

MASSENSPEKTROMETRIE VON FLAVONOID-O-GLYKOSIDEN—II

O. SELIGMANN und H. WAGNER
Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München

(Received in Germany 20 February 1978; Received in the UK for publication 8 May 1978)

Zusammenfassung—Die MS-Analyse natürlich vorkommender Flavonoid-mono-, -di- und -tri-O-glykoside in Form ihrer Isopropyliden-Permethyl-derivate ermöglicht: (1) die massenspektroskopische Unterscheidung zwischen diastereoisomeren Zuckeranteilen, (2) die Ermittlung der Molekulargewichte und zugleich die Bestimmung interglykosidischer Bindungen bei Di- und Triglykosiden mit Hilfe deutlicher M^+ -Peaks und (3) die Differenzierung zwischen der furanoiden und pyranoiden Form von Zuckern in den genuine Glykosiden. Es werden die charakteristischen MS-Daten von über 20 Flavonoid-O-glykosid-IP-Derivaten tabellarisch angegeben.

Abstract—MS-analysis of more than 20 naturally occurring flavonoid-mono-, di- and triglycosides as isopropyliden-permethyl-derivatives allows: (1) MS-differentiation between stereoisomeric sugar moieties, (2) determination of the interglycosidic linkages in di- and tri-glycosides with the aid of improved M^+ -peaks and (3) differentiation between the furanoid and pyranoid ring form of sugars in the genuine glycosides.

In vorausgegangenen Arbeiten^{1,2} wurde von uns über die MS-Analyse von natürlich vorkommenden Flavonoid-O-monosiden, -biosiden und -bis-glykosiden nach Permethylierung im Mikromaßstab berichtet. Es konnte gezeigt werden, dass hiermit einfach und schnell die Zuckerhaftstelle in Mono- und Diglykosiden lokalisiert und bei Flavonol-3,7-O-bis-glykosiden zwischen möglichen Isomeren unterschieden werden kann. In ähnlicher Weise haben Schmid und Mitarbeiter³⁻⁶ die Perdeuteromethyläther von Flavonoidbiosiden und -triosiden zur Strukturaufklärung herangezogen. Die TMS-Derivate wurden von Schels und Mitarb.⁷ zur Strukturermittlung von Mono-, Di- und Triglykosiden von Flavonoiden eingesetzt. Allerdings konnten die hohen Massen der Molekülpeaks von 1-8% rel. Int. nur durch besondere Kalibrierung der MS-Datenverarbeitung bestimmt werden.

Obwohl mit Hilfe der FD-MS⁸ und der ¹³C-NMR-Spektroskopie⁹ in jüngster Zeit weitere Verbesserungen in der Strukturanalyse von Polyphenolglykosiden erreicht wurden, sind im EI-MS-Routinebetrieb einige strukturanalytische Probleme ungelöst geblieben:

(1) Schwache oder fehlende Molekülpeaks bei Flavonol-3- und 5-O- sowie Flavon-5- und 2'-O-mono- oder -diglykosiden lassen die Molekulargewichte nur indirekt aus Fragmenten erkennen.

(2) Die Bestimmung interglykosidischer Bindungen bei Di- und Triglykosiden ist in vielen Fällen nicht möglich.

(3) Zwischen diastereomeren Zuckeranteilen wie Glucose und Galaktose oder Xylose und Arabinose kann nicht unterschieden werden. Wir haben gefunden, dass diese Schwierigkeiten durch die MS-Analyse von Isopropyliden-Permethyl-Derivaten (IP-PM) weitgehend behoben werden können.

Als schonende und einfach durchzuführende Methode, Isopropylidengruppen in Glykosiden einzuführen, eignet sich die Umsetzung mit Aceton in Gegenwart von *p*-Toluolsulfonsäure oder wasserfreiem Kupfer-II-sulfat.¹⁰ Mit CuSO₄ als Kondensationsmittel werden nach unseren Ergebnissen durch 5-stündige Behandlung bei Raumtemperatur (Methode A) praktisch nur *cis*-vicinale

Diolgruppierungen substituiert (1,3-Dioxolanringe), während mit TsOH nach 15-stündiger Einwirkung auch 6-Ringe (1,3-Dioxanringe) gebildet werden (Methode B). Eine Acetonierung im Mikromaßstab wurde in beiden Fällen mit jeweils 1 mg Glykosid erreicht. Die Vollständigkeit der Reaktion erkennt man sofort an den Glykosylfragmenten T, deren Massen um 12 μ vermehrt zu finden sind (Tabelle 1).

