



ALKALOIDIEN
MOLEKYYLIVERKOSTOANALYTIikka

Ilari Kuukkanen

Pro gradu

Toukokuu 2021

Luonnonyhdistekemia tutkimusryhmä

Kemian laitos

TURUN YLIOPISTO

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

KUUKKANEN ILARI: Alkaloidien molekyyliverkostoanalytiikka

Pro gradu, 57 s., 34 liites.

Kemia

Toukokuu 2021

Turun yliopiston laatujärjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

Alkaloidit ovat yleisesti kasvikunnassa esiintyviä, tyypeä sisältäviä erikoistuneita metaboliitteja, jotka tunnetaan korkeasta bioaktiivisuudestaan. Tästä syystä ne ovat potentiaalinen tutkimuskohde muun muassa lääkekehityksessä. Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografiaan (UHPLC) ja korkean resoluution massaspektrometriaan (HR-MS) pohjaavien analyysimenetelmien kehittyessä, näytematriisista havaittavien yhdisteiden määrä on noussut voimakkaasti, jopa tuhansiin yhdisteisiin näytettä kohden. Näin suurien datamäärien hallintaan on pitänyt kehittää tehokkaita *in silico* -työkaluja. Tandemmassaspektrometriaan (MS/MS) pohjaavasta molekyyliverkostoanalytiikasta on tullut yksi käytetyimmistä bioinformatiikan työkaluista, joka mahdollistaa tuhansien erilaisten yhdisteiden havaitsemisen, karakterisoinnin, kvantitoinnin ja kemiallisen diversiteetin visualisoinnin HR-MS–datasta.

Tässä tutkimuksessa kehitettiin tehokas, ei-kohdehakuiseen metabolomiikkaan soveltuva UHPLC-HR-MS/MS–analyysimenetelmä molekyyliverkostoanalytiikan vaatimukset huomioon ottaen. Tuotetun HR-MS–datan avulla optimoitiin *in silico* -menetelmin molekyyliverkosto, jota käytettiin apuna 62 Panamasta kerätyn kasvilajin sisältämien alkaloidien havaitsemisessa, karakterisoinnissa ja alkaloididiversiteetin määrittämisessä, yhdessä perinteisten analyysimenetelmien kanssa.

HR-MS–data saatiin onnistuneesti analysoitua molekyyliverkostoanalytiikan avulla ja kasvilajeista havaittiin tutkimuksessa yhteensä 133 eri alkaloidia, jotka kuuluivat todellisten alkaloidien pääryhmän indoli- ja isokinoliinialaluokkiin. Alkaloidit ryhmittäytyivät molekyyliverkostossa omiksi kokonaisuuksiksi, yhdisteiden MS-fragmentaation samankaltaisuuden perusteella. Molekyyliverkostoanalytiikka osoittautui tutkimuksessa erittäin potentiaalliseksi työkaluksi alkaloidien analysointiin.

Avainsanat: alkaloidi, massaspektrometria, metabolomiikka, molekyyliverkosto, nestekromatografia

Sisällysluettelo

Lyhenteet.....	iii
1 Johdanto.....	1
1.1 Työn tarkoitus	1
1.2 Alkaloidit	2
1.3 Analyttiset menetit.....	6
1.3.1 Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia (UHPLC)	6
1.3.2 Korkean resoluution massaspektrometria (HR-MS).....	7
1.4 Metabolomiikka	8
1.4.1 Ei-kohdehakuinen UHPLC-HR-MS–metabolomiikka	8
1.4.2 Molekyyliverkostoanalytiikka.....	8
1.4.3 LC-MS –datan <i>in silico</i> -käsittely	12
2 Materiaalit ja menetelmät	13
2.1 Käytetyt reagenssit ja liuottimet.....	13
2.2 Standardit	14
2.2.1 Sisäinen standardi.....	14
2.2.2 Ulkoinen standardi ja laadunvarmistusnäytteet	15
2.3 Kasvinäytteet.....	17
2.3.1 Kasvinäytteiden esikäsittely ja maserointi	18
2.3.2 Kasvinäytteiden uuttaminen.....	19
2.3.3 Näytteiden valmistaminen UHPLC-HR-MS/MS-analyyseihin	19
2.4 UHPLC-HR-MS/MS –analyysit	20
2.4.1 Laitteiston kuvaus	20
2.4.2 UHPLC-MS/MS-menetelmät.....	20
2.5 LC-MS–datan <i>in silico</i> -käsittely	22
2.5.1 ProteoWizard MSConvertGUI- ja MZmine-ohjelmistot	22
2.5.2 Compound Discoverer -ohjelmisto	24
2.6 Molekyyliverkostoanalytiikka.....	25
2.7 Yhdisteiden karakterisointi	25

3 Tulokset ja niiden tarkastelu	26
3.1 UHPLC-HR-MS/MS-analyysimenetelmän toimivuus.....	26
3.1.1 Kvantitointi	27
3.2 Molekyyliverkostoanalytiikka.....	29
3.3 Alkaloidien karakterisointi ja diversiteetti	32
3.3.1 Isokinoliinialkaloidit	37
3.3.2 Indoli alkaloidit	39
4 Johtopäätökset.....	42
Viiteluettelo.....	44
Liitteet	58

Lyhenteet

DAD	diode array detector diodirividetektor
LC	liquid chromatography nestekromatografia
DBE	double bond equivalent kaksoissidosekvivalentti
EIC	extracted-ion chromatogram eristetyn ionin kromatogrammi
ESI	electrospray ionization sähkösumutusionisaatio
FBMN	featured-based molecular networking piirrepohjainen molekyyliverkosto
FTICR	Fourier-transform ion cyclotron resonance Fourier-muunnosionisyklotroniresonanssi
GNPS	the global natural product social molecular networking maailmanlaajuinen ja yhteisöllinen luonnonyhdisteiden molekyyliverkosto
HCl	hydrogen chloride vetykloridi (suolahappo)
HR-MS	high-resolution mass spectrometry korkean resolution massaspektrometria

IS	internal standard sisäinen standardi
LC	liquid chromatography nestekromatografia
MS	mass spectrometry massaspektrometria
PTFE	polytetrafluoroethylene polytetrafluorieteeni (teflon)
QC	quality control laadunvarmistus
RP	reverse phase käänteisfaasi
TIC	total ion current kokonaisonivirta
TOF	time-of-flight lentoaika
U(H)PLC	ultra high performance liquid chromatography erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia
UV	ultraviolet ultravioletti

1 Johdanto

1.1 Työn tarkoitus

Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografiaan (UHPLC) ja korkean resoluution massaspektrometriaan (HR-MS) pohjaavasta molekyyliverkostoanalytiikasta on tullut yksi eniten kiinnostusta herättäneistä ei-kohdehakuisten metabolomiikan, tietokonepohjaiseen datan laskennalliseen käsittelyyn (*in silico*) pohjaavista työkaluista. Tämä verkostopohjainen datan analysointi mahdollistaa muun muassa tuntemattomien yhdisteiden ryhmittelyn, luoden korrelaation kemiallisten rakenteiden yhteneväisyydestä yhdisteiden välillä, vertaillen *in silico* UHPLC-HR-MS-analyysissä havaittujen tandemmassaspektrien (MS/MS) samankaltaisuutta.

Perinteisesti eri metaboliittien karakterisointi ja kvantitointi hyvin monimutkaisesta biologisesta näytematriisista on työläs ja paljon aikaa vievä prosessi. MS-analytiikan kehittyessä kerätyn datan määrä on kasvanut voimakkaasti tuhansiin metaboliitteihin näytettä kohti, joista perinteisillä menetelmillä karakterisoidaan ja kvantitoidaan parhaiten tunnetut päämetaboliitit tai esimerkiksi metaboliittiryhmälle ominaisen MS-fragmentaation omaavat yhdisteet, jolloin pienemmässä roolissa olevat, huonommin tunnetut, metaboliitit jäävät helposti huomiotta. Kuitenkin huonommin tunnetut metaboliitit ovat tunnettujen metaboliittien rinnalla osa suurempaa kokonaisuutta ja kemiallista diversiteettiä. Tehokkaita *in silico* -menetelmiä tarvitaan näiden voimakkaasti kasvavien datamäärien käsittelyyn ja analysointiin, jotta voidaan paremmin ymmärtää monimutkaisia, suuren kemiallisen diversiteetin omaavia biologisia kokonaisuuksia.

Tämän tutkimuksen tavoitteena oli kehittää alkaloidien molekyyliverkostoanalytiikkaan tehokas ja laadukas UHPLC-HR-MS/MS-analyysimenetelmä, joka kykenee tuottamaan riittävän korkealaatuista MS-dataa perinteiseen yhdisteiden karakterisointiin ja kvantitointiin, samalla turvaten fragmentoitujen metaboliittien MS/MS-spektrien riittävän määrän, laadukkaan molekyyliverkoston rakentamista varten. Lisäksi *in silico* -työkalujen parametrit pyrittiin optimoimaan mahdollisimman tehokkaiksi. Kolmantena päätavoitteena oli hyödyntää edellä kuvattua analyysimenetelmää, Panamasta, San Lorenzon luonnonpuistosta kerättyjen 294 kasvinäytteen analysointiin ja rekonstruoida *in silico* -menetelmiä käyttäen näytteistä havaittujen metaboliittien kemiallista monimuotoisuutta kuvaava molekyyliverkosto ja

käyttää tätä työkaluna perinteisten tunnistusmenetelmien tukena alkaloideihin kuuluvien erikoistuneiden metaboliittien karakterisointiin ja alkaloididiversiteetin tarkasteluun.

1.2 Alkaloidit

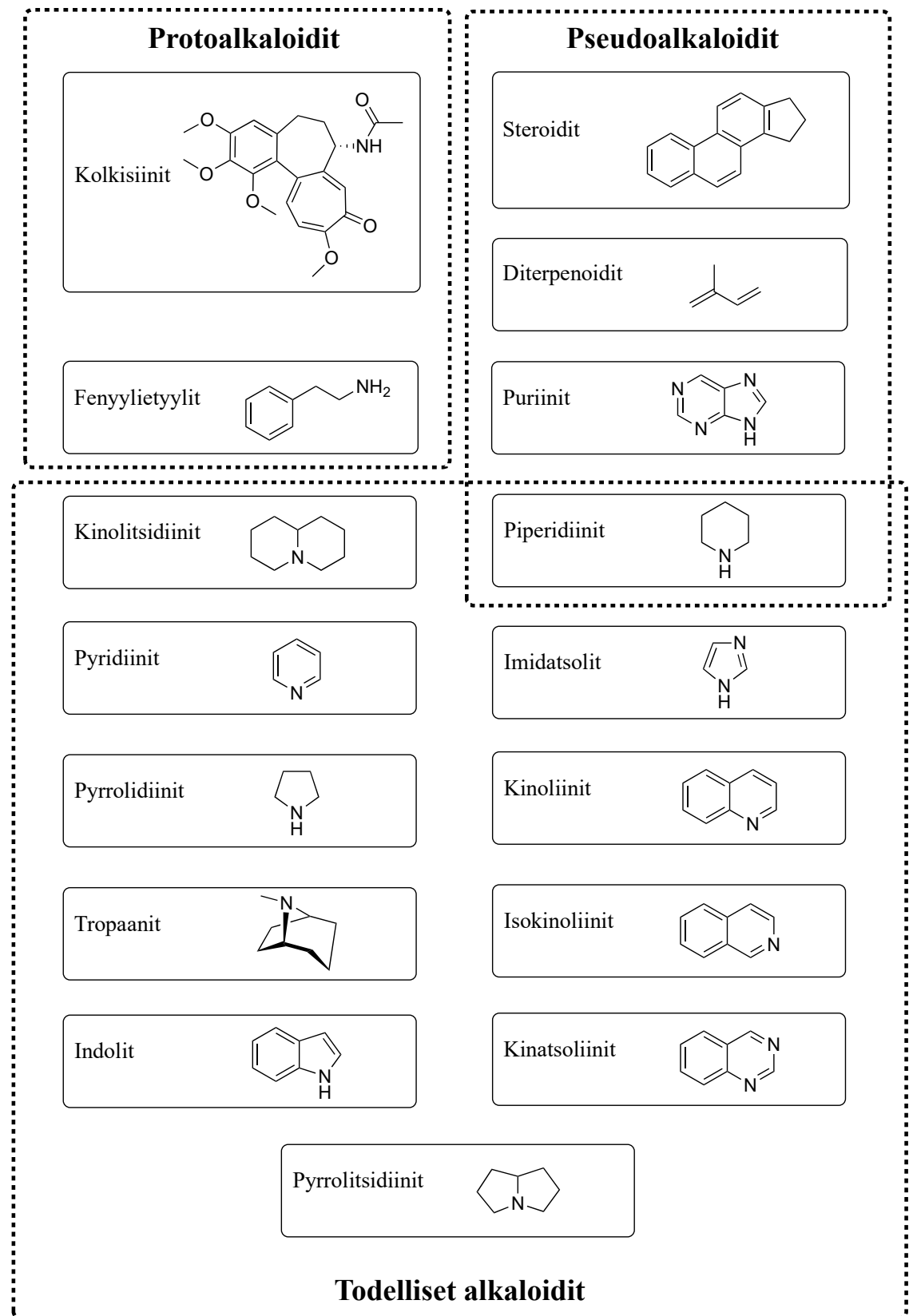
Klassisen määritelmän mukaan alkaloidit ovat pääasiassa kasveissa esiintyviä bioaktiivisia erikoistuneita metaboliitteja, jotka ovat yleensä emäksisiä aminohappojohdannaisia.¹ Alkaloideihin ei kuitenkaan lueta kuuluviksi peptidejä, yksinkertaisia amiineja, nukleotidejä, nukleinihappoja, aminohappoja, proteiineja eikä antibiootteja.²⁻⁴ Rakenteellisesti alkaloidit sisältävät aina yhden tai useamman yleensä heterosyklisen typpiatomin ja esiintyvät yleensä negatiivisilla hapetusluvuilla.^{1,5} Osa alkaloideihin luokiteltavista yhdisteistä on lisäksi optisesti aktiivisia.⁶ Alkaloideja esiintyy kasvikunnan lisäksi eläinkunnassa, mukaan lukien ihmisissä, sienissä, hyönteisissä ja erilaisissa mikrobeissa.^{2,3,7} Alkaloidien roolista kasvien toiminnassa tiedetään toistaiseksi suhteellisen vähän, mutta ne vaikuttaisivat olevan osa kasvien omaa puolustusstrategiaa herbivoreja vastaan.^{8,9}

Alkaloidit eivät yleensä esiinny vapaassa emäsmuodossa vaan orgaanisten ja myös epäorgaanisten happojen suoloina ja lisäksi yhdessä esimerkiksi sokereiden kanssa glukookalkaloideina.¹⁰⁻¹⁴ Fysikaalisilta ja kemiallisilta ominaisuuksiltaan alkaloidit ovat yleensä kiteisiä, hajuttomia, värittömiä ja korkean kiehumispisteen omaavia yhdisteitä sekä maultaan kitkeriä.¹ Kuitenkin alkaloidit, joilla ei ole rakenteessaan happiatomeita, omaavat tyypillisesti matalan molekyyli­massan, esiintyvät yleensä värittöminä ja helposti haihtuvina nesteinä.¹ Vapaina emäksinä esiintyvät alkaloidit ovat yleensä hyvin niukkaliukoisia veteen, mutta liukenevat hyvin orgaanisiin poolittomiin liuottimiin, kuten kloroformiin. Suoloina esiintyvät alkaloidit liukenevat taas hyvin veteen ja alkoholeihin, mutta ovat vastaavasti niukkaliukoisia orgaanisiin liuottimiin.¹

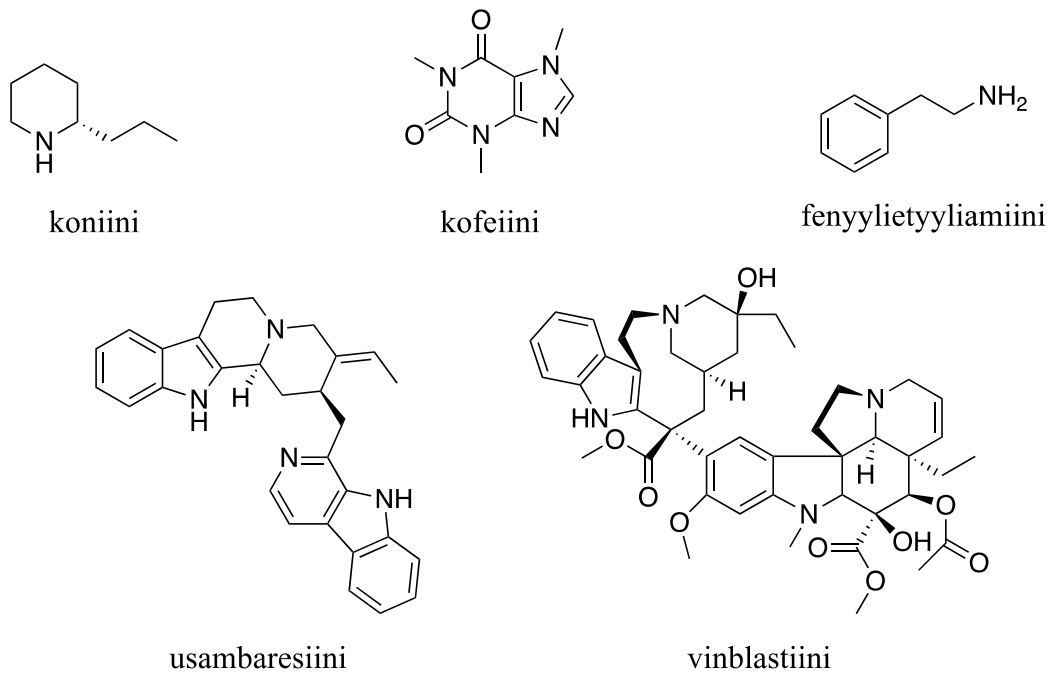
Alkaloideille ei ole olemassa yhtenäistä luokittelutapaa ja täten on aiheellista mainita, että aina ei voida tarkasti määrittää mihin alkaloidien pääryhmään yhdiste kuuluu luokittelun puutteellisuudesta ja ristiriitaisuudesta johtuen.¹⁵ Näin voi syntyä paikoin harmaita alueita, jossa rajanveto alkaloidien pää- ja alaryhmien, sekä muiden tyypipitoisten erikoistuneiden metaboliittien välillä voi sumentua.¹⁵ Rakenteensa perusteella alkaloidit voidaan kuitenkin ryhmitellä karkeasti kolmeen eri pääryhmään: todellisiin alkaloideihin, protoalkaloideihin ja pseudoalkaloideihin. Näistä todelliset alkaloidit ja protoalkaloidit ovat suoria aminohappojohdannaisia, kun taas

pseudoalkaloidit eivät ole. Aminohappojen pre- ja postkursorit voivat kuitenkin olla pseudoalkaloidien biosynteesipolun varhaisempia tasoja, mutta ne voivat muodostua myös pre- ja postkursoreihin liittyvien aminaatio- ja transaminaatioreaktioiden seurauksena.¹⁶ Pseudoalkaloidit voivat lisäksi muodostua kokonaan ilman aminohappoihin linkittyvää pre- tai postkursoria, jolloin yksi tai useampi typpi atomi on liittynyt osaksi muodostuvan pseudoalkaloidin rakennetta suhteellisen myöhäisessä vaiheessa.² Rakenteellisesti todelliset alkaloidit sisältävät aina heterosyklissä tyypä, pseudoalkaloideilla tämä on mahdollista ja protoalkaloideilla typpi ei ole osa alkaloidin heterosyklistä rengasrakennetta.^{1,2,4} Alkaloidien pääryhmät ja niihin kuuluvia yleisimpiä alaluokkia on esitetty kuvassa 1.

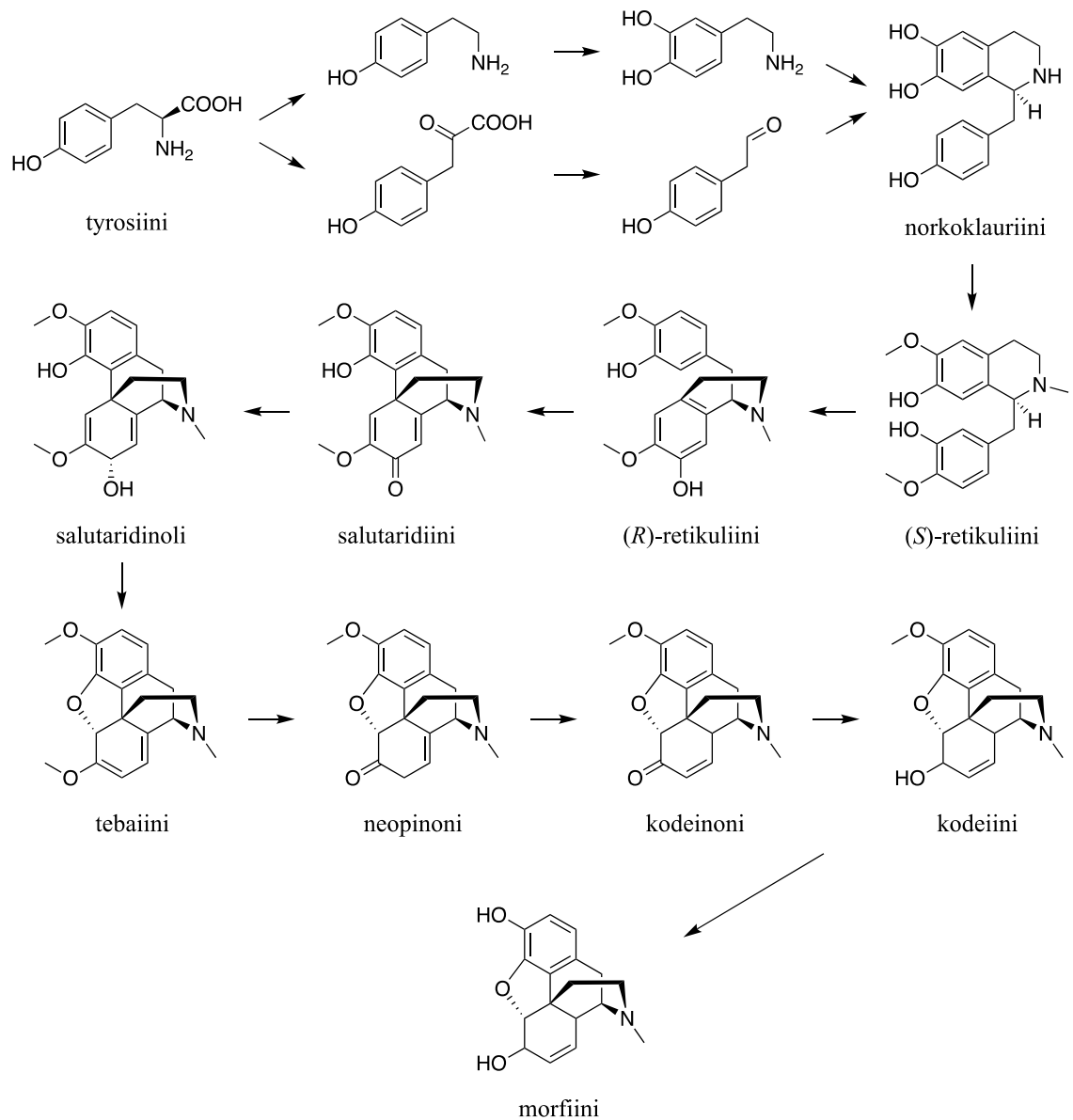
Merkittävän bioaktiivisuutensa ja monimuotoisuutensa vuoksi alkaloidit ovat olleet suuri mielenkiinnon kohde läpi ihmiskunnan historian. Esimerkiksi filosofi Sokrates myrkytettiin myrkkycatkosta (*Conium maculatum*) valmistetulla juomalla vuoden 399 eaa tienoilla. Myrkkymalja sisälsi kasvilajille tyypillistä, tappavan myrkyllistä, kuvassa 2 esitettyä piperidiini alkaloidi koniinia.¹⁷ Laajasti kipulääkkeenä tänäkin päivänä käytetty opiootti, bentsyyli-isokinoliineihin kuuluva, morfiini oli vuonna 1805 ensimmäisen dokumentoidusti eristetty alkaloidi, jonka apteekkarin apulainen Friedrich Sertürner, eristi unikkokasveihin (*Papaveraceae*) kuuluvan *Papaver somniferum* siemenistä.¹⁸ Morfiinin muodostumisen biosynteesipolun tärkeimmät välivaiheet on kuvattu alla kuvaajassa 1.¹⁹ Myöhemmin kasveista eristettyjä alkaloideja on valjastettu kohdennetuiksi lääkkeiksi, esimerkiksi indoli alkaloideihin kuuluvat usambarensiini ja vinblastiini (kuva 2). Usambarensiinin on todettu tehoavan leukemiaa ja malariaa vastaan, kun taas vinblastiini on tunnettu solusalpaaja.^{20,21} Stimulantteihin kuuluvat, biogeeninen monoamiini alkaloidi fenylylietyyliamiini ja ksantiini johdannainen kofeiini ovat esimerkkejä arkipäiväisessä käytössä olevista alkaloideista (kuva 2).^{22,23}



Kuva 1. Alkaloidien pääluokat ja niihin kuuluvia yleisimpiä alaluokkia. Alaluokkien perusrakenteet on lisäksi esitetty kuvassa ja pääluokkiin kuuluvat alaluokat on rajattu.



Kuva 2. Piperidiinialkaloideihin kuuluvan koniinin, ksantaanijohdannaisiin kuuluvan kofeiinin, indolialkaloideihin kuuluvien usambaresiinin ja vinblastiinin sekä monoamiinialkaloideihin kuuluvan fenyylietiyyliamiinin kemialliset rakenteet. Koniini, usambaresiini ja vinblastiini kuuluvat todellisten alkaloidien pääryhmään, kofeiini pseudoalkaloidien pääryhmään ja fenyylietiyyliamiini protoalkaloidien pääryhmään.^{17,20–23}



Kuvaaja 1. Todellisten alkaloidien bentsyyli-isokinoliineihin kuuluvan morfiinin muodostuminen unikkokasveihin (*Papaveraceae*) kuuluvassa *P. somniferumissa*, kahdesta tyrosiinimolekyylistä. Kuvaajassa on esitetty yksinkertaistetusti morfiinin biosynteesipolun merkittävimmät päävaiheiden välituotteet.¹⁹

1.3 Analyttiset menetit

1.3.1 Erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia (UHPLC)

Nestekromatografia (LC) on analyttisen kemian erotustekniikka, jonka perustuu liuosmuodossa olevan analysoitavan näytteen sisältämien komponenttien erottamiseen toisistaan kolonnissa, jossa ne ovat aktiivisessa vuorovaikutuksessa liikkuvan mobiilifaasin ja paikallaan pysyvän stationaarifaasin kanssa. Kolonnin jälkeen komponentit ohjataan detektorille, jossa ne havaitaan retentioajan mukaisessa

järjestyksessä. Metabolomiikassa käytetyimpiä LC:n muotoja on käänteisfaasinestekromatografia (RP-LC), jossa eluentista koostuva mobiilifaasi on poolinen ja kiinteä stationaarifaasi pooliton.^{24,25} RP-LC mahdollistaa hyvin monimutkaisen näytematriisin poolisten ja poolittomien komponenttien erottumisen.²⁶ Kolonnimateriaalina stationaarifaasissa käytetään tyypillisesti silikapartikkeleja, joihin on liitetty kolonnityypistä riippuen funktionaalisia ryhmiä esimerkiksi erimittaisia hiiliketjuja tai fenyylirengasrakenteita.^{27–29} Näytteen poolittomat komponentit sitoutuvat samankaltaisen poolisuutensa ohjaamina stationaarifaasin funktionaaliin sivuketjuihin tehokkaammin kuin pooliset komponentit. Näin ollen pooliset komponentit eluotuvat kolonnista nopeammin detektorille ja poolittomat myöhemmin. Komponenttien elutio voidaan toteuttaa käyttäen gradientteluutiota ja isokraattistaa eluutiota näytematriisista riippuen.³⁰

UHPLC mahdollistaa näytekomponenttien paremman erottumisen toisistaan normaalia korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC) tehokkaammin, hyödyntäen korkeampaa painetta (maksimipaine ~1200 bar) ja pienemmän partikkelikoon (< 2 µm) omaavaa kolonnimateriaalia.^{31,32} Tehokkaamman erotuskyvynsä vuoksi UHPLC soveltuu hyvin monimutkaisten biologisten näytematriisien analysointiin yhdessä gradientteluution kanssa.^{30,31}

1.3.2 Korkean resoluution massaspektrometria (HR-MS)

Massaspektrometria (MS) on analyttisen kemian tekniikkamuoto, joka pyrkii erottamaan näytematriisista analysoitavat ionit niiden massa-varaussuhteen (m/z) perusteella. HR-MS–instrumentilla analysoidun molekyylin MS-datan massatarkkuus on lähellä molekyylin teoreettista tarkkaa massaa. Tällaisia laitteistosta ovat esimerkiksi lentoaika- (TOF), Fourier-muunnosionisyklotroniresonanssi- (FTICR) ja Orbitrap-instrumentit.³³

Lähellä teoreettista massaa oleva mitattu tarkka massa mahdollistaa tuntemattomien molekyylien molekyylikaavan arvioinnin suoraan MS-datasta. HR-MS–instrumenteilla kyetään lisäksi erottamaan analysoitujen molekyylien isotooppijakaumat mitatusta massaspektristä. Tämä ei kuitenkaan yleensä yksin riitä tuntemattomien molekyylin karakterisointiin. Integroimalla HR-MS–instrumentti esimerkiksi kolmoiskvadrupoliin, pystytään kasvattamaan laitteiston selektiivisyyttä ja

mahdollistaa suuremman rakenteellisen informaation saavuttamisen tuotettujen MS/MS-spektrien avulla.³⁴

1.4 Metabolomiikka

1.4.1 Ei-kohdehakuinen UHPLC-HR-MS–metabolomiikka

Metabolomiikka on hyvin laaja-alainen omiikkatyyppejä, joka pyrkii monimutkaisten biologista alkuperää olevien näytematriisien sisältämien pienen molekyylipainon (< 800 - 1000 Da) omaavien metaboliittien analysointiin.^{35,36} Sen tarkoituksena on metaboliittien karakterisoinnin ohella pyrkiä selvittämään ja ymmärtämään tutkittavaa monimutkaista biologista prosessia. Ei-kohdehakuksessa metabolomiikassa ei ole tarkoitus havainnoida vain ennalta tiedossa olevia metaboliitteja, vaan halutaan tutkia koko näytematriisin sisältämää metaboliittikirjoa.

