

FELDDESORPTIONS-MASSENSPEKTROMETRIE UND THERMISCHE FRAGMENTIERUNG VON FLAVONOIDGLYKOSIDEN

HANS GEIGER und GERHARD SCHWINGER

Institut für Chemie der Universität Hohenheim, D-7000 Stuttgart-70, W. Germany

(Eingegangen am 10 Juli 1979)

Key Word Index—FD-MS Fragmentation; thermal fragmentation; flavonoid glycosides.

Abstract—The scope and limitation of field desorption mass spectrometry (FD-MS) of flavonoid glycosides are described. It is demonstrated that FD-MS fragmentation is essentially due to thermal effects.

Voraussetzung für die Elektronenstoß-Massenspektrometrie (EI-MS) ist, daß die zu untersuchende Substanz unzersetzt flüchtig ist. Flavonoidglykoside können daher nach dieser Methode nur in Form von Derivaten untersucht werden. Als Derivate werden hauptsächlich Perdeuteromethylether [1] und Pertrimethylsilylether [2] verwendet. Nachteilig ist bei den Perdeuteromethylethern, daß bei deren Darstellung eventuell vorhandene Acylgruppen eliminiert werden. Pertrimethylsilylether haben den Nachteil, daß sie eine viel größere relative Molekülmasse besitzen als die zugrunde liegenden Glykoside, wodurch man häufig in einen für Routinemessungen ungünstigen Massenbereich kommt. Ferner sind bei der Darstellung von Pertrimethyletheren auch schon tiefergehende Reaktionen beobachtet worden [3, 4]. Die Felddesorptions-Massenspektrometrie (FD-MS) ist demgegenüber eine recht elegante Methode zur Bestimmung der relativen Molekülmassen von nicht unzersetzt verdampfbaren Substanzen. Im Idealfall zeigt das FD-Massenspektrum nur das Radikalion M^+ und/oder das durch Protonierung entstandene $(M+H)^+$ -Ion, sowie ggf. die Clusterionen $(M+Li)^+$, $(M+Na)^+$ und $(M+K)^+$, falls diese Metalle entweder als Verunreinigung in der Probe vorhanden waren, oder zur Erleichterung der Kationbildung absichtlich zugesetzt worden waren [5, 6]. Im Realfall (vgl. Abb. 1, 2, 5 und 6 sowie [6, 7]) beobachtet man außer dem Molekülion auch einige wenige Fragmentionen.

Da eine systematische Untersuchung der FD-Massenspektren von Flavonoidglykosiden bislang noch nicht durchgeführt worden ist, haben wir die in Tabelle 1 aufgeführten Glykoside untersucht. Dabei hat sich ergeben, daß die relative Häufigkeit der Fragmentionen von der Temperatur des Emitterfadens bzw., da diese Temperatur nicht ohne weiteres bestimbar ist, von dessen Heizstrom abhängt. Dies brachte uns eine frühere Beobachtung in Erinnerung: Bei der Bestimmung des Schmelzpunkts von Avicularin (= Quercetin-3- α -L-arabofuranosid) hatten wir gefunden, daß sich kurz oberhalb des Schmelzpunkts ($216-217^\circ$ aus der Schmelze wieder Kristalle abscheiden, die dann erst oberhalb 300° unter Zersetzung

schmelzen; eine chromatographische Nachprüfung hatte damals ergeben, daß aus der Schmelze nicht, wie zunächst vermutet, die kristallwasserfreie Substanz, sondern durch thermische Spaltung entstandenes Quercetin auskristallisiert war. Im Prinzip ähnliche

Tabelle 1. Flavon- und Flavonolglykoside, deren Fragmentierungsverhalten bei FD-MS und Thermolyse untersucht wurde