Bei allen permethylierten O-Glykosiden, von denen keine oder nur undeutliche M^+ -Peaks erhalten wurden, lieferten die IP-PM-Derivate deutliche, d.h. > 1%ige M^+ -Peaks (Tabelle 1). Diese lagen um 12 ME höher als bei den für die PM-Äther zu erwartenden M^+ -Peaks. Sie waren an den für Acetonide typischen M-15-Peaks (CH₃-Abspaltung) zu erkennen.¹¹

Da je nach der Verknüpfungsweise der Zucker in Di- und Trisaccharideinheiten bei der Acetonierung Mono-Di- oder Tri-IP-Derivate entstehen, war es auf die gleiche Weise möglich, zwischen Rutosiden bzw. Gentiobiosiden mit einer 1→6-Verknüpfung und Neohesperidosiden bzw. Sophorosiden mit einer 1→2-Verknüpfung zu unterscheiden. Im ersten Fall können nur Mono-IP-Derivate, im zweiten Di-IP-Derivate gebildet werden.

Bei den Flavonol-3-triosiden Xanthorhamnin-B und -C aus *Rhamnus petiolaris*¹² konnten Molekülpeaks bei *m/e* 948 und 960 entsprechend einem Di-(I)- und einem Tri-IP-PM-Derivat-(II) eindeutig nachgewiesen werden (Abb 1). Damit ist für das Xanthorhamnin-C eine Gal 6←1 Rha 4←1 Rha-Verknüpfung in der Rhamninose bestätigt. Die Bildung eines Di-IP-Derivates für Xanthorhamnin-B zeigt dagegen eine 1→2 oder 1→3 verknüpften Di-rhamnoseanteil an. Eine 1→3-Verknüpfung wurde bereits früher durch Methylierungsanalyse und GC-MS der Al-ditolacetate ausgeschlossen.

In ähnlicher Weise konnte bei einigen O-C-Triglykosiden aus *Melandrium album* auf eine 2'-O-Verknüpfung zwischen Glucose bzw. Rhamnose und der C-gebundenen Glucose geschlossen werden.¹³

Die Spektren von Xanthorhamnin-B und -C (Abb. 2-4) erlauben auch Rückschlüsse, in welchen Monosac-

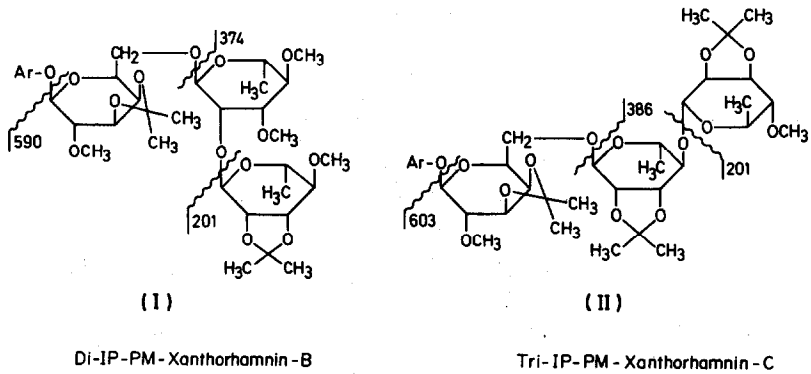
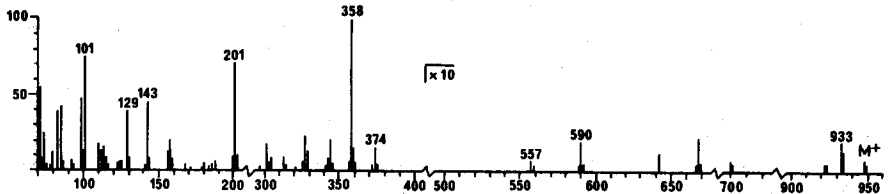


Abb. 1



MS von Di-IP-PM-Xanthorhamnin-B

Abb. 2

Tabelle 1.

