

DIPLOMARBEIT

Titel der Diplomarbeit

Aufbau einer Flavonoid MSⁿ Datenbank mittels
ESI-Ionenfallen-Massenspektrometrie

Verfasser

Michael Burgert

angestrebter akademischer Grad

Magister der Pharmazie (Mag.pharm.)

Wien, 2011

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 449

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Pharmazie

Betreuerin / Betreuer:

Ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek

Danksagung

Frau Univ.-Prof. Dr. Verena M. Dirsch danke ich für die Bereitstellung des Diplom-arbeitsplatzes am Department für Pharmakognosie.

Ich danke Herrn ao. Univ.-Prof. Mag. Dr. Gottfried Reznicek für die Bereitstellung des Themas meiner Diplomarbeit sowie für die sehr gute Betreuung während meiner Arbeit am Department für Pharmakognosie.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Martin Zehl, der mir bei massenspektrometrischen Fragestellungen und technischen Problemen jederzeit kompetent und freundschaftlich zur Seite stand.

Weiters möchte ich mich bei allen StudienkollegInnen und MitarbeiterInnen des Departments für Pharmakognosie für die Freundschaft und Unterstützung bedanken.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern Susanna und Helmut Burgert, sowie meiner Schwester Daniela, die mir während meines gesamten Studiums beistanden und meiner Partnerin Sylvia Vogl für die fachliche und emotionale Unterstützung.

Ich widme meine Diplomarbeit zwei einzigartigen Menschen. Meinem Großvater Willibald Fink, der mich zu diesem Studium inspiriert hat und meinem verstorbenen Studienkollegen und Freund Christoph Matt.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Problemstellung	7
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Flavonoide	17
2.2	Massenspektrometrie (MS).....	21
2.2.1	Probenaufarbeitung	23
3	Ergebnisse.....	25
3.1	Flavonoid-Aglyka	25
3.2	Methoxylierte Flavonoid-Aglyka	38
3.3	Flavonoid-Glykoside	44
4	MS/MS Flavonoid-Datenbank	51
5	Diskussion.....	55
6	Zusammenfassung	59
7	Summary	60
8	Literaturverzeichnis	61
9	Abbildungsverzeichnis	63
10	Tabellenverzeichnis.....	64
	Curriculum vitae	67

1 Einleitung und Problemstellung

Flavonoide (lat. flavus [gelb]) sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die meist eine gelbe Färbung aufweisen. Es wurden in der Literatur weit über 6500 Flavonoide beschrieben.

Sie kommen ubiquitär im Pflanzenreich vor und werden daher auch mit der Nahrung in größeren Mengen aufgenommen. In Früchten und Gemüse ist die Konzentration am höchsten, zum Beispiel beträgt sie in Zwiebeln bis zu 1,2g/kg Frischgewicht. Durch den Verzehr von flavonoidreichen Lebensmitteln soll das Risiko einer koronaren Herzkrankheit (CHD) zu erleiden vermindert werden. Interessant ist auch das neuroprotektive Potential dieser Lebensmittel, welches sich positiv bei Parkinson und Alzheimer auswirken könnte. Auch das Risiko an Krebs zu erkranken soll mit einer flavonoidreichen Kost gemindert werden [1]. Somit besteht ein möglicher Zusammenhang zwischen der gesundheitsfördernden Wirkung einer ausgewogenen Ernährung mit flavonoidhaltigen Arzneidrogen. Der Weißdorn (*Crataegus monogyna* Jacq. (Lindm.), *Crataegus laevigata* (Poiret)) wird beispielsweise als Arzneidroge bei Herz- und Kreislaufstörungen angewendet und Ginkgo Extrakte von *Ginkgo biloba* werden zur Behandlung von Demenz eingesetzt [2].

Für die einzelnen Flavonoide wurden zahlreiche pharmakologische Wirkungen beschrieben. Die wichtigsten sind, die antioxidative, antiphlogistische, antiallergische, antimikrobielle, antivirale, antikarzinogene und antiproliferative Wirkung [2].

In der Natur liegen Flavonoide nicht nur ungebunden, sondern auch als Ester, Glykoside oder als Oligomere vor. Die Resorption im Körper findet vorwiegend im Darm statt. Flavonoidglykoside können mit Hilfe der mikrobiellen Darmflora hydrolysiert und als Aglyka resorbiert werden. Ihre geringe intrinsische Aktivität beruht auf der hohen Metabolisierungsrate und der schnellen Elimination, die sowohl biliär als auch renal erfolgt. Im Körper liegen die Flavonoide in methylierter, sulfatierter und hauptsächlich in glucuronierter Form, gebunden an Albumin, vor.

Die biliäre Elimination geschieht über das Cytochrom P450 System, vorwiegend ist hier die Isoform 3A4 beteiligt, über welche auch Arzneistoffe metabolisiert werden. Die Glucuronide werden im Verlauf ihrer Elimination im enterohepatischen Kreislauf wieder aufgenommen, wodurch es zu einer zweiten Plasmakonzentrationspitze zirka 7 Stunden nach der Aufnahme kommt [3].

Die Grundstruktur der Flavonoide ist das Flavan (2-Phenyl-chroman) (Abbildung 1). Je nach Oxidationsstufe und Substitution des C-Rings, lassen sich die Flavonoide in *Flavanone*, *Flavanonole*, *Flavone*, *Flavonole*, *Isoflavone* und *Chalkone* einteilen. *Leucoanthocyanidine*, *Anthocyanidine* und *Aurone* werden ebenfalls unter den Begriff Flavonoide geführt (Abbildung 2).

Die Ringe A und B können weiters mit Hydroxy- und Methoxy-Gruppen unterschiedlicher Anzahl an allen möglichen Positionen substituiert sein [2]. Aufgrund des Biosynthesewegs sind die Positionen 5, 7, und 4' meist hydroxyliert. Allerdings können diese Hydroxy-Gruppen ebenso wieder enzymatisch entfernt werden, wie die Position 3, 3', und 5' (häufig) bzw. 6, 8, 2' und 6' (selten) zusätzlich hydroxyliert bzw. methoxyliert werden.