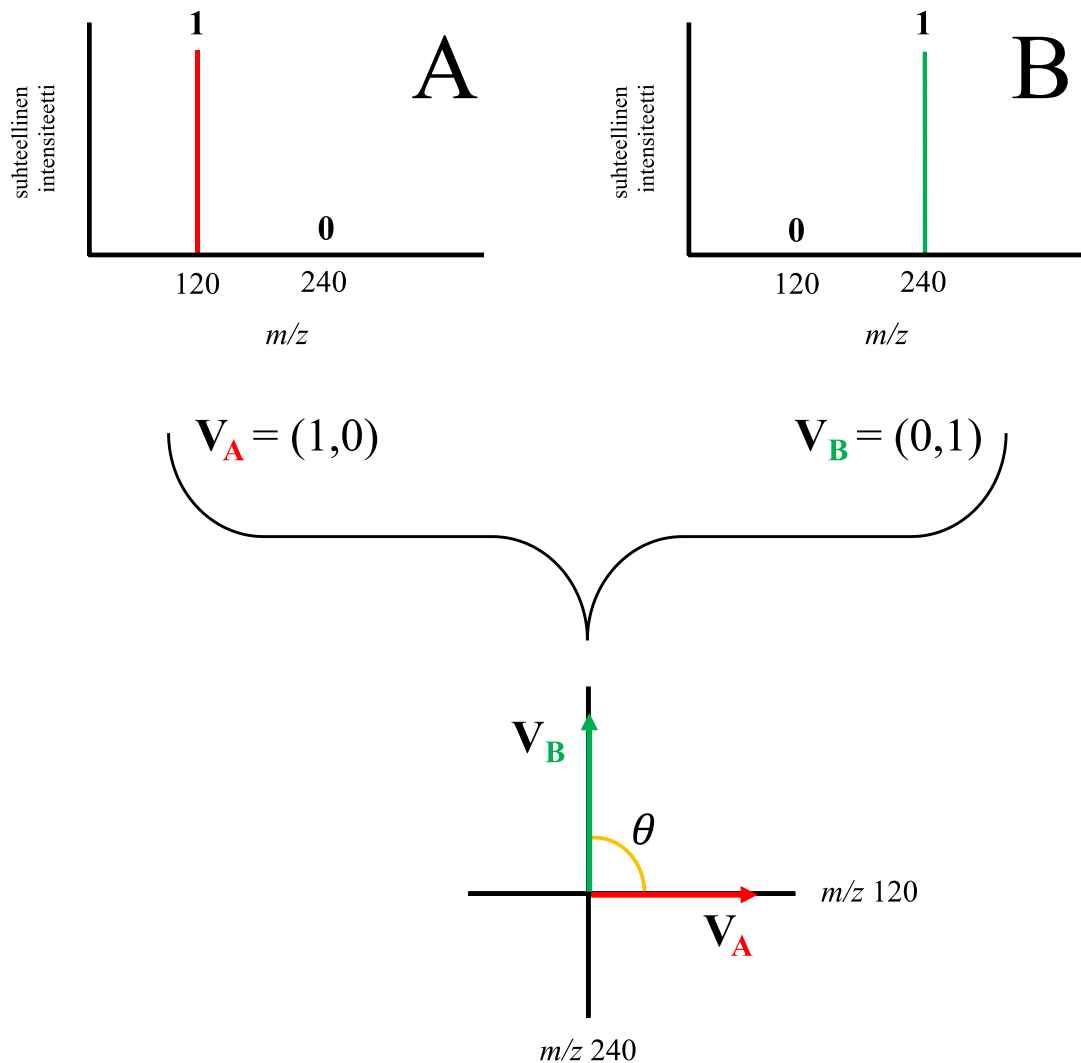
Metabolomiikassa HR-MS–instrumenttien korkea selektiivisyys ja matala detektoraja integroituna UHPLC:hen, parantaa isomeerien erottumista kromatografisesti ja vähentää matriisiefektistä aiheutuvaa häiriötä analyysin aikana.³⁷ Integroituna yhteen instrumentit muodostavat tehokkaan ja herkän työkalun, jolla voidaan analysoida laajasti tuhansia metaboliitteja, käyttäen tähän kuitenkin suhteellisen vähän analyysiaikaa.³⁸

1.4.2 Molekyyliverkostoanalytiikka

Ei-kohdehakuksen MS-datan analysointiin ja visualisointiin kehitetty bioinformatiikkatyökalu, molekyyliverkostoanalytiikka, esiteltiin ensimmäisen kerran vuonna 2012.^{39,40} Molekyyliverkostot pyrkivät rekonstruoimaan analysoitujen näytteiden kemiallista diversiteettiä ja yhdisteiden välistä rakenteellista samankaltaisuutta analysoiduissa näytematriiseissa. Nykyisin käytössä olevat MS-instrumentit kykenevät tuottamaan yhdestä analysoitavasta näytteestä jopa tuhansia MS/MS-spektrejä. Molekyyliverkostojen idea piilee yksinkertaisuudessaan juuri näiden yhdisteille uniikkien MS/MS-spektrien ”sormenjälkien” samankaltaisuuden laskennallisessa arvioinnissa, eikä vain MS/MS-spektrikirjastoista löytyneiden MS/MS-spektrivastineiden vertailussa.⁴¹

Rakenteeltaan samankaltaisten yhdisteet tuottavat fragmentoitua myös tyypillisesti samankaltaisia fragmentteja, kun MS/MS-olosuhteet pidetään vakiona. Näin ollen myös samankaltaisten yhdisteiden MS/MS-spektrit ovat lähellä toisiaan. Molekyyliverkostot kokoavat tämän yhdisteiden fragmentaatiosta saadun datan *in silico*,

muuttaen sen vektorimuotoon rakenteellisen samankaltaisuuden vertailua varten.^{39,42} Vektorimuotoon muutettuna avaruuskoordinaatiston akselit vastaavat yhdisteen fragmenttien m/z -arvoja ja niiden intensiteetit vektorikoordinaatteja. Yksinkertaistettu esimerkki massaspektrien vektorimuunnoksesta on esitetty kuvassa 3.



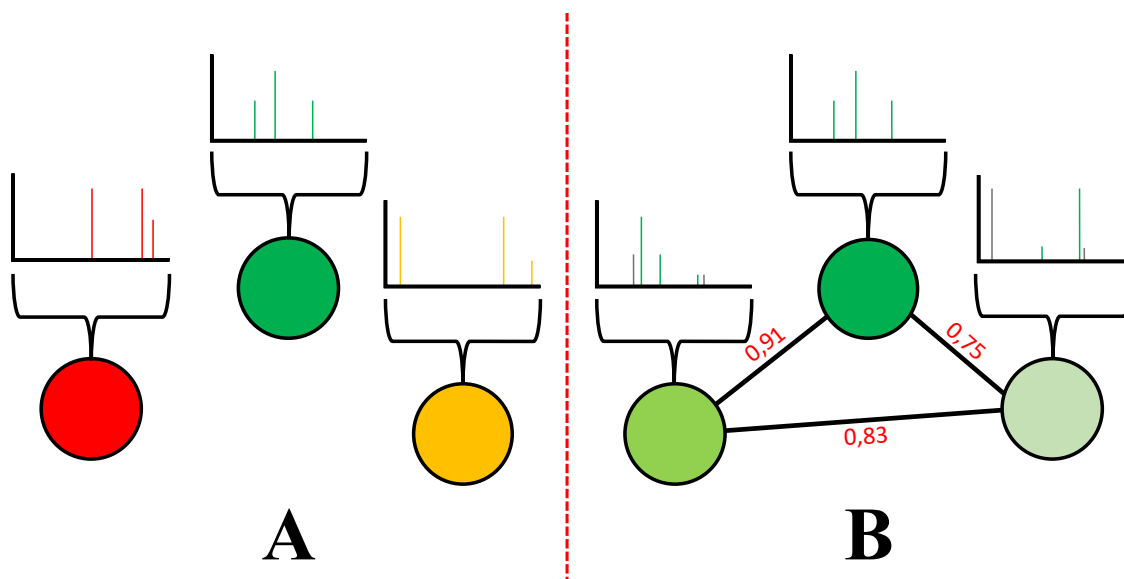
Kuva 3. Esimerkki kahden massaspektrin A ja B vektorimuunnoksesta. Fragmentit m/z 120 ja 240 edustavat vektorien koordinaattiakseleita ja niiden suhteellisten intensiteettien koordinaatit vektoreita \mathbf{V}_A ja \mathbf{V}_B . Vektoreiden väliin jää kulma θ , jota voidaan käyttää vektoreiden \mathbf{V}_A ja \mathbf{V}_B samankaltaisuuden vertailuun.

Korrelaatio samankaltaisten yhdisteiden välille muodostetaan laskennallisesti vektoreiden pistetulon (kaava 1) avulla, josta käytetään myös molekyyliverkostoanalytiikassa nimitystä kosini-pistearvo.⁴² Se voi saada arvoja 0 ja 1 väliltä.^{39,42} Arvolla 0, vertailtavilla MS/MS-spektreillä ei ole samankaltaisuutta, joten

kyseessä on kaksi rakenteellisesti täysin eri yhdistettä, jotka eivät linkity toisiinsa molekyyliverkostossa. Vastaavasti lähestyttäessä kosini-pistearvoa 1, verrattavien MS/MS-spektrien vektorimuunnosten samankaltaisuusindeksi nousee, korrelaatio yhdisteiden välille syntyy ja ne klusteroituvat verkostossa omaksi molekyyliperheekseen. Kosini-pistearvon ollessa 1, yhdisteet ovat identtiset MS/MS-spektrien näkökulmasta. Molekyyliverkostossa kosini-pistearvolla verrataan jokaista MS/MS-spektriä keskenään ja määritetyn raja-arvon ylittävät MS/MS-spektrit yhdistyvät visuaalisesti toisiinsa. Jokaista MS/MS-keskiarvospektriä verkostossa edustaa noodi, joiden välillä linkitykset visualisoidaan. Kuvassa 4 on esitetty yksinkertainen mallinnus molekyyliverkoston toiminnasta.

$$\cos\theta = \frac{\sum_1^n a_i b_i}{\sqrt{\sum_1^n a_i^2} \times \sqrt{\sum_1^n b_i^2}}$$

Kaava 1. Vektorimuodossa olevien MS/MS-spektrien välisen kulman θ avulla laskettava pistetulo eli kosini-pistearvo. Muuttujat a ja b edustavat kaavassa vektorkoordinaatteja.⁴²



Kuva 4. Yksinkertaistettu mallinnus molekyyliverkoston toiminnasta. Verkosto **A**:n noodit (MS/MS-keskiarvospektrit) eivät sisällä samankaltaisia MS/MS-fragmentteja, jolloin ne eivät korreloi keskenään ja noodien välistä linkitystä ei muodostu verkostossa. Verkoston **B** noodien MS/MS-spektrien välillä havaitaan keskinäistä samankaltaisuutta, jolloin niiden kosini-pistearvot ylittävät verkostolle asetetun raja-arvon ja ne linkittyvät omaksi molekyyliperheekseen.

Vuonna 2013 julkaistu maailmanlaajuinen ja yhteisöllinen luonnonyhdisteiden molekyyliverkosto, Global Natural Products Social Molecular Networking (GNPS), on Kalifornian San Diegon yliopiston ylläpitämä, kaikkien saatavilla oleva (open-access) verkkopohjainen analyysialusta (<https://gnps.ucsd.edu>) eri MS-instrumenteilla tuotetun MS/MS-datan käsittelyyn, jakamiseen ja molekyyliverkostoanalytiikkaan.^{43,44} GNPS mahdollistaa suurien MS/MS-datakokonaisuuksien analysoimisen ja tulosten vertaamisen muihin yleisesti saatavilla oleviin MS/MS-spektrikirjastoihin yhdisteiden karakterisointia varten.⁴⁴⁻⁵¹

Feature-Based Molecular Networking (FBMN) eli piirrepohjainen molekyyliverkostoanalytiikka on päivitetty versio ensimmäisestä GNPS:n perinteisestä molekyyliverkostoanalytiikkatyökalusta, joka perustui yksin niin sanottuun MS-klusterialgoritmiin (MS-Cluster algorithm).^{52,53} FBMN yhdistää perinteiseen verkostomalliin MS-datan ominaisuudet, jolloin FBMN-analytiikan avulla luodut verkostot visualisoivat, tunnistavat ja erottavat myös yhdisteiden eri isomeerit toisistaan retentioajan perusteella. Tämä oli perinteisen molekyyliverkostoanalytiikan suurimpia haasteita, sillä sama lähtöioni saatettiin fragmentoida useasti analyysin aikana, jolloin luotu molekyyliverkosto visualisoi myös saman yhdisteen monikerrat verkostossa.⁵⁴⁻⁵⁷ Molekyyliverkoston yksinkertaistaminen ylimääräisistä saman yhdisteen monikerroista

tekee verkostosta todenmukaisemman ja tehostaa uusien yhdisteiden havainnointia ja karakterisointia. FBMN mahdollistaa myös ioniliikkuvuuspektrometrian käytön molekyyliverkostoanalytiikassa.⁵²

Käyttäen hyödyksi UPHLC-HR-MS/MS–datan ominaisuuksia, kuten piikkien pinta-aloja tai intensiteettiä, FBMN-analytiikka kykenee määrittämään tarkemmin yhdisteiden suhteellista ioni-intensiteettiä näytteissä, mahdollistaen näin yhdisteiden paremman kvantitoinnin.⁵⁸ Perinteinen malli käyttää taas hyväkseen MS/MS-spektrien lukumäärää tai lähtöioninen lukumäärän summaa suhteellisen ioni-intensiteetin arvioinnissa. FBMN-analytiikka pystyy näin lisäämään myös semikvantitatiivisen informaation, yhdessä lähtöioninen isotooppijakaumien kanssa retentioaikatietoon ja MS/MS-dataan.

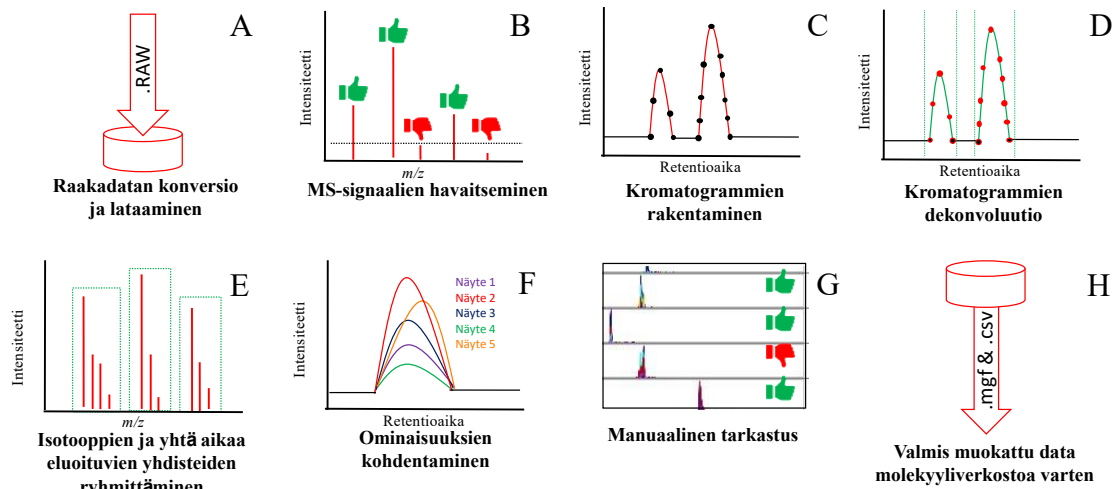
1.4.3 LC-MS–datan *in silico* -käsittely

Ennen varsinaista molekyyliverkostoanalytiikkaa, FBMN vaati toimiakseen perinteisestä molekyyliverkostoanalytiikasta poiketen, *in silico* -käsiteltyä LC-MS–dataa. Datan sisältämät LC-MS–ominaisuudet täytyy havaita ja kohdentaa oikeisiin lähtöioneihin ennen lopullista analyysiä GNPS:n analyysialustalla. Tätä ennen UHPLC-HR-MS/MS–analyysissä tallennettu, LC-MS–laitteistokohtainen raakadata, täytyy konvertoida vaadittavaan mzML- tai mzXML-tiedostomuotoon.

Konvertoitujen tiedostojen *in silico* -käsittelyn pääkohdat koostuvat yleensä MS- ja MS/MS-signaalien havaitsemisesta, kromatogrammien rakentamisesta ja dekonvoluutiosta, isotooppien ja samanaikaisesti eluoituvien yhdisteiden ryhmittelystä, kromatogrammien ominaisuuksien kohdentamisesta näytteiden välillä ja tarvittaessa manuaalisesta tarkastelusta ennen varsinaista FBMN-analytiikkaa (kuva 5). Datan käsittelyssä tulee huolehtia tutkittavien näytteiden hyvästä tuntemuksesta, jotta voidaan varmistua käytettyjen parametrien soveltuvuudesta näytteille. Tämä on syytä huomioida eritoten ennestään tuntemattomien näytteiden tapauksessa ja arvioida asetettujen parametrein toimivuus.

Viimeisen manuaalisen tarkistuksen jälkeen käsitellystä LC-MS–datasta luodaan kaksi tiedostoa, LC-MS–ominaisuuksien kvantitointitiedosto (csv-formaatti) ja MS/MS-spektrien yhteenvetotiedosto (mgf-formaatti). Kvantitointitiedosto sisältää aina jokaisen lähtöionin retentioajan, m/z -arvot, intensiteetin ja yksilöllisen tunnistenumeron. MS/MS-spektritiedosto sisältää kaikkien MS/MS-spektrien lisäksi skannausnumeron ja

kvantitointitiedostoa vastaavan yksilöllisen tunnistenumeron. Yksilöivien tunniste- ja skannausnumeroiden avulla FBMN-analytiikka kykenee yhdistämään jokaiseen MS/MS-spektriin sille kuuluvat LC-MS-ominaisuudet. Lisäksi on mahdollista rakentaa vielä näytekohtaista informaatiota sisältävä metadatatiedosto (txt-formaatti) verkostoon.



Kuva 5. LC-MS–datankäsittelyn yleisimmät päävaiheet ennen lopullista FBMN-analytiikkaa: **A)** raakadatan konversio ja lataaminen, **B)** MS-signaalin havaitseminen, **C)** kromatogrammien rakentaminen, **D)** kromatogrammien dekonvoluutio, **E)** isotooppien ja yhtä aikaa eluutuvien yhdisteiden ryhmittely, **F)** ominaisuuksien kohdentaminen näytteiden välillä, **G)** prosessoidun datan manuaalinen tarkastelu ja **H)** lataus lopullista GNPS:n FBMN-analytiikkaa varten. Kuva on mukailtu Daniel Petrasin kuvaamasta LC-MS–datan käsittelystä MZmine-ohjelmalla.⁵⁹

Lopullisten MS/MS-, kvantitointi- ja metadatatiedostojen lataamisen jälkeen on vielä asetettava tarvittavat parametrit FBMN-analytiikan toteuttamiseen GNPS:n analyysisivustolla. Parametrit koostuvat muun muassa kosini-pisteraja-arvosta ja verkostoparin vastaavien fragmenttien lukumäärästä, käytetystä MS-instrumentista riippuvista lähtö- ja fragmentti-ionien massatoleransseista. Laadukkaita molekyyliverkostoja saadaan aikaan testatulla LC-MS–datan käsittelyllä ja soveltuvilla parametreilla.

2 Materiaalit ja menetelmät

2.1 Käytetyt reagenssit ja liuottimet

Sisäisenä standardina käytetyn deuteroidun d5-DL-fenyylialaniinin valmistaja oli Cambridge Isotope Laboratories Inc. (Andover, MA, Yhdysvallat). Kasvinäytteiden

uuttamiseen käytetyn analyysilaatuisen asetonin valmistaja oli VWR International S.A.S. (Fontenay-sous-Bois, Ranska). Hapotetun veden valmistukseen käytettiin LC-MS-laatuista Normatom[®] 34-37% suolahappoliuosta (HCl), jonka valmistaja oli VWR International bvba (Leuven, Belgia). UHPLC-HR-MS/MS-analyyseissä käytetyn Etax Aa (99,5 %) -etanolin valmistaja oli Altia Oyj (Rajamäki, Suomi). Eluenteina käytettyjen LC-MS-laatuisen asetonitriilin (ACN) ja muurahaishapon valmistaja oli Sigma-Aldrich (Steinheim am Albuch, Saksa). Kaikki uuttoihin ja analyyseihin käytetty vesi oli puhdistettu Merck KGaA:n Millipore Synergy -vedenpuhdistuslaitteistolla (Darmstadt, Saksa).

Näytteiden liuotuksessa käytetyn 3 mM:sen HCl (aq.) -liuoksen valmistus aloitettiin mittaamalla noin 500 ml:a ultrapuhdasta vettä 1000 ml:n mittapulloon, johon pipetoitiin varovasti 1 ml:n lasisella täyspipetillä 0,27 ml:a Normatom[®] 34-37% HCl-liuosta. Liuosta pidettiin hetki magneettisekoituksessa, magneettirae poistettiin ja mittapullo täytettiin merkkiin ultrapuhdalla vedellä. Magneettisekoitusta jatkettiin yön yli ja liuoksen pH tarkistettiin seuraavana päivänä elektronisella ja kalibroidulla Ω Metrohm 744 pH-mittarilla (Methrom Ltd., Herisau, Sveitsi). Liuoksen pH:n tuli olla noin 2.52. Liuos säilytettiin 1000 ml:n borosilikaattipullossa valolta suojattuna huoneenlämmössä.

Uutoissa käytetty asetoni/vesi (80/20, v/v) -uuttoliuotin valmistettiin suoraan automaattiannostelijalla varustettuun 1000 ml:n borosilikaattipulloon, mittaamalla mittalasitarkkuudella 800 ml:a analyysilaatuista asetonia ja 200 ml:a ultrapuhdasta vettä. Liuosta ravistettiin voimakkaasti ja sen annettiin tekeytyä yön yli.

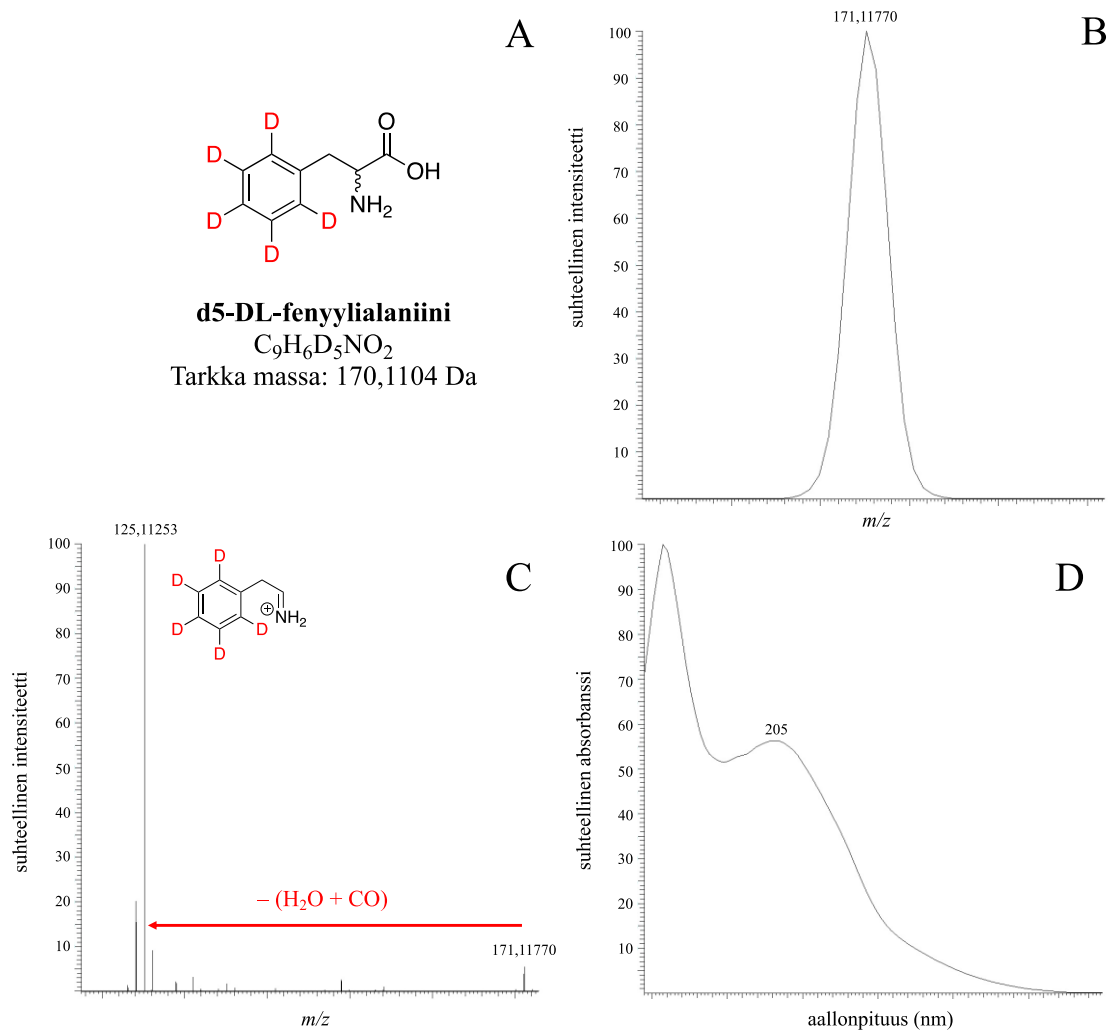
Näytteiden laimentamiseen käytetty 8% asetonitriili 3 mM:ssa HCl (aq.) -liuos valmistettiin 3 mM:seen HCl (aq.) -liuokseen mittaamalla 1000 ml:n mittapulloon 920 ml:a 3 mM:sta HCl (aq.) -liuosta ja 80 ml:a analyysilaatuista asetonitriiliä. Liuosta ravistettiin voimakkaasti ja sen annettiin tekeytyä yön yli. Liuos säilytettiin borosilikaattipullossa huoneenlämmössä valolta suojattuna.

2.2 Standardit

2.2.1 Sisäinen standardi

Sisäisenä standardin (IS) kantaliuoksen valmistus aloitettiin punnitsemalla 10,02 mg:a d5-DL-fenyylialaniinia (kuva 6) analyysivaa'alla. Punnittu d5-DL-fenyylialaniini huuhdeltiin kvantitatiivisesti ultrapuhdalla vedellä 100 ml:n mittapulloon, johon lisättiin

noin 80 ml:a ultrapuhdasta vettä ja liuosta magneettisekoitettiin yön yli. Seuraavana päivänä magneettirae poistettiin ja mittapullo täytettiin merkkiin. Magneettisekoitusta jatkettiin vielä 2 h ajan. Valmistetun IS-kantaliuoksen vahvuus oli 100,2 µg/ml:ssa. Kantaliuos säilytettiin 100 ml:n borosilikaattipullossa jääkaapissa valolta suojattuna.

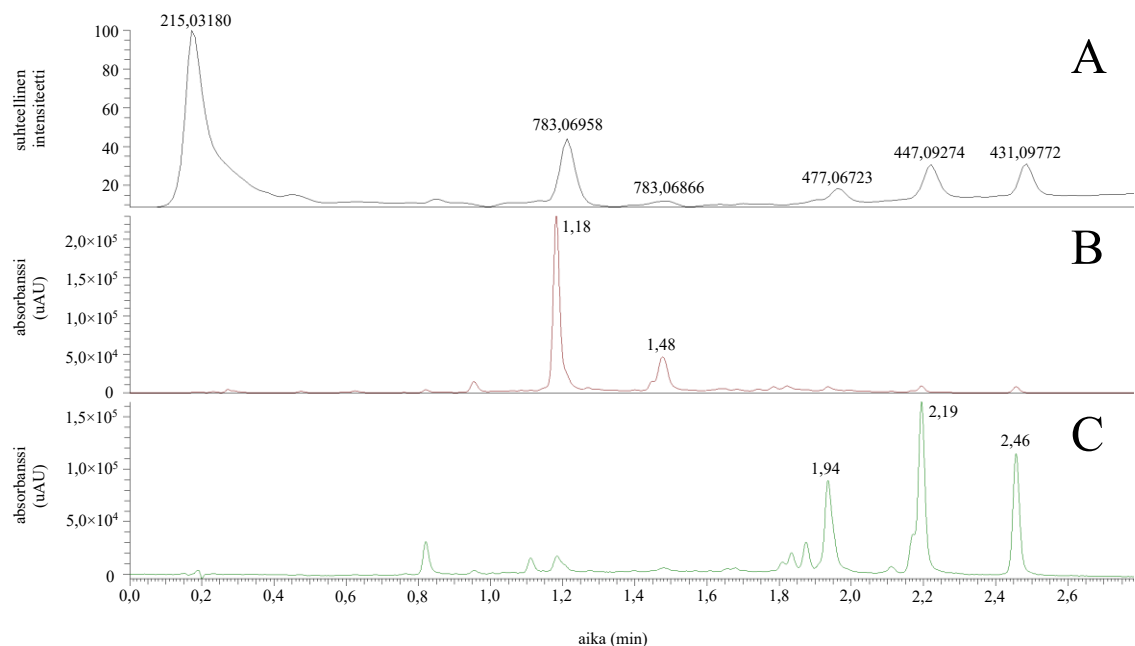


Kuva 6. D5-DL-fenyylialaniini kemiallinen rakenne **A** (jossa bentseenirenkaan vetyatomit on korvattu deuteriumilla), eristetyn ionin kromatogrammi (EIC) **B**, MS/MS-spektri **C** ja UV-spektri **D**.

2.2.2 Ulkoinen standardi ja laadunvarmistusnäytteet

Ulkaisen standardin kantaliuoksen pohjana käytettiin maitohorsman (*Chamaenerion angustifolium*) kylmäkuivattua raakauutetta (kuva 7). Analyysivaa'alla punnittiin 100,0 mg:a raakauutetta punnitusruuhessa, josta se huuhdeltiin kvantitatiivisesti 100 ml:n mittapulloon. Mittapulloon lisättiin noin 80 ml:a ultrapuhdasta vettä ja liuosta

magneettisekoitettiin yön yli. Seuraavana päivänä magneettirae poistettiin ja mittapullo täytettiin merkkiin. Magneettisekoitusta jatkettiin vielä 2 h ajan. Tätä 1 mg/ml:ssa kantaliuosta jaettiin eppendorf -putkiin automaattipipetillä 1000 µl:a per eppendorf-putki. Jokaiseen putkeen lisättiin lisäksi automaattipipetillä 200 µl:a luvussa 2.2.1 valmistettua IS:n kantaliuosta. Valmistetut putket pakastettiin, kylmäkuivattiin ja säilytettiin syväjäätssä -80 °C:ssa.



Kuva 7. Maitohorsman raakauutteen kokonaisionikromatogrammi (A) ja UV-kromatogrammit aallonpituudella 280 nm (B) ja 349 nm (C).

Analyysipäivän aamuna yksi eppendorf-putki ulkoista standardia otettiin 30 minuutiksi huoneenlämpöön sulamaan, jonka jälkeen se liuotettiin 1000 µl:aan 3 mM:sta HCl (aq.) -liuosta, vorteksoitiin 30 minuuttia tasaisen sekoittumisen turvaamiseksi ja suodatettiin uusiin putkiin 0,2 µm:n PTFE-suodattimilla. Tämän uudelleen liuotetun kantaliuoksen vahvuus d5-DL-fenyylialaniinin suhteen oli 20,02 µg/ml:ssa ja maitohorsman raakauutteen suhteen 1000 µg/ml:ssa. Ulkoisesta standardista tehtiin UHPLC-HR-MS/MS-analyysiä varten kolme 20-kertaista laimennosta pipetoimalla suodatettua liuosta 3 × 100 µl:a uusiin eppendor-putkiin ja lisäämällä näihin 1900 µl:a luvun 2.1 8% asetonitriliä 3 mM:ssa HCl (aq.) -liuoksessa ja vorteksoimalla liuosta 30 minuuttia. Valmistetut laimennokset pipetoitiin uusiin 2 ml:n sertifioituihin LC-MS-

vialeihin, joista kaksi oli analyysilaitteiston toistettavuuden tarkkailuun ja yksi laimennossarjoja varten. D5-DL-fenyylialaniinin pitoisuus analysoitavassa laimennoksessa oli 1 µg/ml:ssa ja maitohorsman raakauutteen 50 µg/ml:ssa.

Laadunvarmistusnäytteet (QC) valmistettiin ja säilytettiin ennen näytteiden käsittelyä vastaavalla tavalla kuin ulkoinen standardi, mutta niihin ei ollut pipetoitu sisäistä standardia. Kasvinäytteiden valmistuspäivinä otettiin kaksi QC-näytettä jokaista 50 kasvinäytteen erää kohti syväjäästä huoneenlämpöön sulamaan. QC-näytteet käsiteltiin vastaavalla tavalla kuin kasvinäytteet luvuissa 2.3.1-2.3.3 ja myös säilytettiin vastaavasti, sillä ne toimivat kontrollina uutujen onnistumisesta ja analyysilaitteiston toiminnasta heti UHPLC-HR-MS/MS analyysien alussa.

2.3 Kasvinäytteet

Kasvinäytteet oli kerätty ForestGEO:n (The Forest Global Earth Observatory) tutkimusalueelta, San Lorenzon kansallispuiston trooppisesta sademetsästä (N 9°16'53,4"; W 79°58'26,4"). Näytemateriaali koostui hehtaarin tutkimusalueelta kerätyistä 294 kasvinäytteestä, jotka edustivat 62 eri kasvilajia (taulukko 1). Kaikki kerätyt kasvit olivat vapaasti seisovia puuvartisia lajeja, joiden rungon halkaisija oli ≥ 1 cm ja jotka kasvoivat vähintään kerääjän rinnan korkeudella. Kaikki analysoidut kasvinäytteet on listattu liitteessä 5.

Taulukko 1. Tutkimuksessa analysoidut 62 kasvilajia. Lajeista 33, 36 ja 44 oli tunnistettu vain kasvisuku ja lajia 61 ei ollut tunnistettu.

No.	Kasvilaji	No.	Kasvilaji
1	<i>Andira inermis</i>	32	<i>Miconia ligulata</i>
2	<i>Apeiba membranacea</i>	33	<i>Miconia</i> -suku
3	<i>Aspidosperma spruceanum</i>	34	<i>Mortoniiodendron anisophyllum</i>
4	<i>Beilschmiedia pendula</i>	35	<i>Mouriri myrtilloides</i>
5	<i>Brosimum guianense</i>	36	<i>Myrciaria</i> -suku
6	<i>Brosimum utile</i>	37	<i>Ocotea insularis</i>
7	<i>Carapa guianensis</i>	38	<i>Oenocarpus mapora</i>
8	<i>Cespedesia spathulata</i>	39	<i>Perebea xanthochyma</i>
9	<i>Chrysophyllum argenteum</i>	40	<i>Poulsenia armata</i>
10	<i>Coccoloba padiformis</i>	41	<i>Pourouma bicolor</i>
11	<i>Crematosperma panamensis</i>	42	<i>Prestoea decurrens</i>
12	<i>Crossopetalum parviflorum</i>	43	<i>Protium panamense</i>
13	<i>Dendropanax arboreus</i>	44	<i>Sapium</i> -suku
14	<i>Dussia atropurpurea</i>	45	<i>Simarouba amara</i>
15	<i>Euterpe precatorea</i>	46	<i>Socratea exorrhiza</i>
16	<i>Garcinia madruno</i>	47	<i>Tabernaemontana arborea</i>
17	<i>Guarea sherman</i>	48	<i>Tapirira guianensis</i>
18	<i>Guatteria dumetorum</i>	49	<i>Tetrochidium gorgonae</i>
19	<i>Heisteria acuminata</i>	50	<i>Theobroma bernoullii</i>
20	<i>Humiriastrum diguense</i>	51	<i>Thevetia ahouai</i>
21	<i>Inga goldmanii</i>	52	<i>Tocoyena pittieri</i>
22	<i>Inga multijuga</i>	53	<i>Tovomita longifolia</i>
23	<i>Jacaranda copaia</i>	54	<i>Tomovita stylosa</i>
24	<i>Lacistema aggregatum</i>	55	<i>Trichilia tuberculata</i>
25	<i>Licania hypoleuca</i>	56	<i>Unonopsis panamensis</i>
26	<i>Lonchocarpus heptaphyllus</i>	57	<i>Virola elongata</i>
27	<i>Lozania pittieri</i>	58	<i>Virola multiflora</i>
28	<i>Maquira guianensis</i>	59	<i>Virola sebifera</i>
29	<i>Maranthes panamensis</i>	60	<i>Xylopia macrantha</i>
30	<i>Marila laxiflora</i>	61	tuntematon kasvilaji
31	<i>Meliosma glabrata</i>	62	<i>Poulsenia armata</i>

2.3.1 Kasvinäytteiden esikäsittely ja maserointi

Kylmäkuivatut kasvinäytteet jauhettiin kuulajauhimmella homogeeniseksi hienoksi jauheeksi. Näytteistä punnittiin 20,0 mg:a analyysivaa'alla omiin 2 ml:n eppendorff-putkiin, joihin lisättiin 200 µl:a luvussa 2.1 kuvatulla tavalla valmistettua d5-DL-

fenyylialaniinin 100,2 µg/ml:ssa kantaliuosta. IS:n ja kasvimateriaalin annettiin olla vuorovaikutuksessa 1 h ajan huoneenlämmössä. Kasvimateriaalin ja IS:n joukkoon lisättiin 1 h vuorovaikutusajan jälkeen 1400 µl:a luvussa 2.1 kuvatulla tavalla valmistettua asetoni/vesi (80/20, v/v) -uuttoliuotinta. Näytteitä vorteksoitiin 10 minuutin ajan tai tarvittaessa pidempään, jotta kasvimateriaali oli sekoittunut tasaisesti liuottimeen. Lopuksi näytteet annettiin maseroitua kylmähuoneessa (4°C) yön yli. Seuraavana aamuna näytteiden sekoittuminen uuttoliuottimeen tarkastettiin uudelleen ennen varsinaista uuttoa.