	M ⁺	m/e (% rel.Int.)		
		M-15	A+H	T
PM-Ap-7-glu (Cosmosiin)	516(42)	-	298(100)*	218(63)
IP-PM-Ap-7-glu B**	528(52)	513(20)	298(100)	230(39)
PM-Ap-7-gal (Thalictiin)	515(50)	-	298(100)	218(48)
IP-PM-Ap-7-gal A	528(47)	513(5)	298(100)	219(30)
PM-Lut-7-glu	546(50)	-	328(100)	230(37)
IP-PM-Lut-7-glu B	559(55)	543(17)	328(100)	218(52)
PM-Lut-5-glu (Galuteolin)	546(0,1)	-	328(100)	230(43)
IP-PM-Lut-5-glu B	546(3)	543(1)	328(100)	218(27)
PM-Qu-4'-glu (Spiraeosid)	576(4)	-	358(100)	230(18)
IP-PM-Qu-4'-glu B	588(7)	573(2)	358(100)	218(49)
PM-Qu-3-gal (Hyperosid)	576(0,2)	-	358(100)	230(21)
IP-PM-Qu-3-gal A	588(1)	573(3)	358(100)	218(65)
PM-Qu-3-glu (Isoquercitrin)	576(0,8)	-	358(100)	219(42)
IP-PM-Qu-3-glu B	588(2)	573(1)	358(100)	230(54)
PM-Qu-3-rha (Quercitrin)	546(0,2)	-	358(100)	218(38)
IP-PM-Qu-3-rha A	558(2)	543(8)	358(100)	230(40)
PM-Qu-3-ara (Guajaverin)	532(0,2)	-	358(100)	189(8)
IP-PM-Qu-3-ara _p A	544(2)	529(10)	358(100)	188(15)
PM-Qu-3-ara _f (Avicularin)	532(0,1)	-	358(100)	201(5)
kein IP-Derivat B	-	-	-	175(15)
PM-Qu-3-xyl _p	532(0,1)	-	358(100)	175(26)
kein IP-Derivat B	-	-	-	175(36)
PM-Qu-3-xyl _f (Reynoutrin)	532(0,1)	-	358(100)	174(19)
IP-PM-Qu-3-xyl _f B	544(1,5)	529(1)	358(100)	174(22)
PM-8-OH-Qu-3-glu (Gossytrin)	606(0,1)	-	388(100)	175(53)
IP-PM-8-OH-Qu-3-glu _B	618(1)	603(1)	388(100)	186(12)
				218(47)
				230(31)

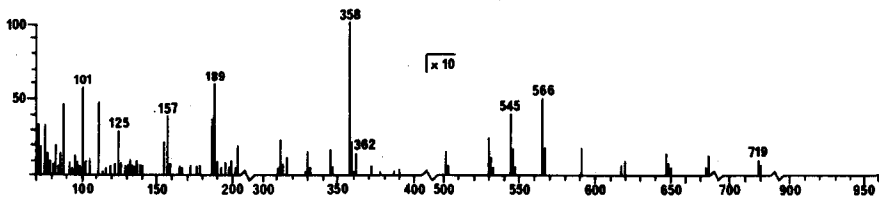
Tabelle 1 (Contd.)

	M ⁺	M-15	m/e (% rel. Int.) A+H A+H+S	T	T+S
PM-Kä-3,7-di-rhamnosid (Lespedin)	690(-)	-	314(100) 502(47)	189(32)	-
Di-IP-PM-Kä-3,7-di-rha.	A 714(2)	675(6)	314(100) 514(42)	201(40)	-
PM-Qu-3-rutinosid (Rutin)	750(-)	-	358(100) 545(2)	189(4)	392(2)
IP-PM-Qu-3-rut.	B 762(1)	747(3)	358(100)	201(35)	404(10)
PM-Qu-3-gentiobiosid	780(-)	-	358(100) 545(3)	218(12)	422(8)
IP-PM-Qu-3-gentiob.	B 792(2)	777(5)	358(100) 545(1)	230(42)	434(11)
PM-Qu-3-sophorosid (Carmenosid)	780(-)	-	358(100) 545(2)	218(14)	-
Di-IP-PM-Qu-3-sophor.	B 804(1)	789(4)	358(100) 557(2)	230(55)	446(3)
PM-Nar-7-neohesperidosid (Naringin)	706(8)	-	314(100) 503(5)	189(200)	393(92)
Di-IP-PM-Nar-7-neohesp.	B 730(1)	715(3)	314(100)	201(155)	416(13)
PM-Hesp-7-rutinosid (Hesperidin)	736(8)	-	344(100) 532(10)	189(310)	392(31)
IP-PM-Hesp-7-rut.	B 748(3)	733(5)	344(100)	201(210)	404(18)
PM-Xanthorhamnin-B	924(-)	-	358(100) 545(2)	189(60)	362(12) 566(3)
Di-IP-PM-Xanthorh.-B	B 948(0,6)	933(2)	358(100) 557(0,5)	201(71)	374(15) 590(2)
PM-Xanthorhamnin-C	924(-)	-	358(100) 545(4)	189(60)	362(15) 566(5)
Tri-IP-PM-Xanthorh.-C	B 960(1)	945(3)	358(100) 557(1)	201(66)	386(16) 603(3)