Apigenin-7-apiosylglucosid	(1)*
Luteolin-5-glucosid	(2)*
Luteolin-3'-glucosid	(3)*
Luteolin-7-glucosid	(4)*
Luteolin-7,3'-diglucosid	(5)*
Kämpferol-7-glucosid	(6)*
Kämpferol-7-rhamnosid	(7)
Kämpferol-3-glucosid	(8)*
Kämpferol-3-sophorosid	(9)*
Kämpferol-3-rutinosid	(10)*
Kämpferol-3,7-diglucosid	(11)*
Kämpferol-3-(6-O-acetylglucosid)-7-glucosid	(12)*
Kämpferol-3-glucosid-7-rhamnosid	(13)*
Kämpferol-3-(6-O-acetylglucosid)-7-rhamnosid	(14)*
Kämpferol-3-sophorosid-7-glucosid	(15)*
Kämpferol-3-(2'-O-sinapoylsophorosid)-7-glucosid	(16)*
Kämpferol-3-rutinosid-7-glucosid	(17)*
Kämpferol-3-rutinosid-7-rhamnosid	(18)*
Kämpferol-3-glucosid-7-diglucosid	(19)
Quercetin-3-arabofuranosid (= Avicularin)	(20)*
Quercetin-3-arabopyranosid (= Guajaverin)	(21)*
Quercetin-3-rhamnosid	(22)*
Quercetin-3-glucosid	(23)*
Quercetin-3-galactosid	(24)*
Quercetin-3-rutinosid	(25)
Quercetin-4'-glucosid	(26)*

*Die Struktur durch ^{13}C -NMR gesichert [8].

