

## MASSENSPEKTROMETRIE VON FLAVONOID-O-GLYKOSIDEN – I

H. WAGNER\* und O. SELIGMANN

Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München

(Received in Germany 28 March 1973; Received in UK for publication 5 June 1973)

**Zusammenfassung** – 13 natürlich vorkommende Flavonol-O-monoglykoside und 12 Flavonol-bis-O-glykoside wurden im Mikromassstab permethyliert und von den Permethylierungsprodukten die Massenspektren aufgenommen. Die Analyse dieser Spektren liefert eine einfache und schnelle Methode, um bei Monoglykosiden die Zuckerhaftstelle zu lokalisieren und bei Flavonol-3,7-O-bis-glykosiden zwischen den möglichen Isomeren zu unterscheiden.

**Abstract** – Thirteen naturally occurring flavonol-O-monoglycosides and twelve flavonol-bis-O-glycosides were permethylated in micro-scale and subjected to mass spectrometry. Analysis of the spectra yielded a simple and quick method for determining the linkage position of the sugar in monoglycosides and for differentiating between possible isomers in the case of flavonol-3,7-bis-O-glycosides.

Es gibt eine Vielzahl von natürlichen Flavonol-bis-O-glykosiden, aus denen durch Hydrolyse verschiedene Zucker erhalten werden.<sup>1</sup> Durch Reaktion mit Salz- und Komplex-bildenden Agentien und UV-Spektroskopie<sup>2,3,4</sup> lässt sich meist schnell ermitteln, in welchen Positionen des Aglukons die Zucker gebunden sind. In letzter Zeit wird auch die NMR-Spektroskopie<sup>4</sup> zum Nachweis der Zuckerhaftstelle herangezogen. Schwierigkeiten bereitet es aber oft, die verschiedenen Zucker den richtigen Positionen am Aglykon zuzuordnen. Nach den systematischen Untersuchungen von Harborne<sup>5,6</sup> eignen sich hierzu die Verfahren der selektiven und partiellen enzymatischen und sauren Hydrolyse. Die Geschwindigkeit einer Hydrolyse hängt dabei wesentlich von der Art der Zucker und der Verknüpfungstelle am Aglukon ab. Diese Hydrolysen verlaufen aber abgesehen von dem Zeit aufwand oft nicht eindeutig genug und setzen reine Enzympräparate voraus. So wird z.B. von einer 50%igen Hydrolyse für Kämpferol-3-O-glucosid nach 1·8 Minuten und für das Kämpferol-7-O-rhamnosid nach 2·0 Minuten berichtet.

Die Massenspektrometrie bietet demgegenüber die Möglichkeit einer sicheren Differenzierung im Mikromassstab und in kürzester Zeit. Mit Ausnahme der Flavonoid-C-glykoside, die von Prox<sup>7</sup> untersucht wurden, eignen sich die freien Glykoside weniger für die MS. Deshalb haben auch Schmid und Mitarbeiter<sup>8,9</sup> zur MS-Strukturermittlung und Identifizierung von Flavonoid-di- und trisacchariden die per-(deutero)-methylierten Verbindungen eingesetzt. Nach unseren Erfahrungen eignen sich ebenfalls die permethylierten Mono- und bis-O-glykoside am besten für die Massenspektroskopie.

Die dominierende Fragmentierung dieser Ver-

bindungen ist die Zuckerabspaltung vom Aglukon unter H-Wanderung (A + H, A + 2H), während die Aglukonfragmentierung wenig signifikante Bruchstücke liefert (Abb 1). Der Molekül-Peak tritt nur bei den 7-O-Glykosiden deutlich in Erscheinung. In allen anderen Fällen ist er sehr schwach ausgeprägt oder er fehlt ganz.

Unsere MS-Studien an 13 Flavon- und Flavonol-monoglykosid-permethyl-äthern (PMÄ) haben ergeben, dass die in 5- und 3-Stellung gebundenen Zucker leichter abgespalten werden, als diejenigen in 7-Stellung. In 4'-Stellung substituierte Zucker nehmen eine Zwischenstellung ein. Dieses Verhalten deckt sich mit den Ergebnissen der Säure-Hydrolyse. Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, zeigen deshalb Flavon- und Flavonol-7-O-mono-glykoside einen relativ intensiven Molekülion-Peak. Die untersuchten 5-O- und 3-O-Glykoside zeigen keinen erkennbaren M<sup>+</sup>-Peak, das einzige untersuchte 4'-O-Glucosid einen schwachen aber noch deutlich erkennbaren M<sup>+</sup>-Peak. Das Aglukonsignal ist bei Flavonoid-glykosid-permethyläthern stets sehr intensiv und manchmal als Base-Peak ausgebildet.

