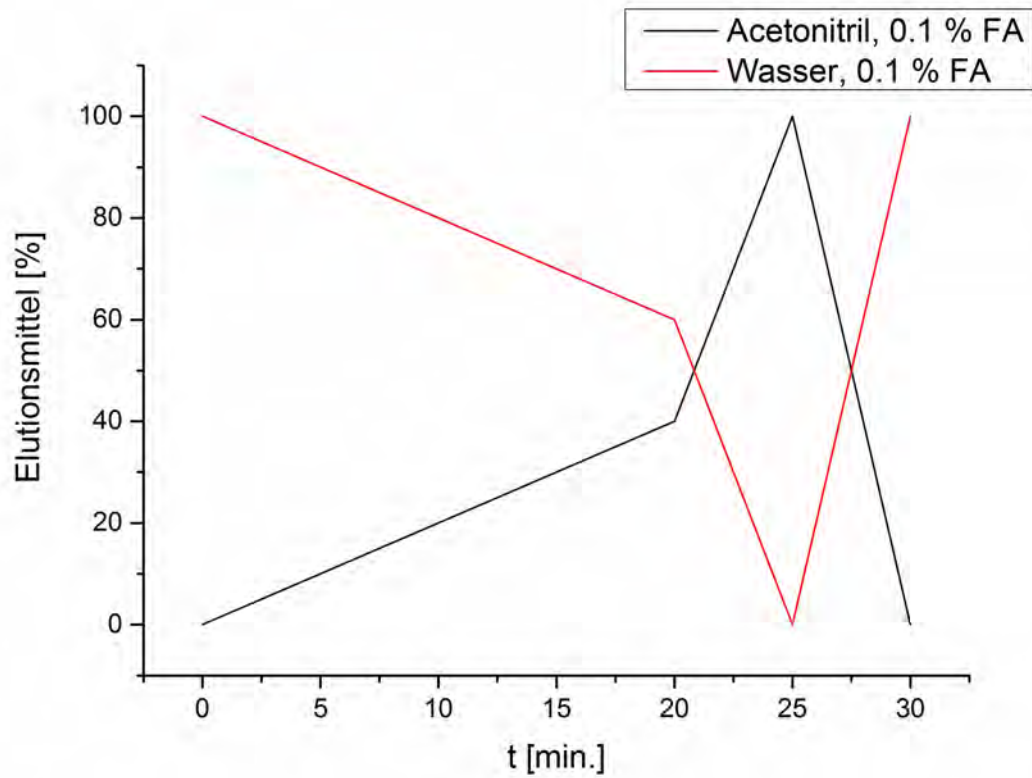


Abbildung 60: Graphische Darstellung des Gradienten der HPLC-Trennung 4 der Spargelprobe 3 mithilfe des Sepacore® Flash Systems der Spargelprobe 1. Min. 0: 0% Eluent B, Min. 20: 40% Eluent B, Min. 25: 100 % Eluent B, Min. 30: 0% Eluent B.

Danksagung

2009 – Welch ein Umbruch, Welch ein Neustart!

Ich möchte mich hiermit bei allen Menschen bedanken, die mich auf diesem spannenden Weg begleitet und unterstützt haben.

Zunächst gilt mein Dank den großartigen Arbeitskreisen, von denen ich ein Teil sein durfte. Danke dem AK Fischer für die freundliche Aufnahme und Unterstützung. Ein besonderer Dank gilt dem AK Meyer, allen derzeitigen sowie ehemaligen Mitgliedern für eine einzigartige Zeit sowohl in den Laboren, Büros als auch auf dem Flur des Erdgeschosses. Vielen Dank besonders an Tim, für Deine große Hilfe bei der Anwendung von 3DCC und für das anwenderfreundliche GUI und natürlich für die Namensinspiration. Dank an Max für Benutzungsrechte deines Rotis und die damit verbundene Zeitersparnis im letzten Abschnitt meiner Promotionsarbeit und hier fällt mir auf, dass auch Dein Name mir bekannt vorkommt.

Vielen Dank, liebe Brita, für die tollen Gespräche und sportlichen Gemeinsamkeiten. Nie werde ich unsere Zeiten an der Alster und beim Marathon vergessen! Vielen Dank an Carsten für die Praktikumszeit. Dir und Raffi danke ich auch für spätere Hilfen an der Agilent.