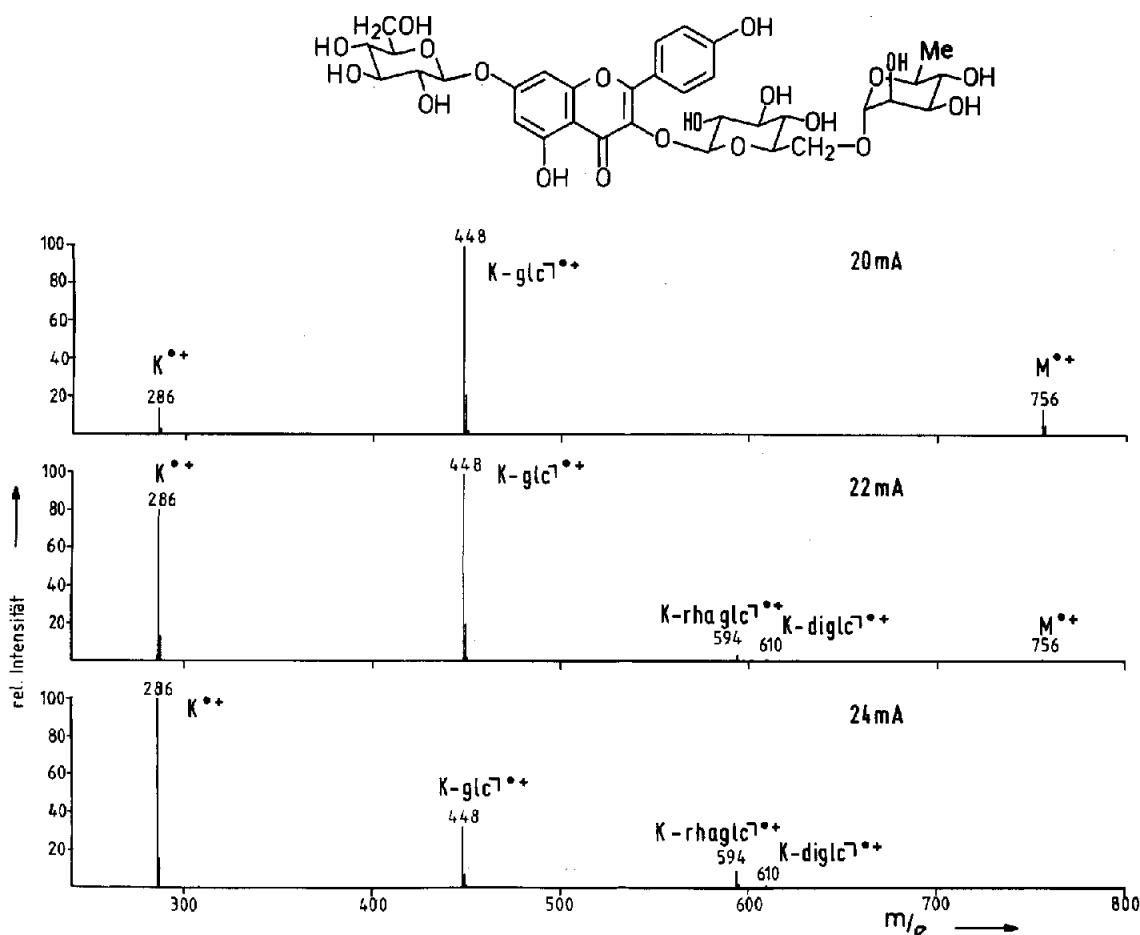


Abb. 1. FD-Massenspektren von Kämpferol-3-rutinosid-7-glucosid (17).

Glykosidspaltungen spielen auch bei der Thermo-fraktographie nach Stahl (vgl. z. B. [9] und [10]) eine Rolle, jedoch finden hierbei wegen der stärkeren Temperaturbelastung auch noch weitergehende Fragmentierungen statt. Es lag daher nahe zu vermuten, daß auch bei der FD-MS die Fragmente durch eine thermische Spaltung entstehen. Deswegen wurden alle von uns massenspektroskopisch untersuchten Glykoside auch auf ihre thermische Stabilität untersucht. Das Ergebnis war wie erwartet: Beim Erhitzen auf ca. 250°, bzw. bei höher schmelzenden Verbindungen über den Schmelzpunkt, werden alle untersuchten Flavon- und Flavonolglykoside mehr oder weniger stark fragmentiert.

Die Resultate sollen, um Wiederholungen zu vermeiden, nur anhand einiger Beispiele besprochen werden. Abb. 1 und 2 zeigen die bei verschiedenen Emittiergeheizströmen aufgenommenen FD-Spektren von Kämpferol-3-rutinosid-7-glucosid (17) und Kämpferol-3-rutinosid-7-rhamnosid (18). Diese zeigen erstens, daß die Fragmentierung, wie dies auch schon von anderer Seite [6, 7] beobachtet worden ist, im wesentlichen an den Glykosidbindungen erfolgt und zweitens, daß die Bildung der Fragmente von der Temperatur des Emittorfadens abhängt. Abb. 3 und 4 zeigen die Dünnschichtchromatogramme der Thermolyseprodukte derselben Glykoside; auf diesen findet man dieselben Fragmente, die auch bei der FD-MS

entstehen. Mit Hilfe des Chromatogramms ist es nun aber auch möglich, die Fragmente der FD-Spektren eindeutig zuzuordnen: Bei 17 könnte es sich bei dem Fragment 448 m/e entweder um Kämpferol-3-glucosid (8) oder um Kämpferol-7-glucosid (6) handeln, das DC zeigt, daß fast ausschließlich das 7-Glucosid 6 entsteht; entsprechend könnte das Fragment 595 m/e im Spektrum von 18 auf Kämpferol-3-glucosid-7-rhamnosid (13) oder Kämpferol-3-rutinosid (10) zurückgehen, das DC entscheidet zugunsten von Kämpferol-3-rutinosid (10).

Schon anhand dieser zwei Beispiele sieht man, daß die Thermolyse eine wertvolle Ergänzung zur FD-MS darstellt, denn auf dem DC läßt sich aufgrund von R_f-Werten, Fluoreszenzverhalten und Farbreaktionen der Ort der Glykosidierung ermitteln, während das FD-MS die relativen Molekulmassen der Fragmente liefert.