Eine Verknüpfung mit Zuckern, gleich ob Pyranosen oder Furanosen, führt zu O- oder C-Glykosiden. Es werden Mono-, Di- und Oligosaccharide gebunden, wobei auch mehrere Zucker in unterschiedlichen Positionen anzutreffen sind. O-Glykoside treten häufig in den Positionen 3 und 7, C-Glykoside typischerweise in den Positionen 6 und 8 auf.

Es treten auch andere bekannte Modifikationen auf, wie zum Beispiel aliphatische oder aromatische Acyl-Gruppen aber auch Sulfat-Gruppen. Diese können sowohl direkt über die Hydroxygruppe am Aglykon als auch an den Zuckern gebunden sein.

Die Biosynthese der Flavonoide beginnt mit einem Molekül Acetyl-CoA, welches über den Shikimisäureweg in die aromatische Aminosäure Phenylalanin umgewandelt wird. Phenylalanin wird mit Hilfe von drei Schlüsselenzymen über zwei Zwischenprodukte in

Cumaryl-Coenzym A umgewandelt. Cumaryl-CoA und drei Moleküle Malonyl-CoA werden mit Hilfe des Enzyms Chalkon-Synthase verknüpft, wodurch sich der zweite aromatische Ring ausbildet und somit das Chalkon entsteht. Das Chalkon steht mit dem Flavanon durch das Enzym Chalcon-Isomerase im Gleichgewicht, wodurch sich der sauerstoffhaltige C-Ring ausbildet (Abbildung 3) [4].

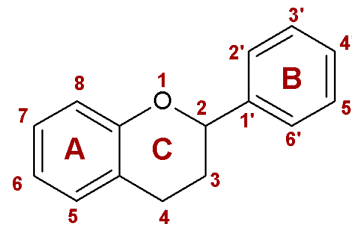
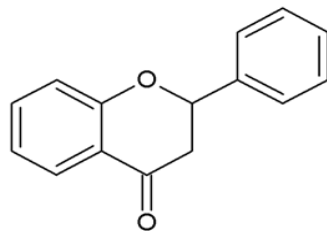
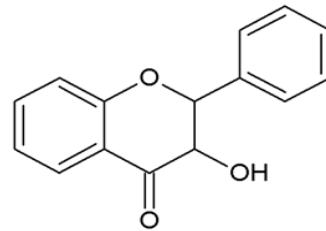


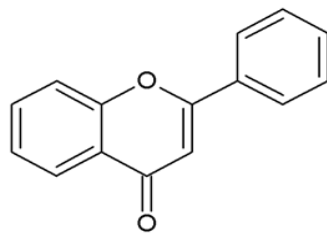
Abbildung 1 Flavan (2-Phenyl-chroman)