2.3.2 Kasvinäytteiden uuttaminen

Käsinäytteitä uutettiin 2×3 h tasoravistelijassa nopeudella 280 / min. Ensimmäisen 3 h tasoravistelun jälkeen näytteet sentrifugoitiin (10 min, 14000 rpm) ja uutteet dekantoitiin huolellisesti uusiin eppendorf-putkiin. Kasvimateriaalin joukkoon lisättiin toinen 1400 µl:n uuttoliuotinerä ja uuttoa toistettiin edellä kuvatulla tavalla, ilman luvun 2.3.1 maserointivaihetta. Samaan aikaan uusiin eppendorf-putkiin dekantoitu kasviuute, sisäisine standardeineen, konsentroidiin vesifaasiin vakuumikonsentraattorissa (Eppendorf Concentrator mallit Plus ja 5301, Eppendorf AG, Hampuri, Saksa) ja jätettiin huoneenlämpöön odottamaan viimeisen uuttoa valmistumista. Viimeisen uuttoa vaiheen päätyttyä uutteet yhdistettiin samaan eppendorf-putkeen, liuos haihdutettiin vesifaasiin, jäädytettiin ja lopuksi kylmäkuivattiin. Kylmäkuivatut kasvinäytteet joko analysoitiin heti kylmäkuivauksen jälkeen tai varastoitettiin pakastimeen (-18°C) odottamaan analyysiä.

2.3.3 Näytteiden valmistaminen UHPLC-HR-MS/MS-analyysiin

Analyysipäivänä näytteet liuotettiin 1000 µl:aan, luvussa 2.1 kuvatulla tavalla valmistettua 3 mM:sta HCl (aq.) -liuosta, käyttäen automaattipipettiä. Näytteitä vorteksoitiin 1 h ajan, jonka jälkeen ne suodatettiin uusiin eppendorf-putkiin käyttäen 0,2 µm:n polytetrafluorieteeni (PTFE) -suodattimia. Näytteistä tehtiin 20-kertaiset laimennoksen analyysiä varten, pipetoimalla automaattipipetillä 50 µl:a näytettä uuteen eppendorf-putkeen ja lisäämällä 950 µl:a luvun 2.1 8% asetonitriiliä 3 mM:ssa HCl (aq.)-liuosta. Laimennosta vorteksoitiin 30 minuutin ajan ennen 600 µl:n näyte-erän pipetointia 96-kuoppaisen kuoppalevyn 700 µl:seen kuoppaan. Samalla valmistettiin yhdistelmänäyte, ottamalla viidestä laimentamattomasta ja suodatetusta näytteestä 50 µl:a uuteen eppendorf-putkeen ja lisäämällä 750 µl:a 8% asetonitriiliä 3 mM HCl (aq.) -

liuosta, vorteksoimalla 30 minuutin ajan ja pipetoimalla 600 µl:n näyte-erä kuoppalevyille.

2.4 UHPLC-HR-MS/MS –analyysit

2.4.1 Laitteiston kuvaus

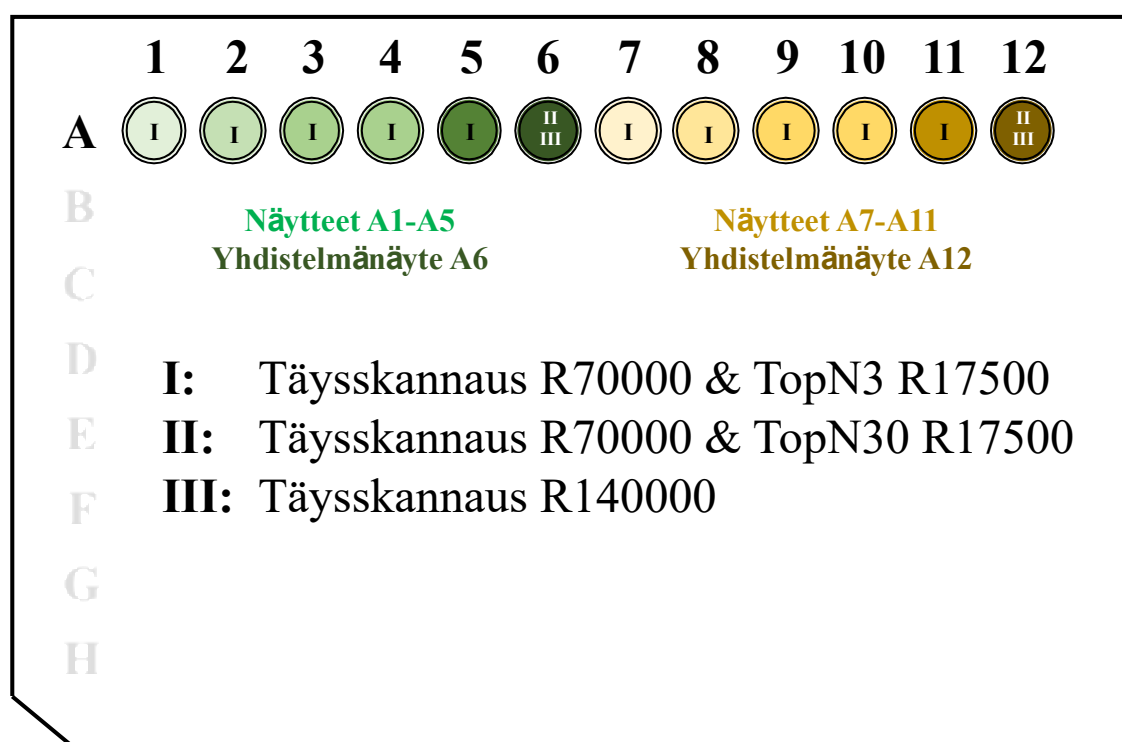
Kasvinäytteet analysoitiin käyttäen Acquity UPLC[®]-DAD-laitteistoa (Waters Corp., Milford, MA, Yhdysvallat), joka oli yhdistetty lämmitetyn sähkösumutus-ionisaatiolähteen (H-ESI II, Thermo Fisher Scientific GmbH, Bermen, Saksa) välityksellä hybridi-kvadrupoli-Orbitrap-massaspektrometriin (Q Exactive[™], Thermo Fisher Scientific GmbH, Bermen, Saksa). UHPLC-laitteisto koostui automatisoidusta näytteenkäsittelijästä, binääripumpusta, esikolonnista, kolonnista, kolonniuunista ja diodirividetektorista (DAD). Käytetty kolonni oli Acquity UPLC[®] BEH-fenyylkolonni (Waters Corp., Wexford, Irlanti) 2,1 × 30 mm (Ø × pituus), 1,7 µm:n partikkelikoolla. Gradientteluution virtausnopeus oli 0,650 ml/min ja se koostui (A) asetonitriilistä ja (B) 0,1 -% muurahaishapon vesiliuoksesta (99,9 / 0,1; v/v). Eluentigradienttiprofiili oli A:n suhteen seuraava: 0-0,1 min, 1 % A; 0,1-3,8 min, 33 % A (lineaarinen gradientti); 3,8-3,9 min, 90 % A (lineaarinen gradientti); 3,9-4,8 min, 90 % A; 4,8-4,9 min, 1 % A (lineaarinen gradientti); 4,9-5,0 min, 1 % A. Injektoitava tilavuus oli 5 µl:a. HESI-lähteen kapillaarin lämpötila oli 380 °C, sumutusjännite ±3,0 kV, suojakaasun (N₂) virtaus 60 yksikköä, apukaasun (N₂) virtaus 20 yksikköä ja S-linssin RF-arvo 60.

2.4.2 UHPLC-MS/MS-menetelmät

Käytettyjä analyysimetodeja oli yhteensä kuusi, kolme negatiiviselle ionisaatiolle ja kolme positiiviselle ionisaatiolle. Negatiivinen ja positiivinen ionisaatiomoodi mitattiin massavälillä m/z 100–1500, lisäksi positiivisella ionisaatiolla käytettiin lukkomassaa (m/z 214,08963) korjaamaan massasiirtymiä ja näin parantamaan analyysien massatarkkuutta. UV-data kerättiin aallonpituusvälillä 190–500 nm koko analyysin ajan (0–5,0 min).

Luvun 2.3.3 laimennetut yksittäiset näytteet analysoitiin sekä negatiivisella että positiivisella ionisaatiolla. Menodit sisälsivät 4,5 minuutin täysskannaus (Full MS) -analyysin resoluutiolla 70000 ja AGC-arvolla 3×10^6 . Lisäksi metodit sisälsivät dd-MS² -analyysin (TopN) resoluutiolla 17500, AGC-arvolla 1×10^5 ja TopN-arvolla 3. TopN 3

mittasi vuoroperään kokonaisen massaspektrin ja tästä massaspektristä kolmesta intensiivisimmästä ionista MS/MS-spektrit valitulla resoluutiolla. Viiden näytteen pakettien yhdistelmänäytteet analysoitiin vastaavasti, mutta TopN-arvolla 30. Näin tallennettiin kokonaisesta massaspektristä maksimissaan kolmestakymmenestä intensiivisimmästä ionista MS/MS-spektrit. Lisäksi yhdistelmänäytteet analysoitiin erillisellä 4,5 minuutin Full MS-analyysillä resoluutiolla 140000 ja AGC-arvolla 3×10^6 . Kuvassa 8 on esitetty yksinkertaistetusti näytekohtaiset metodit kuoppalevyllä kymmenellä esimerkkinäytteellä.



Kuva 8. Kuoppalevyllä pipetoidut kymmenen näytettä (A1-A5 ja A7-A11) ja kaksi yhdistelmänäytettä (A6 ja A12). A6 sisältää yhdistelmän näytteistä A1-A5 ja A12 yhdistelmän näytteistä A7-A11 luvussa 2.2.3 kuvatulla tavalla. Yksittäiset näytteet A1-A5 ja A7-A11 analysoitiin positiivisella ja negatiivisella ionisaatiolla käyttäen parametreja I. Yhdistelmänäytteet analysoitiin positiivisella ja negatiivisella ionisaatiomoodilla parametreilla II ja III. Täysskannaus mittasi koko massakromatogrammin valituilla resoluutioilla (R) ja TopN-ohjelma mittasi vuoroperään kokonaisen massaspektrin ja tästä massaspektristä kolmesta (I) tai kolmestakymmenestä (II) intensiivisimmästä ionista MS/MS-spektrit valitulla resoluutiolla.

2.5 LC-MS–datan *in silico* -käsittely

2.5.1 ProteoWizard MSConvertGUI- ja MZmine-ohjelmistot

Kaikki UHPLC-HR-MS/MS–data konvertoitiin raw-tiedostoformaattista mzXML-tiedostoformaattiin käyttäen ProteoWizardin MSConvertGUI -massadatan konversio-ohjelmaa (versio 3.0.19316).^{60,61} Konvertoidut tiedostot ladattiin MZmine (versio 2.53) massadatan käsittely- ja visualisointiohjelmaan.⁶² Luvussa 2.3.3 kuvattujen yksittäisten näytteiden positiivisen ionisaation datan *in silico* -käsittely tehtiin taulukon 2 LC-MS–ominaisuuksilla ja -parametreilla. Yhdistelmänäytteet analysoitiin taulukon 3 mukaan. Ennen FBMN-analyysiä yksittäisten näytteiden ja yhdistelmänäytteiden MS/MS-data yhdistettiin *Join aligner* -ominaisuudella (LC-MS–ominaisuuksien kohdentaminen näytteiden välillä) käyttäen taulukon 3 parametreja. Käsitelty data tarkastettiin manuaalisesti ja siitä luotiin MS/MS-spektritiedosto (mgf-formaatti), kvantitointitiedosto (csv-formaatti) ja metadatatiedosto (txt-formaatti). Kvantitointitiedosto sisälsi muun muassa havaitut MS-signaalit, niiden retentioajat, intensiteetit, pinta-alat, datapisteiden määrän ja lähtöionikohtaiset tunnistenumerot. Spektritiedosto sisälsi listan kakista havaituista MS/MS-spektreistä, niiden skannausnumerot ja kvantitointitiedostoa vastaavat tunnistenumerot. Metadatatiedosto sisälsi tarkentavia tietoja näytteistä, kuten kasvilajien nimet ja kasvimateriaalin punnitustulokset.

Taulukko 2. Yksittäisille kasvinäytteille positiivisella ionisaatiolla käytetyt MZmine -ohjelman LC-MS-ominaisuudet ja niiden parametrit.

LC-MS-ominaisuus	Parametri
Mass detection	MS1 noise level: 1.0E5 MS2 noise level: 1.0E0
ADAP chromatogram builder	Minimum group size # of scans: 5 Group intensity threshold: 3.0E5 Minimum highest intensity: 1.0e5 <i>m/z</i> tolerance: 0.01 / (ppm)
Smoothing	Filter width: 7
Chromatogram deconvolution	Algorithm: Local minimum search Chromatographic threshold: 30.0% Search minimum in RT range (min): 0.05 Minimum relative height: 5.0% Minimum absolute height: 3.0E5 Minimum ratio of peak top/edge: 1.2 Peak duration range (min): 0.01-0.50 <i>m/z</i> center calculation: MEDIAN <i>m/z</i> range for MS2 scan pairing (Da): TRUE / 0.01 RT range for MS2 scan pairing (min): TRUE / 0.05
Isotopic peaks grouper	<i>m/z</i> tolerance: 0.01 / (ppm) Retention time tolerance: 0.05 absolute (min) Maximum charge: 3 Representative isotope: Most intense
Join aligner	<i>m/z</i> tolerance: 0.01 / (ppm) Weight of <i>m/z</i> : 75 Retention time tolerance: 0.05 absolute (min) Weight of RT: 25
Gap filling: Peak finder (multithreaded)	Intensity tolerance: 25.0% <i>m/z</i> tolerance: 0.001 / (ppm) Retention time tolerance: 0.01 absolute (min)
Feature list rows filter	Minimum peaks in a isotope pattern: TRUE / 2 Keep only peaks with MS2 scan (GNPS): FALSE Reset the peak number ID: TRUE

Taulukko 3. Yhdistelmänäytteille positiivisella ionisaatiolla käytetyt MZmine -ohjelman LC-MS-ominaisuudet ja niiden parametrit.

LC-MS-ominaisuus	Parametri
MS/MS peak list builder	<i>m/z</i> window: 0.01 Time window 0.05
Peak extender	<i>m/z</i> tolerance: 0.01 / (ppm) Minimum height: 0
Smoothing	Filter width: 7 Algorithm: Local minimum search Chromatographic threshold: 30.0% Search minimum in RT range (min): 0.05 Minimum relative height: 5.0% Minimum absolute height: 3.0E5
Chromatogram deconvolution	Minimum ratio of peak top/edge: 1.2 Peak duration range (min): 0.01-0.50 <i>m/z</i> center calculation: MEDIAN <i>m/z</i> range for MS2 scan pairing (Da): TRUE / 0.01 RT range for MS2 scan pairing (min): TRUE / 0.05 <i>m/z</i> tolerance: 0.01 / (ppm)
Isotopic peaks grouper	Retention time tolerance: 0.05 absolute (min) Maximum charge: 3 Representative isotope: Most intense <i>m/z</i> tolerance: 0.01 / (ppm)
Join aligner	Weight of <i>m/z</i> : 75 Retention time tolerance: 0.05 absolute (min) Weight of RT: 25
Gap filling: Peak finder (multithreaded)	Intensity tolerance: 25.0% <i>m/z</i> tolerance: 0.001 / (ppm) Retention time tolerance: 0.01 absolute (min) Filter mode: NEW AVERAGE
Duplicate peak filter	<i>m/z</i> tolerance: 0.01 / (ppm) Retention time tolerance: 0.05 absolute (min)

2.5.2 Compound Discoverer -ohjelmisto

Positiivisella ionisaatiolla yksittäin analysoidut kasvinäytteet käsiteltiin myös *in silico* Compound Discoverer 3.1 massadatan käsittely- ja kvantitointiohjelmalla (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Yhdysvallat). Ionit karakterisoitiin suoraan raw-

tiedostoista, käyttäen tarkkaa massaa, MS/MS-spektrien samankaltaisuutta ja *Untargeted Metabolomics using Online Databases, mzLogic and Molecular Networking* -analyysipohjaa taulukossa 4 kuvatuilla parametreilla.

Taulukko 4. Compound Discoverer -ohjelmiston *Untargeted Metabolomics using Online Databases, mzLogic and Molecular Networking* -analyysipohjaan asetetut LC-MS-ominaisuuksien parametrit yhdisteiden havaitsemiseen.

LC-MS-ominaisuus	Parametri
Intensity tolerance	30 %
S/N threshold	3
Minimum peak intensity	1×10 ⁶
Maximum element count	C × 100, H × 200, N × 20, O × 100, S × 10, P × 10
Filter peaks	TRUE
Peak width	0,5 min
Filter singlets	TRUE
Minimum # scans per peak	5
Minimum # isotope signals	1

2.6 Molekyyliverkostoanalytiikka

Luvun 2.5.1 parametreilla *in silico* muodostetut tiedostot ladattiin GNPS:n verkkosivustolle (<https://gnps.ucsd.edu>). Tiedostojen sisältämä UHPLC-HR-MS/MS-data analysoitiin FBMN-analyysinä käyttäen seuraavia parametreja: lähtöionien massatoleranssi 0,01 Da, fragmentti-ioninen massatoleranssi 0,01 Da, verkostoparin minimi kosini-pistearvo 0,7; verkostoparin vastaavien fragmenttien minimimäärä 6 ja noodin maksimi linkitysmäärä (TopK) 10. Muut parametrit pidettiin oletusasetuksissa. Molekyyliverkoston visualisoitiin käyttäen Cytoscape -verkostovisualisointiohjelmaa (versio 3.8.2).

2.7 Yhdisteiden karakterisointi

Lopullinen yhdisteiden karakterisointi tehtiin manuaalisesti käyttäen Thermo Xcalibur Qual Browser -ohjelmaa (versio 3.0.63, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, Yhdysvallat) tarkastelemalla yhdisteiden UV-spektriä, MS/MS-fragmentaatiota, tarkkaa

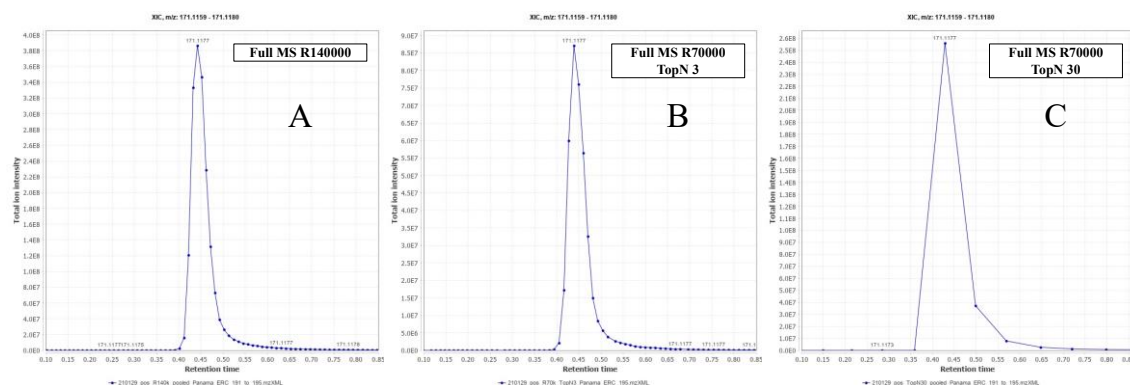
massaa ja siihen perustuvaa arviota molekyylikaavasta ja kaksoisidosekvivalentista (DBE). Lisäksi hyödynnettiin yhdiste- ja kasvilajikohtaisia kirjallisuuslähteitä, GNPS:n MS- ja MS/MS-spektrikirjastoja, luotua molekyyliverkostoa ja Compound Discoverer -ohjelman tuloksia.⁶³

3 Tulokset ja niiden tarkastelu

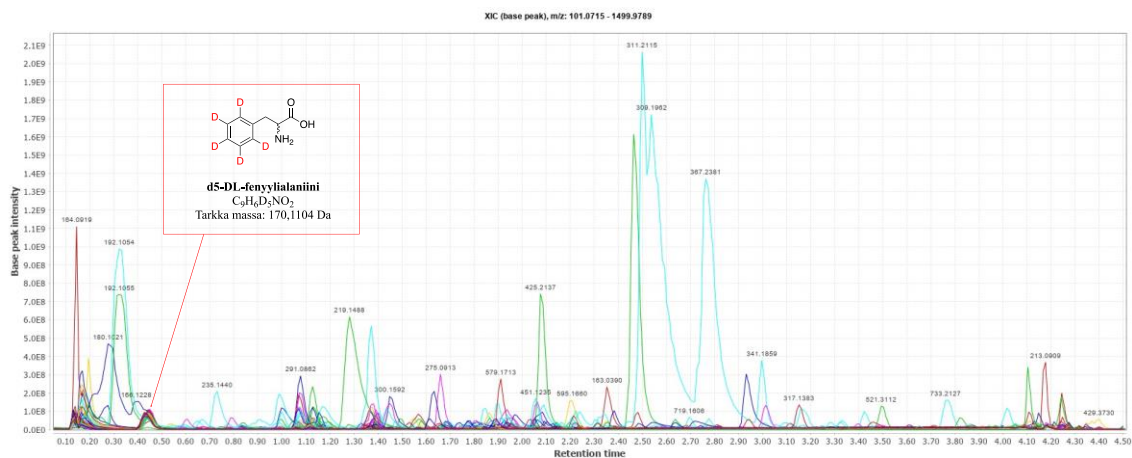
3.1 UHPLC-HR-MS/MS-analyysimenetelmän toimivuus

Käytetyllä analyysimenetelmällä pystyttiin tallentamaan monimutkaisesta näytematriisista täysskannauksessa, resoluutiolla 70000, pääsääntöisesti riittävä määrä datapisteitä (≥ 10) EIC:ia kohden ja myös pieni määrä MS/MS-spektrejä (TopN 3) datapistettä kohden. Tämä mahdollisti manuaalisen yhdisteiden karakterisoinnin ja lisäksi kohtalaisen molekyyliverkostanalytiikan hyödyntämisen näytteisiin.

Yhdistelmänäytteille kehitetty menetelmä tallensi onnistuneesti kymmenkertaisen määrän MS/MS-spektrejä (TopN 30) datapistettä kohti, mutta datapisteiden määrä oli luonnollisesti vähäisempi. TopN 30 oli kuitenkin kehitetty pääasiassa rikastamaan molekyyliverkon MS/MS-spektrien määrää eikä sitä käytetty kvantitoinnissa. Suuresta MS/MS-spektrien määrästä oli myös lisähyötyä yhdisteiden karakterisoinnissa, mikäli tavoiteltua MS/MS-spektriä ei löytynyt TopN 3 -datasta. Lisäksi yhdistelmänäytteille käytetty tarkkaan massaan painottuva metodi resoluutiolla 140000 ilman MS/MS-dataa osoittautui toimivaksi, eikä viiden näytteen yhdistelmän näytematriisi ollut liian monimutkainen analysoitavaksi. Kuvassa 9 on esitetty käytettyjen analyysimetodien EIC:t d5-DL-fenyylialaniinista positiivisella ionisaatiolla. Kuvassa 10 on nähtävillä koko näyteskaala 62:sta eri lajista, jokaisen kasvisuvun edustajan kokonaisionikromatogrammi (TIC).



Kuva 9. D5-DL-fenyylialaniini (m/z 171,1177 ; positiivinen ionisaatio) kolmen eristetyn ionin kromatogrammit (EIC) kolmella analyysianalyysimetodilla **A** (Full MS R140000), **B** (Full MS R70000 TopN3) ja **C** (Full MS R70000 TopN 30) kuvattuna MZmine-ohjelman kokonaisionivirran (TIC) -visualisoinnissa. Metodien täyskannauksen (Full MS) resoluution (R) ja MS/MS-fragmentaation TopN-ohjelman arvot (R 17500) on esitetty kuvassa. A:n EIC on eristetty *P. bicolorin* (laji 41) yksittäisestä näytteestä, kun B ja C ovat eristetty viiden näytteen yhdistelmänäytteestä, jossa *P. bicolorin* näyte (Panama ERC 195) oli mukana. Tallennetut datapisteet näkyvät korostettuina EIC:ssa.

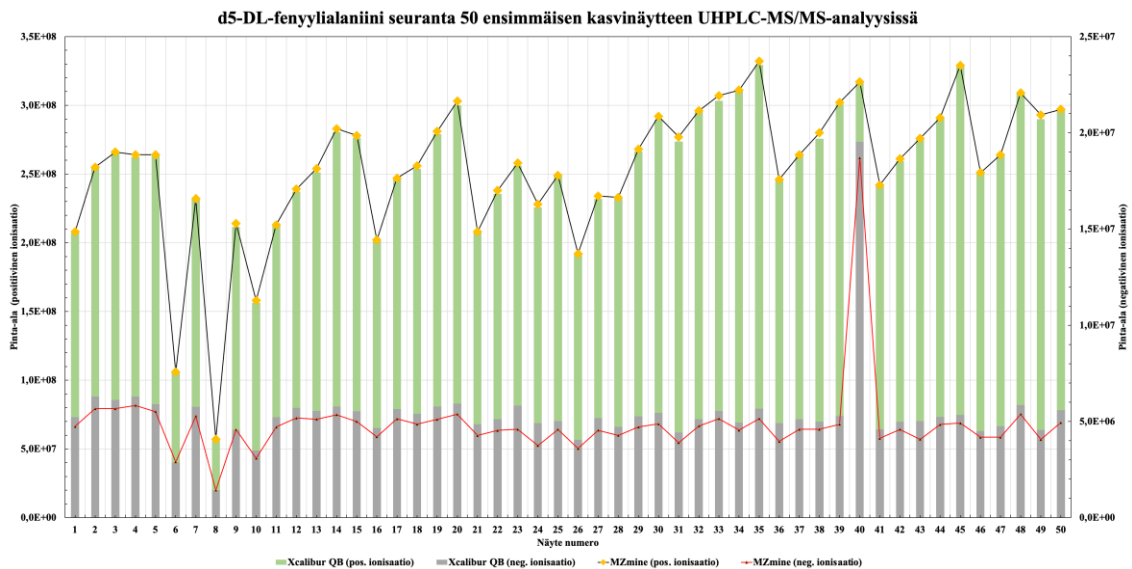


Kuva 10. 62 kasvilajin kokonaisionikromatogrammit (TIC) 4,5 minuutin täyskannauksessa (Full MS) resoluutiolla (R) 70000. Kromatogrammissa on korostettuna lisäksi d5-DL-fenyylialaniini retentioajalla 0,45 minuuttia.

3.1.1 Kvantitointi

Sisäinen standardi oli tarkoitettu uuttotehokkuuden tarkkailuun, korjaamaan mahdollista matriisiefektiä ja ulkoisen standardin osaksi UHPLC-HR-MS-laitteiston toiminnan seurannassa. IS:n säilyvyydestien tulokset huoneenlämmössä (21°C), jääkaapissa (4°C), pakastimessa (-18°C) ja syväjäässä (-80°C) on raportoitu liitteessä 1, toistettavuus liitteessä 2 ja mitatut laimennossarjat liitteessä 3. Edellä mainittujen esitestien tulosten perusteella optimoitiin protokola varsinaisessa analyysissä käytettyyn muotoonsa.

Lopullisten analyysien tulokset poikkesivat kuitenkin liitteen 2 toistettavuusmittauksissa, jotka oli suoritettu ennen näytteiden analysointia. Näytteiden välinen IS:n seuranta osoittaa positiivisella ionisaatiolla toistuvaa asteittaista nousua lähes jokaisessa peräkkäisessä viiden yksittäisen näytteen analyysissä, palautuen taas alemmalle tasolle seuraavan viiden näytteen kokonaisuuden alussa. Ilmiö vaikuttaisi johtuvan mahdollisesti laitteistosta tai analyysimetodista, sillä se havaitaan vain positiivisella ionisaatiolla. Analyysimetodi on kuitenkin sama, mitä käytettiin liitteiden 1, 2 ja 3 esitesteissä. Kuvassa 11 on esitetty IS:n piikkien pinta-alat 50 ensimmäisen näytteen aikana positiivisella ja negatiivisella ionisaatiolla. Saatujen tulosten pohjalta IS:a ei voi hyödyntää kvantitoinnissa korjaavana tekijänä, mutta sen avulla voidaan tarkastella tulisiko näytteitä analysoida uudestaan, kuten näytteet 6, 8 ja 10 osoittavat. Näyte 40 osoittaa negatiivisella ionisaatiolla 2,8-kertaista nousua keskiarvoon nähden, mutta vastaavaa nousua ei havaita positiivisella ionisaatiolla, eikä UV:lla.

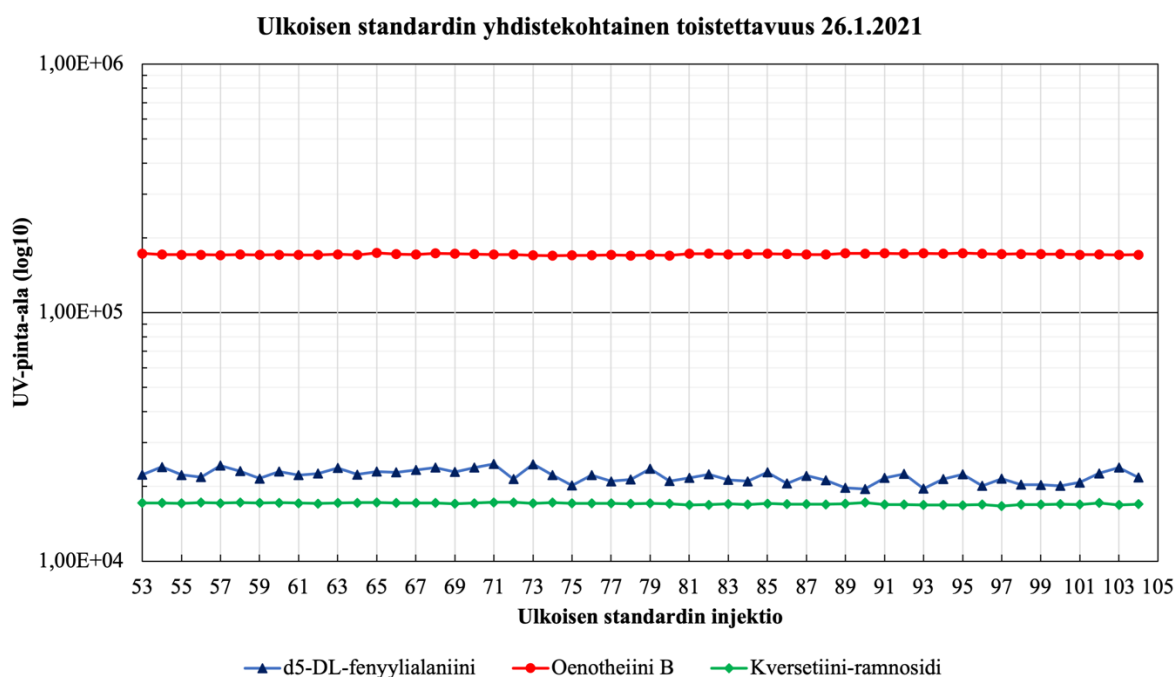


Kuva 11. IS:n seuranta positiivisella ja negatiivisella ionisaatiolla ensimmäisen 50 kasvinäytteen aikana. Kuvaaja sisältää lisäksi vertailun Xcalibur Quan Browser- ja MZmine-ohjelmien integrointitulosten välillä. Positiivisella ionisaatiolla on havaittavissa intervallimaista nousua lähes kaikissa viiden näytteen sarjoissa, mutta vastaavaa ilmiötä ei havaita negatiivisella ionisaatiolla.