Unübersichtlich werden die Verhältnisse bei acylierten Glykosiden. Im Spektrum von Kämpferol-3-(6-O-acetylglucosid)-7-glucosid (12) (Abb. 5) finden sich zwar alle nach dem bisher Gesagten zu erwartenden Fragmente; darüber hinaus beobachtet man aber mit steigender Temperatur des Emittorfadens zunehmend Fragmente, die durch Transacylierung entstanden sein müssen. Das Chromatogramm der Thermolyseprodukte von 12 ist aufgrund von, im FD-MS nicht wahrnehmbaren innermolekularen Acylwanderungen so

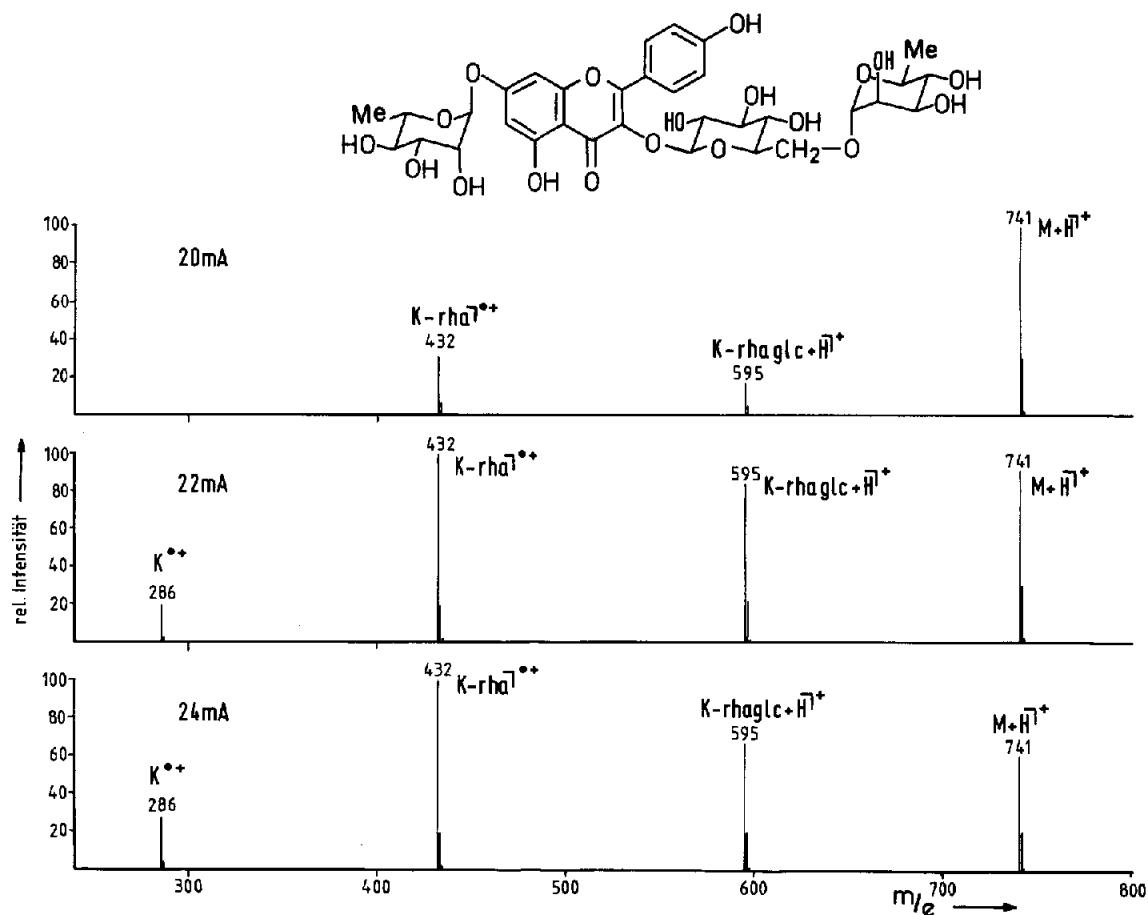
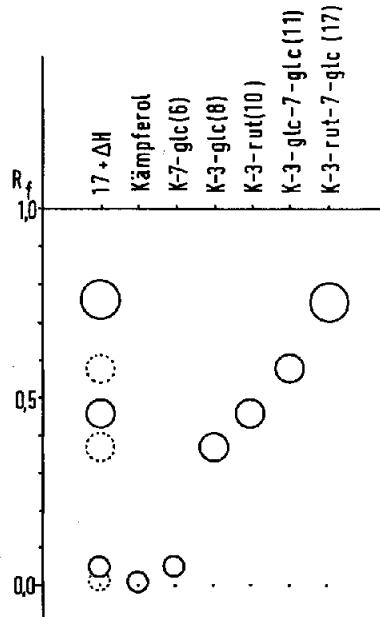
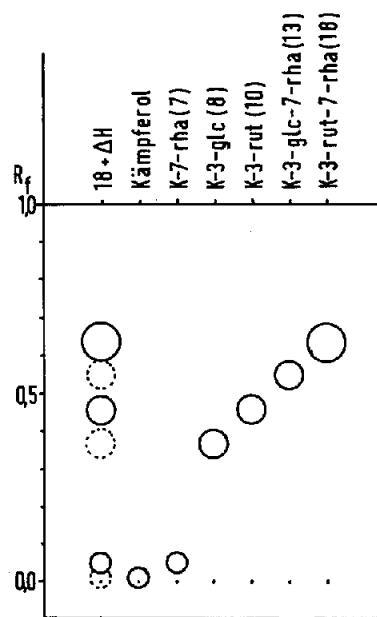