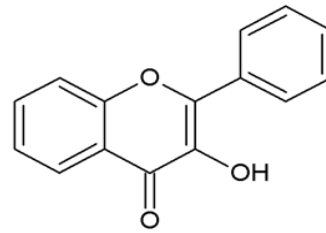
Flavanon



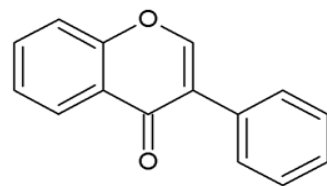
Flavanonol



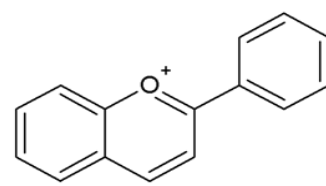
Flavon



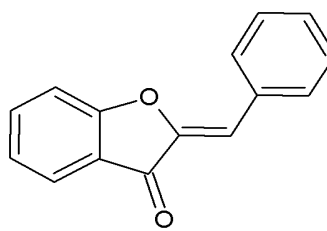
Flavonol



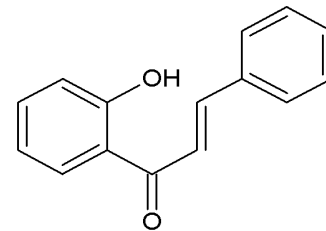
Isoflavon



Anthocyanidin



Auron



Chalkon

Abbildung 2 Grundkörper der Flavonoide

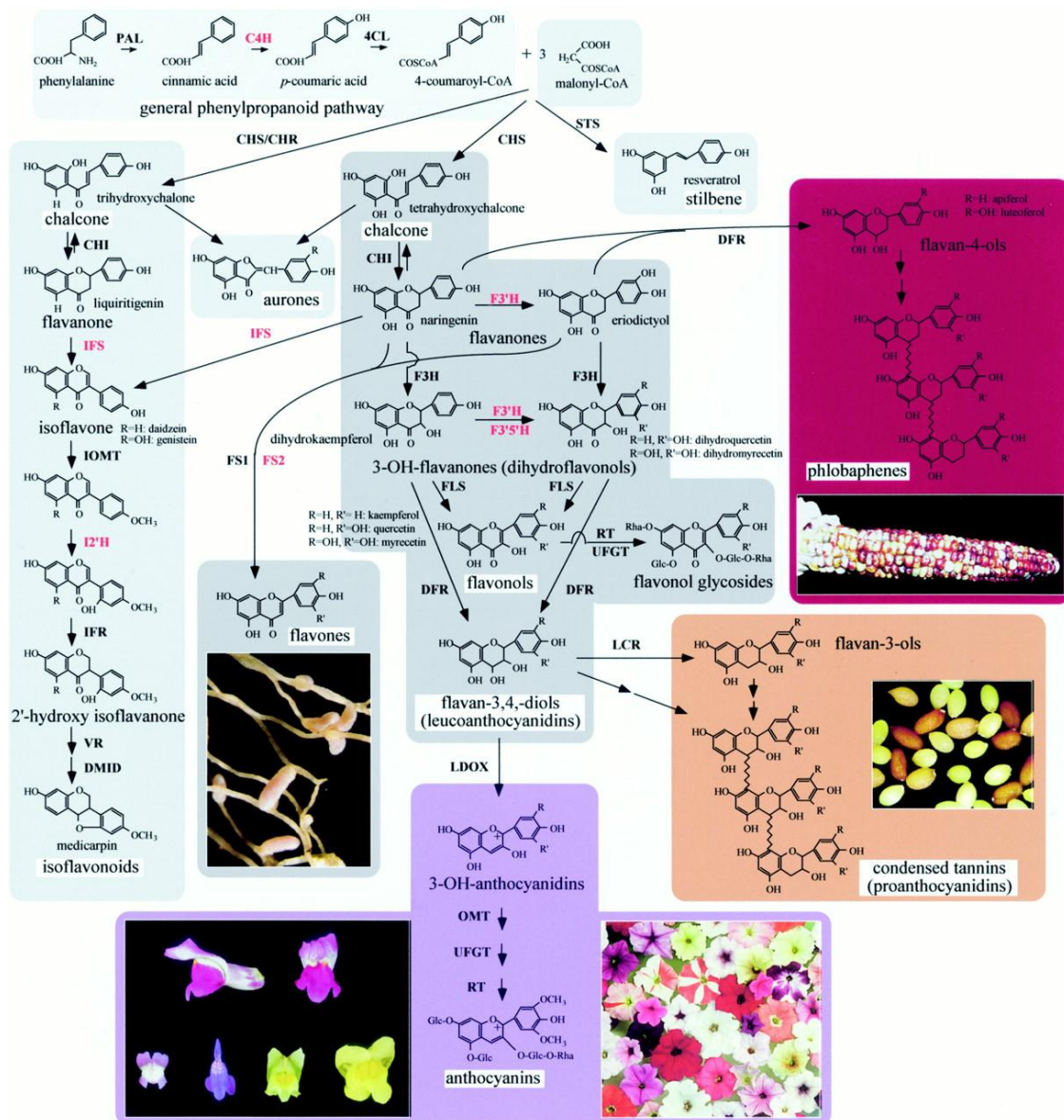


Abbildung 3 Biosynthese der Flavonoide [4]

Heutzutage können verschiedene analytische Messmethoden gekoppelt werden, um in einem Arbeitsschritt so viel Information wie möglich über eine unbekannte Probe zusammenzutragen. Eine der gängigen Kopplungen ist die Verbindung der Hochleistungsflüssigchromatographie mit der Massenspektrometrie (HPLC-MS). Mittels der Massenspektrometrie ist es möglich, Moleküle im Hochvakuum anhand ihres Molekulargewichtes beziehungsweise erzeugter Fragmente zu identifizieren.

Ein Massenspektrometer besitzt eine Ionenquelle, einen Analysator und einen Detektor. Die Moleküle werden in die Gasphase übergeführt, ionisiert und durch ein elektromagnetisches Feld beschleunigt. Im Analysator werden die Ionen nach ihrem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) aufgetrennt und anschließend detektiert (Abbildung 4).

Für diese Arbeit wurde das ElektroSpray-Ionisations (ESI) Verfahren gewählt um die Flavonoide zu ionisieren. Hierbei wird die flüssige Probe in einer Sprühkammer mittels einer feinen Nadel und Stickstoffgas zerstäubt. Durch eine zwischen der ESI-Nadel und dem Eingang des Massenspektrometers angelegte Hochspannung erhält das Aerosol wahlweise positive oder negative Überschussladungen. Bei dem verwendeten Instrument ist die Nadel im rechten Winkel zu einer metallbeschichteten Glaskapillare angeordnet, wodurch nur die Tröpfchen mit der gewünschten Größe in das Massenspektrometer gelangen. Vor dem Eingang der Kapillare passieren die Tröpfchen einen Trocknungsgasstrom, der das Lösungsmittel großteils verdampft. Durch das Schrumpfen des Tropfens verdichten sich die Ladungen auf der Oberfläche, bis diese aufgrund der Coulomb'schen Abstoßung explodieren und sich kleinere Tropfen bilden. Dieser Vorgang wiederholt sich so oft, bis die Probe desolvatisiert und ionisiert vorliegt (Abbildung 5).

Die so erhaltenen Ionen (z.B. $[M+H]^+$ oder $[M-H]^-$) werden durch das elektrische Feld der Oktopole fokussiert und beschleunigt und gelangen schlussendlich in die Ionenfalle. Entlang dieses Ionentransferbereichs wird noch zusätzlich der Druck stufenweise zu einem Hochvakuum reduziert, damit kein Lösungsmitteldampf in die Ionenfalle und den Detektor gelangen kann, wodurch sich das Hintergrundrauschen reduziert (Abbildung 4).

Die Ionenfalle (IT) wird mit Helium Gas befüllt (ca. 1×10^{-5} mbar), um die Ionen zu kühlen und effizient in der Falle festzuhalten.