Abkürzungen: Qu = Quercetin; Ap = Apigenin; Lut = Luteolin; Kä = Kämpferol;
Nar = Naringenin; Hesp = Hesperetin

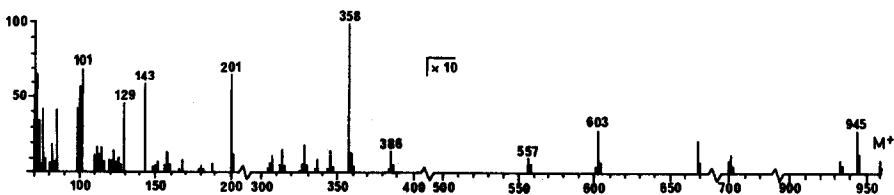
* Aglucon + H-Fragment als 100% gesetzt

** Acetonierungsmethode



MS von PM-Xanthorhamnin-C

Abb. 3.



MS von Tri-IP-PM-Xanthorhamnin-C

Abb. 4.

charideinheiten die Acetalisierung erfolgt ist: Ein Bruchstück bei *m/e* 201 ist ein Indiz für eine terminale Rhamnose, bei *m/e* 374 bzw. 386 für eine endständige Dirhamnoseeinheit und bei *m/e* 590 bzw. 603 für eine Dirhamnosylgalaktose.

Bei Flavon- und Flavonol-O-monoglykosiden werden die 2,3-O-IP-Derivate von Rhamnosiden (III) und die 3,4-O-IP-Derivate von Galaktosiden (IV) und Arabinosiden (V) leichter gebildet (mit CuSO_4), als die 4,6-O-IP-Derivate von Gluco- (VI) und Galaktopyranosiden (VII), welche Säurekatalyse und längere Einwirkung erfordern.

Über ähnliche Ergebnisse berichteten Chopin und Mitarb. bei IP-PM-Flavon-di-C-glykosiden.¹⁴

Xyloside in der Pyranoseform (VIII) geben infolge der transständigen OH-Gruppen keine Isopropylidenderivate. Im übrigen lässt sich eine quantitativ erfolgte Acetonierung dünn-schichtchromatographisch überprüfen, wenn man säurefreie Fließmittel verwendet.

Die Acetonierung von Hyperosid (Qu-3-galaktopyranosid) oder Thalictiin (Apigenin-7-galaktopyranosid) mit CuSO_4 lieferte quantitativ Mono-3'',4''-O-IP-Hyperosid bzw. 3'',4''-O-IP-Thalictiin, während Isoquercitrin (Qu-3-glucopyranosid) und Cosmosiin (Apigenin-7-glucopyranosid) unter den gleichen Bedingungen nur in Spuren ein IP-Derivat ergaben. Erst nach längerer Einwirkung von Aceton und Toluolsulfonsäure werden die 4'',6''-O-IP-Derivate von Isoquercitrin und Cosmosiin gebildet. Die Auswertung der MS erlaubt somit die Differenzierung zwischen Galaktopyranosiden und Glucopyranosiden: Findet man einen Molekülpeak für ein IP-Derivat bereits nach Kupfersulfat-Zugabe, so kann man auf eine Galaktose, im umgekehrten Falle auf eine Glucose schliessen.