Abb. 2. FD-Massenspektren von Kämpferol-3-rutinosid-7-rhamnosid (18).

Abb. 3. Dünnschichtchromatogramm der Thermolyseprodukte von 17 (Cellulose/10 proz. wässrige Essigsäure). ($\Delta H = 1 \text{ min auf } 250^\circ \text{ erhitzt}$).Abb. 4. Dünnschichtchromatogramm der Thermolyseprodukte von 18 (Cellulose/10 proz. wässrige Essigsäure). ($\Delta H = 1 \text{ min auf } 250^\circ \text{ erhitzt}$).

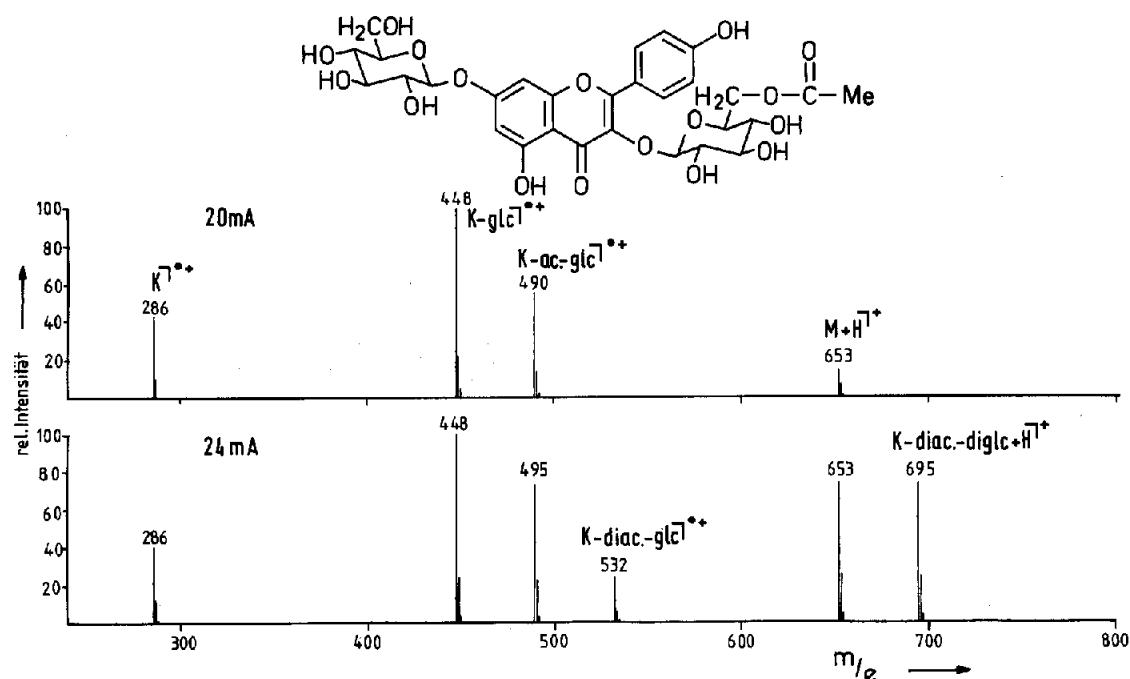


Abb. 5. FD-Massenspektren von Kämpferol-3-(6-O-acetylglucosid)-7-glucosid (12).