Setzen wir diesen bei der Auswertung gleich 100% rel. Intensität, so ergeben sich für die Molekülkationen von Quercetin-7-O-glucosid 90%, von Luteolin-7-O-glucosid 50%, von Luteolin-7-O-neohesperidosid 10%, von Quercetin-4'-O-glucosid 3% rel. Intensitäten, für Quercetin-3-O-mono-glykoside dagegen 0·1 bis 0·2% und weniger. Die 3-O-Glucuronide zeigen davon abweichend eine rel. Intensität von ca. 2%. Auf Grund der charakteristischen MeOH-Abspaltung aus dem bei der Methylierung gebildeten ME sind die Glucuronide leicht zu erkennen.

In Tabelle 2 sind 12 Flavonol-3,7-bis-glykoside

Tabelle 1

|   | <i>m/e</i><br>A + H   | (100%<br>Rel.<br>Int.) | <i>m/e</i>                                  | (% rel.<br>Int.) |
|---|-----------------------|------------------------|---|------------------|
| Luteolin-7-glucosid-PMÄ   | 328                   |                        | M <sup>+</sup><br>546                       | (50%)            |
| Luteolin-7-neohesperidosid-PMÄ                                  | 328<br>A + 2H<br>329  | (95%)                  | M <sup>+</sup><br>720<br>M-Rha<br>517       | (10%)<br>(12%)   |
| Luteolin-5-glucosid-PMÄ<br>= Galuteolin                         | 328                   |                        | M <sup>+</sup><br>546                       | ϕ                |
| Chrysoeriol-7-glucuronid-ME-PMÄ                                 | 328                   |                        | M <sup>+</sup><br>560<br>M-MeOH<br>528      | (45%)<br>(40%)   |
| Quercetin-7-glucosid-PMÄ<br>= Quercimeritrin                    | 358                   |                        | M <sup>+</sup><br>576                       | (90%)            |
| Quercetin-4'-glucosid-PMÄ<br>= Spiraeosid                       | 358                   |                        | M <sup>+</sup><br>576<br>M + 1<br>557       | (3%)<br>(3%)     |
| Quercetin-3-glucosid-PMÄ<br>= Isoquercitrin                     | 358                   |                        | M <sup>+</sup><br>576                       | (0.1%)           |
| Quercetin-3-galaktosid-PMÄ<br>= Hyperosid                       | 358                   |                        | M <sup>+</sup><br>576                       | (0.2%)           |
| Quercetin-3-rhamnosid-PMÄ<br>= Quercitrin                       | 358                   |                        | M <sup>+</sup><br>546                       | (0.2%)           |
| Quercetin-3-glucuronid-ME-PMÄ                                   | 358                   |                        | M <sup>+</sup><br>590<br>M-MeOH<br>588      | (2%)<br>(1%)     |
| Quercetin-3-rutinosid-PMÄ<br>= Rutin                            | 358<br>A + Glu<br>545 | (0.3%)                 | M <sup>+</sup><br>750                       | ϕ                |
| Rhamnetin-3-rhamno-rhamno-<br>galaktosid-PMÄ<br>= Xanthorhamnin | 358                   |                        | M <sup>+</sup><br>924<br>M-Disacch.<br>358  | ϕ<br>(20%)       |
| Kämpferol-3-(p-Cumaroyl)-<br>glucosid-PMÄ<br>= Tilirosid        | 328                   |                        | M <sup>+</sup><br>692<br>p-Cumaroyl.<br>161 | ϕ<br>(125%)      |

mit den entsprechenden Peak-Intensitäten aufgeführt. Die Signale, die ein Bruchstück M – (3-O-Zucker) wiedergeben, liegen zwischen 40 und 50% rel. Intensität. Die M – (7-O-Zucker)-Bruchstücke ergeben bezogen auf den A + 2H-Peak, Peak-Intensitäten unter 1%. Die M<sup>+</sup>Signale sind hier noch schwächer und meist nicht zu erkennen. Triglykoside mit einem Biosidanteil wie z.B. das Robinin verhalten sich in gleicher Weise. Die Fragmentierungen sind so zu deuten, dass 3-Glykoside ebenso wie 5-Glykoside infolge Ausbildung eines 5-Ring bzw. 6-Ring-Chelates mit der Carbonylgruppe den Zucker leicht abspalten, während bei 7- und 4'-O-gebundenen Zuckern keine solche Stabilisierungsmöglichkeiten gegeben sind. Auch

thermische Fragmentierungen sind nicht auszuschließen.