Vertailtaessa IS:n d5-DL-fenyylialaniinin MS-pinta-aloja (100 %:n taso) kasvinäytteiden vastaavaan tasoon, todettiin IS:n pinta-alojen olevan useasti matalampia kuin itse näytteissä havaitut pinta-alat. Uuton ja näytteen käsittelyn aikana tulisi syntyä alenemaa IS:n tasossa, ei päinvastoin. Tähän mahdollisena syynä voi olla vuorovaikutus

näytematriisin yhdisteiden ja IS:n välillä, mikä havaitaan vasteen muutoksina näytteissä.⁶⁴

Ulkoiset standardin pohjana olevan *C. angustifoliumin* raakauutteen yhdisteillä, dimeerisellä makrosyklisellä ellagitanniini oenotheiini B:llä ja flavonoidiglykosidi kversetiini-ramnosidilla todettiin keskihajonnan olevan koko analyysin ajalta 1,05% oenotheiini B:lle ja 0,81% kversetiini-ramnosidille. Sisäisen standardin keskihajonta oli 4,94% koko analyysin aikana, mutta peräkkäisten injektioiden välinen ero saattoi olla lähes 15%. Kuvassa 12 on esitetty ulkoisen standardin toistettavuus kolmantena analyysipäivänä. Oenotheiini B ($R_t=1,18$ min) ja kversetiini-ramnosidi ($R_t=2,46$ min) eluoutuivat myöhemmin (kuva 7) ja niiden toistettavuus oli parempi verrattuna d5-DL-fenyylialaniiniin. Ulkoisen standardin laimennossarjat ja toistettavuusanalyysit on esitetty liitteissä 3 ja 4.



Kuva 12. Ulkoisen standardin toistettavuusvertailu kolmantena analyysipäivänä d5-DL-fenyylialaniinille, oenotheiini B:lle ja kversetiini-ramnosidille. Oenotheiini B:n keskihajonta oli päivän sisällä 0,64%, kversetiini-ramnosidin 0,80% ja d5-DL-fenyylialaniinin 6,01%.

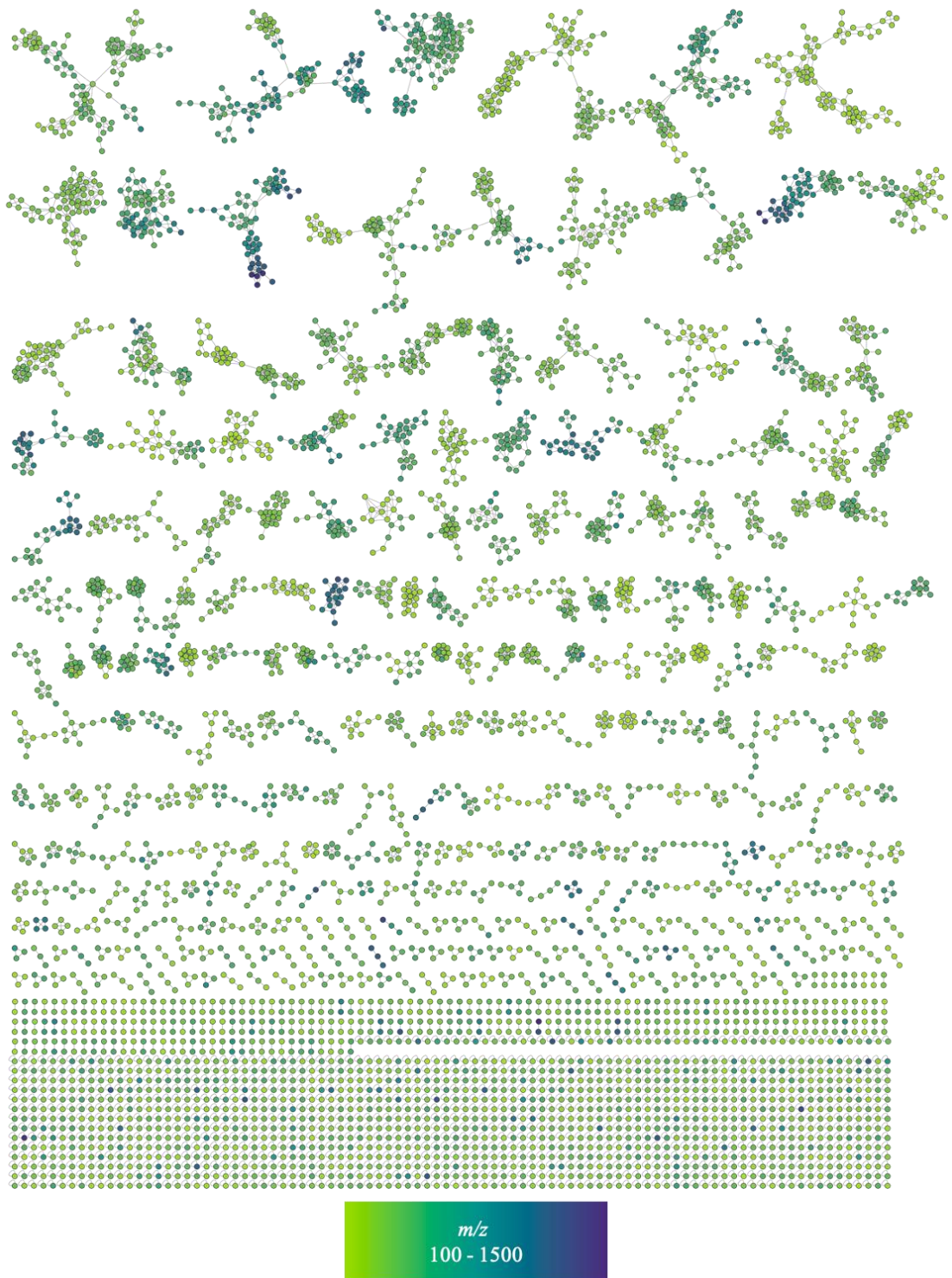
3.2 Molekyyliverkostoanalytiikka

Käyttäen GNPS:n tarjoamaa FBMN-analytiikkatyökalua pystyttiin tutkimuksessa luomaan onnistuneesti molekyyliverkosto, joka käsittää 8184 erillistä noodia. Suuri

noodien määrä selittyy taulukon 3 ominaisuuden *Feature list rows filter* parametrissa *Keep only peaks with MS2 scan (GNPS): FALSE*, jolloin verkosto visualisoi myös ne yhdisteet noodeina, joille ei ole mitattu MS/MS-spektriä. Näin verkostoa pystyttiin käyttämään mahdollisimman tehokkaasti hyödyksi alkaloidien havaitsemiseen esimerkiksi kirjallisuuslähteiden perusteella, eikä verkosto jättänyt huomioimatta mahdollisia yhdisteitä, joilta MS/MS-fragmentaatio puuttui.

Kosini-pisteraja-arvon 0,7 ylittäviä noodeja verkostossa oli 4073 ja niiden välisiä linkityksiä 13217 TopK-arvolla 10. Tämä kuvaa parhaiten verkoston rakennetta, sillä jokaista klusteroitunutta noodia kohden on linkittynyt keskimäärin 3,25 rakenteeltaan samankaltaista noodia. MS/MS-spektripankeista löytyi 651 MS/MS-spektrivastinetta, joiden antamiin karakterisointeihin tulee, kuitenkin suhtautua hyvin kriittisesti. Osa työssä luodusta molekyyliverkostosta on esitetty kuvassa 13. Molekyyliverkosto on kokonaisuudessaan nähtävillä ja ladattavissa GNPS:n verkkosivuston palvelimelta osoitteessa <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/status.jsp?task=6d1edaf579cf40fdb7ed34e6bb13e932>

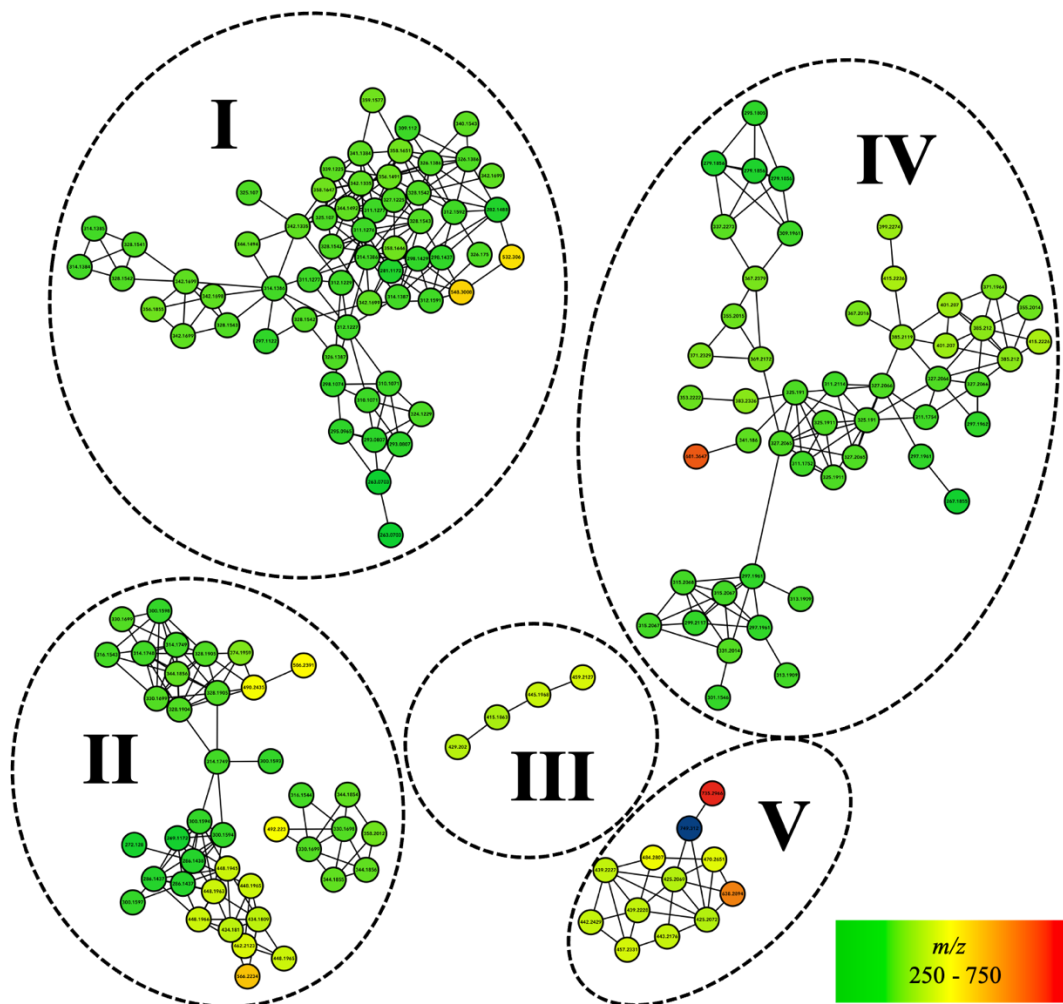
.



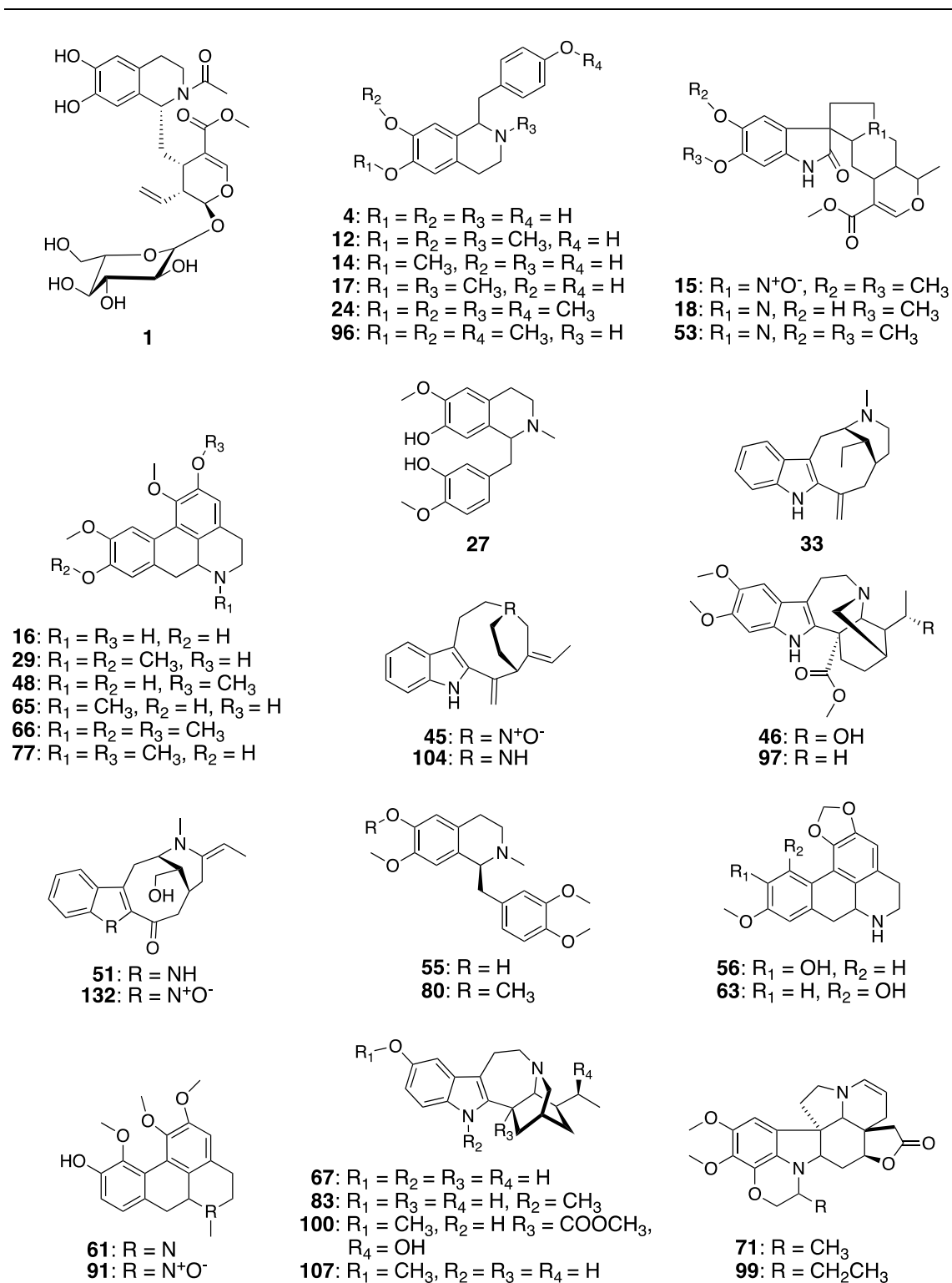
Kuva 13. FBMN-analyysimenetelmällä luotu molekyyliverkosto visualisoituna Cytoscape-verkostovisualisointiohjelmalla. Verkoston noodit on värikoodattu ilmentämään lähtöioniensa m/z -arvoa massavälillä 100-1500 Da.

3.3 Alkaloidien karakterisointi ja diversiteetti

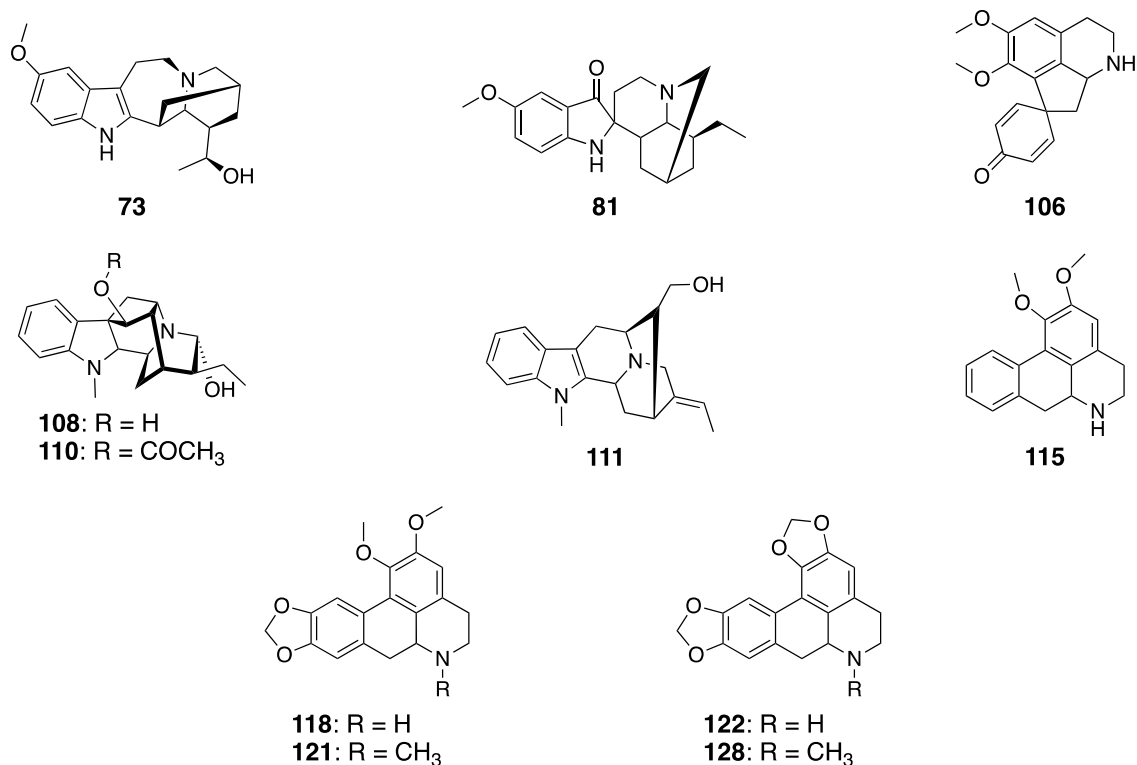
Molekyyliverkostoa hyödyntäen karakterisoitiin 133 alkaloidia (liite 6). Kaikki löydetyt ja karakterisoidut alkaloidit kuuluivat todellisten alkaloidien pääryhmään ja sen isokinoliini- ja indoliaalkaloidien alaryhmiin (kuva 1). Isokinoliinit jakautuivat aporfinoidi-isokinoliineihin (I) ja tetrahydroisokinoliineihin (II). Indoliaalkaloidit jakautuivat monoterpenoidioksiindoleihin (III), monoterpenoidi-indoleihin (IV) ja aspidosperma-monoterpenoidi-indoleihin (V). Tutkimuksessa havaittujen alkaloidien molekyyliverkosto on kuvattu alla kuvassa 14 ja yhdistekohtaisesti tunnistettujen alkaloidien rakenteet on esitetty kuvissa 15 ja 16. Alkaloidien esiintyminen kasvilajeissa on kuvattu kuvissa 17 ja 18.



Kuva 14. Isokinoliini- ja indoliaalkaloidien ryhmittäminen molekyyliverkostossa: aporfinoidi-isokinoliinit (I), tetrahydroisokinoliinit (II), monoterpenoidioksiindolit (III), monoterpenoidi-indolit (IV) ja aspidosperma-monoterpenoidi-indolit (V). Verkoston noodit on värikoodattu ilmentämään lähtöioniensa m/z -arvoa massavälillä 250-750 Da.



Kuva 15. Tutkimuksessa karakterisoitujen alkaloidien kemiallisia rakenteita. Rakenteiden numerointi ja niitä vastaavat mahdolliset isomeerit ja muut alkaloidiluokkien johdannaiset on raportoitu liitteessä 6.

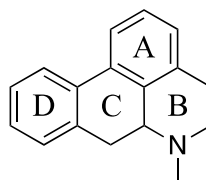


Kuva 16. Tutkimuksessa karakterisoitujen alkaloidien kemiallisia rakenteita. Rakenteiden numerointi ja niitä vastaavat mahdolliset isomeerit ja muut alkaloidiluokkien johdannaiset on raportoitu liitteessä 6.

Kasvilajien *A. inermis*, *B. utile*, *I. multijuga*, *M. laxiflora*, *Miconia* -suvun kasvilaji, *M. anisophyllum*, *M. myrtilloides*, *P. armata*, *P. bicolor*, *P. panamense*, *T. longifolia*, *T. tuberculata*, *V. multiflora* ja tunnistamattoman kasvilajin näytteistä ei tutkimuksessa löydetty alkaloideja (kuva 17 ja 18).

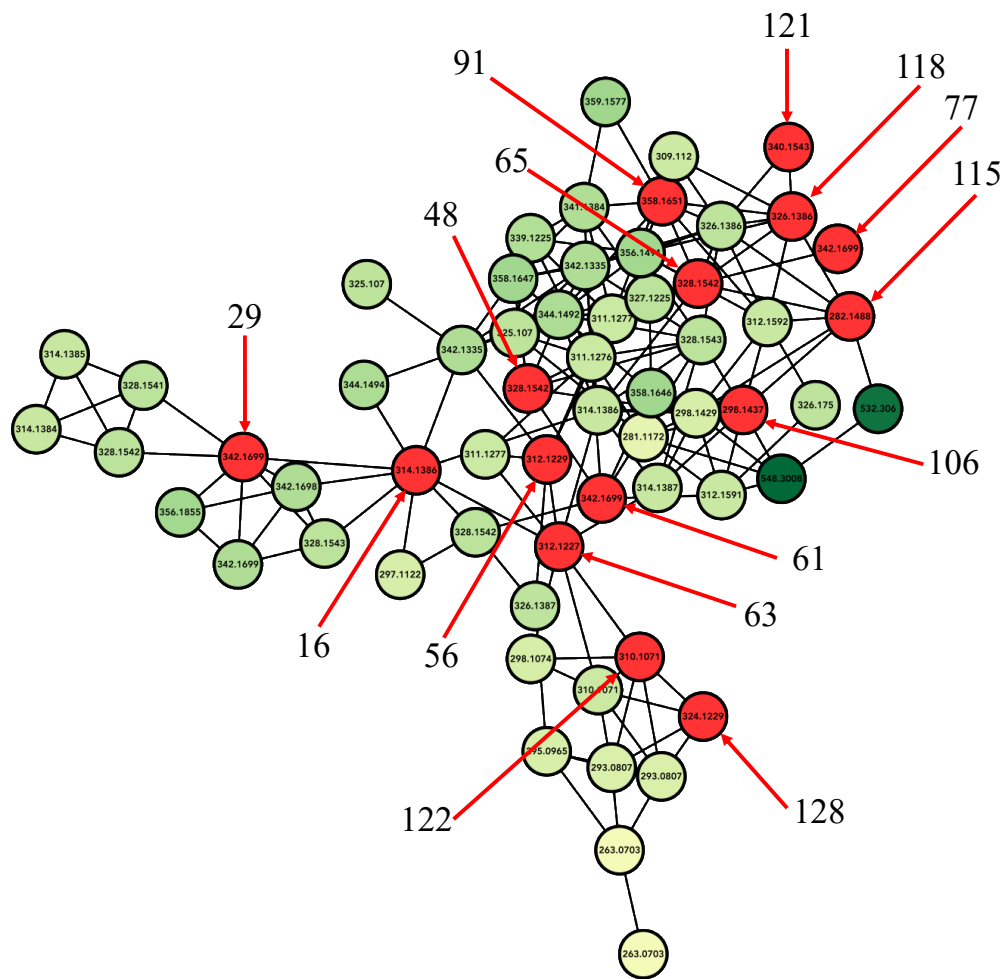
3.3.1 Isokinoliinialkaloidit

Tetrasyklisen rengasrakenteen (A-D) omaavat aporfinoidi-isokinoliinit (I) olivat suurimpia tutkimuksessa havaittuja alkaloidiluokkia. Aporfinoidien toisen pääryhmän aporfiinien rakenteellisena lähtöyhdisteenä on pidetty apomorfiinia (kuva 19), jonka johdannaisina muita aporfiini-luokan alkaloideja pidetään.⁶⁵⁻⁶⁷ Apomorfiinia ei kuitenkaan tutkittavissa lajeissa havaittu. Kaikilla aporfinoideilla havaittiin $[M+H]^+$ -pääioni ja luokalle ominaisia fragmentteja substituutiosta riippuen, kuten m/z 297 ($[M-(CH_3)_2NH]^+$) tai m/z 311 ($[M-CH_3NH_2]^+$).^{68,69} Lisäksi A- ja D-renkaan substituutiosta riippuen havaittiin tyypillisiä -15 Da ($[M+H-CH_3]^+$), -28 Da ($[M+H-CO]^+$), -31 Da ($[M+H-OCH_3]^+$), ja -32 Da ($[M+H-MeOH]^+$) -massahäviöitä.⁷⁰



Kuva 19. Apomorfiinin tetrasyklinen rengasrakenne (A-D).

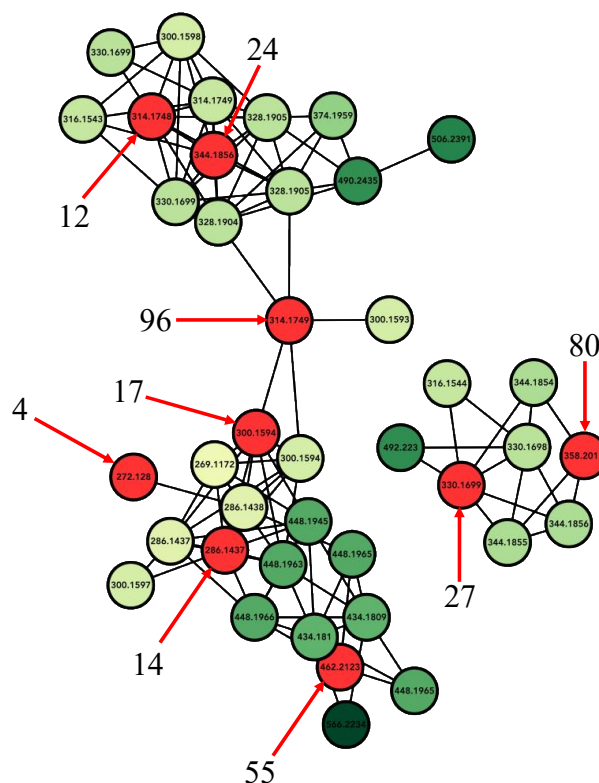
Aporfiinityypin alkaloideja olivat laurolitsiini (16), (iso)boldiini (65), *O*-metyyli(iso)boldiini (29), laurotetaniini (48), *N*-metyylilauroteniini (77), aktinodafniini (56), kalysiniini (63), (iso)korydiini (61), (iso)korydiini-*N*-oksidi (91), nornusiferiini (115), nanteniini (121), normanteniini (118), neolitsiini (128) ja norneolitsiini (122) m/z -arvoilla 314, 328, 342, 328, 342, 328, 312, 342, 358, 282, 340, 326, 324 ja 310. Lisäksi aporfinoidien toisen pääluokkaan, proaprofiineihin, kuuluva stefariini (106) m/z -arvolla 298 havaittiin muun muassa *C. parviflorum*, *G. dumetorum*, *L. hypoleuca*, *U. panamensis* ja *X. macantha* -kasvilajien lehdistä. Edellä mainittujen alkaloidien ilmentyminen molekyyliverkostossa on esitetty kuvassa 20. Erilaisia aporfinoideja esiintyi tulosten perusteella eniten *C. padiformis*, *C. panamensis* ja *G. dumetorum* -kasvilajien lehdistä (kuva 17 ja 18). Lisäksi havaittiin edellä mainittuja yhdisteitä vastaavia isomeerejä ja tunnistamattomia aporfinoidijohdannaisia (yhdisteet 3, 11, 19, 35, 36, 37, 39, 42, 52, 72, 74, 75, 86, 102, 109, 116, 119, 120, 127, 130 ja 133).



Kuva 20. Aporfinoidien 16, 29, 48, 56, 61, 63, 65, 77, 91, 106, 115, 118, 121, 122 ja 128 ilmentyminen molekyyliverkoston aporfinoidi-isokinoliiniiryhmittymässä. Alkaloidien numerointia vastaavat noodit on korostettu kuvassa punaisella ja ne vastaavat liitteen 6 numerointia.

Tetrahydroisokinoliinien (II) bentsyylijohdannaisille tyypillisiä fragmentteja, substituutiosta riippuen, olivat m/z 299 ($[M+H-(CH_3)_2NH]^+$) ja m/z 251 ($[M+H-(CH_3)_2NH-MeOH]^+$), ja näiden rakenteiden hajoamisesta syntyneet fragmentit m/z 175, 147 ja 137. Bentsyyli-tetrahydroisokinoliineihin kuuluvia alkaloideja olivat demetyylikoklauriini (4), koklauriini (14), *N*-metyylikoklauriini (17), dimetyylikoklauriini (97), armepaviini (12), *O*-metyyliarmepaviini (24), retikuliini (27) laudanosiini (80) ja demetyyllaudanosiini (55) m/z -arvoilla 272, 286, 300, 314, 314, 328, 330, 358 ja 344. Lisäksi havaittiin mahdollinen tetrahydroisokinoliini-monoterpenoidi-glykosidi ipekosidi (1) m/z -arvolla 556. Edellä mainittujen bentsyyli-tetrahydroisokinoliinien ilmentyminen molekyyliverkostossa on esitetty kuvassa 21. Eri tetrahydroisokinoliineja esiintyi tulosten perusteella eniten *C. padiformis*, *C. panamensis*, *G. dumetorum*, *O.*

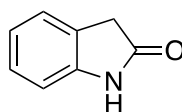
insularis ja *U. panamensis* kasvilajien lehdistä (kuva 17 ja 18). Lisäksi havaittiin edellä mainittuja yhdisteitä vastaavia isomeerejä ja tunnistamattomia tetrahydroisokinoliinijohdannaisia (yhdisteet **6**, **7**, **8**, **13**, **31**, **32**, **38**, **43**, **44**, **47**, **49**, **50**, **57**, **64**, **92**, **94** ja **95**).



Kuva 21. Bentsyylitetrahydroisokinoliinin **4**, **12**, **14**, **17**, **24**, **27**, **55**, **80**, ja **96** ilmentyminen molekyyliverkoston kahdessa eri yhdisteklusterissa. Alkaloidien numerointia vastaavat noodit on korostettu kuvassa punaisella ja ne vastaavat liitteen 6 numerointia.

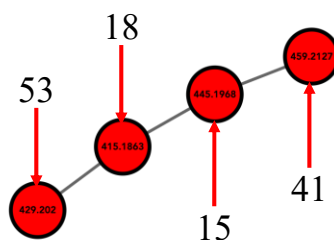
3.3.2 Indoli alkaloidit

Oksindoli alkaloidien terpenoidijohdannaiset (III) olivat lukumäärältään pienin tutkimuksessa karakterisoitu indoli alkaloidien alaluokka, jotka ovat perusrakenteeltaan indoli-2-oneja (kuva 22). Tyypillisiä fragmentteja havaituille yhdisteille olivat m/z 397 ($[M+H-CH_3OH]^+$) ja m/z 369 ($[M+H-CH_3OH-CO]^+$).⁷¹



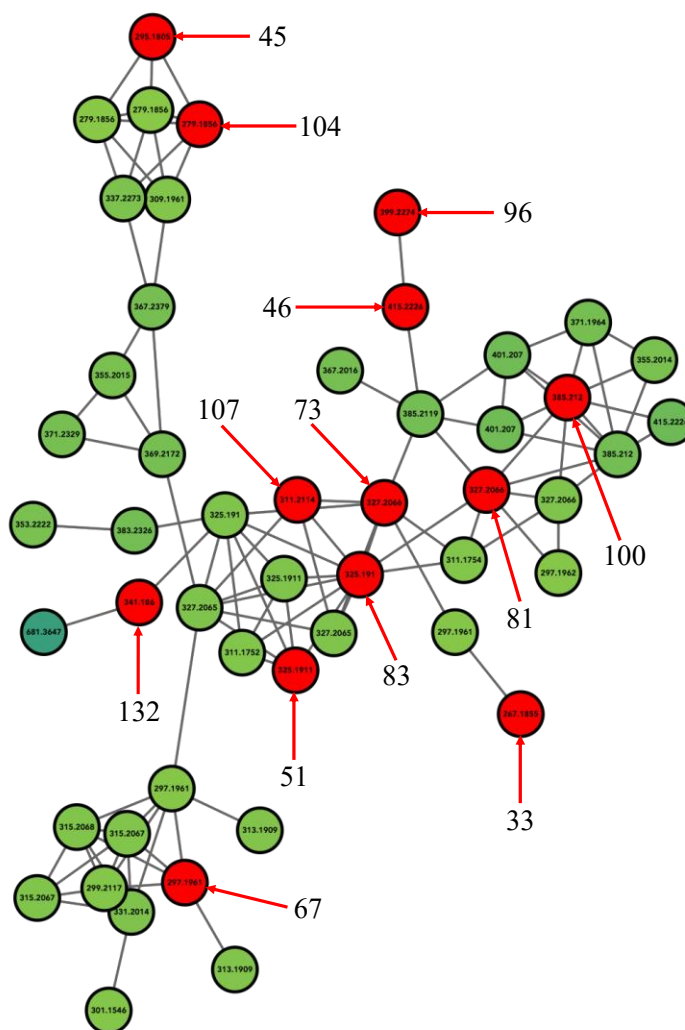
Kuva 22. Oksindolin kemiallinen rakenne.