Ausserdem kann zwischen pyranoiden und furanoiden Zuckern, wie sie mehrmals bei natürlich vorkommenden Flavonoidglykosiden beschrieben wurden,¹⁵ differenziert werden. Wie bekannt, spalten PM-Aldofuranosen bevorzugt die exocyclische Seitenkette ab, sodass sie sich in ihrer Fragmentierung von den PM-Pyranosen unterscheiden.¹⁶ Das gleiche gilt nach unseren Untersuchungen für phenolisch gebundene Glykosylreste. Ein starkes Fragment mit der MZ 129 im Spektrum ist typisch für Furanoside. Auch hier bieten die IP-Derivate eine bessere Unterscheidungsmöglichkeit. Da ein von uns untersuchtes Quercetin-3-arabinosid aus Psidium

guajava¹⁷ kein IP-Derivat lieferte, musste es sich um ein Arabinofuranosid (IX) handeln (Avicularin), welches aus sterischen Gründen nicht reagieren kann. Im Gegensatz dazu bildete eine authentische Probe des isomeren Guajaverin¹⁸ bereits mit CuSO_4 ein 3'',4''-O-IP-Derivat (V), wie es für Quercetin-3-arabinopyranosid zu erwarten war.

Ein als Quercetin-3-xylosid identifiziertes Glykosid aus *Reynoutria japonica* (Reynoutrin),¹⁹ gab mit Toluolsulfonsäure ein Mono-IP-Derivat (X), d.h. Xylose musste in furanoider Form gebunden sein. Damit war dieses Glykosid eindeutig von synthetischem Quercetin-3-xylopyranosid verschieden.²⁰

Obwohl keine natürlichen Glucofuranoside (XI) zur Verfügung standen, darf angenommen werden, dass diese durch Bildung der 5,6-O-IP-Derivate²¹ unter milden Bedingungen in ähnlicher Weise identifiziert werden können.

Damit besteht die Möglichkeit, Flavonoid-furanoside, die bis jetzt in keinem Fall durch Synthese endgültig bewiesen wurden, durch MS ihrer PM und IP-PM-Derivate zu identifizieren.

EXPERIMENTELLES

1. *Darstellung der Isopropylidenderivate. Methode A.* Ca. 1 mg Glykosid wurde in 10–15 ml wasserfr. Aceton p.a. gelöst und eine Spatelspitze wasserfr. Kupfer-II-sulfat zugegeben. Nach 5 stünd. Stehen wurde vom CuSO_4 abfiltriert und am Rotationsverdampfer eingedampft. Nach Trocknen im HV wurde nach *Brimacombe*²² permethyliert. *Methode B.* Ca. 1 mg Glykosid wurde in 10–15 ml wasserfr. Aceton p.a. gelöst, mit einer Spur wasserfr. Toluolsulfonsäure (frisch geschmolzen) versetzt und unter Rühren 15 h. bei RT behandelt. Dann wurde mit 10%iger Ammoniaklösung tropfenweise bis pH = 7 neutralisiert und am Rotationsverdampfer vom Aceton befreit. Nach Trocknen im HV wurde wie oben permethyliert.

2. *Massenspektrometrie.* AEI MS 30; EI 70 eV, 4 KV, 100–300 μA , 200°C; DE 180°, 10⁻⁶ Torr.

3. *DC der IP-Derivate.* Kieselgel 60 F 254 Merck, Äthylacetat-Methanol-Wasser 100:17:13, DC der IP-PM-Derivate. Kieselgel 60 F 254 Merck, Chloroform p.a.-Aceton 9:2.

4. *Herkunft der Flavonoid-glykoside.* Die Glykoside stammen zum grössten Teil aus eigenen Isolierungen oder Synthesen. Einige Glykoside verdanken wir Herrn Prof. L. Farkas (Budapest). Eine Probe Guajaverin stellte uns Herr Prof. El Khadem (Kairo) zur Verfügung.

Danksagung—Der Deutschen Forschungsgemeinschaft gilt unser Dank für grosszügige Sachbeihilfen.