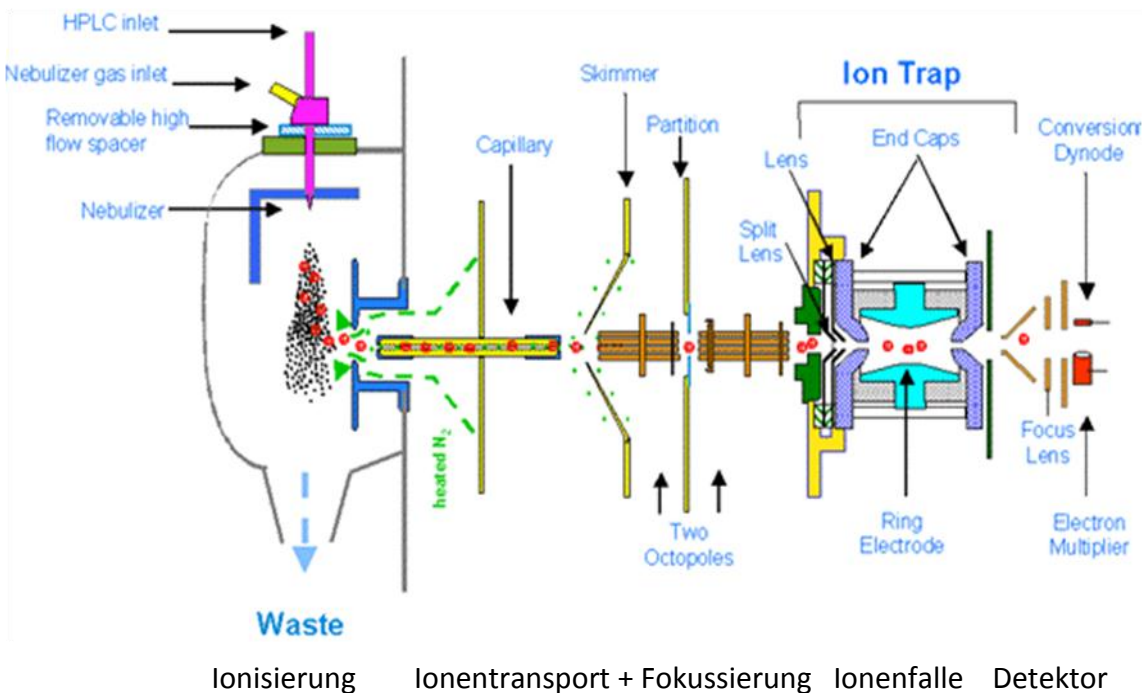


Abbildung 4 Schematischer ESI-IT-MS Aufbau

Quelle: esquire HCT series User Manual V1

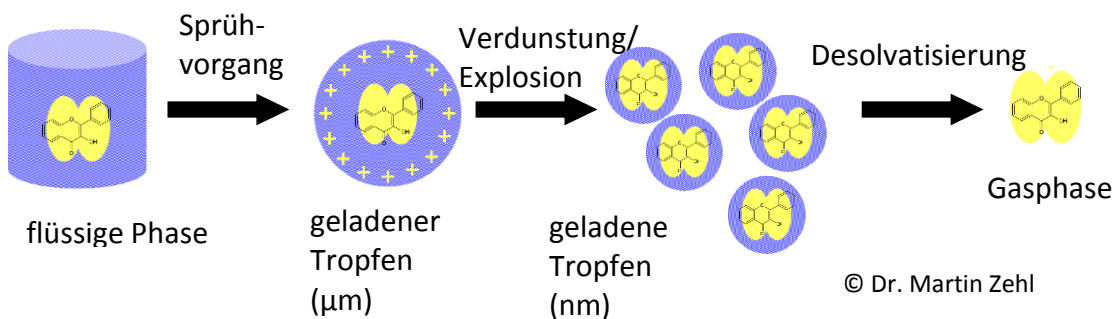


Abbildung 5 ElectroSpray Ionisation (ESI)

ESI ist eine sanfte Ionisationsmethode, die Vorteile im Vergleich zu den „harten“ Ionisationsmethoden sind das Arbeiten unter Normaldruck und dass labile, polare Moleküle intakt in die Gasphase gebracht und ionisiert werden können. Somit kann die Fragmentierung gezielt in der IT vorgenommen werden, wohingegen z.B. bei der Elektronenstoßionisation (EI) durch die Bildung eines Radikalkations die Fragmentierung von selbst abläuft und man häufig nur mehr die Fragmente detektieren kann.

Zwar ist diese Fragmentierung durch Einhalten konstanter Parameter reproduzierbar, aber nicht gezielt steuerbar. Bei der Chemischen Ionisation (CI) muss man zuerst ein Reaktandgas ionisiert werden, das in weiterer Folge dessen Ladung auf die gasförmige Probe überträgt. Bei beiden Ionisationsmethoden muss die Probe zusätzlich vor der Ionisation in den gasförmigen Zustand übergeführt werden, wodurch nur unzersetzt verdampfbare Substanzen ionisiert werden können.

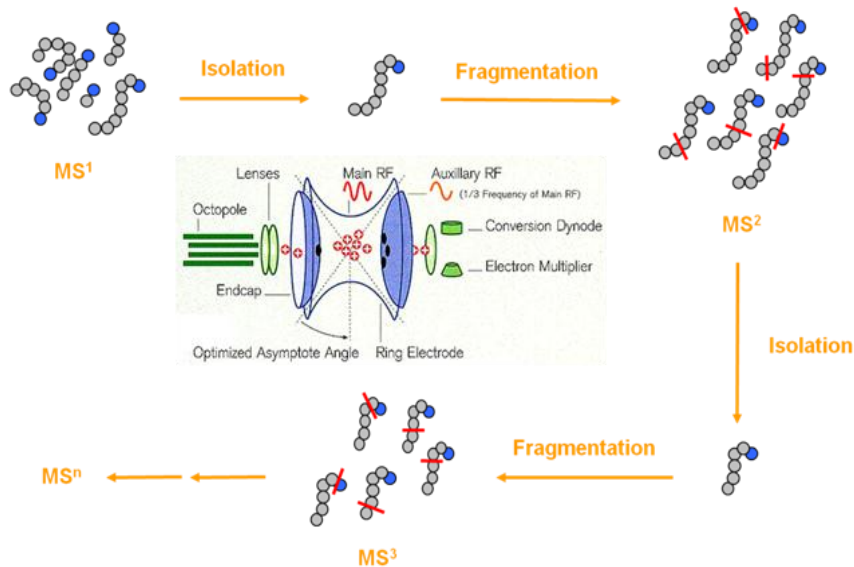
Da bei der ESI die Probe gelöst vorliegen muss, kann man diese Methode sehr gut mit einer HPLC koppeln und somit die Substanzen nach der chromatographischen Trennung einzeln analysieren.

Die Ionenfalle, die bei der Mehrstufenmassenspektrometrie (MS^n) als Ionenspeicher und Massenanalysator fungiert, besteht aus drei Hauptkomponenten: zwei Verschluss- und einer Ringelektrode. Durch das Anlegen geeigneter RF-Spannungen an diese Elektroden bewegen sich die Ionen auf stabilen dreidimensionalen Bahnen in ihr, so dass eine Ionenwolke entsteht (Abbildung 4).

Somit erlaubt einem die IT sowohl unterschiedliche Ionen über einen weiten Masse-zu-Ladungs Verhältnis (m/z) Bereich, als auch nur Ionen mit einem bestimmten m/z Verhältnis in ihr festzuhalten. Für die Detektion werden die Ionen entsprechend ihrem m/z der Reihe nach aus der IT geleitet und Richtung Detektor beschleunigt. Beim Auftreffen auf die Konversionsdynode werden Elektronen freigesetzt, welche im Elektronenvervielfacher über eine Kaskadenreaktion vermehrt werden und so das Detektorsignal geben.