Wie aus der Tabelle 2 und Abb 2 deutlich wird, kann bei 3,7-Bis-glykosiden die Verteilung der Zuckerkomponenten aus den Spektren direkt abgelesen werden, da A + H + Monosaccharid-Fragmente von hoher rel. Intensität immer die Zuckerart am C<sub>7</sub> wiedergeben. Die beiden miteinander isomeren Verbindungen Isorhamnetin-3-gluco-7-rhamnosid-PMÄ (1) und Isorhamnetin-3-rhamno-7-glucosid-PMÄ (2) können ebenso wie Isorhamnetin-3-gluco-7-arabinosid-PMÄ (3) und Isorhamnetin-3-arabino-7-glucosid-PMÄ (4) somit leicht auf Grund der beiden miteinander korrespondierenden Peak-Intensitäten unterschieden werden:

- |                                     |                                   |
|-------------------------------------|-----------------------------------|
| 1. A + H + Rha <i>m/e</i> 532 (40%) | A + H + Glu <i>m/e</i> 562 (0.5%) |
| 2. A + H + Glu <i>m/e</i> 562 (42%) | A + H + Rha <i>m/e</i> 532 (1.4%) |
| 3. A + H + Ara <i>m/e</i> 518 (40%) | A + H + Glu <i>m/e</i> 562 (0.5%) |
| 4. A + H + Glu <i>m/e</i> 562 (45%) | A + H + Ara <i>m/e</i> 518 (1%)   |

Tabelle 2

|   | <i>m/e</i><br>A + 2H | (100%<br>rel.<br>Int.) | <i>m/e</i>            | (% rel.<br>Int.) |
|---|----------------------|------------------------|-----------------------|------------------|
| Isorhamnetin-3-gluco-<br>7-rhamnosid-PMÄ (1)                    | 344                  |                        | A + H + Rha           |                  |
|   |                      |                        | 532                   | (40%)            |
|   |                      |                        | A + H + Glu           |                  |
| Isorhamnetin-3-rhamno-<br>7-glucosid-PMÄ (2)                    | 344                  |                        | 562                   | (0.5%)           |
|   |                      |                        | A + H + Glu           | (42%)            |
|   |                      |                        | A + H + Rha           | (1.4%)           |
| Quercetin-3-rhamno-7-<br>glucosid-PMÄ <sup>(a)</sup>            | 344                  |                        | 532                   | (50%)            |
|   |                      |                        | A + H + Glu           | (0.8%)           |
|   |                      |                        | A + H + Rha           |                  |
| Isorhamnetin-3-gluco-<br>7-arabinosid-PMÄ (3)<br>= Hunnemanosid | 344                  |                        | 518                   | (40%)            |
|   |                      |                        | A + H + Glu           | (0.5%)           |
|   |                      |                        | 562                   |                  |
| Isorhamnetin-3-arabino-<br>7-glucosid-PMÄ (4)                   | 344                  |                        | A + H + Glu           | (45%)            |
|   |                      |                        | 562                   |                  |
|   |                      |                        | A + H + Ara           | (1%)             |
| Quercetin-3-xylo-<br>7-glucosid-PMÄ <sup>(a)</sup>              | 344                  |                        | A + H + Glu           | (48%)            |
|   |                      |                        | 562                   |                  |
|   |                      |                        | A + H + Xyl           | (0.7%)           |
| Kämpferol-3-arabino-7-<br>rhamnosid-PMÄ <sup>(b)</sup>          | 314                  |                        | A + H + Rha           | (44%)            |
|   |                      |                        | 502                   |                  |
|   |                      |                        | A + H + Ara           | (0.5%)           |
| Isorhamnetin-3,7-<br>diglucosid-PMÄ                             | 344                  |                        | A + H + Glu           | (44%)            |
|   |                      |                        | 562                   |                  |
| Kämpferol-3,7-dirhamnosid-<br>PMÄ = Kämpferitrin                | 314                  |                        | A + H + Rha           | (47%)            |
|   |                      |                        | 502                   |                  |
| Rutin-7-glucosid-PMÄ <sup>(a)</sup>                             | 344                  |                        | A + H + Clu           | (48%)            |
|   |                      |                        | 562                   |                  |
|   |                      |                        | A + H + Rutinose      | ϕ                |
| Kämpferol-3-robinobiosido-<br>7-rhamnosid-PMÄ<br>= Robinin      | 314                  |                        | A + H + Rha           | (46%)            |
|   |                      |                        | 502                   |                  |
|   |                      |                        | A + H + Robinobiose   | ϕ                |
| Apigenin-7,4'-<br>diglucuronid-ME-PMÄ                           | 284                  |                        | A + H + Glu           | (45%)            |
|   |                      |                        | 516                   |                  |
|   |                      |                        | A + H + (Glucur-MeOH) | (50%)            |
|   |                      |                        | 484                   | (50%)            |
|   |                      |                        | M <sup>+</sup> 748    | (1.8%)           |