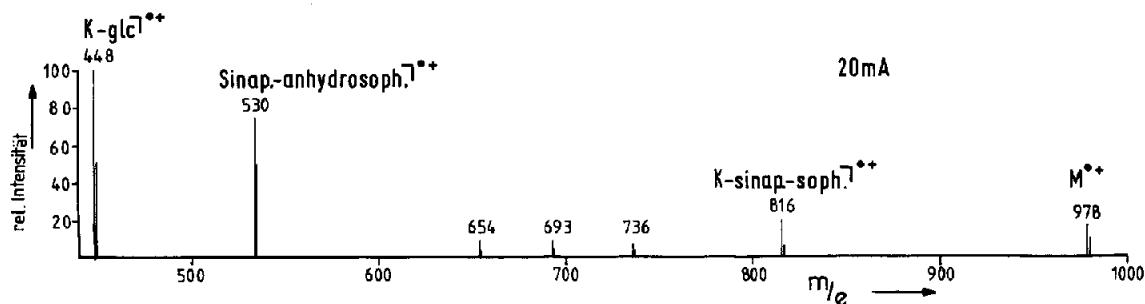
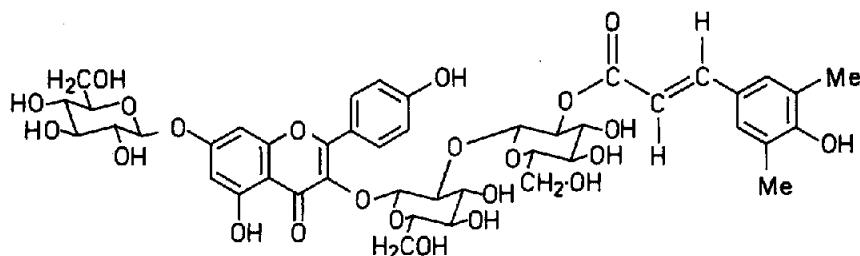


Abb. 6. FD-Massenspektrum von Kämpferol-3-(2-O-sinapoylsophorosid)-7-glucosid (16).

komplex, daß sich seine Wiedergabe nicht lohnt. Abb. 6 zeigt schließlich ein FD-Spektrum von Kämpferol-3-(2'-O-sinapoyl-sophorosid)-7-glucosid (16) als Beispiel eines mit einer aromatischen Säure veresterten Glykosids. In diesem Spektrum fällt vor allem das intensive Fragment bei $m/e = 530$ auf, das einer Sinapoylanhydrosophorose entspricht. Derartig intensive

Zuckerfragmente findet man regelmäßig nur, wenn der Zucker noch einen aromatischen Substituenten trägt, andernfalls ist offenbar häufig die Ionisierungswahrscheinlichkeit zu gering. Bezuglich der Transacylierungen gilt für 16 das schon für 12 Gesagte, nur liegen hier die Produkte teilweise außerhalb des Meßbereichs.