Eine IT ermöglicht weiters eine gezielte Fragmentierung der Ionen. Das Vorläuferion wird dabei zunächst isoliert, indem alle Ionen, die nicht das gewünschte m/z aufweisen entfernt werden. Darauf folgt eine Anregung des Vorläuferions, wobei durch Anlegen von RF-Spannungen geeigneter Frequenzen dessen kinetische Energie erhöht wird, welche durch Stöße mit Heliumatomen in innere Energie umgewandelt wird. Wurde dem Vorläuferion ausreichend Energie zugeführt, kommt es zum Brechen der schwächsten kovalenten Bindungen und zur Bildung von Fragment-Ionen. Diese Technik wird als Kollisions-induzierte Dissoziation (CID) bezeichnet. Die so erhaltenen

Fragment-Ionen können wiederum einzeln in der IT gesammelt und weiter fragmentiert werden (Abbildung 6).



© Dr. Martin Zehl

Abbildung 6 Fragmentierung mittels Ionenfalle

Bei anderen Instrumententypen ist zwischen zwei räumlich getrennten Analysatoren eine Kollisionszelle zwischengeschaltet in der die Fragmentierung abläuft. Eine gängige Methode ist hier die Triple-Quadrupol Technik. Dabei wird z.B. im ersten Quadrupol ein Ion isoliert, im zweiten fragmentiert und im dritten Quadrupol werden die Fragmente gescannt.

Der Vorteil der Ionenfalle, im Vergleich zu anderen Instrumentendesigns, besteht darin, dass hier mit einem einzigen kompakten Bauteil, sowohl fragmentiert als auch analysiert werden kann, und dass in der IT gebildete Fragment-Ionen in mehreren Stufen erneut isoliert und weiter fragmentiert werden können (Mehrstufen-MS, MS^n).

Bei der CID von Flavonoiden ist ein typisches Fragmentierungsverhalten auffällig, welches sich bei positiver und negativer Ionisation voneinander unterscheidet. Die Fragmentierung von Flavonoid-Aglyka findet vorrangig am C-Ring statt, die Ringe A und

B bleiben meist erhalten. Durch die Angabe, welche beiden Bindungen im C-Ring gespalten wurden und in welchem Modus gemessen wurde, kann man die so erhaltenen Fragmente nomenklieren [5].

Die folgende Abbildung enthält die möglichen Fragmente je nach Ionisierung (Abbildung 7).

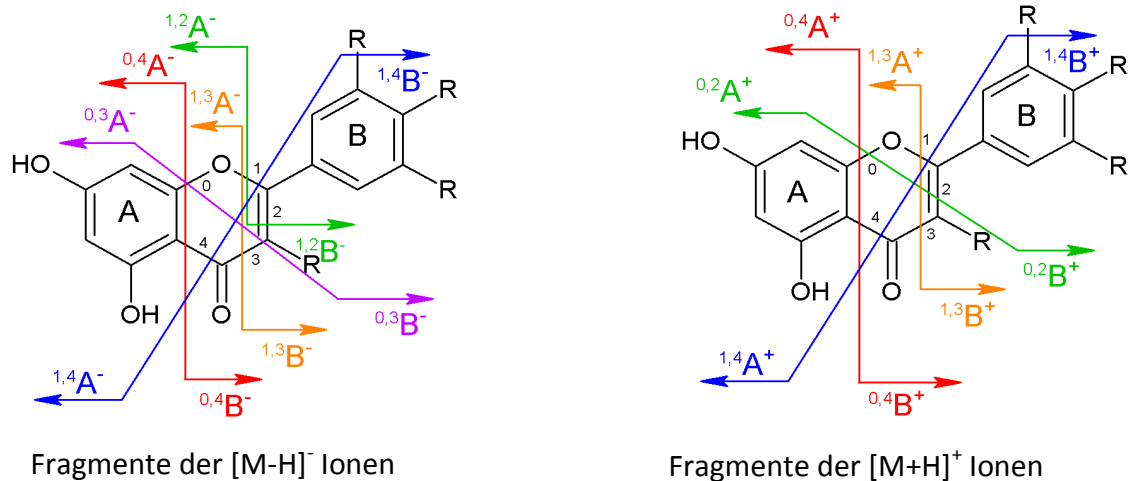


Abbildung 7 Flavonoid-Aglyka Fragmentierungsschema

Die Nomenklatur der Fragmente, die bei Flavonoid-Glykosiden auftreten, ähnelt der der Aglyka. Mit den Buchstaben X, Y und Z wird die „Art“ des Fragmentes beschrieben und mit der rechten Zahl (Abbildung 8) der Ort der Fragmentierung. Y- und Z-Fragmente beziehen sich auf die glykosidische Bindung, während X-Fragmente den Ringbruch eines Zuckers darstellen. Die Zahl 0 im Index steht dabei für die erste glykosidische Bindung des Zuckers am Aglykon, alle weiteren Ziffern nummerieren die Zuckerkette vom Aglykon gesehen. Hochgestellte Ziffern bei X-Ionen geben die Bindungen im Zucker an, die gebrochen wurden.

Die oben genannten Bezeichnungen beziehen sich auf jene Fragment-Ionen, die noch das Aglykon beinhalten. Abhängig von der Position des Ladungsträgers können dieselben Bindungsbrüche aber auch zur Bildung der Komplementärionen, also der geladenen Zucker(teil)strukturen ohne das Aglykon, führen. In diesem Fall verwendet

man eine Nomenklatur mit A, B und C - hochgestellte Ziffern bei den C-Ionen zeigen auch hier den Ringbruch an. Der Index nummeriert vom Kettenende aus die glykosidisch verknüpften Zucker. Damit es zu keiner Verwechslung mit den Aglykon-Fragmenten kommt, wird in diesem Fall das Aglykon mit dem Index 0 beziffert [6] (Abbildung 8).