Wie das Beispiel des Tilirosids zeigt, kann bei *Acyglykosiden* ausgeschlossen werden, dass der Acylrest an das Aglukon gebunden ist.

Bei *Flavanonglykosiden* findet man, da unter den stark alkalischen Bedingungen der Methylierung Ringöffnung zum Hydroxy-Chalkon erfolgt, eine zusätzliche Methylgruppe im Spektrum. Die Bruchstücke der Aglykon-Fragmentierung, wie sie von Kingston<sup>10</sup> sowie Reed und Wilson<sup>11</sup> beschrieben wurden, sind von geringerer Intensität, können aber gelegentlich zu Unterstützung bei der Strukturaufklärung dienen. Es handelt sich z.B. um die RDA- und A1, A-15, A-17, A-18, A-43-Fragmente.

Für die Zuckerfragmentierung gelten die von

Kochetkov und Mitarbeitern<sup>12</sup> für Phenyl-glucosid-permethylläther angegebenen Regeln. Die Glucose zeigt z.B. die charakteristische Fragmentierung: *m/e* 218 → 187 → 155 → 111 → 101. Glucose- und Galactoseanteile lassen sich auf diese Weise nicht unterscheiden.

Nach Fertigstellung der Arbeit erhaltenes Quercetin-3'-O-glucosid<sup>(a)</sup> zeigte nach Permethylierung eine rel. Int. des M<sup>+</sup>-Peaks von 8%, das Quercetin-5-O-glucosid<sup>(a)</sup> eine solche von 0,2%.

#### EXPERIMENTELLES

##### 1. Darstellung der Permethylläther

Die Permethylierungen erfolgten nach Hakomori<sup>13</sup> in DMSO oder DMF als Lösungsmittel.<sup>14</sup> 0.1–1 mg Glyko-



Forschungsgemeinschaft sind wir für die großzügige Förderung des Naturstoffprogramms durch Bereitstellung eines MS-30-Gerätes zu grossem Dank verpflichtet.

#### LITERATUR

- <sup>1</sup>J. B. Harborne, *Comparative Biochemistry of the Flavonoids*, Academic Press, London and New York (1967)
- <sup>2</sup>L. Jurd and R. M. Horowitz, *J. Org. Chem.* **22**, 1618 (1957)
- <sup>3</sup>L. Jurd, *Phytochem.* **8**, 445 (1969)
- <sup>4</sup>T. J. Mabry, K. R. Markham, M. B. Thomas. *The Systematic Identification of Flavonoids*, Springer Verlag, Berlin-Heidelberg-New York (1970)
- <sup>5</sup>J. B. Harborne, *Phytochem.* **4**, 107 (1965)
- <sup>6</sup>J. B. Harborne, *Ibid.* **3**, 151 (1964)
- <sup>7</sup>A. Prox, *Tetrahedron*, **24**, 3697 (1968)
- <sup>8</sup>R. D. Schmid, *Ibid.* **28**, 3259 (1972)
- <sup>9</sup>R. D. Schmid, P. Varenne and R. Paris, *Ibid.* **28**, 5037 (1972)
- <sup>10</sup>D. G. J. Kingston, *Ibid.* **27**, 2691 (1971)
- <sup>11</sup>R. I. Reed and J. M. Wilson, *J. Chem. Soc.*, 5949 (1963)
- <sup>12</sup>N. K. Kochetkov, N. S. Wulfson, O. S. Chizhov and B. M. Zolotarev, *Tetrahedron*, **19**, 2209 (1963)
- <sup>13</sup>S. Hakomori, *J. Biochem.* **55**, 205 (1964)
- <sup>14</sup>J. S. Brimacombe, B. D. Jones, M. Stacey and J. J. Willard, *Carbohydr. Res.* **2**, 167 (1966)