Aus der Untersuchung aller in Tabelle 1 aufgeführten Flavon- und Flavonolglykoside ließen sich folgende Regeln ableiten: (1) Es findet fast ausschließlich eine Spaltung zwischen Aglykon und Zucker statt; die Spaltung einer Zucker-Zuckerbindung ist nur von untergeordneter Bedeutung, obgleich sie, falls sie beobachtet werden kann, für die Ermittlung der Zuckersequenz in Bi- oder Triosiden sehr wertvoll sein kann. (2) Die Spaltungsgeschwindigkeit der Aglykon-Zuckerbindung hängt in erster Linie von der Bindungsstelle am Aglykon ab. Die Reihenfolge derselben ist ähnlich wie bei der sauren Hydrolyse, also: $5 > 3 > 3' = 5' > 4' > 7$. Die Abhängigkeit von der Natur des Zuckerteils ist, zumindest in den von uns untersuchten Fällen, so gering, daß sie für diagnostische Zwecke nicht herangezogen werden kann. (3) Die im FD-Spektrum an sich zu erwartenden Zuckerfragmente wurden, wenn sie nicht, wie oben erwähnt, mit einer aromatischen Säure verestert sind, auch bei ein und demselben Glykosid nicht regelmäßig beobachtet. Aus dem Vorhandensein oder Fehlen von Zuckerfragmenten sollten daher keine zu weitgehenden Schlüsse gezogen werden. Wenn Zuckerfragmente auftreten, so handelt es sich zumeist um Anhydrozucker. Die Bildung von Anhydrozuckern bei der Thermolyse von Glykosiden ist eine bekannte Reaktion; es sei hier nur an die Bildung des Laevoglucosans aus Stärke, Cellulose, Salicin, Arbutin oder Phlorrhizin erinnert [11, 12].

Zur systematischen Untersuchung der Glykoside anderer Flavonoidklassen lag uns leider nicht genügend Material vor. Das Verhalten der Flavanon-glykoside scheint, wie schon durch die Arbeitlen anderer Autoren [7] zu vermuten war, demjenigen der Flavonglykoside zu entsprechen. Interessant ist das FD-Spektrum des Malvins, das nur in hoher Intensität das Malviniumion zeigt. Offenbar wird das stabile Malviniumion so schnell desorbiert, daß keine Zeit für eine eventuelle Thermolyse bleibt.

EXPERIMENTELLES

Die untersuchten Substanzen stammten aus unserem Labor. Die FD-MS wurden mit einem mit FD-Quelle ausgerüsteten Varian MAT 311A Massenspektrometer aufgenommen. Die Thermolyse wurde zwischen zwei Mikroskop-Deckgläschchen von ca. 0,2 mm Dicke auf einer Koflerbank, die zuvor mit den üblichen, aber ebenfalls zwischen zwei Deckgläschchen befindlichen Testsubstanzen geeicht worden war, durchgeführt; nach 1 min Erhitzen auf 250–270° wurde die Schmelze samt den Deckgläschchen in einer kleinen Achatschale pulverisiert und die Reaktionsprodukte mit einem geeigneten Lösungsmittel, z.B. Ethanol oder Pyridin, herausgelöst. Die so erhaltene Lösung wurde unmittelbar chromatographisch untersucht.

LITERATUR

1. Mabry, T. J. und Markham, K. R. (1975) in *The Flavonoids* (Harborne, J. B., Mabry, T. J. und Mabry, H., Hrsg.) London.
2. Schels, H., Zinsmeister, H. D. und Pfleger, K. (1977) *Phytochemistry* **16**, 1019.
3. Bombardelli, E., Bonati, A., Gabetta, B., Martinelli, E. M. und Mustich, G. (1976) *J. Chromatogr.* **120**, 115.
4. Bombardelli, E., Bonati, A., Gabetta, B., Martinelli, E. M. und Mustich, G. (1977) *J. Chromatogr.* **139**, 111.
5. Veith, H. J. (1976) *Angew. Chem.* **88**, 762.
6. Schulten H.-R. und Games, D. E. (1974) *Biomed. Mass Spectrom.* **1**, 120.
7. Lehmann, W. D., Schulten, H. -R. und Beckey, H. (1973) *Org. Mass Spectrom.* **7**, 1103.
8. Markham, K. R., Ternai, B., Stanley, R., Geiger, H. und Mabry, T. J. (1978) *Tetrahedron* **34**, 1389.
9. Stahl, E. und Brombeer, J. (1973) *Sci. Pharm.* **2**, 133.
10. Stahl, E. und Brombeer, J. (1975) *Pharm. Acta Helv.* **50**, 385.
11. Pictet, A. und Sarasin, J. (1918) *Helv. Chim. Acta* **1**, 88.
12. Pictet, A. und Goudet, H. (1919) *Helv. Chim. Acta* **2**, 699.