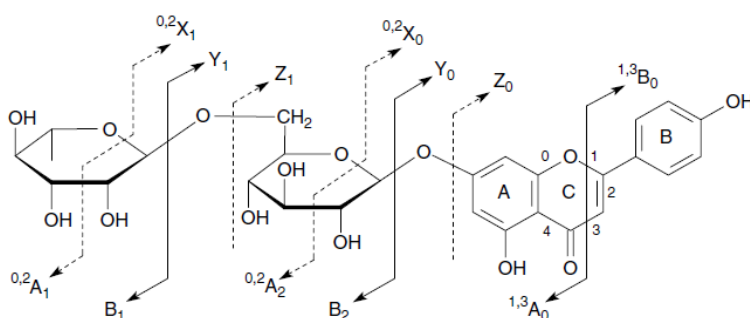


Abbildung 8 Flavonoid-Glykosid Fragmentierungsschema [6]

Aufgrund der oben genannten Informationen wurde in der vorliegenden Arbeit das Fragmentierungsverhalten von Flavonoiden eingehend studiert. Dabei sollte festgestellt werden, ob im Zuge der Fragmentierung mit Hilfe der Ionenfalle charakteristischen Bruchstücke entstehen. Diese Fragmente müssten dann je nach Substitutionsgrad ein definiertes m/z Verhältnis besitzen. Da viele Flavonoide ein gleiches Molekulargewicht aufweisen, jedoch das Substitutionsmuster unterschiedlich ist, könnte man somit, aufgrund charakteristischer Fragmente, den einzelnen Flavonoiden Substrukturen zuordnen, welche der Identifizierung dienen.

In weiterer Folge sollte eine Datenbank mit Referenzspektren erstellt werden, um so Flavonoide in einer Probe softwaregestützt identifizieren zu können. Falls die Datenbank kein entsprechendes Referenzspektrum beinhaltet, müsste es zumindest möglich sein, die Substrukturen eines unbekannten Flavonoids anhand charakteristischer Bruchstücke aufzuklären.

2 Material und Methoden

2.1 Flavonoide

Damit eine entsprechend gute MSⁿ Datenbank über Flavonoide aufgebaut werden kann, benötigt man Proben mit einer ausreichenden Reinheit. Hier wurde auf die am Department für Pharmakognosie vorrätigen Flavonoid-Reinsubstanzen zurückgegriffen, um hochqualitative Spektren aufnehmen zu können.

Die nachfolgenden Tabellen enthalten alle untersuchten Flavonoid-Aglyka, Monoglykoside und -Diglykoside.

Tabelle 1 Vermessene Flavonoid-Aglyka

Aglyka

		Substituenten	MG	Charge
Nr.	Flavanone			
1	5-Methoxyflavanon	5-MeO	254,30	Roth 3576348
2	5,7-Dihydroxy-8-methyl-flavanon	5,7-OH-8-Me	270,29	Roth 4592730
3	Naringenin	5,7,4'-OH	272,27	ES 03120108
4	Homoeriodictyol	5,7,4'-OH-3'-OMe	302,29	Roth 03313751

Nr.	Flavanonole			
5	Dihydrofisetin (Fustin)	7,3',4'-OH	288,26	Roth 1347577
6	Dihydorobinetin	7,3',4',5'-OH	304,27	Roth 1454823
7	Dihydroquercetin (Taxifolin)	5,7,3',4',-OH	304,27	Roth 5186462
				ES Extrasynthese

		Substituenten	MG	Charge
Nr.	Flavone			
8	5-Hydroxyflavon (Primuletin)	5-OH	238,26	Roth 10210426
9	6-Hydroxyflavon	6-OH	238,26	Roth 4315272
10	7-Hydroxyflavon	7-OH	238,26	Roth k.A.
11	Chrysin	5,7-OH	254,25	Roth 501864
12	Tectochrysin	7-OMe-Chrysin	268,28	Fluka AG 433173
13	Apigenin	5,7,4'-OH	270,25	ES 05081808
14	Acacetin	4'-Me-Apigenin	284,26	Roth 5010631
15	Luteolin (>90%)	5,7,3',4'-OH	286,25	ES 02071720
16	Diosmetin	4'-Me-Luteolin	300,26	Roth 30680794
17	Chrysoeriol	3'-Me-Luteolin	300,29	Roth 47792261
18	3',4',5'-Tri-O-methyl- Tricetin	5,7-OH-3',4',5'- OMe	344,32	k.A.

Nr.	Flavonole			
19	3-Hydroxyflavon		238,26	Roth 49213354
20	Galangin (Norizalpinin)	5,7-OH	270,25	Roth 0874998
21	Kämpferol	5,7,4'-OH	286,24	Roth 3689559
22	Fisetin	7,3',4'-OH	286,25	Roth 0999525
23	Kämpferid	4'-Me-Kämpferol	300,27	Roth 1000986
24	Quercetin	5,7,3',4'-OH	302,24	Dep.Pharmakognosie
25	Robinetin	7,3',4',5'-OH	302,25	Roth 4129432
26	Isorhamnetin	3'-Me-Quercetin	316,26	Roth 07210340
27	Rhamnetin	7-Me-Quercetin	316,26	Roth 1240329
28	Tamarixetin	4'-Me-Quercetin	316,28	ES 06102304
29	Myricetin	5'-OH-Quercetin	318,25	Roth 4319569

Nr.	Isoflavone			
30	Formononetin	7-OH-4'-OMe	268,28	Roth 23940631

Tabelle 2 Vermessene Flavonoidmonoglykoside**Monoglykoside**

		Trivialname	MG	Charge
Nr.	<i>Mono-O-Glykoside</i>			
31	Formononetin-7-O-glukosid	Ononin	430,43	Roth
32	Apigenin-7-O-glukosid		432,38	Extrasynthèse 05081808
33	Naringenin-7-O-glukosid		434,40	Roth 24211689
34	Kämpferol-3-O-glukosid	Astragalin	448,38	Extrasynthèse 07010211
35	Luteolin-4'-O-glukosid		448,38	Extrasynthèse 03120106
36	Luteolin-7-O-glukosid		448,38	Extrasynthèse 04111604
37	Quercetin-3-O-rhamnosid	Quercitrin	448,38	k.A.
38	Eriodictyol-7-O-glukosid		450,40	Extrasynthèse 03041106
39	Quercetin-3-O-galaktosid	Hyperosid	464,38	Extrasynthèse 03120118
40	Quercetin-3-O-glukosid	Isoquercitrin	464,38	Roth 0574000
41	Myricetin-3-O-rhamnosid	Myricitrin	464,38	Extrasynthèse 08020706
42	Isorhamnetin-3-O-glukosid		478,41	Roth 03313763