Einen lieben Dank an Maria Riedner und ihre Arbeitsgruppe. Vielen Dank für all die Unterstützung und großartigen Gespräche.

Ich bedanke mich ebenso bei allen Bacheloranden und Praktikanten, die ich ein Stück ihrer Ausbildung begleiten durfte: Simon Sander (BA), Kevin Schlütter (BA), Henrike Wagler (BA), Franz Heinemann, Karolina Dudzik, Knut Krügel, Michael Druschka, Manuela Taescher, Johanna Hårdter und Tobias Schneider.

Marie und Simon, ohne Euch wären wir nie die *Four oft of the Fourth* geworden. Ich danke Euch für die unglaublich tolle Zeit, die wir hatten und freue mich darauf noch lange von Euch zu hören. Da auch bei Euch aktuell neue Wege anstehen, wünsche ich Euch von Herzen viel Kraft und alles Gute!

Ebenso gilt ein ganz besonderer Dank dem AK Hackl, dem anderen Gründer und denen, die nach uns kamen! Danke euch allen für eine großartige Zeit auch hier in den Laboren, den Büros, der Küche und auch auf dem Flur.

Danke Thomas, Du warst ein großartiger Chef. Vielen Dank, dass ich die Möglichkeit hatte in Deinem Arbeitskreis zu arbeiten, reifen und zu wachsen. Es war eine tolle Zeit, die wir alle auch Dir zu verdanken haben!

Ein besonderer Dank gilt meinem kleinen Bruder, den ich nie hatte und schließlich in der Uni fand. René, eine Ära endet. Durch Dick und Dünn sind wir gegangen, haben uns in den letzten 10 Jahren gleich und auch ganz anders entwickelt. Von Anfang an ein Team mit einer Bindung, die wir beide nicht recht in Worte fassen können. Du hast mir bei all meinen Sinuskurven beiseite gestanden. Dafür danke ich Dir! Ich wünsche mir, dass sich unsere Wege nach all der Zeit noch lange kreuzen werden. Ich danke meinen Eltern, für alles, für mein Leben, meine Erfahrungen, meine Stärken und Schwächen und alles was ich ihnen noch zu verdanken habe. Sie waren mir jederzeit ein Anker und haben mich von keinen meiner noch so verrückten Vorhaben je abgehalten und mir damit die Möglichkeit zu dem Menschen zu werden der ich heute bin.

Ich danke meinen Schwiegereltern dafür, dass sie mir den tollsten Mann auf Erden geschenkt haben und mir ein zweites zu Hause in Belgien geschaffen haben. Ein zu Hause in dem immer ein Platz für mich und meine Kinder ist und wir uns wohlfühlen dürfen.

Und natürlich gilt mein größter Dank meinem Mann Erik für seine unendliche Liebe, Fürsorge und den ständigen Versuch der Erfüllung unserer Träume! Ich danke Dir ganz besonders für all Deine Unterstützung und Geduld auf dem langen Weg zu diesem Abschluss. Ich danke Dir für die zwei wertvollsten Geschenke in meinem Leben, unsere wundervollen zwei Söhne Max und Tim, die besser und perfekter nicht sein könnten. Und das ist natürlich eine rein objektive Feststellung. Euch zwei Mäusen, Max und Tim, möchte ich natürlich auch dafür danken, dass Ihr so seid wie ihr seid! Kreativ, aktiv, lustig, süß, lieb, wild, wundervoll und so vieles mehr. Jeden Tag gebt ihr mir die nötige Kraft für neue Taten.

Ein extra Dank gilt der Wirtschaftskrise von 2008, ohne die ich nie diesen Neuanfang gewagt hätte.