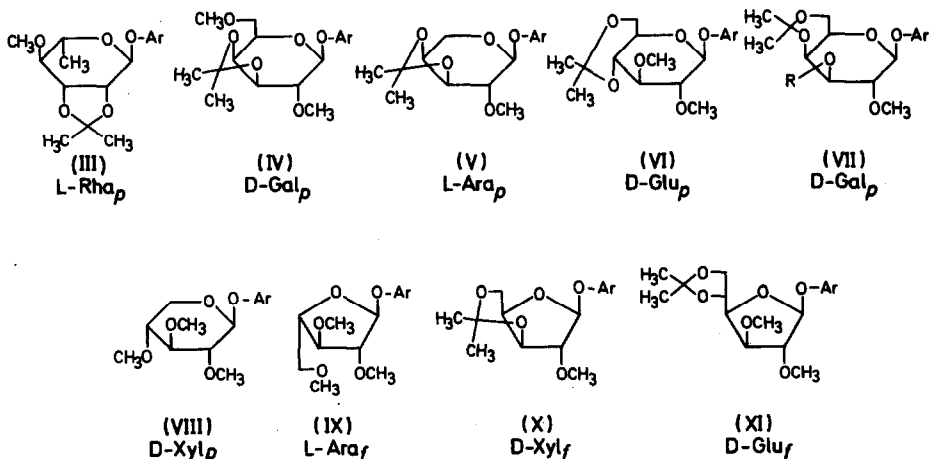


Abb. 5.

LITERATUR

- ¹H. Wagner und O. Seligmann, *Tetrahedron* **29**, 3029 (1973).
- ²O. Seligmann und H. Wagner, In *Topics in Flavonoid Chemistry and Biochemistry* (Ed. L. Farkas, M. Gabor und F. Kallay). Akademiai Kiado, Budapest (1975).
- ³R. D. Schmid, *Tetrahedron* **28**, 3259 (1972).
- ⁴R. D. Schmid, P. Varenne und R. Paris, *Ibid.* **28**, 5037 (1972).
- ⁵R. D. Schmid und J. B. Harborne, *Phytochem.* **12**, 2269 (1973).
- ⁶Núñez-Alarcón, E. Rodríguez, R. D. Schmid und T. J. Mabry, *Ibid.* **12**, 1451 (1973).
- ⁷H. Schels, H. D. Zinsmeister und K. Pfeleger, *Ibid.* **16**, 1019 (1977).
- ⁸H. D. Schulten und D. E. Games, *Biomed. Mass Spectrom.* **1**, 120 (1974).
- ⁹V. M. Chari, M. Jordan, H. Wagner und P. W. Thies, *Phytochem.* **16**, 1110 (1977).
- ¹⁰O. T. Schmidt, In *Methods in Carbohydr. Chemistry* (Ed. by R. L. Whistler), Vol. II, p. 318. Bemiller, New York (1972).
- ¹¹C. D. De Jongh und K. Biemann, *J. Am. Chem. Soc.* **86**, 67 (1964).
- ¹²H. Wagner, M. Ertan und O. Seligmann, *Phytochem.* **13**, 857 (1974).
- ¹³H. Wagner, G. Obermeier, O. Seligmann und V. M. Chari, *Ibid.* im Druck.
- ¹⁴J. Chopin, G. Dellamonica, E. Besson, L. Skrzypczakowa, J. Budzianowski und T. J. Mabry, *Ibid.* **16**, 1999 (1977).
- ¹⁵J. B. Harborne und C. A. Williams, In *The Flavonoids* (Ed. J. B. Harborne und T. J. Mabry). Chapman, London (1975).
- ¹⁶N. K. Kochetkov, N. S. Wulfson, O. S. Chizhov und B. M. Zolotarev, *Tetrahedron* **19**, 2209 (1963).
- ¹⁷H. El Khadem und Y. S. Mohammed, *J. Chem. Soc.* 3320 (1958).
- ¹⁸R. Dirscherl, Dissertation, München (1968).
- ¹⁹T. Nakaoki und N. Morita, *J. Pharm. Soc. Japan* **76**, 323 (1956).
- ²⁰L. Hörhammer, H. Wagner, H. G. Arndt, H. Krämer und L. Farkas, *Tetrahedron Letters* **6**, 567 (1966).
- ²¹S. Morgenlie, *Acta Chem. Scand. (B)*, **29**, 278 (1975).
- ²²J. S. Brimacombe, B. D. Jones, M. Stacey und J. J. Willard, *Carbohydr. Res.* **2**, 167 (1966).