Nr.	<i>Mono-C-glykoside</i>			
43	Apigenin-8-C-glukosid	Vitexin	432,38	Extrasynthèse 03120113
44	Apigenin-6-C-glukosid	Isovitexin	432,38	Extrasynthèse k.A.
45	Luteolin-6-C-glukosid	Homoorientin	448,38	Extrasynthèse 04061708
46	Luteolin-8-C-glukosid	Orientin	448,38	Extrasynthèse 02021912

Tabelle 3 Vermessene Flavonoidglykoside

Diglykoside

		Trivialname	MG	Charge
Nr.	<i>O-Diglykoside</i>			
47	Apigenin-7-O-aposylglukosid	Apiin	564,48	Roth 3222804
48	Apigenin-7-O-neohesperidosid	Rhoifolin	578,53	Roth 02313748
49	Kämpferol-7-O-neohesperidosid		594,53	Extrasynthèse 07010204
50	Quercetin-3-O-arabinoglukosid	Peltatosid	596,50	Roth k.A.
51	Eriodictyol-7-O-neohesperidosid	Neoeriocitrin	596,55	Roth 45838000
52	Quercetin-3-O-rutinosid	Rutin	610,52	Dep. Pharmakognosie
53	Luteolin-3',7-di-O-glukosid		610,53	Extrasynthèse 07072404
54	Hesperetin-7-O-neohesperidosid	Neohesperidin	610,57	Roche B51225
55	Isorhamnetin-3-O-rutosid	Narcissin	624,56	Extrasynthèse 04070704

Nr.	<i>C-Diglykosid</i>			
56	Vitexin-2"-O-rhamnosid		578,53	Extrasynthèse 02021910

Nr.	<i>O- und C-Glykosid</i>			
57	Isovitexin-7-O-glukoside	Saponarin	594,52	Roth 04834464

2.2 Massenspektrometrie (MS)

Mit der ESI lassen sich Flavonoide, welche polare und nicht flüchtige Verbindungen mit einem mittleren Molekulargewicht darstellen, gut ionisieren.

Die Analysen wurden mit einem ESI-IT-Massenspektrometer der Firma Bruker Daltonics durchgeführt (Abbildung 9).

Die Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die Parameter während der MSⁿ Analyse.

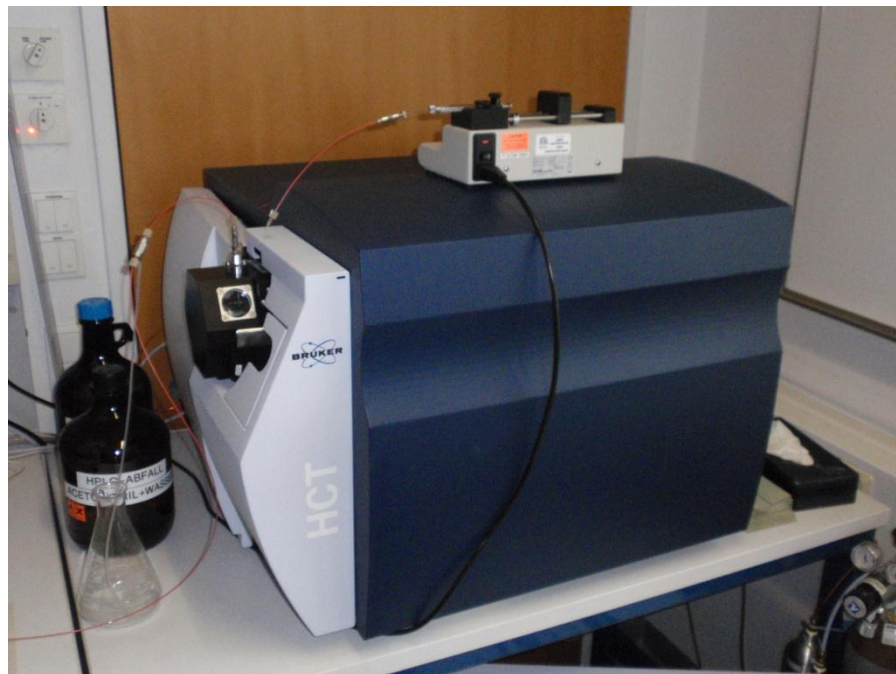


Abbildung 9 ESI-IT-Massenspektrometer

Tabelle 4 MS Parameter

Gerät	Bruker Daltonics HCT	
Probeninfusion	Direkt mittels Spritzenpumpe (0,6ml/h)	
Ionenquelle	ESI; positiv und negativ Modus	
Massenanalysator	Ionenfalle	
Software	esquireControl Version 6.2 (Build 62.24) DataAnalysis Version 4.0 (Build 234)	
Modus	Standard / Enhanced	
ESI-Parameter	Nebulizer:	7 psi
	Dry Temperature:	250,0 °C
	Dry Gas:	4,0 l/min
	Voltage Capillary:	±4,0 kV
Ionenfalle	ICC:	on
	Smart Target:	Negative Mode: 50000-70000 Positive Mode: 150000
	Scan:	MS ¹ 100 – 2000 m/z
	Averages	5 Spectra
MS/MS Parameter	Manual MS	on
	Isolation Width	4,0 oder 2,0 m/z (MS ² , MS ³)
	Fragmentation Cutoff	80 m/z
Fragmentierung standardisiert	MS ² MS ³	Fragment. Amplitude 0,7 Fragment. Amplitude 0,7 / 1,0
Fragmentierung optimiert	MS ² MS ³	Fragment. Amplitude auf ca. 10% Intensität Precursor Ion

2.2.1 Probenaufarbeitung

Die Flavonoid-Reinsubstanzen (2.1 Flavonoide Seite 17) wurden in Methanol (p.A.) gelöst und für weitere Untersuchungen bei -20°C gelagert. Die einzelnen Stammlösungen hatten eine Konzentration von 1 mg/ml bzw. waren in Methanol gesättigt. Sie wurden abhängig von der bevorstehenden Ionisierung differenziert behandelt. Die Proben wurden für die negative Ionisation (NI) mit MeOH:H₂O+Ammoniumacetat (5mM) (1:1) und für die positive Ionisation (PI) mit MeOH:H₂O+Ameisensäure (pH 3,0) (1:1) auf eine Zielkonzentration von 1:100 ($\leq 0,001\%$) verdünnt.