Curriculum Vitae

Anke Bollen, geb. Bieling

geboren: 27.07.1980, Hamburg

Familienstand: verheiratet, zwei Kinder (*2014, *2018)

Wissenschaftlicher und beruflicher Werdegang

11/2015-heute

Universität Hamburg, Deutschland, Promotion: Analytische und Lebensmittelchemie

Betreuung: Dr. Thomas Hackl und Prof. Bernd Meyer

Vorläufiger Titel der Dissertation: Entwicklung einer NMR- und MS-basierten Strategie zur Identifizierung von Metaboliten aus Gemischen

Ausbildung

12/2012-11/2015

Universität Hamburg, Deutschland, MSc: Analytische und Lebensmittelchemie

Betreuung: Dr. Thomas Hackl und Prof. Bernd Meyer

Titel der Masterarbeit: Identifizierung von Metaboliten aus Gemischen mittels dreidimensionaler Kreuzkorrelation (3DCC); Gesamtnote: 1.5

10/2009 -12/2012

Universität Hamburg, Deutschland BSc: Biochemie, Enzymkinetik

Betreuung: Dr. Thomas Hackl und Prof. Bernd Meyer

Titel der Bachelorarbeit: Kinetische Analyse der Invertasereaktion mittels zweidimensionaler NMR-Spektroskopie; Gesamtnote: 1.9

08/2002-10/2009

Selbständige Tätigkeit im künstlerischen Bereich (Schauspiel, Comedy, Moderation, Konzeptionierung und Ausführung von Comedyshow)

08/1999-08/2002

Schauspielunterricht bei Angélique Duvier, Hamburg, Germany

07/1996-07/1999

Copernicus-Gymnasium, Norderstedt, Germany, Abitur, Gesamtnote: 3.2

Fort- und Weiterbildung

G-NMR School, Goethe-Universität Frankfurt, 2016

Praktikumsbetreuung

WS 2016-2018

SPIN – SPEktroskopische IdeNtifizierung, Universität Hamburg

WS 2015-2018

Modul CHE452 „Struktur-Funktions-Analyse biologischer Makromoleküle“

Externe Praktika

Forschungszentrum Borstel, Programmbereich Infektionen, FG Bioanalytische Chemie
Qualitative und quantitative Bestimmung von Phospholipiden der Plasmamembran von
E. coli mittels ^{31}P -NMR-Spektroskopie

Landeskriminalamt (LKA34) Hamburg, 2013

Erstellung eines FTIR-Bestimmungsschlüssels zur Faserspurenanalytik

Stipendien

2016

Reisestipendium für die Konferenz der Fachgruppe Magnetische Resonanzspektroskopie, Gesellschaft Deutscher Chemiker (GDCh)

Publikationen

SMART Metabolite ID: A novel strategy for the identification of unknown metabolites from complex extracts

Anke Bollen, Christian Czaschke, Simon Sander, Tobias Schneider, Bernd Meyer, Markus Fischer, Thomas Hackl (*in Vorbereitung*)

Poster

Identifizierung chemischer Marker zur Herkunftsbestimmung, Woran erkennen wir woher der Spargel kommt?

Regionalverbandstagung Nord der Lebensmittelchemischen Gesellschaft Hamburg 2017, Hamburg

Correlation of LC,MS- and NMR for the identification of (food-)metabolites

Euromar 2016, Aarhus, Dänemark

Novel strategy for the identification of (food-)metabolites by correlation of HPLC/MS- and NMR-Spectra

FGMR Discussion Meeting 2016, Düsseldorf, Deutschland

Novel strategy for the identification of (food-)metabolites by correlation of HPLC/MS- and NMR-Spectra

FGMR Discussion Meeting 2015, Darmstadt, Deutschland

Vorträge

Metabolomics- The identification of unknown metabolites by SMART Metabolite ID

Deutsch-Polnisch-Baltische Konferenz der Organischen Chemie, 2018 Hamburg, Deutschland

FTIR-Bestimmungsschlüssel zur Faserspurenanalytik

21. Kriminaltechnisches Symposium "Textile Spuren", 2013 Berlin, Germany

Zusätzliche Fähigkeiten

Software: Software zur NMR-Prozessierung (TopSpin), Software zur MS-Prozessierung (Data Analysis), Software zur Datenanalyse (Matlab, Origin, Excel), Microsoft und Libre/Open Office, Datenbanken (HMDB, PubMed, SciFinder, SDBS)

Management und Verwaltung: Planung, Umsetzung und Bewertung eigener Projekte, Ressourcenmanagement

Erklärung

„Hiermit versichere ich an Eides statt, die vorliegende Dissertation selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt zu haben. Die eingereichte schriftliche Fassung entspricht der auf dem elektronischen Speichermedium. Ich versichere, dass diese Dissertation nicht in einem früheren Promotionsverfahren eingereicht wurde.“

Datum, Unterschrift