Karakterisoidut monoterpenoidioksidolijohdannaiset olivat karapanaubiini (**53**) m/z 429 ja sen johdannaiset karapanaubiini-*N*-oksidi (**15**) m/z 445 ja demetyylikarapanaubiini (**18**) m/z 415. Lisäksi havaittiin tuntematon oksindolijohdannainen (**41**) m/z 459. Edellä mainittujen alkaloidien ilmentyminen molekyyliverkostossa on esitetty kuvassa 23. Oksindolijohdannaisia esiintyi tulosten perusteella eniten *A. spruceanum* -kasvilajin lehdissä (kuva 17 ja 18).



Kuva 23. Monoterpenoidioksidolien **53**, **18**, **15** ja **46** ilmentyminen molekyyliverkoston karapanaubiinijohdannaisten yhdisteklusterissa. Alkaloidien numerointia vastaavat noodit on korostettu kuvassa punaisella ja ne vastaavat liitteen 6 numerointia.

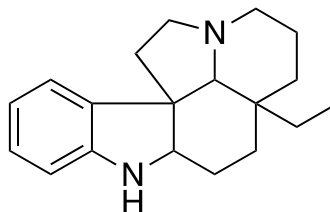
Monoterpenoidi-indolit (IV) olivat toinen suuri tutkimuksessa karakterisoitu alkaloidiryhmä. *Aspidosperma* -kasvisuvun lajeille tyypillinen monoterpenoidi-indoli, uleiini (**33**) m/z 327 ($[M + H]^+$), tunnistettiin alkaloidityypille ominaisten fragmenttien perusteella (m/z 238, 224, 210 ja 168).^{72,73} Samankaltaisen perusrakenteen omaavat affiniini (**51**) ja sen johdannainen affiniini-*N*-oksidi (**132**) havaittiin m/z -arvoilla 325 ja 341. Lisäksi löydettiin mahdollinen monoterpenoidi-indoli perisiini (**45**) m/z 279 ja sen johdannainen perisiini-*N*-oksidi (**104**) m/z 295. Iboga-monoterpenoidi-indoliaikaloideihin kuuluvat konofaryngiini (**96**), hydroksikonofaryngiini (**46**), ibogaiini (**107**), noribogaiini (**67**), alloibogaiini (**83**), voakristiini (**100**), iboksigaiini (**73**) ja iboluteiini (**81**) havaittiin m/z -arvoilla 399, 415, 311, 297, 325, 385, 327 ja 327. Sarpagaani-aimaliini-tyyppin monoterpenoidi-indoliaikaloideja edustavat aimaliini (**108**), 17-*O*-asetyylinoraimaliini (**110**) ja affinisiini (**111**) havaittiin m/z -arvoilla 327, 355 ja 309. Näiden monoterpenoidi-indolijohdannaisten ilmentyminen molekyyliverkostossa on esitetty kuvassa 24. Edellä mainituille alkaloidille havaittiin lisäksi joukko isomeerejä ja tunnistamattomia monoterpenoidi-indoliaikaloideja (yhdisteet **2**, **5**, **9**, **20**, **28**, **30**, **34**, **40**, **54**, **59**, **60**, **62**, **68**, **76**, **78**, **79**, **84**, **85**, **87**, **88**, **90**, **93**, **101**, **105**, **112**, **114**, **124**, **125**, **126** ja **131**). Monoterpenoidi-idoleita esiintyi tulosten perusteella erityisesti *T. arborea*, *T. guianensis* ja *T. gorgonae* -kasvilajien lehdissä (kuva 17 ja 18).



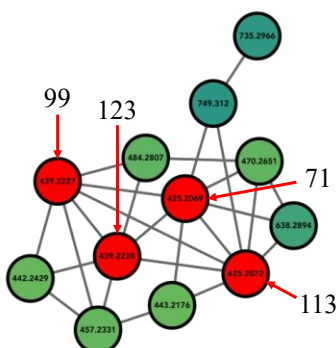
Kuva 24. Monoterpenoidi-indolijohdannaisten **33, 45, 46, 51, 67, 73, 81, 83, 96, 100, 107** ja **131** ilmentymisen molekyyliverkostossa. Alkaloidien numerointia vastaavat noodit on korostettu kuvassa punaisella ja ne vastaavat liitteen 6 numerointia.

Viimeinen havaittu indolijohdannaisten alaluokka olivat aspidosperma-monoterpenoidi-indolit (V), jotka jakavat yhdisteryhmälle tyypillisen, indolipohjaisen pentasyklisen rengasrakenteen (kuva 25).⁷³ Löydetyt yhdisteet olivat heptasykliset obskunervidiini (**71**) m/z 425 ja obskunerviini (**99**) m/z 439, sekä näitä vastaavat isomeerit (yhdisteet **113** ja **123**, m/z -arvoilla 425 ja 439).⁷⁴ Kyseisten aspidosperma-monoterpenoidi-indolijohdannaisten ilmentymisen molekyyliverkostossa on esitetty kuvassa 26. Edellä mainittujen alkaloidien lisäksi havaittiin joukko MS/MS-fragmentaation perusteella aspidosperma-monoterpenoidi-indolialkaloideihin kuuluvia metaboliotteja joita ei tunnistettu (yhdisteet **10, 22, 58, 69, 70, 89, 98** ja **103**).

Aspidoperma-tyypin alkaloideja esiintyi tulosten perusteella erityisesti nimikkolajiin kuuluvan *A. spruceanumin* ja lisäksi *T. arborean* lehdissä (kuva 17 ja 18).



Kuva 25. Aspidosperma-monoterpenoidi-indoli alkaloidien pentasyklinen perusrakenne.



Kuva 26. Aspidosperma-monoterpenoidi-indolijohdannaisten 71, 99, 113 ja 123 ilmentyminen molekyyliverkostossa. Alkaloidien numerointia vastaavat noodit on korostettu kuvassa punaisella ja ne vastaavat liitteen 6 numerointia.

4 Johtopäätökset

Tutkimuksen tarkoituksena oli kehittää laadukas ja tehokas UHPLC-HR-MS/MS-analyysimenetelmä alkaloidien molekyyliverkostoanalytiikkaan ja hyödyntää tätä menetelmää eri kasvilajien sisältämien alkaloidien karakterisointiin perinteisten menetelmien rinnalla. Tutkimus onnistui asetetussa tavoitteessaan hyvin ja lisäksi analyysimenetelmä toimi erinomaisesti myös muille erikoistuneille metaboliiteille alkaloidien ohella.

Alkaloidien kvantitointi ei onnistunut tutkimuksessa odotetulla tavalla IS:n toistettavuusongelman vuoksi ja tämä ongelma tulisikin ratkaista ennen molekyyliverkostoanalyysimetodin laajempaa käyttöä. Toistettavuusongelma ei kuitenkaan vaikuttanut alkaloidien karakterisointiin ja diversiteetin määrittämiseen kasvilajeista. Tutkimuksessa kehitetty menetelmä ei ole lopullinen, vaan alati kehittyvä

ja sitä tulee testata vielä uusilla kasvilajeilla, ja menetelmän parametreja on optimoitava näistä testeistä saatavien tulosten perusteella lisää.

GNPS-analyysiympäristössä luodun molekyyliverkoston hyödyntäminen yhdessä MZmine- ja Cytoscape-ohjelmien kanssa mahdollisti yhteensä 133 eri alkaloidin kartoittamisen todellisten alkaloidien indoli- ja isokinoliini-alaluokista, jotka ryhmittäytyivät pääsääntöisesti erittäin hyvin omiin yhdisteperheisiinsä verkostossa. Tämä osoittaa, miten potentiaalinen työkalu molekyyliverkosto pystyy olemaan ei-kohdehakuiseen metabolomiikan tuntemattomien ja tunnettujen metaboliittien tutkimuksessa, kun se valjastetaan hyödyntämään huipputason UHPLC-HR-MS/MS-instrumentilla tuotettua ja molekyyliverkostoanalytiikan vaatimukset huomioon ottavalla analyysimenetelmällä optimoitua LC-MS/MS-dataa. MS- ja MS/MS-spektrikirjastojen antamiin automaattisiin yhdisteiden karakterisointeihin kannattaa kuitenkin edelleen suhtautua kriittisesti ja tarkistaa aina karakterisoinnit manuaalisesti.

Ottaen huomioon kehitetyn, erittäin nopean UHPLC-HR-MS/MS-analyysimetodin, voidaan todeta molekyyliverkostoanalytiikan onnistuneen näytteiden kemiallisen diversiteetin kartoittamisessa erittäin hyvin, kuitenkin tunnustaen samalla mahdollisuuden vieläkin laadukkaampien verkostojen rakentamiseen, mikäli tehostetaan ja annetaan mahdollisuus monimutkaisten näytematriisien sisältämien yhdisteiden paremmalle kromatografiselle erottumiselle.

Molekyyliverkostojen ja muiden laajojen tietomäärien käsittelyyn kehitettyjen *in silico* -työkalujen käyttö tulee lisääntymään tulevaisuudessa huomattavasti, mutta prosessin on edelleen oltava valvottu ja lopullinen yhdisteiden karakterisointi on jatkossakin tarkistettava manuaalisesti. Alkaloidianalytiikassa verkostot pystyvät vaivattomasti osoittamaan rakenteelliset yhteneväisyydet ja niitä on jo otettu käyttöön muun muassa uusien psykoaktiivisten yhdisteiden löytämisessä ja testauksessa.⁷⁵ Ehkä suurimmat muutokset tulevat kohdistumaan uusien kehitettävien HR-MS-instrumenttien tarpeiden lisäksi verkostojen käyttöliittymiin ja ehkä tulemme näkemään lähivuosina molekyyliverkostoja virtuaalitodellisuudessa.

Viiteluettelo

- (1) Kukula-Koch, W. A. Widelski, J. Alkaloids. *Pharmacognosy*; Elsevier, 2017; 163–198. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802104-0.00009-3>.
- (2) Aniszewski, T. *Alkaloids - Secrets of Life: Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role*, 1. painos; Elsevier: Amsterdam; Boston, 2007.
- (3) Buckingham, J. *Dictionary of Alkaloids*, 1. painos; CRC Press: Boca Raton, FL, 2010.
- (4) Eagleson, M. *Concise Encyclopedia Chemistry*; de Gruyter: Berlin, 1994.
- (5) Pelletier, S. W. *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives. Vol. 11*; Wiley: New York, 1996.
- (6) Brode, W. R. Optical Rotation of Polarized Light by Chemical Compounds*. *J. Opt. Soc. Am.* **1951**, *41* (12), 987. <https://doi.org/10.1364/JOSA.41.000987>.
- (7) Roberts, M. F.; Wink, M. *Alkaloids: Biochemistry, Ecology, and Medicinal Applications*; Springer US: Boston, MA, 1998.
- (8) Hegnauer, R. Biochemistry, Distribution and Taxonomic Relevance of Higher Plant Alkaloids. *Phytochemistry* **1988**, *27* (8), 2423–2427. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(88\)87006-7](https://doi.org/10.1016/0031-9422(88)87006-7).
- (9) Hartmann, T. Herbivores. Their Interactions with Secondary Plant Metabolites, 2. painos, *Physiol Entomol* **1992**, *17* (3), 33–85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3032.1992.tb01027.x>.
- (10) Kar, A. *Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*; New Age International (P) Ltd.: New Delhi, 2007.
- (11) Chin, Y.-W.; Jones, W. P.; Waybright, T. J.; McCloud, T. G.; Rasoanaivo, P.; Cragg, G. M.; Cassady, J. M.; Kinghorn, A. D. Tropane Aromatic Ester Alkaloids from a Large-Scale Re-Collection of *Erythroxylum ervillei* Stem Bark Obtained in Madagascar. *J. Nat. Prod.* **2006**, *69* (3), 414–417. <https://doi.org/10.1021/np050366v>.
- (12) Konan, K. V.; Le, T. C.; Mateescu, M. A. Enhanced Solubility of Alkaloids by Complexation with Polycarboxylic Materials for Controlled Release Formulations: Case of Peschiera Fuchsiaefolia. *AAPS PharmSciTech* **2019**, *20* (3), 108. <https://doi.org/10.1208/s12249-019-1315-1>.
- (13) Isolation of Alkaloids. *Journal of Chromatography Library*; Elsevier, 1983; Vol.

-
- 23, 51–58. [https://doi.org/10.1016/S0301-4770\(08\)60904-5](https://doi.org/10.1016/S0301-4770(08)60904-5).
- (14) EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Schrenk, D.; Bignami, M.; Bodin, L.; Chipman, J. K.; del Mazo, J.; Hogstrand, C.; Hoogenboom, L. (Ron); Leblanc, J.; Nebbia, C. S.; Nielsen, E.; Ntzani, E.; Petersen, A.; Sand, S.; Schwerdtle, T.; Vleminckx, C.; Wallace, H.; Brimer, L.; Cottrill, B.; Dusemund, B.; Mulder, P.; Vollmer, G.; Binaglia, M.; Ramos Bordajandi, L.; Riolo, F.; Roldán-Torres, R.; Grasl-Kraupp, B. Risk Assessment of Glycoalkaloids in Feed and Food, in Particular in Potatoes and Potato-derived Products. *EFS2* **2020**, *18* (8). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.6222>.
- (15) Appendino, G. Capsaicin and Capsaicinoids. In *Modern Alkaloids*; Fattorusso, E., Tagliatalata-Scafati, O., Eds.; Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: Weinheim, Germany, 2007; 73–109. <https://doi.org/10.1002/9783527621071.ch4>.
- (16) Cordell, G. A. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach, Second edition P. M. Dewick. John Wiley and Sons, Ltd., *J. Nat. Prod.* **2002**, *65* (6), 952–952. <https://doi.org/10.1021/np0207217>.
- (17) Gaillard, Y.; Pepin, G. Poisoning by Plant Material: Review of Human Cases and Analytical Determination of Main Toxins by High-Performance Liquid Chromatography–(Tandem) Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications* **1999**, *733* (1–2), 181–229. [https://doi.org/10.1016/S0378-4347\(99\)00181-4](https://doi.org/10.1016/S0378-4347(99)00181-4).
- (18) *Companion Encyclopedia of the History of Medicine*, Bynum, W. F., Porter, R., Eds.; Routledge, 2013. <https://doi.org/10.4324/9781315002514>.
- (19) Ziegler, J.; Facchini, P. J.; Geißler, R.; Schmidt, J.; Ammer, C.; Kramell, R.; Voigtländer, S.; Gesell, A.; Pienkny, S.; Brandt, W. Evolution of Morphine Biosynthesis in Opium Poppy. *Phytochemistry* **2009**, *70* (15–16), 1696–1707. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.07.006>.
- (20) Habli, Z.; Toumieh, G.; Fatfat, M.; Rahal, O.; Gali-Muhtasib, H. Emerging Cytotoxic Alkaloids in the Battle against Cancer: Overview of Molecular Mechanisms. *Molecules* **2017**, *22* (2), 250. <https://doi.org/10.3390/molecules22020250>.
- (21) Dassonneville, L.; Wattez, N.; Mahieu, C.; Colson, P.; Houssier, C.; Frederich, M.; Tits, M.; Angenot, L.; Bailly, C. The Plant Alkaloid Usambarensine Intercalates into DNA and Induces Apoptosis in Human HL60 Leukemia Cells. *Anticancer Res*

-
- 1999, 19 (6B), 5245–5250.
- (22) Donovan, J. L.; DeVane, C. L. A Primer on Caffeine Pharmacology and Its Drug Interactions in Clinical Psychopharmacology. *Psychopharmacol Bull* **2001**, 35 (3), 30–48.
- (23) Irsfeld, M.; Spadafore, M.; Prüß, B. M. β -Phenylethylamine, a Small Molecule with a Large Impact. *Webmedcentral* **2013**, 4 (9).
- (24) Naser, F. J.; Mahieu, N. G.; Wang, L.; Spalding, J. L.; Johnson, S. L.; Patti, G. J. Two Complementary Reversed-Phase Separations for Comprehensive Coverage of the Semipolar and Nonpolar Metabolome. *Anal Bioanal Chem* **2018**, 410 (4), 1287–1297. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0768-x>.
- (25) The Human Serum Metabolome (HUSERMET) Consortium; Dunn, W. B.; Broadhurst, D.; Begley, P.; Zelena, E.; Francis-McIntyre, S.; Anderson, N.; Brown, M.; Knowles, J. D.; Halsall, A.; Haselden, J. N.; Nicholls, A. W.; Wilson, I. D.; Kell, D. B.; Goodacre, R. Procedures for Large-Scale Metabolic Profiling of Serum and Plasma Using Gas Chromatography and Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry. *Nat Protoc* **2011**, 6 (7), 1060–1083. <https://doi.org/10.1038/nprot.2011.335>.
- (26) Poole, C. F.; Lenca, N. Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Liquid Chromatography*; Elsevier, 2017; pp 91–123. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805393-5.00004-X>.
- (27) Scott, R. P. W. Modern Liquid Chromatography. *Chem. Soc. Rev.* **1992**, 21 (2), 137. <https://doi.org/10.1039/cs9922100137>.
- (28) Needham, S. R.; Brown, P. R.; Duff, K. Phenyl Ring Structures as Stationary Phases For the High Performance Liquid Chromatography-Electrospray Ionization Mass Spectrometric Analysis of Basic Pharmaceuticals. *Rapid Commun. Mass Spectrom* **1999**, No. 13, 2231–2236.
- (29) Walter, T. H.; Andrews, R. W. Recent Innovations in UHPLC Columns and Instrumentation. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **2014**, 63, 14–20. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2014.07.016>.
- (30) Schellinger, A. P.; Carr, P. W. Isocratic and Gradient Elution Chromatography: A Comparison in Terms of Speed, Retention Reproducibility and Quantitation. *Journal of Chromatography A* **2006**, 1109 (2), 253–266. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.01.047>.

-
- (31) Swartz, M. E. UPLC™: An Introduction and Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies* **2005**, *28* (7–8), 1253–1263. <https://doi.org/10.1081/JLC-200053046>.
- (32) Guillarme, D.; Ruta, J.; Rudaz, S.; Veuthey, J.-L. New Trends in Fast and High-Resolution Liquid Chromatography: A Critical Comparison of Existing Approaches. *Anal Bioanal Chem* **2010**, *397* (3), 1069–1082. <https://doi.org/10.1007/s00216-009-3305-8>.
- (33) Hu, Q.; Noll, R. J.; Li, H.; Makarov, A.; Hardman, M.; Graham Cooks, R. The Orbitrap: A New Mass Spectrometer. *J. Mass Spectrom.* **2005**, *40* (4), 430–443. <https://doi.org/10.1002/jms.856>.
- (34) Yang, L.; Amad, M.; Winnik, W. M.; Schoen, A. E.; Schweingruber, H.; Mylchreest, I.; Rudewicz, P. J. Investigation of an Enhanced Resolution Triple Quadrupole Mass Spectrometer for High-Throughput Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry Assays. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2002**, *16* (21), 2060–2066. <https://doi.org/10.1002/rcm.824>.
- (35) Nicholson, J. K.; Lindon, J. C. Metabonomics. *Nature* **2008**, *455* (7216), 1054–1056. <https://doi.org/10.1038/4551054a>.
- (36) Issaq, H. J.; Abbott, E.; Veenstra, T. D. Utility of Separation Science in Metabolomic Studies. *J. Sep. Sci.* **2008**, *31* (11), 1936–1947. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700601>.
- (37) Steene, J. C.; Lambert, W. E. Comparison of Matrix Effects in HPLC-MS/MS and UPLC-MS/MS Analysis of Nine Basic Pharmaceuticals in Surface Waters. *J Am Soc Mass Spectrom* **2008**, *19* (5), 713–718. <https://doi.org/10.1016/j.jasms.2008.01.013>.
- (38) Wang, X.; Sun, H.; Zhang, A.; Wang, P.; Han, Y. Ultra-Performance Liquid Chromatography Coupled to Mass Spectrometry as a Sensitive and Powerful Technology for Metabolomic Studies: Liquid Chromatography. *J. Sep. Science* **2011**, *34* (24), 3451–3459. <https://doi.org/10.1002/jssc.201100333>.
- (39) Watrous, J.; Roach, P.; Alexandrov, T.; Heath, B. S.; Yang, J. Y.; Kersten, R. D.; van der Voort, M.; Pogliano, K.; Gross, H.; Raaijmakers, J. M.; Moore, B. S.; Laskin, J.; Bandeira, N.; Dorrestein, P. C. Mass Spectral Molecular Networking of Living Microbial Colonies. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2012**, *109* (26), E1743–E1752. <https://doi.org/10.1073/pnas.1203689109>.

-
- (40) Fox Ramos, A. E.; Evanno, L.; Poupon, E.; Champy, P.; Beniddir, M. A. Natural Products Targeting Strategies Involving Molecular Networking: Different Manners, One Goal. *Nat. Prod. Rep.* **2019**, *36* (7), 960–980. <https://doi.org/10.1039/C9NP00006B>.
- (41) Yang, J. Y.; Sanchez, L. M.; Rath, C. M.; Liu, X.; Boudreau, P. D.; Bruns, N.; Glukhov, E.; Wodtke, A.; de Felicio, R.; Fenner, A.; Wong, W. R.; Linington, R. G.; Zhang, L.; Debonsi, H. M.; Gerwick, W. H.; Dorrestein, P. C. Molecular Networking as a Dereplication Strategy. *J. Nat. Prod.* **2013**, *76* (9), 1686–1699. <https://doi.org/10.1021/np400413s>.
- (42) Stein, S. E.; Scott, D. R. Optimization and Testing of Mass Spectral Library Search Algorithms for Compound Identification. *J Am Soc Mass Spectrom* **1994**, *5* (9), 859–866. [https://doi.org/10.1016/1044-0305\(94\)87009-8](https://doi.org/10.1016/1044-0305(94)87009-8).
- (43) Aron, A. T.; Gentry, E. C.; McPhail, K. L.; Nothias, L.-F.; Nothias-Esposito, M.; Bouslimani, A.; Petras, D.; Gauglitz, J. M.; Sikora, N.; Vargas, F.; van der Hoof, J. J. J.; Ernst, M.; Kang, K. B.; Aceves, C. M.; Caraballo-Rodríguez, A. M.; Koester, I.; Weldon, K. C.; Bertrand, S.; Roullier, C.; Sun, K.; Tehan, R. M.; Boya P., C. A.; Christian, M. H.; Gutiérrez, M.; Ulloa, A. M.; Tejada Mora, J. A.; Mojica-Flores, R.; Lakey-Beitia, J.; Vásquez-Chaves, V.; Zhang, Y.; Calderón, A. I.; Tayler, N.; Keyzers, R. A.; Tugizimana, F.; Ndlovu, N.; Aksenov, A. A.; Jarmusch, A. K.; Schmid, R.; Truman, A. W.; Bandeira, N.; Wang, M.; Dorrestein, P. C. Reproducible Molecular Networking of Untargeted Mass Spectrometry Data Using GNPS. *Nat Protoc* **2020**, *15* (6), 1954–1991. <https://doi.org/10.1038/s41596-020-0317-5>.
- (44) Wang, M.; Carver, J. J.; Phelan, V. V.; Sanchez, L. M.; Garg, N.; Peng, Y.; Nguyen, D. D.; Watrous, J.; Kaponov, C. A.; Luzzatto-Knaan, T.; Porto, C.; Bouslimani, A.; Melnik, A. V.; Meehan, M. J.; Liu, W.-T.; Crüsemann, M.; Boudreau, P. D.; Esquenazi, E.; Sandoval-Calderón, M.; Kersten, R. D.; Pace, L. A.; Quinn, R. A.; Duncan, K. R.; Hsu, C.-C.; Floros, D. J.; Gavilan, R. G.; Kleigrew, K.; Northen, T.; Dutton, R. J.; Parrot, D.; Carlson, E. E.; Aigle, B.; Michelsen, C. F.; Jelsbak, L.; Sohlenkamp, C.; Pevzner, P.; Edlund, A.; McLean, J.; Piel, J.; Murphy, B. T.; Gerwick, L.; Liaw, C.-C.; Yang, Y.-L.; Humpf, H.-U.; Maansson, M.; Keyzers, R. A.; Sims, A. C.; Johnson, A. R.; Sidebottom, A. M.; Sedio, B. E.; Klitgaard, A.; Larson, C. B.; Boya P, C. A.; Torres-Mendoza, D.; Gonzalez, D. J.; Silva, D. B.;

-
- Marques, L. M.; Demarque, D. P.; Pociute, E.; O'Neill, E. C.; Briand, E.; Helfrich, E. J. N.; Granatosky, E. A.; Glukhov, E.; Ryffel, F.; Houson, H.; Mohimani, H.; Kharbush, J. J.; Zeng, Y.; Vorholt, J. A.; Kurita, K. L.; Charusanti, P.; McPhail, K. L.; Nielsen, K. F.; Vuong, L.; Elfeki, M.; Traxler, M. F.; Engene, N.; Koyama, N.; Vining, O. B.; Baric, R.; Silva, R. R.; Mascuch, S. J.; Tomasi, S.; Jenkins, S.; Macherla, V.; Hoffman, T.; Agarwal, V.; Williams, P. G.; Dai, J.; Neupane, R.; Gurr, J.; Rodríguez, A. M. C.; Lamsa, A.; Zhang, C.; Dorrestein, K.; Duggan, B. M.; Almaliti, J.; Allard, P.-M.; Phapale, P.; Nothias, L.-F.; Alexandrov, T.; Litaudon, M.; Wolfender, J.-L.; Kyle, J. E.; Metz, T. O.; Peryea, T.; Nguyen, D.-T.; VanLeer, D.; Shinn, P.; Jadhav, A.; Müller, R.; Waters, K. M.; Shi, W.; Liu, X.; Zhang, L.; Knight, R.; Jensen, P. R.; Palsson, B. Ø.; Pogliano, K.; Lington, R. G.; Gutiérrez, M.; Lopes, N. P.; Gerwick, W. H.; Moore, B. S.; Dorrestein, P. C.; Bandeira, N. Sharing and Community Curation of Mass Spectrometry Data with Global Natural Products Social Molecular Networking. *Nat Biotechnol* **2016**, *34* (8), 828–837. <https://doi.org/10.1038/nbt.3597>.
- (45) Bairoch, A. The SWISS-PROT Protein Sequence Database and Its Supplement TrEMBL in 2000. *Nucleic Acids Research* **2000**, *28* (1), 45–48. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.45>.
- (46) Bouslimani, A.; Sanchez, L. M.; Garg, N.; Dorrestein, P. C. Mass Spectrometry of Natural Products: Current, Emerging and Future Technologies. *Nat. Prod. Rep.* **2014**, *31* (6), 718. <https://doi.org/10.1039/c4np00044g>.
- (47) Guthals, A.; Watrous, J. D.; Dorrestein, P. C.; Bandeira, N. The Spectral Networks Paradigm in High Throughput Mass Spectrometry. *Mol. BioSyst.* **2012**, *8* (10), 2535. <https://doi.org/10.1039/c2mb25085c>.
- (48) Bandeira, N.; Tsur, D.; Frank, A.; Pevzner, P. A. Protein Identification by Spectral Networks Analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **2007**, *104* (15), 6140–6145. <https://doi.org/10.1073/pnas.0701130104>.
- (49) Horai, H.; Arita, M.; Kanaya, S.; Nihei, Y.; Ikeda, T.; Suwa, K.; Ojima, Y.; Tanaka, K.; Tanaka, S.; Aoshima, K.; Oda, Y.; Kakazu, Y.; Kusano, M.; Tohge, T.; Matsuda, F.; Sawada, Y.; Hirai, M. Y.; Nakanishi, H.; Ikeda, K.; Akimoto, N.; Maoka, T.; Takahashi, H.; Ara, T.; Sakurai, N.; Suzuki, H.; Shibata, D.; Neumann, S.; Iida, T.; Tanaka, K.; Funatsu, K.; Matsuura, F.; Soga, T.; Taguchi, R.; Saito, K.; Nishioka, T. MassBank: A Public Repository for Sharing Mass Spectral Data for

-
- Life Sciences. *J. Mass Spectrom.* **2010**, *45* (7), 703–714. <https://doi.org/10.1002/jms.1777>.
- (50) Sawada, Y.; Nakabayashi, R.; Yamada, Y.; Suzuki, M.; Sato, M.; Sakata, A.; Akiyama, K.; Sakurai, T.; Matsuda, F.; Aoki, T.; Hirai, M. Y.; Saito, K. RIKEN Tandem Mass Spectral Database (ReSpect) for Phytochemicals: A Plant-Specific MS/MS-Based Data Resource and Database. *Phytochemistry* **2012**, *82*, 38–45. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.07.007>.
- (51) Lide, D. R. Fifty Years of the *Journal of Physical and Chemical Reference Data*. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **2021**, *50* (1), 010402. <https://doi.org/10.1063/5.0038318>.
- (52) Nothias, L. F.; Petras, D.; Schmid, R.; Dührkop, K.; Rainer, J.; Sarvepalli, A.; Protsyuk, I.; Ernst, M.; Tsugawa, H.; Fleischauer, M.; Aicheler, F.; Aksenov, A.; Alka, O.; Allard, P.-M.; Barsch, A.; Cachet, X.; Caraballo, M.; Da Silva, R. R.; Dang, T.; Garg, N.; Gauglitz, J. M.; Gurevich, A.; Isaac, G.; Jarmusch, A. K.; Kameník, Z.; Kang, K. B.; Kessler, N.; Koester, I.; Korf, A.; Gouellec, A. L.; Ludwig, M.; Christian, M. H.; McCall, L.-I.; McSayles, J.; Meyer, S. W.; Mohimani, H.; Morsy, M.; Moyne, O.; Neumann, S.; Neuweiger, H.; Nguyen, N. H.; Nothias-Esposito, M.; Paolini, J.; Phelan, V. V.; Pluskal, T.; Quinn, R. A.; Rogers, S.; Shrestha, B.; Tripathi, A.; van der Hooft, J. J. J.; Vargas, F.; Weldon, K. C.; Witting, M.; Yang, H.; Zhang, Z.; Zubeil, F.; Kohlbacher, O.; Böcker, S.; Alexandrov, T.; Bandeira, N.; Wang, M.; Dorrestein, P. C. *Feature-Based Molecular Networking in the GNPS Analysis Environment*; preprint; Bioinformatics, 2019. <https://doi.org/10.1101/812404>.
- (53) Frank, A. M.; Bandeira, N.; Shen, Z.; Tanner, S.; Briggs, S. P.; Smith, R. D.; Pevzner, P. A. Clustering Millions of Tandem Mass Spectra. *J. Proteome Res.* **2008**, *7* (1), 113–122. <https://doi.org/10.1021/pr070361e>.
- (54) Esposito, M.; Nothias, L.-F.; Nedev, H.; Gallard, J.-F.; Leyssen, P.; Retailleau, P.; Costa, J.; Roussi, F.; Iorga, B. I.; Paolini, J.; Litaudon, M. *Euphorbia Dendroides* Latex as a Source of Jatrophane Esters: Isolation, Structural Analysis, Conformational Study, and Anti-CHIKV Activity. *J. Nat. Prod.* **2016**, *79* (11), 2873–2882. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b00644>.
- (55) Cohen, L. J.; Kang, H.-S.; Chu, J.; Huang, Y.-H.; Gordon, E. A.; Reddy, B. V. B.; Ternei, M. A.; Craig, J. W.; Brady, S. F. Functional Metagenomic Discovery of

Bacterial Effectors in the Human Microbiome and Isolation of Commendamide, a GPCR G2A/132 Agonist. *Proc Natl Acad Sci USA* **2015**, *112* (35), E4825–E4834. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508737112>.

- (56) McDonald, D.; Hyde, E.; Debelius, J. W.; Morton, J. T.; Gonzalez, A.; Ackermann, G.; Aksenov, A. A.; Behsaz, B.; Brennan, C.; Chen, Y.; DeRight Goldasich, L.; Dorrestein, P. C.; Dunn, R. R.; Fahimipour, A. K.; Gaffney, J.; Gilbert, J. A.; Gogul, G.; Green, J. L.; Hugenholtz, P.; Humphrey, G.; Huttenhower, C.; Jackson, M. A.; Janssen, S.; Jeste, D. V.; Jiang, L.; Kelley, S. T.; Knights, D.; Kosciulek, T.; Ladau, J.; Leach, J.; Marotz, C.; Meleshko, D.; Melnik, A. V.; Metcalf, J. L.; Mohimani, H.; Montassier, E.; Navas-Molina, J.; Nguyen, T. T.; Peddada, S.; Pevzner, P.; Pollard, K. S.; Rahnavard, G.; Robbins-Pianka, A.; Sangwan, N.; Shorenstein, J.; Smarr, L.; Song, S. J.; Spector, T.; Swafford, A. D.; Thackray, V. G.; Thompson, L. R.; Tripathi, A.; Vázquez-Baeza, Y.; Vrbnac, A.; Wischmeyer, P.; Wolfe, E.; Zhu, Q.; Knight, R.; Mann, A. E.; Amir, A.; Frazier, A.; Martino, C.; Lebrilla, C.; Lozupone, C.; Lewis, C. M.; Raison, C.; Zhang, C.; Lauber, C. L.; Warinner, C.; Lowry, C. A.; Callewaert, C.; Bloss, C.; Willner, D.; Galzerani, D. D.; Gonzalez, D. J.; Mills, D. A.; Chopra, D.; Gevers, D.; Berg-Lyons, D.; Sears, D. D.; Wendel, D.; Lovelace, E.; Pierce, E.; TerAvest, E.; Bolyen, E.; Bushman, F. D.; Wu, G. D.; Church, G. M.; Saxe, G.; Holscher, H. D.; Ugrina, I.; German, J. B.; Caporaso, J. G.; Wozniak, J. M.; Kerr, J.; Ravel, J.; Lewis, J. D.; Suchodolski, J. S.; Jansson, J. K.; Hampton-Marcell, J. T.; Bobe, J.; Raes, J.; Chase, J. H.; Eisen, J. A.; Monk, J.; Clemente, J. C.; Petrosino, J.; Goodrich, J.; Gauglitz, J.; Jacobs, J.; Zengler, K.; Swanson, K. S.; Lewis, K.; Mayer, K.; Bittinger, K.; Dillon, L.; Zaramela, L. S.; Schriml, L. M.; Dominguez-Bello, M. G.; Jankowska, M. M.; Blaser, M.; Pirrung, M.; Minson, M.; Kurisu, M.; Ajami, N.; Gottel, N. R.; Chia, N.; Fierer, N.; White, O.; Cani, P. D.; Gajer, P.; Strandwitz, P.; Kashyap, P.; Dutton, R.; Park, R. S.; Xavier, R. J.; Mills, R. H.; Krajmalnik-Brown, R.; Ley, R.; Owens, S. M.; Klemmer, S.; Matamoros, S.; Mirarab, S.; Moorman, S.; Holmes, S.; Schwartz, T.; Eshoo-Anton, T. W.; Vigers, T.; Pandey, V.; Treuren, W. V.; Fang, X.; Zech Xu, Z.; Jarmusch, A.; Geier, J.; Reeve, N.; Silva, R.; Kopylova, E.; Nguyen, D.; Sanders, K.; Salido Benitez, R. A.; Heale, A. C.; Abramson, M.; Waldispühl, J.; Butyaev, A.; Drogaris, C.; Nazarova, E.; Ball, M.; Gunderson, B. American Gut: An Open Platform for Citizen Science Microbiome Research. *mSystems* **2018**, *3*

-
- (3), <https://doi.org/10.1128/mSystems.00031-18>.
- (57) Nothias, L.-F.; Nothias-Esposito, M.; da Silva, R.; Wang, M.; Protsyuk, I.; Zhang, Z.; Sarvepalli, A.; Leyssen, P.; Touboul, D.; Costa, J.; Paolini, J.; Alexandrov, T.; Litaudon, M.; Dorrestein, P. C. Bioactivity-Based Molecular Networking for the Discovery of Drug Leads in Natural Product Bioassay-Guided Fractionation. *J. Nat. Prod.* **2018**, *81* (4), 758–767. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.7b00737>.
- (58) Bolyen, E.; Rideout, J. R.; Dillon, M. R.; Bokulich, N. A.; Abnet, C. C.; Al-Ghalith, G. A.; Alexander, H.; Alm, E. J.; Arumugam, M.; Asnicar, F.; Bai, Y.; Bisanz, J. E.; Bittinger, K.; Brejnrod, A.; Brislawn, C. J.; Brown, C. T.; Callahan, B. J.; Caraballo-Rodríguez, A. M.; Chase, J.; Cope, E. K.; Da Silva, R.; Diener, C.; Dorrestein, P. C.; Douglas, G. M.; Durall, D. M.; Duvallet, C.; Edwardson, C. F.; Ernst, M.; Estaki, M.; Fouquier, J.; Gauglitz, J. M.; Gibbons, S. M.; Gibson, D. L.; Gonzalez, A.; Gorlick, K.; Guo, J.; Hillmann, B.; Holmes, S.; Holste, H.; Huttenhower, C.; Huttley, G. A.; Janssen, S.; Jarmusch, A. K.; Jiang, L.; Kaehler, B. D.; Kang, K. B.; Keefe, C. R.; Keim, P.; Kelley, S. T.; Knights, D.; Koester, I.; Kosciulek, T.; Kreps, J.; Langille, M. G. I.; Lee, J.; Ley, R.; Liu, Y.-X.; Loftfield, E.; Lozupone, C.; Maher, M.; Marotz, C.; Martin, B. D.; McDonald, D.; McIver, L. J.; Melnik, A. V.; Metcalf, J. L.; Morgan, S. C.; Morton, J. T.; Naimey, A. T.; Navas-Molina, J. A.; Nothias, L. F.; Orchanian, S. B.; Pearson, T.; Peoples, S. L.; Petras, D.; Preuss, M. L.; Pruesse, E.; Rasmussen, L. B.; Rivers, A.; Robeson, M. S.; Rosenthal, P.; Segata, N.; Shaffer, M.; Shiffer, A.; Sinha, R.; Song, S. J.; Spear, J. R.; Swafford, A. D.; Thompson, L. R.; Torres, P. J.; Trinh, P.; Tripathi, A.; Turnbaugh, P. J.; Ul-Hasan, S.; van der Hooft, J. J. J.; Vargas, F.; Vázquez-Baeza, Y.; Vogtmann, E.; von Hippel, M.; Walters, W.; Wan, Y.; Wang, M.; Warren, J.; Weber, K. C.; Williamson, C. H. D.; Willis, A. D.; Xu, Z. Z.; Zaneveld, J. R.; Zhang, Y.; Zhu, Q.; Knight, R.; Caporaso, J. G. Reproducible, Interactive, Scalable and Extensible Microbiome Data Science Using QIIME 2. *Nat Biotechnol* **2019**, *37* (8), 852–857. <https://doi.org/10.1038/s41587-019-0209-9>.
- (59) Petras, D. GNPS Documentation: FBMN with MZmine - Processing Steps <https://ccm.sucsd.github.io/GNPSDocumentation/featurebasedmolecularnetworking-with-mzmine2/>. (viitattu 5.5.2021)
- (60) Holman, J. D.; Tabb, D. L.; Mallick, P. Employing ProteoWizard to Convert Raw Mass Spectrometry Data. *Current Protocols in Bioinformatics* **2014**, *46* (1).

<https://doi.org/10.1002/0471250953.bi1324s46>.

- (61) Pedrioli, P. G. A.; Eng, J. K.; Hubley, R.; Vogelzang, M.; Deutsch, E. W.; Raught, B.; Pratt, B.; Nilsson, E.; Angeletti, R. H.; Apweiler, R.; Cheung, K.; Costello, C. E.; Hermjakob, H.; Huang, S.; Julian, R. K.; Kapp, E.; McComb, M. E.; Oliver, S. G.; Omenn, G.; Paton, N. W.; Simpson, R.; Smith, R.; Taylor, C. F.; Zhu, W.; Aebersold, R. A Common Open Representation of Mass Spectrometry Data and Its Application to Proteomics Research. *Nat Biotechnol* **2004**, *22* (11), 1459–1466. <https://doi.org/10.1038/nbt1031>.
- (62) Katajamaa, M.; Miettinen, J.; Oresic, M. MZmine: Toolbox for Processing and Visualization of Mass Spectrometry Based Molecular Profile Data. *Bioinformatics* **2006**, *22* (5), 634–636. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btk039>.
- (63) GNPS Public Spectral Libraries <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/libraries.jsp>. (viitattu 5.5.2021)
- (64) Rule, G. S.; Clark, Z. D.; Yue, B.; Rockwood, A. L. Correction for Isotopic Interferences between Analyte and Internal Standard in Quantitative Mass Spectrometry by a Nonlinear Calibration Function. *Anal. Chem.* **2013**, *85* (8), 3879–3885. <https://doi.org/10.1021/ac303096w>.
- (65) Bentley, K. W.; Cardwell, H. M. E. The Morphine-Thebaine Group of Alkaloids. Part V. The Absolute Stereochemistry of the Morphine, Benzyloisoquinoline, Aporphine, and Tetrahydroberberine Alkaloids. *J. Chem. Soc.* **1955**, 3252. <https://doi.org/10.1039/jr9550003252>.
- (66) Shamma, M.; Guinaudeau, H. Aporphinoids Alkaloids. *Nat. Prod. Rep.* **1985**, *2* (3), 227. <https://doi.org/10.1039/np9850200227>.
- (67) Atkinson, E. R.; Battista, S. P.; Ary, I. E.; Richardson, D. G.; Harris, L. S.; Dewey, W. L. Derivatives of Apomorphine and of Other N-Substituted Norapomorphines. *Journal of Pharmaceutical Sciences* **1976**, *65* (11), 1682–1685. <https://doi.org/10.1002/jps.2600651129>.
- (68) Soares, E. R.; da Silva, F. M. A.; de Almeida, R. A.; de Lima, B. R.; da Silva Filho, F. A.; Barison, A.; Koolen, H. H. F.; Pinheiro, M. L. B.; de Souza, A. D. L. Direct Infusion ESI-IT-MSⁿ Alkaloid Profile and Isolation of Tetrahydroharman and Other Alkaloids from *Bocageopsis Pleiosperma* Maas (Annonaceae): ESI-IT-MSⁿ Alkaloid Profile and Isolation of Tetrahydroharman. *Phytochem. Anal.* **2015**, *26* (5), 339–345. <https://doi.org/10.1002/pca.2568>.

-
- (69) Liu, Q.; Zhou, B.; Wang, X.; Ke, Y.; Jin, Y.; Yin, L.; Liang, X. Establishment of a Search Library about Benzylisoquinoline Alkaloids Based on Selective Separation on the Binaphthyl Column and Standard Analysis on C18 Column: Liquid Chromatography. *J. Sep. Science* **2012**, *35* (23), 3317–3325. <https://doi.org/10.1002/jssc.201200605>.
- (70) de Lima, B.; da Silva, F.; Soares, E.; de Almeida, R.; da Silva-Filho, F.; Barison, A.; Costa, E.; Koolen, H.; de Souza, A.; Pinheiro, M. L. Integrative Approach Based on Leaf Spray Mass Spectrometry, HPLC-DAD-MS/MS, and NMR for Comprehensive Characterization of Isoquinoline-Derived Alkaloids in Leaves of *Onychopetalum Amazonicum* R. E. Fr. *J. Braz. Chem. Soc.* **2020**. <https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190125>.
- (71) Kumar, S.; Singh, A.; Bajpai, V.; Srivastava, M.; Singh, B. P.; Kumar, B. Structural Characterization of Monoterpene Indole Alkaloids in Ethanolic Extracts of *Rauwolfia* Species by Liquid Chromatography with Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Pharmaceutical Analysis* **2016**, *6* (6), 363–373. <https://doi.org/10.1016/j.jpha.2016.04.008>.
- (72) Federlin, J.-D.; Maes, D.; Maes, R. *Aspidosperma Subincanum* I. Characterisation, Extraction of an Uleine-Enriched Fraction and Potential Health Hazard Due to the Contaminant Ellipticine. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2014**, *24* (3), 293–297. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.07.005>.
- (73) Joule, J. A.; Djerassi, C. 533. Alkaloid Studies. Part XLV. Mass Spectrometry in Structural and Stereochemical Problems. Part XLII. Some Aspects of the Chemistry and Mass Spectrometry of Uleine. *J. Chem. Soc.* **1964**, 2777. <https://doi.org/10.1039/jr9640002777>.
- (74) Brown, K. S.; Djerassi, Carl. Alkaloid Studies. XLVI. ¹ The Alkaloids of *Aspidosperma Obscurinervium* Azembuja. A New Class of Heptacyclic Indole Alkaloids. *J. Am. Chem. Soc.* **1964**, *86* (12), 2451–2463. <https://doi.org/10.1021/ja01066a031>.
- (75) Vincenti, F.; Montesano, C.; Di Ottavio, F.; Gregori, A.; Compagnone, D.; Sergi, M.; Dorrestein, P. Molecular Networking: A Useful Tool for the Identification of New Psychoactive Substances in Seizures by LC–HRMS. *Front. Chem.* **2020**, *8*, 572952. <https://doi.org/10.3389/fchem.2020.572952>.
- (76) Battersby, A. R.; Gregory, B.; Spencer, H.; Turner, J. C.; Janot, M.-M.; Potier, P.;

-
- Francois, P.; Levisalles, J. Constitution of Ipecoside: A Monoterpenoid Isoquinoline. *Chem. Commun. Lontoo* **1967**, No. 5, 219. <https://doi.org/10.1039/c19670000219>.
- (77) Torres-Vega, J.; Gómez-Alonso, S.; Pérez-Navarro, J.; Pastene-Navarrete, E. Green Extraction of Alkaloids and Polyphenols from *Peumus Boldus* Leaves with Natural Deep Eutectic Solvents and Profiling by HPLC-PDA-IT-MS/MS and HPLC-QTOF-MS/MS. *Plants* **2020**, *9* (2), 242. <https://doi.org/10.3390/plants9020242>.
- (78) Bhakuni, D. S.; Singh, A. N.; Jain, S. Biosynthesis of Oxyacanthine. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1978**, No. 11, 1318. <https://doi.org/10.1039/p19780001318>.
- (79) Quiroz-Carreño, S.; Céspedes-Acuña, C. L.; Seigler, D. S.; Alarcón-Enos, J. Identification of Structurally Diverse Alkaloids in *Talguenea Quinquinervia* (Gill. Et Hook) by Liquid Chromatography/Electrospray Ionisation Tandem Mass Spectroscopy and Insecticidal Activity. *Phytochemical Analysis* **2019**, *30* (6), 635–643. <https://doi.org/10.1002/pca.2836>.
- (80) Qing, Z.; Xu, Y.; Yu, L.; Liu, J.; Huang, X.; Tang, Z.; Cheng, P.; Zeng, J. Investigation of Fragmentation Behaviours of Isoquinoline Alkaloids by Mass Spectrometry Combined with Computational Chemistry. *Sci Rep* **2020**, *10* (1), 733. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-57406-7>.
- (81) Aguiar, G. P.; Wakabayashi, K. A. L.; Luz, G. F.; Oliveira, V. B.; Mathias, L.; Vieira, I. J. C.; Braz-Filho, R.; Crotti, A. E. M. Fragmentation of Plumeran Indole Alkaloids from *Aspidosperma Spruceanum* by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry: Fragmentation of PIAs from *A. Spruceanum*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2010**, *24* (3), 295–308. <https://doi.org/10.1002/rcm.4389>.
- (82) Stévigny, C.; Jiwan, J.-L. H.; Rozenberg, R.; de Hoffmann, E.; Quetin-Leclercq, J. Key Fragmentation Patterns of Aporphine Alkaloids by Electrospray Ionization with Multistage Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18* (5), 523–528. <https://doi.org/10.1002/rcm.1343>.
- (83) Buckingham, J. *Dictionary of Alkaloids*, CRC Press: Boca Raton, FL, 2010.
- (84) Carnevale Neto, F.; Andréo, M. A.; Raftery, D.; Lopes, J. L. C.; Lopes, N. P.; Castro-Gamboa, I.; Lameiro de Noronha Sales Maia, B. H.; Costa, E. V.; Vessecchi, R. Characterization of Aporphine Alkaloids by Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry and Density Functional Theory Calculations. *Rapid Commun Mass Spectrom* **2020**, *34* (S3). <https://doi.org/10.1002/rcm.8533>.

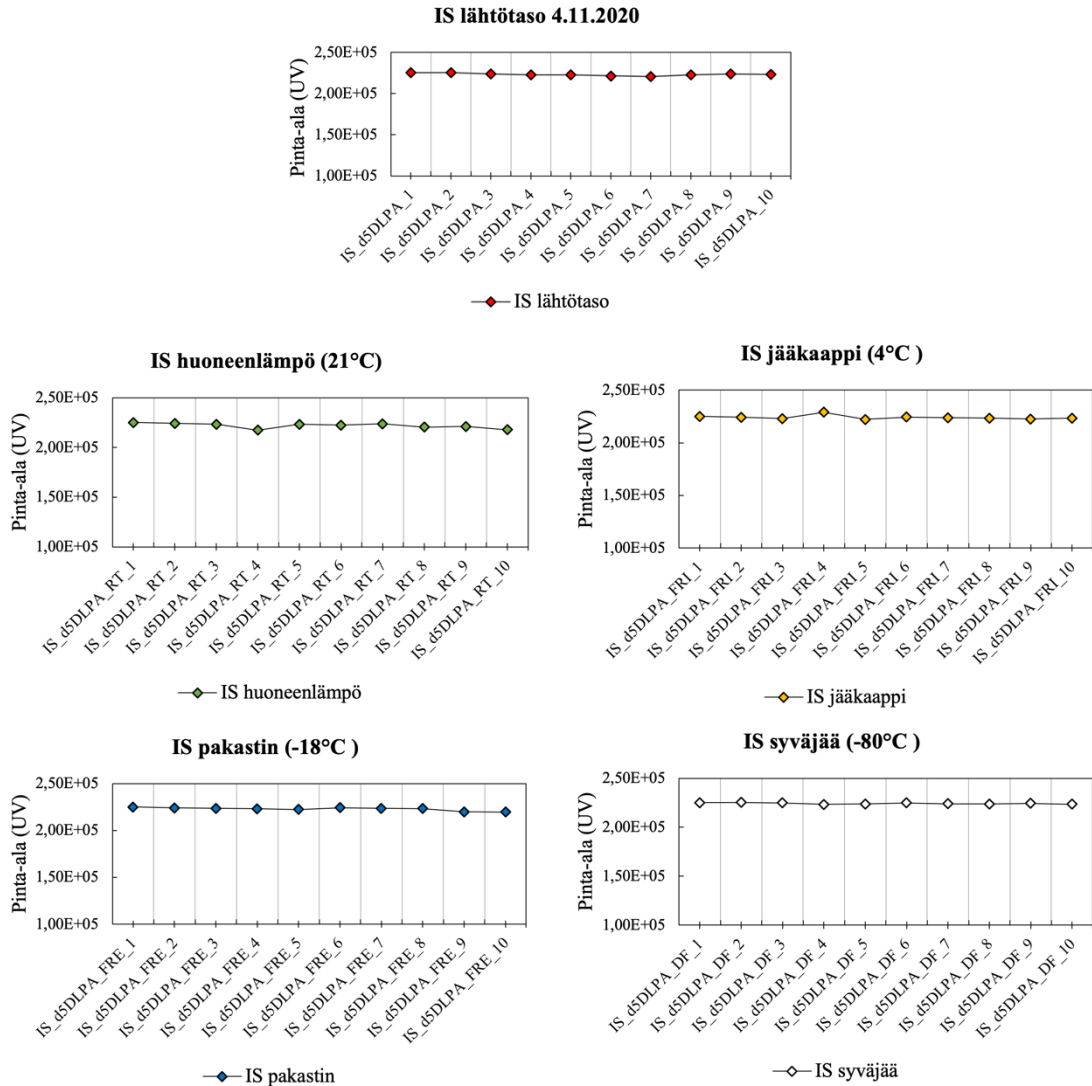
-
- (85) Sévenet, T.; Pusset, J. Alkaloids from the Medicinal Plants of New Caledonia. Kirjassa *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology*; Elsevier, 1996; Vol. 48, 1–73. [https://doi.org/10.1016/S1099-4831\(08\)60029-2](https://doi.org/10.1016/S1099-4831(08)60029-2).
- (86) Dolabela, M. F.; Póvoa, M. M.; Brandão, G. C.; Rocha, F. D.; Soares, L. F.; de Paula, R. C.; de Oliveira, A. B. Aspidosperma Species as Sources of Anti-Malarials: Uleine Is the Major Anti-Malarial Indole Alkaloid from *Aspidosperma Parvifolium* (Apocynaceae). *Malar J* **2015**, *14* (1), 498. <https://doi.org/10.1186/s12936-015-0997-4>.
- (87) Bading-Taika, B.; Akinyeke, T.; Magana, A. A.; Choi, J.; Ouanesisouk, M.; Torres, E. R. S.; Lione, L. A.; Maier, C. S.; Bobef, G. S.; Raber, J. S.; Miranda, C. L.; Stevens, J. F. Phytochemical Characterization of *Tabernanthe Iboga* Root Bark and Its Effects on Dysfunctional Metabolism and Cognitive Performance in High-Fat-Fed C57BL/6J Mice. *JFB* **2018**, *3*, 111–123. <https://doi.org/10.31665/JFB.2018.3154>.
- (88) Xie, S.; Shi, Y.; Wang, Y.; Wu, C.; Liu, W.; Feng, F.; Xie, N. Systematic Identification and Quantification of Tetracyclic Monoterpenoid Oxindole Alkaloids in *Uncaria Rhynchophylla* and Their Fragmentations in Q-TOF-MS Spectra. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* **2013**, *81–82*, 56–64. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.03.017>.
- (89) Reina, M.; Ruiz-Mesia, W.; Ruiz-Mesia, L.; Martínez-Díaz, R.; González-Coloma, A. Indole Alkaloids from *Aspidosperma Rigidum* and *A. Schultesii* and Their Antiparasitic Effects. *Z. Naturforsch. C* **2011**, *66*, 0225. <https://doi.org/10.5560/ZNC.2011.66c0225>.
- (90) Oliveira, V. B.; Vieira, I. J. C.; Braz-Filho, R.; Mathias, L.; Lopes, N. P.; Crotti, A. E. M.; Uchôa, D. E. de A. Spruceanumines A and B, Novel Plumeran Indole Alkaloids from *Aspidosperma Spruceanum* (Apocynaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* **2009**, *20* (4), 753–759. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532009000400019>.
- (91) Renner, U.; Prins, D. A. Voacanga-Alkaloide III. Voacristin: Identität mit Voacangarin und Abbau zu Iboxygain und Ibogain. *Experientia* **1959**, *15* (12), 456–457. <https://doi.org/10.1007/BF02158249>.
- (92) Fournet, A.; Ferreira, M. E.; Rojas de Arias, A.; Guy, I.; Guinaudeau, H.; Heinzen, H. Phytochemical and Antiprotozoal Activity of *Ocotea Lancifolia*. *Fitoterapia* **2007**, *78* (5), 382–384. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2007.03.003>.

-
- (93) Dembitsky, V. M.; Glorizova, T. A.; Poroikov, V. V. Naturally Occurring Plant Isoquinoline *N*-Oxide Alkaloids: Their Pharmacological and SAR Activities. *Phytomedicine* **2015**, *22* (1), 183–202. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.11.002>.
- (94) Exley, R.; Iturriaga-Vásquez, P.; Lukas, R. J.; Sher, E.; Cassels, B. K.; Bermudez, I. Evaluation of Benzyltetrahydroisoquinolines as Ligands for Neuronal Nicotinic Acetylcholine Receptors: Isoquinoline Inhibitors of Nicotinic Receptors. *British Journal of Pharmacology* **2005**, *146* (1), 15–24. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706307>.
- (95) Tang, B.-Q.; Wang, W.-J.; Huang, X.-J.; Li, G.-Q.; Wang, L.; Jiang, R.-W.; Yang, T.-T.; Shi, L.; Zhang, X.-Q.; Ye, W.-C. Iboga-Type Alkaloids from *Ervatamia Officinalis*. *J. Nat. Prod.* **2014**, *77* (8), 1839–1846. <https://doi.org/10.1021/np500240b>.
- (96) Gorpenchenko, T. Y.; Grigorchuk, V. P.; Fedoreyev, S. A.; Tarbeeva, D. V.; Tchernoded, G. K.; Bulgakov, V. P. Stepharine Production in Morphogenic Cell Cultures of *Stephania Glabra* (ROXB.) Miers. *Plant Cell Tiss Organ Cult* **2017**, *128* (1), 67–76. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-1083-5>.
- (97) Zocoler, M. A.; Oliveira, A. J. B. de; Sarragiotto, M. H.; Grzesiuk, V. L.; Vidotti, G. J. Qualitative Determination of Indole Alkaloids of *Tabernaemontana Fuchsiaefolia* (Apocynaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* **2005**, *16* (6b), 1372–1377. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532005000800011>.
- (98) Arens, H.; Borbe, H.; Ulbrich, B.; Stöckigt, J. Detection of Pericine, a New CNS-Active Indole Alkaloid from *Picralima Nitida* Cell Suspension Culture by Opiate Receptor Binding Studies. *Planta Med* **1982**, *46* (12), 210–214. <https://doi.org/10.1055/s-2007-971216>.
- (99) Sheludko, Yu.; Gerasimenko, I.; Unger, M.; Kostenyuk, I.; Stoeckigt, J. Induction of Alkaloid Diversity in Hybrid Plant Cell Cultures. *Plant Cell Reports* **1999**, *18* (11), 911–918. <https://doi.org/10.1007/s002990050683>.
- (100) de Fátima Costa Santos, M.; Dutra, L. M.; Regina de Souza Moraes, V.; Barison, A.; Costa, E. V. Aporphine Alkaloids from the Stem Bark of *Guatteria Pogonopus* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology* **2015**, *60*, 106–109. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2015.04.011>.

Liitteet

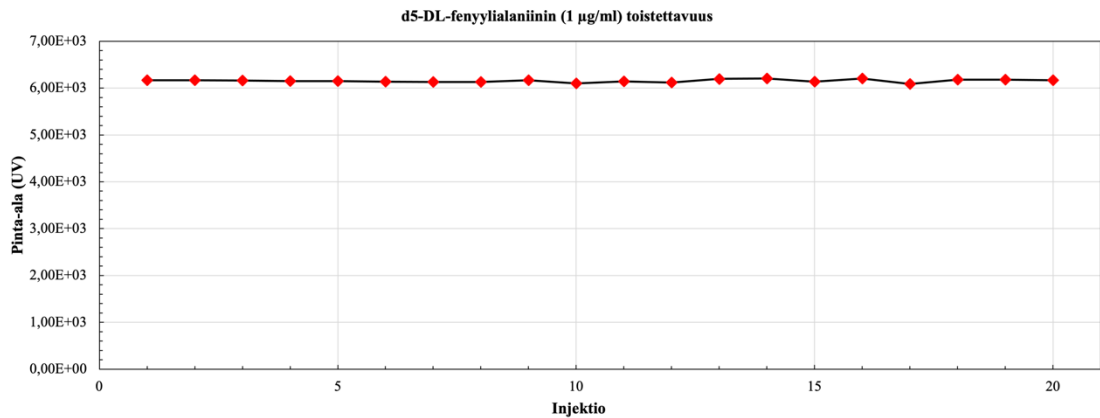
- Liite 1. Sisäisen standardin kantaliuoksen stabiiliuden seuranta**
- Liite 2. Sisäisen standardin toistettavuuden seuranta**
- Liite 3. Sisäisen ja ulkoisen standardin laimennossarjat**
- Liite 4. Ulkoisen standardin toistettavuuden seuranta**
- Liite 5. Kasvinäytteet**
- Liite 6. Alkaloidien karakterisointitaulukko**

Liite 1. Sisäisen standardin kantaliuoksen stabiiliuden seuranta



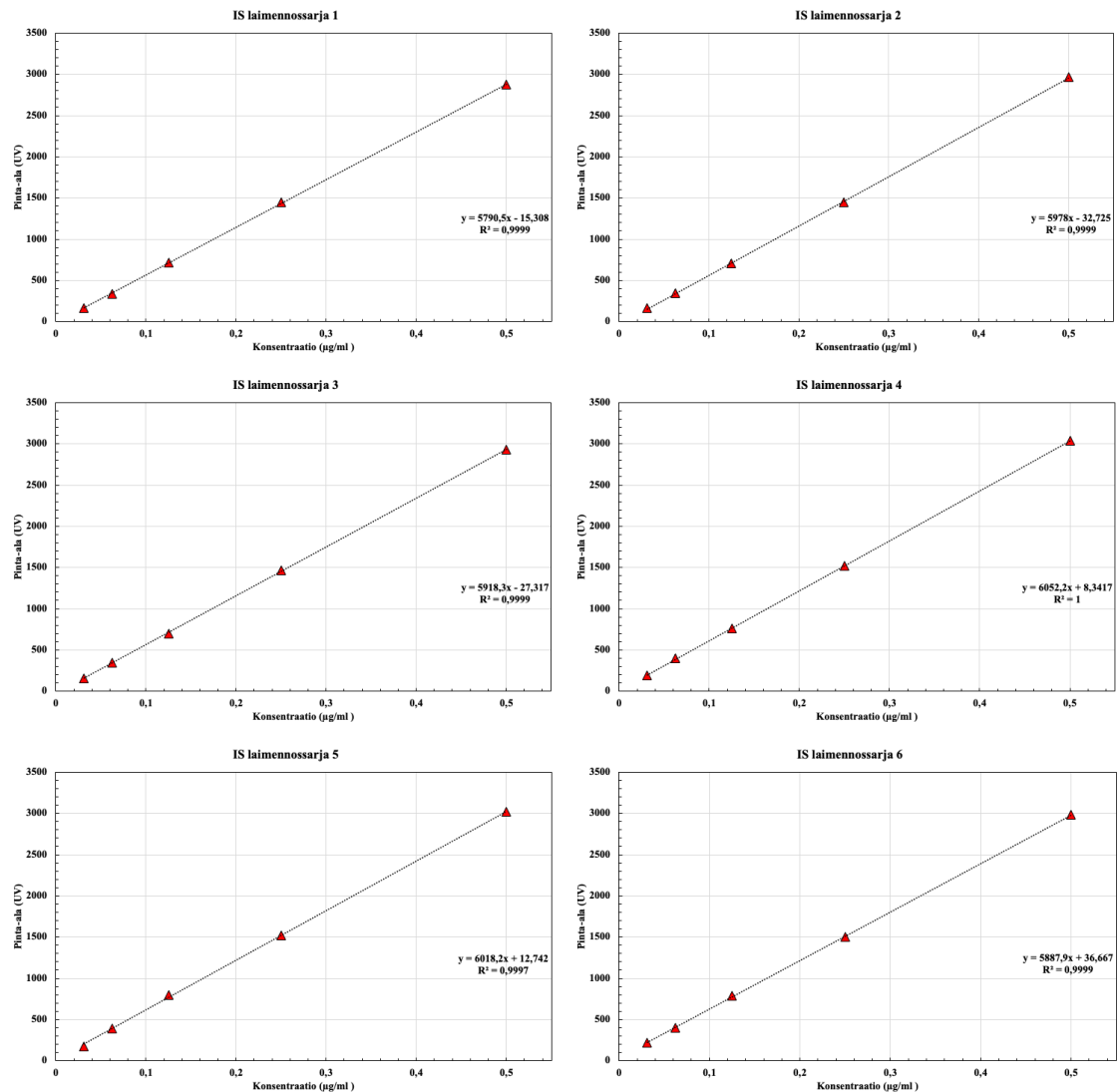
Liitekuva 1. D5-DL-fenyylialaniinin 100 µg/ml:ssa kantaliuoksen stabiiliuden seuranta neljässä eri säilytysolosuhteessa: huoneenlämmössä (21°C), jääkaapissa (4°C), pakastimessa (-18°C) ja syväjäähässä (-80°C). Lähtötasoanalyysi tehtiin 4.11.2020, jossa selvitettiin kantaliuoksen lähtötaso 10 peräkkäisen injektion keskiarvona (keskihajonta injektioiden välillä oli 0,57 %). Seuraavat analyysit tehtiin 11.11.2020 (kuvaajien injektio 1-5) ja 20.11.2020 (kuvaajien injektio 6-10). DAD-detektorilla mitatut UV-pinta-alat integroitiin aallonpituudella 209 nm. Eluutiogradientti oli sama kuin luvussa 2.3.1 kuvattu. Molempien päivien säilytysolosuhteiden viiden injektion keskiarvoa verrattiin 4.11.2020 mitattuun lähtötasoon ja lisäksi tarkasteltiin keskihajontaa päivien sisällä. Huoneenlämmössä säilytetyn liuoksen pitoisuus oli laskenut 0,94% (keskihajonta 1,19%), jääkaapissa säilytetyn 0,01% (keskihajonta 0,88%), pakastimessa säilytetyn 0,43% (keskihajonta 0,88%) ja syväjäähässä säilytetyn 0,03% (keskihajonta 0,45%) 20.11.2020 mennessä. Tulosten ja myös käytännöllisyyden perusteella analyysieihin valmistettu kantaliuos säilytettiin täten jääkaapissa.

Liite 2. Sisäisen standardin toistettavuuden seuranta

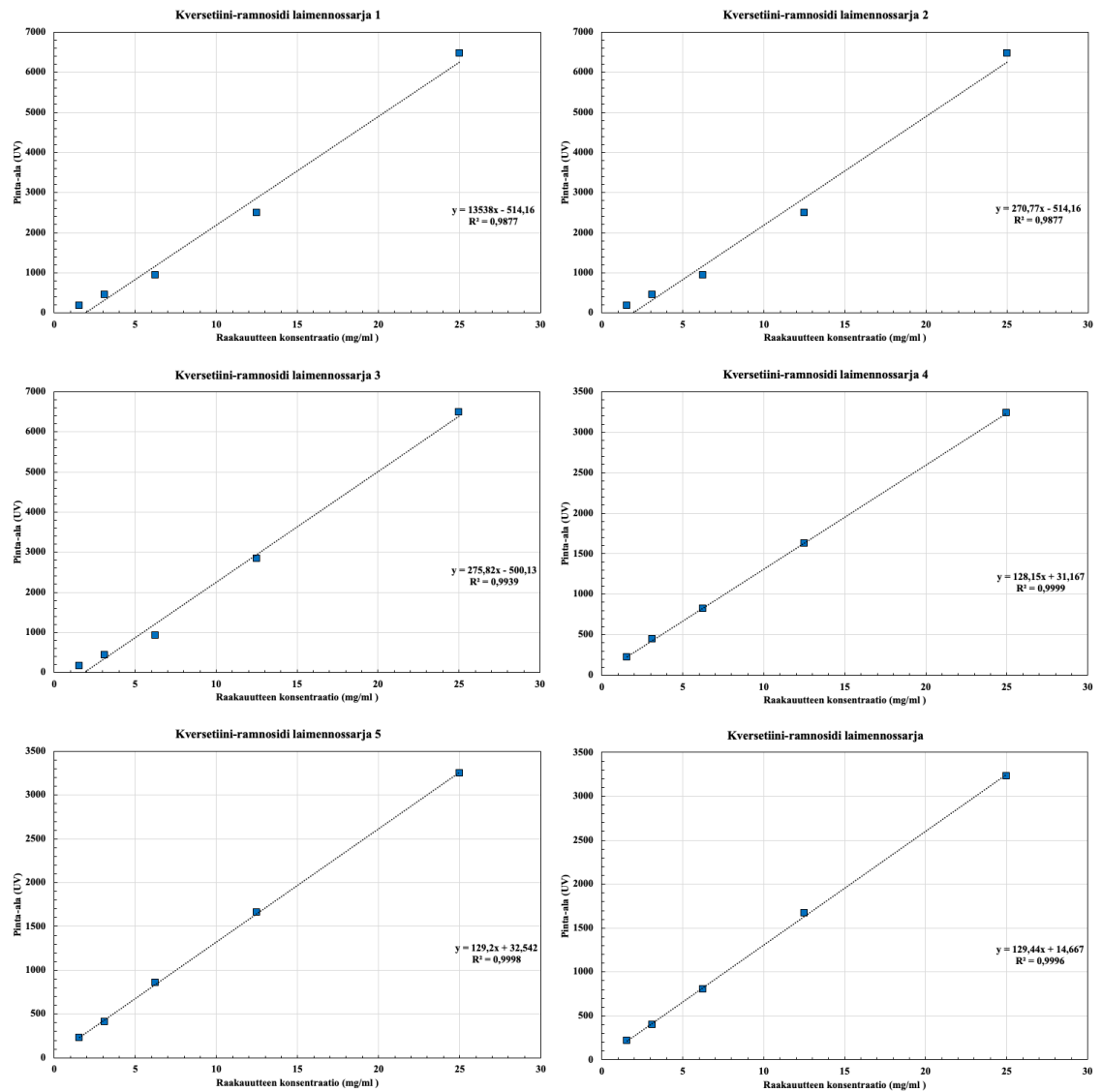


Liitekuva 2. D5-DL-fenyylialaniinin analyysin toistettavuuden seuranta näytteitä vastaavassa 1 µg/ml:ssa konsentraatiossa, 3 mM:ssa HCl (aq.) -liuoksessa, mitattuna luvussa 2.1 kuvatulla tavalla valmistetusta ulkoisesta standardista, 20 injektioita aikana. DAD-detektorilla mitatut UV-pinta-alat integroitiin aallonpituudella 209 nm. Eluutiogradientti oli sama kuin luvussa 2.3.1 kuvattu. IS:n toistettavuus oli erittäin hyvä, keskihajonnan ollessa vain 0,50 % koko analyysin aikana.

Liite 3. Sisäisen ja ulkoisen standardin laimennossarjat

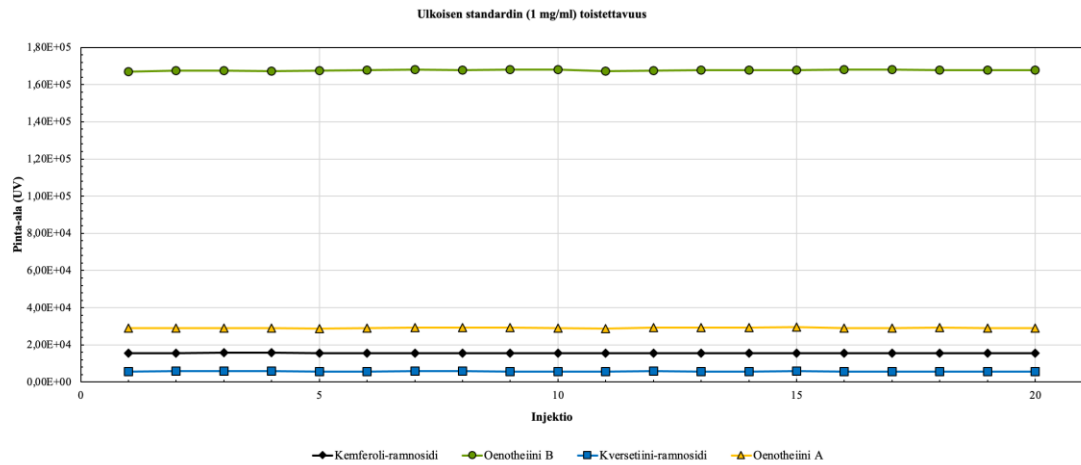


Liitekuva 3. D5-DL-fenyylialaniinin laimennossarjat valmistettuna 3 mM:seen HCl (aq.) -liuokseen (laimennossarjat 1-3) ja 8% asetonitriiliin 3 mM:seen HCl (aq.) -liuokseen (laimennossarjat 4-6) 3 kolmella rinnakkaisella injektiolla. Asetonitriilin konsentraation nostaminen ei vaikuttanut d5-DL-fenyylialaniinin pysyvyyteen liuoksessa merkittävästi.



Liitekuva 4. Ulkoisen standardin sisältämän kversetiini-ramnosidin laimennossarjat valmistettuna 3 mM:seen HCl (aq.) -liuokseen (laimennossarjat 1-3) ja 8% asetonitriiliin 3 mM:seen HCl (aq.) -liuokseen (laimennossarjat 4-6) 3 kolmella rinnakkaisella injektiolla. Myöhemmin eluotuvien lipofiilisempien metaboliittien, kuten kversetiini-ramnosidin, liukoisuutta pystyttiin tulosten perusteella parantamaan nostamalla asetonitriilin konsentraatiota ilman, että aiemmin eluotuvien yhdisteiden laimennossarjoissa, kuten d5-DL-fenyylialaniinilla (liitekuva 3), havaittiin merkittävää muutosta.

Liite 4. Ulkoisen standardin toistettavuuden seuranta



Liitekuva 5. Ulkoisen standardin raakauutteet toistettavuuden seuranta *C. angustifoliumin* raakauutteesta 20 injektioita aikana. Analyysissä seurattiin neljää raakauutteen yhdistettä: oenotheiini B:tä, oenotheiini A:ta, kversetiini-ramnosidia ja kemferoli-ramnosidia. Raakauutteen konsentraatio oli 1 mg/ml:ssa ja liuos oli tehty 3 mM:seen HCl (aq.) -liuokseen. Oenotheiini B:n keskihajonta injektioiden välillä oli 0,17%, oenotheiini A:n 0,65%, kversetiiniramnosidin 0,41% ja kemferoliramnosidin myös 0,41%. DAD-detektorilla mitatut UV-pinta-alat integroitiin aallonpituudella 280 nm (oenotheiini B ja oenotheiini A) ja 340 nm (kversetiiniramnosidi ja kemferoliramnosidi).

Liite 5. Kasvinäytteet

Liitetaulukko 1. Tutkimuksessa analysoitujen näytteiden näytenimet, niitä vastaavat kasvilajit, keräyspäivämäärä ja analyysiä varten punnitun kylmäkuivatun kasvimateriaalin paino.

Näytenimi	Kasvilaji	Keräyspäivä	Punnittu määrä (mg)
Panama-ERC 1	<i>Andira inermis</i>	8.4.2017	20,20
Panama-ERC 2	<i>Andira inermis</i>	8.4.2017	20,20
Panama-ERC 3	<i>Andira inermis</i>	25.2.2017	20,40
Panama-ERC 4	<i>Andira inermis</i>	25.2.2017	19,90
Panama-ERC 5	<i>Andira inermis</i>	4.4.2017	20,20
Panama-ERC 6	<i>Apeiba membranacea</i>	8.4.2017	19,50
Panama-ERC 7	<i>Apeiba membranacea</i>	17.3.2017	20,40
Panama-ERC 8	<i>Apeiba membranacea</i>	4.4.2017	19,80
Panama-ERC 9	<i>Apeiba membranacea</i>	12.4.2017	19,90
Panama-ERC 10	<i>Apeiba membranacea</i>	26.4.2017	19,70
Panama-ERC 11	<i>Aspidosperma spruceanum</i>	8.4.2017	19,60
Panama-ERC 12	<i>Aspidosperma spruceanum</i>	8.4.2017	20,20
Panama-ERC 13	<i>Aspidosperma spruceanum</i>	8.4.2017	20,00
Panama-ERC 14	<i>Aspidosperma spruceanum</i>	1.2.2017	19,90
Panama-ERC 15	<i>Beilschmiedia pendula</i>	12.4.2017	19,60
Panama-ERC 16	<i>Beilschmiedia pendula</i>	20.2.2017	19,60
Panama-ERC 17	<i>Beilschmiedia pendula</i>	19.4.2017	19,60
Panama-ERC 18	<i>Beilschmiedia pendula</i>	19.4.2017	20,50
Panama-ERC 19	<i>Brosimum guianense</i>	4.4.2017	20,35
Panama-ERC 20	<i>Brosimum guianense</i>	12.4.2017	19,50
Panama-ERC 21	<i>Brosimum guianense</i>	12.4.2017	20,30
Panama-ERC 22	<i>Brosimum guianense</i>	25.2.2017	20,40
Panama-ERC 23	<i>Brosimum guianense</i>	12.4.2017	20,20
Panama-ERC 24	<i>Brosimum utile</i>	20.2.2017	19,80
Panama-ERC 25	<i>Brosimum utile</i>	25.2.2017	19,60
Panama-ERC 26	<i>Brosimum utile</i>	20.2.2017	19,80
Panama-ERC 27	<i>Brosimum utile</i>	1.2.2017	19,90
Panama-ERC 28	<i>Brosimum utile</i>	1.2.2017	19,80
Panama-ERC 29	<i>Brosimum utile</i>	1.2.2017	20,10
Panama-ERC 30	<i>Carapa guianensis</i>	25.2.2017	20,40
Panama-ERC 31	<i>Carapa guianensis</i>	25.2.2017	20,15
Panama-ERC 32	<i>Carapa guianensis</i>	4.4.2017	20,40
Panama-ERC 33	<i>Carapa guianensis</i>	1.2.2017	19,60
Panama-ERC 34	<i>Carapa guianensis</i>	25.1.2017	20,20
Panama-ERC 35	<i>Cespedesia spathulata</i>	4.4.2017	20,21

Näytenimi	Kasvilaji	Keräyspäivä	Punnittu määrä (mg)
Panama-ERC 36	<i>Cespedesia spathulata</i>	25.2.2017	19,90
Panama-ERC 37	<i>Cespedesia spathulata</i>	12.4.2017	20,40
Panama-ERC 38	<i>Cespedesia spathulata</i>	4.4.2017	19,60
Panama-ERC 39	<i>Cespedesia spathulata</i>	26.4.2017	19,50
Panama-ERC 40	<i>Chrysophyllum argenteum</i>	12.4.2017	20,10
Panama-ERC 41	<i>Chrysophyllum argenteum</i>	12.4.2017	20,10
Panama-ERC 42	<i>Chrysophyllum argenteum</i>	4.4.2017	20,00
Panama-ERC 43	<i>Chrysophyllum argenteum</i>	1.2.2017	19,90
Panama-ERC 44	<i>Chrysophyllum argenteum</i>	8.4.2017	20,20
Panama-ERC 45	<i>Coccoloba padiformis</i>	25.1.2017	19,70
Panama-ERC 46	<i>Coccoloba padiformis</i>	8.4.2017	19,60
Panama-ERC 47	<i>Crementosperma panamensis</i>	12.4.2017	19,70
Panama-ERC 48	<i>Crementosperma panamensis</i>	8.4.2017	20,13
Panama-ERC 49	<i>Crementosperma panamensis</i>	19.4.2017	20,30
Panama-ERC 50	<i>Crementosperma panamensis</i>	19.4.2017	19,70
Panama-ERC 51	<i>Crementosperma panamensis</i>	19.4.2017	19,70
Panama-ERC 52	<i>Crementosperma panamensis</i>	19.4.2017	20,20
Panama-ERC 53	<i>Crossopetalum parviflorum</i>	21.4.2017	20,40
Panama-ERC 54	<i>Crossopetalum parviflorum</i>	1.2.2017	2,05
Panama-ERC 55	<i>Dendropanax arboreus</i>	8.4.2017	19,80
Panama-ERC 56	<i>Dendropanax arboreus</i>	4.4.2017	19,55
Panama-ERC 57	<i>Dendropanax arboreus</i>	25.2.2017	19,63
Panama-ERC 58	<i>Dendropanax arboreus</i>	4.4.2017	20,18
Panama-ERC 59	<i>Dendropanax arboreus</i>	4.4.2017	19,85
Panama-ERC 60	<i>Dussia atropurpurea</i>	12.4.2017	19,61
Panama-ERC 61	<i>Dussia atropurpurea</i>	1.2.2017	20,37
Panama-ERC 62	<i>Dussia atropurpurea</i>	4.4.2017	20,27
Panama-ERC 63	<i>Dussia atropurpurea</i>	1.2.2017	19,96
Panama-ERC 64	<i>Dussia atropurpurea</i>	12.4.2017	19,70
Panama-ERC 65	<i>Euterpe precatoria</i>	25.2.2017	19,97
Panama-ERC 66	<i>Euterpe precatoria</i>	20.2.2017	19,83
Panama-ERC 67	<i>Euterpe precatoria</i>	8.4.2017	20,25
Panama-ERC 68	<i>Euterpe precatoria</i>	19.4.2017	19,59
Panama-ERC 69	<i>Euterpe precatoria</i>	19.4.2017	19,61
Panama-ERC 70	<i>Garcinia madruno</i>	17.3.2017	19,80
Panama-ERC 71	<i>Garcinia madruno</i>	20.2.2017	19,89
Panama-ERC 72	<i>Garcinia madruno</i>	1.2.2017	20,31
Panama-ERC 73	<i>Garcinia madruno</i>	1.2.2017	20,03
Panama-ERC 74	<i>Garcinia madruno</i>	4.4.2017	20,04
Panama-ERC 75	<i>Guarea sherman</i>	25.2.2017	20,30
Panama-ERC 76	<i>Guarea sherman</i>	17.3.2017	20,00

Näytenimi	Kasvilaji	Keräyspäivä	Punnittu määrä (mg)
Panama-ERC 77	<i>Guarea sherman</i>	1.2.2017	19,79
Panama-ERC 78	<i>Guarea sherman</i>	1.2.2017	20,36
Panama-ERC 79	<i>Guarea sherman</i>	1.2.2017	19,91
Panama-ERC 80	<i>Guatteria dumetorum</i>	17.3.2017	19,83
Panama-ERC 81	<i>Guatteria dumetorum</i>	25.2.2017	20,29
Panama-ERC 82	<i>Guatteria dumetorum</i>	1.2.2017	20,27
Panama-ERC 83	<i>Guatteria dumetorum</i>	1.2.2017	20,29
Panama-ERC 84	<i>Guatteria dumetorum</i>	1.2.2017	19,94
Panama-ERC 85	<i>Heisteria acuminata</i>	4.4.2017	19,97
Panama-ERC 86	<i>Heisteria acuminata</i>	4.4.2017	19,72
Panama-ERC 87	<i>Heisteria acuminata</i>	4.4.2017	20,43
Panama-ERC 88	<i>Heisteria acuminata</i>	1.2.2017	19,99
Panama-ERC 89	<i>Heisteria acuminata</i>	26.4.2017	20,23
Panama-ERC 90	<i>Humirialstrum diguense</i>	12.4.2017	19,93
Panama-ERC 91	<i>Humirialstrum diguense</i>	1.2.2017	19,99
Panama-ERC 92	<i>Humirialstrum diguense</i>	4.4.2017	19,66
Panama-ERC 93	<i>Humirialstrum diguense</i>	19.4.2017	20,27
Panama-ERC 94	<i>Humirialstrum diguense</i>	19.4.2017	19,99
Panama-ERC 95	<i>Inga goldmanii</i>	1.2.2017	20,33
Panama-ERC 96	<i>Inga goldmanii</i>	8.4.2017	20,46
Panama-ERC 97	<i>Inga goldmanii</i>	19.4.2017	19,78
Panama-ERC 98	<i>Inga goldmanii</i>	26.4.2017	20,13
Panama-ERC 99	<i>Inga goldmanii</i>	21.4.2017	19,85
Panama-ERC 100	<i>Inga multijuga</i>	8.4.2017	20,13
Panama-ERC 101	<i>Inga multijuga</i>	1.2.2017	20,16
Panama-ERC 102	<i>Inga multijuga</i>	19.4.2017	19,70
Panama-ERC 103	<i>Inga multijuga</i>	21.4.2017	20,44
Panama-ERC 104	<i>Inga multijuga</i>	21.4.2017	20,46
Panama-ERC 105	<i>Jacaranda copaia</i>	8.4.2017	20,30
Panama-ERC 106	<i>Jacaranda copaia</i>	1.2.2017	19,93
Panama-ERC 107	<i>Jacaranda copaia</i>	4.4.2017	20,18
Panama-ERC 108	<i>Jacaranda copaia</i>	19.4.2017	19,98
Panama-ERC 109	<i>Jacaranda copaia</i>	21.4.2017	20,23
Panama-ERC 110	<i>Lacistema aggregatum</i>	25.2.2017	19,78
Panama-ERC 111	<i>Lacistema aggregatum</i>	12.4.2017	20,10
Panama-ERC 112	<i>Lacistema aggregatum</i>	12.4.2017	20,10
Panama-ERC 113	<i>Lacistema aggregatum</i>	1.2.2017	20,20
Panama-ERC 114	<i>Lacistema aggregatum</i>	12.4.2017	20,20
Panama-ERC 115	<i>Licania hypoleuca</i>	8.4.2017	20,10
Panama-ERC 116	<i>Licania hypoleuca</i>	12.4.2017	19,80

Näytenimi	Kasvilaji	Keräyspäivä	Punnittu määrä (mg)
Panama-ERC 117	<i>Licania hypoleuca</i>	8.4.2017	20,40
Panama-ERC 118	<i>Licania hypoleuca</i>	4.4.2017	20,30
Panama-ERC 119	<i>Licania hypoleuca</i>	25.1.2017	20,10
Panama-ERC 120	<i>Licania hypoleuca</i>	19.4.2017	19,70
Panama-ERC 121	<i>Lonchocarpus heptaphyllus</i>	4.4.2017	20,50
Panama-ERC 122	<i>Lonchocarpus heptaphyllus</i>	25.2.2017	20,40
Panama-ERC 123	<i>Lonchocarpus heptaphyllus</i>	12.4.2017	20,40
Panama-ERC 124	<i>Lonchocarpus heptaphyllus</i>	21.4.2017	19,60
Panama-ERC 125	<i>Lonchocarpus heptaphyllus</i>	21.4.2017	20,30
Panama-ERC 126	<i>Lozania pittieri</i>	8.4.2017	19,90
Panama-ERC 127	<i>Lozania pittieri</i>	25.2.2017	19,80
Panama-ERC 128	<i>Lozania pittieri</i>	12.4.2017	19,90
Panama-ERC 129	<i>Lozania pittieri</i>	1.2.2017	19,60
Panama-ERC 130	<i>Lozania pittieri</i>	25.1.2017	20,00
Panama-ERC 131	<i>Maquira guianensis</i>	1.2.2017	19,80
Panama-ERC 132	<i>Maquira guianensis</i>	25.2.2017	20,10
Panama-ERC 133	<i>Maquira guianensis</i>	21.4.2017	20,50
Panama-ERC 134	<i>Maquira guianensis</i>	26.4.2017	20,30
Panama-ERC 135	<i>Maquira guianensis</i>	26.4.2017	20,40
Panama-ERC 136	<i>Maranthes panamensis</i>	12.4.2017	20,10
Panama-ERC 137	<i>Maranthes panamensis</i>	1.2.2017	19,90
Panama-ERC 138	<i>Maranthes panamensis</i>	19.4.2017	19,50
Panama-ERC 139	<i>Maranthes panamensis</i>	26.4.2017	19,80
Panama-ERC 140	<i>Maranthes panamensis</i>	19.4.2017	19,50
Panama-ERC 141	<i>Marila laxiflora</i>	20.2.2017	19,50
Panama-ERC 142	<i>Marila laxiflora</i>	1.2.2017	20,00
Panama-ERC 143	<i>Marila laxiflora</i>	25.2.2017	20,00
Panama-ERC 144	<i>Marila laxiflora</i>	25.2.2017	20,20
Panama-ERC 145	<i>Marila laxiflora</i>	1.2.2017	20,00
Panama-ERC 146	<i>Meliosma glabrata</i>	25.1.2017	20,50
Panama-ERC 147	<i>Meliosma glabrata</i>	17.3.2017	19,90
Panama-ERC 148	<i>Melisioma glabrata</i>	8.4.2017	20,20
Panama-ERC 149	<i>Miconia ligulata</i>	1.2.2017	19,60
Panama-ERC 150	<i>Miconia ligulata</i>	8.4.2017	20,10
Panama-ERC 151	<i>Miconia ligulata</i>	8.4.2017	20,30
Panama-ERC 152	<i>Miconia ligulata</i>	19.4.2017	20,00
Panama-ERC 153	<i>Miconia ligulata</i>	19.4.2017	20,10
Panama-ERC 154	<i>Miconia -suku</i>	8.4.2017	20,40
Panama-ERC 155	<i>Miconia -suku</i>	1.2.2017	19,80
Panama-ERC 156	<i>Miconia -suku</i>	19.4.2017	20,30
Panama-ERC 157	<i>Miconia -suku</i>	26.4.2017	19,50

Näytteenimi	Kasvilaji	Keräyspäivä	Punnittu määrä (mg)
Panama-ERC 158	<i>Miconia</i> -suku	26.4.2017	19,90
Panama-ERC 159	<i>Mortoniiodendron anisophyllum</i>	25.2.2017	20,10
Panama-ERC 160	<i>Mortoniiodendron anisophyllum</i>	17.3.2017	19,90
Panama-ERC 161	<i>Mortoniiodendron anisophyllum</i>	25.1.2017	19,50
Panama-ERC 162	<i>Mortoniiodendron anisophyllum</i>	19.4.2017	20,50
Panama-ERC 163	<i>Mortoniiodendron anisophyllum</i>	21.4.2017	20,40
Panama-ERC 164	<i>Mouriri myrtilloides</i>	8.4.2017	20,30
Panama-ERC 165	<i>Mouriri myrtilloides</i>	12.4.2017	19,80
Panama-ERC 166	<i>Mouriri myrtilloides</i>	12.4.2017	20,50
Panama-ERC 167	<i>Mouriri myrtilloides</i>	12.4.2017	20,30
Panama-ERC 168	<i>Mouriri myrtilloides</i>	25.1.2017	19,80
Panama-ERC 169	<i>Myrciaria</i> -suku	12.4.2017	20,00
Panama-ERC 170	<i>Myrciaria</i> -suku	4.4.2017	20,30
Panama-ERC 171	<i>Myrciaria</i> -suku	1.2.2017	20,10
Panama-ERC 172	<i>Myrciaria</i> -suku	19.4.2017	19,60
Panama-ERC 173	<i>Myrciaria</i> -suku	19.4.2017	20,40
Panama-ERC 174	<i>Ocotea insularis</i>	4.4.2017	19,70
Panama-ERC 175	<i>Ocotea insularis</i>	1.2.2017	20,00
Panama-ERC 176	<i>Ocotea insularis</i>	17.3.2017	19,70
Panama-ERC 177	<i>Ocotea insularis</i>	17.3.2017	19,80
Panama-ERC 178	<i>Ocotea insularis</i>	17.3.2017	20,10
Panama-ERC 179	<i>Oenocarpus mapora</i>	4.4.2017	20,00
Panama-ERC 180	<i>Oenocarpus mapora</i>	4.4.2017	20,26
Panama-ERC 181	<i>Oenocarpus mapora</i>	25.2.2017	20,12
Panama-ERC 182	<i>Oenocarpus mapora</i>	25.2.2017	19,97
Panama-ERC 183	<i>Oenocarpus mapora</i>	20.2.2017	19,72
Panama-ERC 184	<i>Perebea xanthochyma</i>	20.2.2017	19,56
Panama-ERC 185	<i>Perebea xanthochyma</i>	20.2.2017	19,57
Panama-ERC 186	<i>Perebea xanthochyma</i>	20.2.2017	19,77
Panama-ERC 187	<i>Perebea xanthochyma</i>	1.2.2017	20,44
Panama-ERC 188	<i>Perebea xanthochyma</i>	1.2.2017	19,71
Panama-ERC 189	<i>Poulsenia armata</i>	8.4.2017	20,38
Panama-ERC 190	<i>Poulsenia armata</i>	25.1.2017	19,66
Panama-ERC 191	<i>Poulsenia armata</i>	8.4.2017	20,00
Panama-ERC 192	<i>Poulsenia armata</i>	4.4.2017	20,19
Panama-ERC 193	<i>Poulsenia armata</i>	8.4.2017	19,71
Panama-ERC 194	<i>Pourouma bicolor</i>	8.4.2017	20,10
Panama-ERC 195	<i>Pourouma bicolor</i>	25.2.2017	20,33
Panama-ERC 196	<i>Pourouma bicolor</i>	25.2.2017	20,42
Panama-ERC 197	<i>Pourouma bicolor</i>	4.4.2017	20,20
Panama-ERC 198	<i>Pourouma bicolor</i>	17.3.2017	19,92

Näytteenimi	Kasvilaji	Keräyspäivä	Punnittu määrä (mg)
Panama-ERC 199	<i>Prestoea decurrens</i>	8.4.2017	20,27
Panama-ERC 200	<i>Prestoea decurrens</i>	4.4.2017	20,36
Panama-ERC 201	<i>Prestoea decurrens</i>	17.3.2017	20,17
Panama-ERC 202	<i>Prestoea decurrens</i>	17.3.2017	20,43
Panama-ERC 203	<i>Prestoea decurrens</i>	26.4.2017	19,78
Panama-ERC 204	<i>Protium panamense</i>	25.2.2017	20,22
Panama-ERC 205	<i>Protium panamense</i>	1.2.2017	20,22
Panama-ERC 206	<i>Protium panamense</i>	25.2.2017	20,08
Panama-ERC 207	<i>Protium panamense</i>	17.3.2017	19,76
Panama-ERC 208	<i>Protium panamense</i>	1.2.2017	19,79
Panama-ERC 209	<i>Protium panamense</i>	1.2.2017	20,20
Panama-ERC 210	<i>Sapium</i> -suku	12.4.2017	20,20
Panama-ERC 211	<i>Sapium</i> -suku	12.4.2017	20,14
Panama-ERC 212	<i>Sapium</i> -suku	8.4.2017	19,80
Panama-ERC 213	<i>Sapium</i> -suku	21.4.2017	19,70
Panama-ERC 214	<i>Sapium</i> -suku	21.4.2017	19,83
Panama-ERC 215	<i>Simarouba amara</i>	4.4.2017	19,50
Panama-ERC 216	<i>Simarouba amara</i>	12.4.2017	20,13
Panama-ERC 217	<i>Simarouba amara</i>	12.4.2017	20,45
Panama-ERC 218	<i>Simarouba amara</i>	20.2.2017	20,20
Panama-ERC 219	<i>Simarouba amara</i>	8.4.2017	19,93
Panama-ERC 220	<i>Socratea exorrhiza</i>	25.2.2017	20,37
Panama-ERC 221	<i>Socratea exorrhiza</i>	25.2.2017	19,75
Panama-ERC 222	<i>Socratea exorrhiza</i>	1.2.2017	19,89
Panama-ERC 223	<i>Socratea exorrhiza</i>	20.2.2017	20,18
Panama-ERC 224	<i>Socratea exorrhiza</i>	25.2.2017	19,92
Panama-ERC 225	<i>Tabernaemontana arborea</i>	8.4.2017	20,09
Panama-ERC 226	<i>Tabernaemontana arborea</i>	12.4.2017	19,83
Panama-ERC 227	<i>Tabernaemontana arborea</i>	1.2.2017	20,48
Panama-ERC 228	<i>Tabernaemontana arborea</i>	8.4.2017	20,33
Panama-ERC 229	<i>Tabernaemontana arborea</i>	19.4.2017	19,91
Panama-ERC 230	<i>Tapirira guianensis</i>	25.2.2017	19,59
Panama-ERC 231	<i>Tapirira guianensis</i>	25.2.2017	20,15
Panama-ERC 232	<i>Tapirira guianensis</i>	25.2.2017	20,14
Panama-ERC 233	<i>Tapirira guianensis</i>	25.1.2017	20,38
Panama-ERC 234	<i>Tapirira guianensis</i>	25.2.2017	20,29
Panama-ERC 235	<i>Tetrochidium gorgonae</i>	12.4.2017	19,54
Panama-ERC 236	<i>Tetrochidium gorgonae</i>	8.4.2017	19,54
Panama-ERC 237	<i>Tetrochidium gorgonae</i>	8.4.2017	20,08
Panama-ERC 238	<i>Tetrochidium gorgonae</i>	25.1.2017	19,57
Panama-ERC 239	<i>Tetrochidium gorgonae</i>	12.4.2017	19,63

Näytenimi	Kasvilaji	Keräyspäivä	Punnittu määrä (mg)
Panama-ERC 240	<i>Tetrorchidium gorgonae</i>	19.4.2017	19,53
Panama-ERC 241	<i>Theobroma bernoullii</i>	20.2.2017	19,52
Panama-ERC 242	<i>Theobroma bernoullii</i>	4.4.2017	19,96
Panama-ERC 243	<i>Theobroma bernoullii</i>	25.2.2017	19,73
Panama-ERC 244	<i>Theobroma bernoullii</i>	1.2.2017	20,50
Panama-ERC 245	<i>Theobroma bernoullii</i>	17.3.2017	20,19
Panama-ERC 246	<i>Thevetia ahouai</i>	20.2.2017	20,04
Panama-ERC 247	<i>Tocoyena pittieri</i>	4.4.2017	20,00
Panama-ERC 248	<i>Tocoyena pittieri</i>	25.2.2017	20,06
Panama-ERC 249	<i>Tocoyena pittieri</i>	1.2.2017	20,21
Panama-ERC 250	<i>Tocoyena pittieri</i>	26.4.2017	20,15
Panama-ERC 251	<i>Tocoyena pittieri</i>	26.4.2017	20,21
Panama-ERC 252	<i>Tovomita longifolia</i>	25.2.2017	19,90
Panama-ERC 253	<i>Tovomita longifolia</i>	25.2.2017	20,37
Panama-ERC 254	<i>Tovomita longifolia</i>	4.4.2017	20,41
Panama-ERC 255	<i>Tovomita longifolia</i>	17.3.2017	20,19
Panama-ERC 256	<i>Tovomita longifolia</i>	4.4.2017	19,65
Panama-ERC 257	<i>Tovomita stylosa</i>	1.2.2017	20,40
Panama-ERC 258	<i>Tovomita stylosa</i>	1.2.2017	20,34
Panama-ERC 259	<i>Tovomita stylosa</i>	1.2.2017	19,85
Panama-ERC 260	<i>Tovomita stylosa</i>	25.1.2017	19,74
Panama-ERC 261	<i>Tovomita stylosa</i>	25.1.2017	19,80
Panama-ERC 262	<i>Tovomita stylosa</i>	25.1.2017	20,26
Panama-ERC 263	<i>Trichilia tuberculata</i>	8.4.2017	20,08
Panama-ERC 264	<i>Trichilia tuberculata</i>	21.4.2017	19,82
Panama-ERC 265	<i>Unonopsis panamensis</i>	20.2.2017	20,06
Panama-ERC 266	<i>Unonopsis panamensis</i>	1.2.2017	19,93
Panama-ERC 267	<i>Unonopsis panamensis</i>	1.2.2017	20,00
Panama-ERC 268	<i>Unonopsis panamensis</i>	1.2.2017	20,01
Panama-ERC 269	<i>Unonopsis panamensis</i>	1.2.2017	19,75
Panama-ERC 270	<i>Unonopsis panamensis</i>	1.2.2017	19,78
Panama-ERC 271	<i>Virola elongata</i>	8.4.2017	19,45
Panama-ERC 272	<i>Virola elongata</i>	8.4.2017	19,85
Panama-ERC 273	<i>Virola elongata</i>	4.4.2017	20,41
Panama-ERC 274	<i>Virola elongata</i>	20.2.2017	19,83
Panama-ERC 275	<i>Virola elongata</i>	17.3.2017	19,96
Panama-ERC 276	<i>Virola elongata</i>	12.4.2017	19,85
Panama-ERC 277	<i>Virola elongata</i>	12.4.2017	19,61
Panama-ERC 278	<i>Virola multiflora</i>	25.2.2017	20,21
Panama-ERC 279	<i>Virola multiflora</i>	12.4.2017	20,14
Panama-ERC 280	<i>Virola multiflora</i>	8.4.2017	19,81

Näyttenimi	Kasvilaji	Keräyspäivä	Punnittu määrä (mg)
Panama-ERC 281	<i>Viola multiflora</i>	1.2.2017	19,91
Panama-ERC 282	<i>Viola multiflora</i>	26.4.2017	20,20
Panama-ERC 283	<i>Viola sebifera</i>	25.2.2017	20,01
Panama-ERC 284	<i>Viola sebifera</i>	17.3.2017	19,83
Panama-ERC 285	<i>Viola sebifera</i>	8.4.2017	20,29
Panama-ERC 286	<i>Viola sebifera</i>	8.4.2017	19,80
Panama-ERC 287	<i>Viola sebifera</i>	8.4.2017	19,69
Panama-ERC 288	<i>Xylopi macrantha</i>	4.4.2017	19,72
Panama-ERC 289	<i>Xylopi macrantha</i>	25.2.2017	19,78
Panama-ERC 290	<i>Xylopi macrantha</i>	25.2.2017	20,08
Panama-ERC 291	<i>Xylopi macrantha</i>	4.4.2017	19,72
Panama-ERC 292	<i>Xylopi macrantha</i>	25.1.2017	20,08
Panama-ERC 293	tuntematon kasvilaji	20.2.2017	19,95
Panama-ERC 294	<i>Poulsenia armata</i>	17.3.2017	19,86

Liite 6. Alkaloidien karakterisointitaulukko

Liitetaulukko 2. Tutkimuksessa karakterisoitujen alkaloidien järjestysnumero, retentioaika, teoreettinen ja havaittu tarkka massa, $[M+H]^+$ -pääionin m/z -arvo, kuusi intensiivisintä MS/MS-fragmenttia, arvio molekyylikaavasta, kaksoissidosekvivalentti (DBE), virhe, yhdisteen nimi, havaittu esiintyvyys tutkituissa kasvilajeissa ja viitteet.

No.	Rt (min)	teoreettinen tarkka massa	havaittu tarkka massa	$[M+H]^+$ (m/z)	MS/MS	Molekyylikaava	DBE	Virhe (ppm)	Yhdiste	Kasvilajit	Viitteet
1	0,84	565,2159	565,2159	566,2231	107,05 434,18 272,13 255,10 161,06 69,03	$C_{27}H_{35}NO_{12}$	11	0,010	ipekosidi	10, 11, 31, 37, 56	[3,76]
2	0,87	300,1474	300,1472	301,1545	146,06 138,09 86,10 136,08 132,04 198,09	$C_{17}H_{20}N_2O_3$	9	-0,596	monoterpenoidi-inodolijohdannainen	11, 18, 47	[71]
3	0,94	313,1314	313,1312	314,1384	251,07 269,08 58,07 223,08 205,06 177,07	$C_{18}H_{19}NO_4$	10	-0,818	laurolitsiini isomeeri	11, 37	[77]

4	0,97	271,1208	271,1207	272,1280	107,05 255,10 161,06 123,04 275,07 143,05	$C_{16}H_{17}NO_3$	9	-0,594	demetyylikokklauriini	10, 11, 18, 23, 37, 60	[78,79]
5	1,08	330,1943	330,1944	331,2017	146,06 144,08 313,19 58,07 158,10 72,08	$C_{19}H_{26}N_2O_3$	8	0,091	monoterpenoidi- inodolijohdannainen	3, 47	[71]
6	1,15	329,1627	329,1625	330,1698	151,07 58,07 91,05 107,05 119,05 123,04	$C_{19}H_{23}NO_4$	9	-0,656	tetrahydroisokinoliini- johdannainen	4, 10, 11, 18	[80]
7	1,26	329,1627	329,1625	330,1697	58,07 151,07 91,05 107,05 119,05 123,04	$C_{19}H_{23}NO_4$	9	-0,778	tetrahydroisokinoliini- johdannainen	10, 11, 18, 37, 60	[80]

8	1,30	491,2155	491,2153	492,2226	192,10 137,06 330,17 143,05 115,06 299,13	$C_{25}H_{33}NO_9$	10	-0,389	tetrahydroisokinoliini- johdannainen	10, 11, 60	[80]
9	1,30	310,1681	310,1678	311,1751	160,08 210,09 172,08 281,17 282,15 146,06	$C_{19}H_{22}N_2O_2$	10	-0,951	monoterpenoidi- indolijohdannainen	47, 48	[71]
10	1,30	734,2893	734,2898	735,2971	425,21 260,13 395,16 230,08 85,03 245,11	$C_{48}H_{38}N_4O_4$	32	0,677	aspidosperma- monoterpenoidi- indolijohdannainen	3	[81]
11	1,34	327,1471	327,1470	328,1542	251,07 283,10 205,06 223,07 58,07 177,07	$C_{19}H_{21}NO_4$	10	-0,293	(iso)boldiini isomeeri	8, 10, 11, 18, 19, 26, 48, 60	[77,82]

12	1,37	313,1678	313,1676	314,1749	58,07 107,05 269,12 175,07 137,06 91,06	$C_{19}H_{23}NO_3$	9	-0,706	armepaviini	4, 8, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 31, 32, 37, 56,	[79]
13	1,37	447,1893	447,1892	448,1965	107,05 286,14 269,12 115,06 143,05 237,09	$C_{23}H_{29}NO_8$	10	-0,326	tetrahydroisokinoliini- johdannainen	10, 11	[80]
14	1,38	285,1365	285,1362	286,1435	107,05 269,12 175,08 143,05 137,06 115,06	$C_{17}H_{19}NO_3$	9	-1,017	koklauriini	4, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 25, 31, 37, 56, 60	[77,79]

15	1,43	444,1897	444,1894	445,1967	206,12 234,11 399,19 216,10 280,12 370,19	$C_{23}H_{28}N_2O_7$	11	-0,518	karapanaubiini- <i>N</i> - oksiidi	3	[83]
16	1,43	313,1314	313,1312	314,1385	297,11 265,09 282,09 222,07 191,09 237,09	$C_{18}H_{19}NO_4$	10	-0,075	laulolitsiini	18, 19, 37, 56	[77,82]
17	1,45	299,1521	299,1520	300,1593	107,05 269,12 175,08 237,09 143,05 115,06	$C_{18}H_{21}NO_3$	9	-0,538	<i>N</i> -metyylikoklauriini	4, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 19, 20, 31, 32, 37, 56, 60	[77,79]
18	1,45	414,1791	414,1789	415,1862	369,18 204,10 94,07 206,12 138,06 198,09	$C_{22}H_{26}N_2O_6$	11	-0,495	demetyylikarapanaubii ni	3, 4, 8, 37, 57	[83]

19	1,46	327,1471	327,1468	328,1541	251,07 283,10 223,07 205,06 58,07 177,07	C ₁₉ H ₂₁ NO ₄	10	-0,660	(iso)boldiini isomeeri	18, 56, 60	[77,82]
20	1,51	312,1838	312,1836	313,1909	295,18 170,10 210,13 156,08 144,08 122,10	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₂	9	-0,657	monoterpenoidi- indolijohdannainen	47	[71]
21	1,53	329,1627	329,1625	330,1698	192,10 137,06 143,05 175,08 115,06 299,13	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄	9	-0,595	retikuliini isomeeri	10, 15, 18, 56	[77,79]
22	1,57	748,2434	748,2386	749,2459	425,21 260,13 395,16 230,08 85,03 245,11	C ₄₆ H ₃₂ N ₆ O ₅	34	-6,410	aspidosperma- monoterpenoidi- indolijohdannainen	3	[81]

23	1,60	343,1420	343,1420	344,1493	58,07 295,10 207,08 267,10 327,12 344,19	$C_{19}H_{21}NO_5$	10	0,085	aporfinoidi- isokinoliinijohdannaine n	37, 56, 60	[84]
24	1,61	343,1784	343,1783	344,1856	58,07 137,06 175,08 299,13 143,05 151,07	$C_{20}H_{25}NO_4$	9	-0,251	<i>O</i> -metyylilarmepaviini	3, 4, 8, 10, 11, 12, 13, 15, 17, 18, 31, 37, 60	[85]
25	1,62	297,1001	297,1002	298,1075	281,08 251,07 223,08 205,06 177,07 235,07	$C_{17}H_{15}NO_4$	11	0,215	aporfinoidi- isokinoliinijohdannaine n	10, 11, 18	[84]
26	1,62	341,1627	341,1622	342,1695	58,07 192,10 265,09 297,11 177,08 237,09	$C_{20}H_{23}NO_4$	10	-1,366	(iso)korydiini isomeeri	18, 29, 39,56, 57, 60	[82]

27	1,67	329,1627	329,1627	330,1699	192,10 137,06 143,05 177,08 175,07 115,05	C ₁₉ H ₂₃ NO ₄	9	-0,170	retikuliini	3, 4, 10, 11, 17, 18, 25, 31, 32, 36, 37, 38, 56, 57, 60	[77,79]
28	1,69	370,1893	370,1891	371,1964	353,19 160,08 136,11 122,10 321,16 293,17	C ₂₁ H ₂₆ N ₂ O ₄	10	-0,338	monoterpenoidi- inodolijohdannainen	47	[71]
29	1,71	341,1627	341,1626	342,1699	58,07 265,09 297,11 237,09 205,06 222,07	C ₂₀ H ₂₃ NO ₄	10	-0,369	<i>O</i> -metyyli(iso)boldiini	11, 12, 13, 14, 15, 59	[83]
30	1,72	312,1838	312,1837	313,1910	160,08 295,18 144,08 170,10 166,12 108,08	C ₁₉ H ₂₄ N ₂ O ₂	9	-0,112	monoterpenoidi- inodolijohdannainen	47	[71]

31	1,74	505,2325	505,2324	506,2397	284,13 121,06 58,07 275,61 177,08 344,19	$C_{27}H_{31}N_5O_5$	15	-0,192	tetrahydroisokinoliini- johdannainen	10, 11, 50	[80]
32	1,76	299,1521	299,1527	300,1600	107,05 283,13 189,09 145,06 151,07 252,11	$C_{18}H_{21}NO_3$	9	1,802	<i>N</i> -metyylikoklauriini isomeeri	4, 10, 11, 18, 37	[77,79]
33	1,78	266,1783	266,1782	267,1855	184,11 210,13 124,11 168,08 144,08 224,14	$C_{18}H_{22}N_2$	9	-0,432	uleiini	3, 47, 48	[86]
34	1,79	296,1889	296,1888	297,1961	144,08 122,10 130,06 172,08	$C_{19}H_{24}N_2O$	9	-0,098	noribogaiini isomeeri	47	[87]

35	1,80	341,1627	341,1626	342,1699	58,07 297,11 265,09 282,09 222,07 237,09	$C_{20}H_{23}NO_4$	10	-0,340	<i>O</i> -metyyli(iso)boldiini isomeeri	13, 18, 19, 31, 37	[83]
36	1,80	313,1314	313,1314	314,1387	297,11 266,09 221,06 195,08 237,09 282,09	$C_{18}H_{19}NO_4$	10	0,013	laulolitsiini isomeeri	10, 11, 12, 18, 31, 56	[77,82]
37	1,81	327,1471	327,1470	328,1543	265,09 297,11 205,06 233,06 237,09 194,07	$C_{19}H_{21}NO_4$	10	-0,202	(iso)boldiini isomeeri	11, 18, 38, 56, 60	[77,82]
38	1,82	343,1784	343,1784	344,1856	206,12 137,06 192,10 151,07 313,14 143,05	$C_{20}H_{25}NO_4$	9	0,012	tetrahydroisokinoliini- johdannainen	10, 11, 18, 28, 56, 60	[80]

39	1,84	343,1420	343,1419	344,1492	327,12 296,10 235,07 281,08 207,08 252,08	$C_{19}H_{21}NO_5$	10	-0,178	aporfinoidi- isokinoliini- johdannainen	3, 15, 17, 24, 26, 27, 35, 37, 38, 39, 40, 44, 49, 52, 59	[84]
40	1,84	324,1838	324,1835	325,1908	224,11 186,09 174,09 160,08 295,18 296,16	$C_{20}H_{24}N_2O_2$	10	-0,817	affiniini isomeeri	46, 47, 48, 49, 56	[87]
41	1,85	458,2053	458,2052	459,2125	206,12 234,11 399,19 369,18 370,19 287,06	$C_{24}H_{30}N_2O_7$	11	-0,129	monoterpenoidioksi- indolijohdannainen	3, 38, 47	[88]
42	1,85	313,1314	313,1312	314,1385	266,09 297,11 282,09 222,07 191,09 237,09	$C_{18}H_{19}NO_4$	10	-0,722	lauroliitsiini isomeeri	10, 18	[77,82]

43	1,86	285,1365	285,1364	286,1437	107,05 269,12 115,05 143,05 237,09 209,10	$C_{17}H_{19}NO_3$	9	-0,245	koklauriini isomeeri	15, 18, 37, 56, 60	[77,79]
44	1,87	299,1521	299,1520	300,1592	107,05 269,12 115,06 143,05 121,06 137,06	$C_{18}H_{21}NO_3$	9	-0,638	<i>N</i> -metyylikoklauriini isomeeri	4, 18, 25, 31, 37, 60	[77,79]
45	1,87	294,1732	294,1732	295,1805	170,10 155,07 144,08 122,10 94,07	$C_{19}H_{22}N_2O$	10	0,034	perisiini- <i>N</i> -oksidi	47, 48	[83]
46	1,88	414,2155	414,2153	415,2226	399,19 204,10 138,09 160,08 91,06	$C_{23}H_{30}N_2O_5$	10	-0,386	hydroksikonofaryngiini	47, 57, 59	[83]

47	1,88	343,1784	343,1782	344,1855	192,10 151,08 177,08 143,05 175,08 115,06	$C_{20}H_{25}NO_4$	9	-0,542	tetrahydroisokinoliini- johdannainen	10, 15, 18, 56	[80]
48	1,90	327,1471	327,1470	328,1542	279,10 248,08 264,08 236,08 311,13 296,11	$C_{19}H_{21}NO_4$	10	-0,293	laurotetaniini	4, 11, 15, 18, 37, 56, 60	[77]
49	1,91	447,1893	447,1892	448,1965	121,06 286,14 269,12 143,05 115,05 161,06	$C_{23}H_{29}NO_8$	10	-0,215	tetrahydroisokinoliini- johdannainen	18, 48, 52	[80]
50	1,94	461,2050	461,2050	462,2122	300,16 121,06 178,09 143,05 269,12 161,06	$C_{24}H_{31}NO_8$	10	-0,013	tetrahydroisokinoliini- johdannainen	18, 60	[80]

51	1,94	324,1838	324,1837	325,1910	200,11 224,11 174,09 185,08 295,18 296,16	$C_{20}H_{24}N_2O_2$	10	-0,231	affiniini	45, 47, 49	[87]
52	1,95	357,1576	357,1574	358,1647	327,12 296,10 235,08 281,08 207,08 264,08	$C_{20}H_{23}NO_5$	10	-0,535	aporfinoidi- isokinoliinijohdannaine n	10, 11, 18, 37	[84]
53	1,95	428,1947	428,1948	429,2020	369,18 204,10 198,09 264,12 246,11 341,19	$C_{23}H_{28}N_2O_6$	11	0,058	karapanaubiini	3	[71,89]
54	1,96	314,1994	314,1996	315,2069	158,10 144,08 86,06 184,13 297,20 154,20	$C_{19}H_{26}N_2O_2$	8	0,557	monoterpenoidi- inodolijohdannainen	47	[71]

55	1,96	343,1784	343,1784	344,1857	206,12 137,06 189,09 313,14 189,09 151,07	$C_{20}H_{25}NO_4$	9	0,216	demetyylilaudanosiiini	10, 11, 13, 18, 37, 56, 60	[83]
56	1,97	311,1521	311,1519	328,1539	263,07 235,07 205,06 177,07 280,11 295,10	$C_{19}H_{21}NO_4$	11	-0,742	aktinodafniini	3, 15, 18, 19, 37, 56, 60	[82]
57	1,98	489,2363	489,2361	490,2434	328,19 121,06 58,07 115,06 143,05 135,08	$C_{26}H_{35}NO_8$	10	-0,319	tetrahydroisokinoliini- johdannainen	10, 11, 12, 13, 18	[80]
58	1,98	442,2104	442,2104	443,2177	260,13 427,19 229,11 190,05 224,10 112,08	$C_{24}H_{30}N_2O_6$	11	0,014	aspidosperma- monoterpenoidi- indolijohdannainen	3, 47	[81]

59	2,01	296,1889	296,1888	297,1961	144,08 154,12 279,19 136,11 122,10	$C_{19}H_{24}N_2O$	9	-0,098	noribogaiini isomeeri	3, 47	[87]
60	2,01	298,2045	298,2105	299,2177	281,20 144,08 158,10 136,11 138,13 70,07	$C_{19}H_{26}N_2O$	8	19,91 9	monoterpenoidi- inodolijohdannainen	47	[71]
61	2,02	341,1627	341,1626	342,1699	279,10 311,13 248,08 264,08 236,08 296,11	$C_{20}H_{23}NO_4$	10	-0,281	(iso)korydiini	3, 4, 11, 18, 25, 31, 37, 38, 47, 56, 60	[82]
62	2,05	314,1994	314,1994	315,2067	158,10 144,08 298,18 174,09 130,06 108,08	$C_{19}H_{26}N_2O_2$	8	0,048	monoterpenoidi- inodolijohdannainen	3, 47	[71]

63	2,06	311,1158	311,1155	312,1227	295,10 263,07 237,09 235,07 296,10 205,06	$C_{18}H_{17}NO_4$	11	-0,984	kalysiniini	10, 11, 12, 17, 18, 60	[83]
64	2,07	327,1834	327,1832	328,1905	58,07 121,06 283,13 175,07 143,05 115,06	$C_{20}H_{25}NO_3$	9	-0,645	<i>O</i> -metyyliarmepaviini isomeeri	9, 10, 11, 12, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 23, 29, 32	[85]
65	2,07	327,1471	327,1470	328,1542	280,11 296,10 311,13 265,09 237,09 297,11	$C_{19}H_{21}NO_4$	10	-0,293	(iso)boldiini	18, 37, 38, 39, 56, 60	[77,82]
66	2,08	355,1784	355,1781	356,1854	58,07 311,13 296,10 253,09 281,08 279,10	$C_{21}H_{25}NO_4$	10	-0,664	glausiini	11, 18, 19, 37, 56, 60	[82]

67	2,08	296,1889	296,1886	297,1959	154,12 144,08 279,19 158,10 136,11 122,10	$C_{19}H_{24}N_2O$	9	-0,807	noribogaiini	47	[87]
68	2,08	400,1998	400,1996	401,2068	383,20 323,18 174,09 160,08 122,10	$C_{22}H_{28}N_2O_5$	10	-0,675	monoterpenoidi- indolijohdannainen	47, 48	[71]
69	2,09	469,2577	469,2578	470,2650	260,13 425,21 229,11 190,05 413,17 439,19	$C_{26}H_{35}N_3O_5$	11	0,173	aspidosperma- monoterpenoidi- indolijohdannainen	3, 4, 47	[81]
70	2,09	637,2820	637,2821	638,2894	260,13 91,06 229,11 346,17 105,07 190,05	$C_{26}H_{39}N_9O_1$ 0	12	0,144	aspidosperma- monoterpenoidi- indolijohdannainen	3	[81]

71	2,09	424,1998	424,1998	425,2070	260,13 229,11 190,05 214,09 94,07 110,06	$C_{24}H_{28}O_5N_2$	12	-0,141	obskurinervidiini	3, 5, 7, 10, 47	[74,90]
72	2,10	341,1263	341,1263	342,1336	293,08 207,08 325,11 235,08 265,09 310,08	$C_{19}H_{19}NO_5$	11	-0,062	aporfinoidi- isokinoliinijohdannain n	18, 37, 56	[84]
73	2,10	326,1994	326,1993	327,2066	309,20 253,13 174,09 136,11 122,10 160,08	$C_{20}H_{26}N_2O_2$	9	-0,414	iboksigaiini	47, 48, 49	[87,91]
74	2,10	325,1314	325,1314	326,1387	263,07 235,07 205,06 295,10 177,07 137,06	$C_{19}H_{19}NO_4$	11	-0,049	normanteiini isomeeri	18, 37, 56, 60	[92]

75	2,13	357,1576	357,1576	358,1649	278,09 341,14 309,11 294,09 326,11 266,09	$C_{20}H_{23}N_2O_5$	10	-0,115	(iso)korydiini- <i>N</i> -oksiidi isomeeri	37, 56, 60	[93]
76	2,13	314,1994	314,1994	315,2066	158,10 144,08 143,07 130,06 86,06 58,07	$C_{19}H_{26}N_2O_2$	8	-0,207	monoterpenoidi- inodolijohdannainen	47	[71]
77	2,15	341,1627	341,1626	342,1699	280,11 311,13 296,10 265,09 237,09 281,08	$C_{20}H_{23}NO_4$	10	-0,193	<i>N</i> - metyylilaurotetaniini	4, 18, 31, 37, 56, 60	[77]
78	2,15	414,2155	414,2154	415,2227	397,21 136,11 122,10 174,09 353,19 365,19	$C_{23}H_{30}N_2O_5$		-0,145	monoterpenoidi- inodolijohdannainen	47	[71]

79	2,16	400,1998	400,1997	401,2070	383,20 323,18 174,09 160,08 122,10	$C_{22}H_{28}N_2O_5$	10	-0,250	monoterpenoidi- inodolijohdannainen	47	[71]
80	2,20	357,1940	357,1939	358,2012	206,12 151,08 327,16 174,07 158,07 107,05	$C_{21}H_{27}NO_4$	9	-0,241	laudansiini	5, 8, 13, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 23, 24, 27, 29	[94]
81	2,21	326,1994	326,1993	327,2066	309,20 174,09 136,11 122,10 253,13	$C_{20}H_{26}N_2O_2$	9	-0,261	iboluteiini	47, 48	[95]
82	2,22	384,2049	384,2046	385,2119	174,09 138,09 367,20 91,06 79,05 325,19	$C_{22}H_{28}N_2O_4$	10	-0,742	monoterpenoidi- inodolijohdannainen	45, 47, 48, 49	[71]

83	2,23	324,1838	324,1835	325,1908	174,09 122,10 160,07 296,16 307,18 79,05	$C_{20}H_{24}N_2O_2$	10	-0,817	alloibogaiini	47, 48, 49	[87]
84	2,23	310,1681	310,1681	311,1754	160,08 199,09 186,09 174,09 79,06 122,10	$C_{19}H_{22}N_2O_2$	10	-0,048	monoterpenoidi- inodolijohdannainen	9, 47	[71]
85	2,31	326,1994	326,1993	327,2066	309,20 174,09 136,11 122,10 253,13	$C_{20}H_{26}N_2O_2$	9	-0,414	aimaliini isomeeri	3, 47, 49	[71]
86	2,33	297,1365	297,1362	298,1434	281,12 249,09 266,09 207,08 223,07 178,08	$C_{18}H_{19}NO_3$	10	-1,144	stefariini isomeeri	5, 9, 10, 11, 18, 19, 25, 44, 60	[96]

87	2,33	370,2256	370,2255	371,2328	309,20 200,11 144,08 122,10 353,22 185,08	$C_{22}H_{30}N_2O_3$	9	-0,432	monoterpenoidi- indolijohdannainen	47	[71]
88	2,33	296,1889	296,1888	297,1961	122,10 279,19 144,08 136,11	$C_{19}H_{24}N_2O$	9	-0,233	noribogaiini isomeeri	47	[87]
89	2,40	456,2260	456,2257	457,2330	274,15 243,19 190,05 228,10	$C_{25}H_{32}N_2O_6$	11	-0,690	aspidosperma- monoterpenoidi- indolijohdannainen	3, 17	[81]
90	2,40	366,1943	366,1943	367,2016	293,17 174,09 136,11 308,18 352,18 335,18	$C_{22}H_{26}N_2O_3$	11	-0,164	monoterpenoidi- indolijohdannainen	47	[71]

91	2,41	357,1576	357,1575	358,1648	310,12 326,12 341,14 295,10 367,10 279,07	$C_{20}H_{23}NO_5$	10	-0,227	(iso)korydiini- <i>N</i> -oksidi	10, 11, 18, 37, 56	[93]
92	2,42	299,1521	299,1520	300,1593	121,06 282,12 215,10 143,05 115,06 91,06	$C_{18}H_{21}NO_3$	9	-0,572	<i>N</i> -metyylikoklauriini isomeeri	18, 19, 37, 60	[77,79]
93	2,42	384,2049	384,2048	385,2121	367,20 136,11 335,18 307,18 174,09 122,10	$C_{22}H_{28}N_2O_4$	10	-0,325	voakristiini isomeeri	45, 47, 48, 50, 52, 56	[91]
94	2,42	327,1834	327,1832	328,1905	121,06 58,07 115,06 143,05 283,13 135,08	$C_{20}H_{25}NO_3$	9	-0,737	<i>O</i> -metyyliarmepaviini isomeeri	10, 11, 60	[85]

95	2,43	373,1889	373,1887	374,1959	121,07 58,07 115,05 276,11 143,05 194,08	$C_{21}H_{27}NO_5$	9	-0,699	tetrahydroisokinoliini- johdannainen	10, 11	[80]
96	2,44	398,2206	398,2202	399,2275	204,10 122,10 383,20 160,08 146,06 91,06	$C_{23}H_{30}N_2O_4$	10	-0,967	konofaryngiini	47	[97]
97	2,46	313,1678	313,1676	314,1749	121,06 115,06 143,05 283,13 192,10 175,07	$C_{19}H_{23}NO_3$	9	-0,610	dimetyylikoklauriini	17, 18, 19, 31	[78,79]
98	2,46	441,2264	441,2348	442,2421	274,15 243,13 190,05 110,06 94,07 410,22	$C_{24}H_{31}N_3O_5$	11	19,20 1	aspidosperma- monoterpenoidi- indolijohdannainen	3, 17	[81]

99	2,47	438,2155	438,2155	439,2228	274,15 94,07 423,20 409,18 190,05 110,06	$C_{25}H_{30}N_2O_5$	12	0,114	obskurinerviini	3, 8, 9, 47	[74,90]
100	2,48	384,2049	384,2048	385,2120	367,20 136,11 335,18 307,18 174,09 122,10	$C_{22}H_{28}N_2O_4$	10	-0,403	voakristiini	7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 18, 31, 47, 48, 49, 50, 54,	[91]
101	2,49	354,1943	354,1941	355,2014	337,19 305,17 277,17 136,11 144,08 221,11	$C_{21}H_{26}N_2O_3$	10	-0,649	monoterpenoidi- inodolijohdannainen	47	[71]
102	2,49	341,1263	341,1263	342,1336	325,11 294,09 235,07 249,05 279,06 310,08	$C_{19}H_{19}NO_5$	11	-0,062	aporfinoidi- isokinoliinijohdannainen	37, 38, 56, 60	[84]

103	2,50	483,2733	483,2735	484,2808	274,15 439,23 243,12 190,05 228,10 187,06	$C_{27}H_{37}N_3O_5$	11	0,457	aspidosperma- monoterpenoidi- indolijohdannainen	3	[81]
104	2,51	278,1783	278,1783	279,1856	170,10 155,07 122,10 143,09 208,11	$C_{19}H_{22}N_2$	10	-0,054	perisiini	45, 47, 48	[98]
[10 5	2,51	368,2100	368,2099	369,2172	309,20 200,11 122,10 185,08 174,09 169,08	$C_{22}H_{28}N_2O_3$	10	-0,190	monoterpenoidi- inodolijohdannainen	47	[71]
106	2,51	297,1365	297,1363	298,1436	281,12 250,10 178,08 205,06 266,09 234,07	$C_{18}H_{19}NO_3$	10	-0,572	stefariini	12, 18, 25, 56, 60	[96]

107	2,51	310,2045	310,2041	311,2113	122,10 174,09 201,11 150,13	$C_{20}H_{26}N_2O$	9	-1,483	ibogaiini	47, 50	[87,91]
108	2,53	326,1994	326,1993	327,2066	174,09 309,20 200,11 122,10 160,08 93,07	$C_{20}H_{26}N_2O_2$	9	-0,475	aimaliini	47, 48, 49, 50	[71]
109	2,54	547,2934	547,2936	548,3009	281,12 250,10 178,08 298,14 266,09 178,08	$C_{33}H_{41}NO_6$	14	0,411	aporfinoidi- isokinoliinijohdannaine n	18	[84]
110	2,54	354,1943	354,1941	355,2014	309,20 200,11 122,10 136,11 185,08 174,09	$C_{21}H_{26}N_2O_3$	10	-0,649	17- <i>O</i> - asetyylinoraimaliini	3, 47	[99]

111	2,56	308,1889	308,1889	309,1962	200,11 122,10 185,08 170,06 157,09 238,12	$C_{20}H_{24}N_2O$	10	0,165	affinisiini	23, 45, 47, 48, 49, 50, 52, 56	[87]
112	2,58	324,1838	324,1837	325,1910	188,07 160,08 307,18 174,09 122,10 79,06	$C_{20}H_{24}N_2O_2$	10	-0,139	affiniini isomeeri	47, 48, 49, 50, 52, 54	[87]
113	2,59	424,1998	424,2001	425,2074	260,13 229,11 261,13 190,05 94,07 110,06	$C_{24}H_{28}N_2O_5$	12	0,613	obskurinervidiini isomeeri	3	[74,90]
114	2,59	326,1994	326,1991	327,2064	174,09 309,20 326,19 200,11 160,07 122,10	$C_{20}H_{26}N_2O_2$	9	-1,058	iboksigaiini isomeeri	47, 48, 49	[87,91]

115	2,59	281,1416	281,1414	282,1487	265,12 250,10 235,08 191,09 179,09 207,08	$C_{18}H_{19}NO_2$	10	-0,555	nornusiferiini	10, 11, 12, 13, 18, 37, 56, 60	[84,100]
116	2,60	531,2985	531,2986	532,3059	265,12 250,10 235,07 282,15 191,09 179,09	$C_{33}H_{41}NO_5$	14	0,320	aporfinoidi- isokinoliinijohdannaine n	18	[84]
117	2,60	327,1471	327,1471	328,1543	311,13 280,11 236,08 265,08 251,11 296,10	$C_{19}H_{21}NO_4$	10	0,012	laurotetaniini isomeeri	18, 56	[77]
118	2,62	325,1314	325,1313	326,1386	278,09 294,09 235,07 263,07 205,06 165,07	$C_{19}H_{19}NO_4$	11	-0,265	nornanteniini	18, 37, 38, 56, 60	[92]

119	2,65	311,1521	311,1519	312,1592	281,12 250,10 178,08 266,09 205,06 221,10	$C_{19}H_{21}NO_3$	10	-0,742	aktinodafniini isomeeri	13, 18	[82]
120	2,66	325,1314	325,1311	326,1384	278,09 294,09 279,06 235,07 205,06 263,07	$C_{19}H_{19}NO_4$	11	-0,972	normanteiini isomeeri	11, 26, 38, 48, 62	[92]
121	2,72	339,1471	339,1468	340,1541	278,09 294,09 177,06 235,07 263,07 145,03	$C_{20}H_{21}NO_4$	11	-0,725	nanteniini	18, 37, 60	[92]
122	2,73	309,1001	309,0999	310,1072	263,07 205,06 235,08 177,07 189,07 165,07	$C_{18}H_{15}NO_4$	12	-0,602	norneolitsiini	18	[82,84]

123	2,76	438,2155	438,2156	439,2229	274,15 243,13 94,07 110,06 423,19 409,18	$C_{25}H_{32}N_2O_5$	12	0,319	obskurinerviini isomeeri	3, 47	[74,90]
124	2,78	366,2307	366,2308	367,2381	309,20 200,11 122,10 185,08	$C_{23}H_{30}N_2O_2$	10	0,205	monoterpenoidi- inodolijohdannainen	47, 48, 49, 50	[71]
125	2,79	382,2256	382,2253	383,2325	325,19 188,07 174,09 160,08 122,10 307,18	$C_{23}H_{30}N_2O_3$	10	-1,020	monoterpenoidi- inodolijohdannainen	23, 47, 48, 52	[71]
126	2,80	278,1783	278,1784	279,1857	170,10 155,07 122,10 143,09 128,06	$C_{19}H_{22}N_2$	10	0,485	perisiini isomeeri	47, 48	[98]

127	2,81	309,1001	309,1000	310,1073	293,08 263,07 235,07 205,06 177,07	$C_{18}H_{15}NO_4$	12	-0,440	norneolitsiini isomeeri	19, 56	[82,84]
128	2,82	323,1158	323,1156	324,1229	293,08 263,07 235,08 205,06 177,07 72,94	$C_{19}H_{17}NO_4$	12	-0,514	neolitsiini	11, 18, 56	[82,84]
129	2,82	336,2202	336,2201	337,2274	279,19 170,10 122,10 155,07 143,09	$C_{22}H_{28}N_2O$	10	-0,238	monoterpenoidi- inodolijohdannainen	47, 48, 49	[71]
130	2,90	311,1521	311,1519	312,1592	280,11 265,09 249,09 205,06 221,10 233,06	$C_{19}H_{21}NO_3$	10	-0,807	aktinodafiini isomeeri	11, 13, 60	[82]

131	3,00	680,3574	680,3572	681,3645	341,19 188,07 190,09 160,08 323,18 166,12	$C_{40}H_{48}N_4O_6$	19	-0,210	dimeerinen monoterpenoidi- inodolialkaloidi- johdannainen	47	[71]
132	3,00	340,1787	340,1788	341,1861	188,07 190,07 160,08 323,18 147,07 67,06	$C_{20}H_{24}N_2O_3$	10	0,294	affiniini- <i>N</i> -oksidi	3, 45, 46, 47, 49, 52	[87]
133	3,01	325,1678	325,1677	326,1750	295,13 280,11 265,08 205,06 249,09 233,06	$C_{20}H_{23}NO_3$	10	-0,249	aporfinoidi- isokinoliinijohdanna- inen	60	[84]