Bei der NI ist die Sensitivität (bezogen auf das S/N) am besten und es bilden sich stabile Phenolat Anionen. Die PI liefert weitere wichtige komplementäre Informationen für die Identifizierung bekannter bzw. die Strukturanalyse unbekannter Flavonoide [7, 8].

Die Proben wurden direkt mittels einer Spritze und einer Spritzenpumpe in der Sprühkammer vernebelt. Es wurden alle Flavonoide in einem „standardisierten“ und „optimierten“ Modus fragmentiert. Der Unterschied in den Spektren ist die Intensität des verbleibenden Precursor-Ions. Die Fragmentierungsamplitude im „optimierten“ Modus wurde so eingestellt, dass noch etwa 10% Intensität des Precursor-Ions vorhanden ist.

Beim „standardisierten“ Modus wurden alle Flavonoide mit einer konstanten Fragmentierungsamplitude gemessen, wobei das Precursor-Ion in diesem Fall typischerweise vollständig zerstört wird. Diese Bedingungen ähneln jenen im „Auto-MS-Modus“, also bei der automatisierten Generierung von MSⁿ-Spektren. Dieser Modus wird zur Inhaltsstoffanalyse einer pflanzlichen Probe mittels HPLC-MS Kopplung genutzt. Diese Spektren erzielen dann in weiterer Folge eine bessere Übereinstimmung mit der Datenbank bei einem Identifizierungsversuch der Inhaltsstoffe einer pflanzlichen Probe.

3 Ergebnisse

Die folgenden Tabellen enthalten die Produktionen, die bei der Fragmentierung entstanden sind. Die in der Literatur beschriebene Fragmentierung wurde für die Interpretation der Spektren herangezogen [5-16]. Die für die einzelnen Strukturklassen typische Fragmentierung ist im Folgenden an ausgewählten Beispielen diskutiert.

3.1 Flavonoid-Aglyka

Die Hauptfragmente im NI und PI werden durch die Spaltung einer C-O und einer C-C Bindung am C-Ring erhalten. Die Ionen $^{ij}A^-$, $^{ij}B^-$ und $^{ij}A^+$, $^{ij}B^+$ können anhand der unterschiedlichen Substituenten und deren Anzahl am Ring A und B identifiziert werden. Zusätzlich kommt der Verlust an kleinen Molekülen (z.B. CO, H₂O) vor, welcher weitere strukturelle Informationen liefert. In Einzelfällen konnten einem experimentell gefundenen Fragmentation mehrere mögliche Strukturen zugeordnet werden. In diesen Fällen ist ein m/z- Wert mehrfach in den folgenden Tabellen zu finden.

Die Fragmentierung im NI-Modus wurde in Anlehnung an die Arbeiten von Fabre [5] und de Rijke [7] studiert. De Rijke et al. [7] und Y.L. Ma et al. [13] lieferten das Fragmentierungsschema von Flavonoiden im PI-Modus. Für die Interpretation von methoxylierten Flavonoiden wurde zusätzlich die Arbeit von Justesen [10, 13] herangezogen.

Flavanone und Flavanonole

Abbildung 10 und Abbildung 11 zeigen die NI- und PI- Spektren der Flavanonole Dihydrorobinetin (6) und Dihydroquercetin (7), welche ein gleiches Molekulargewicht aufweisen und sich strukturell nur in der Anordnung ihrer Hydroxygruppen unterscheiden. Bei der NI im MS² (Abbildung 10) kommt es bei beiden Aglyka zu einem Neutralverlust von Wasser, wodurch sich ein dominanter Peak bei m/z 285 zeigt. Eine Unter-

scheidung wäre hier nur durch die Fragmentierung des C-Ringes möglich, da sich unterschiedliche Bruchstücke ausbilden. Das Dihydrorobinetin bildet weiters ein $^{1,2}\text{A}^-$ Ion, hingegen entstehen bei Dihydroquercetin die Fragmente $^{1,4}\text{A}^-$ und $^{1,4}\text{B}^-$.

Da die Intensität des $[\text{M}-\text{H}-\text{H}_2\text{O}]^-$ Ions bei m/z 285 der beiden Aglyka im MS^2 ausreichend war, konnte hier ein MS^3 -Spektrum gewonnen werden, in dem sich weitere kleinere Moleküle abspalten. Aufgrund der Intensitätsunterschiede dieser Ionen kann man hier auch zwischen den beiden Flavanonolen differenzieren.

Hingegen sieht man im PI-Modus (Abbildung 11) deutlich das unterschiedliche m/z Verhältnis des $^{1,3}\text{A}^+$ Fragmentes, da bei Dihydrorobinetin eine und bei Dihydroquercetin zwei Hydroxygruppen am A-Ring vorhanden sind. Der strukturelle Unterschied am B-Ring zeigt sich durch das Fragment $[\text{M}+\text{H}-\text{B-Ring}]^+$, welches bei Dihydrorobinetin mit drei Hydroxygruppen am B-Ring bei m/z 179 und bei Dihydroquercetin mit zwei Hydroxygruppen am B-Ring bei m/z 195 detektiert wurde. Bei beiden Flavanonolen kommt es zu einem gleichen Verlust kleinerer Moleküle, die für eine Differenzierung leider nicht herangezogen werden können, da sie auch in ihrer Intensität sehr ähnlich sind. Auffällig ist die Fragmentierung des C-Ringes und somit die Ausbildung der Bruchstücke $^{1,4}\text{A}^+$, $^{0,4}\text{B}^+$ und $^{1,2}\text{B}^+$, die nur bei Dihydroquercetin, aber nicht bei Dihydrorobinetin auftreten.

Tabelle 5 und die Tabelle 6 zeigen die detektierten Ionen, denen eine Struktur zugeordnet werden konnte.

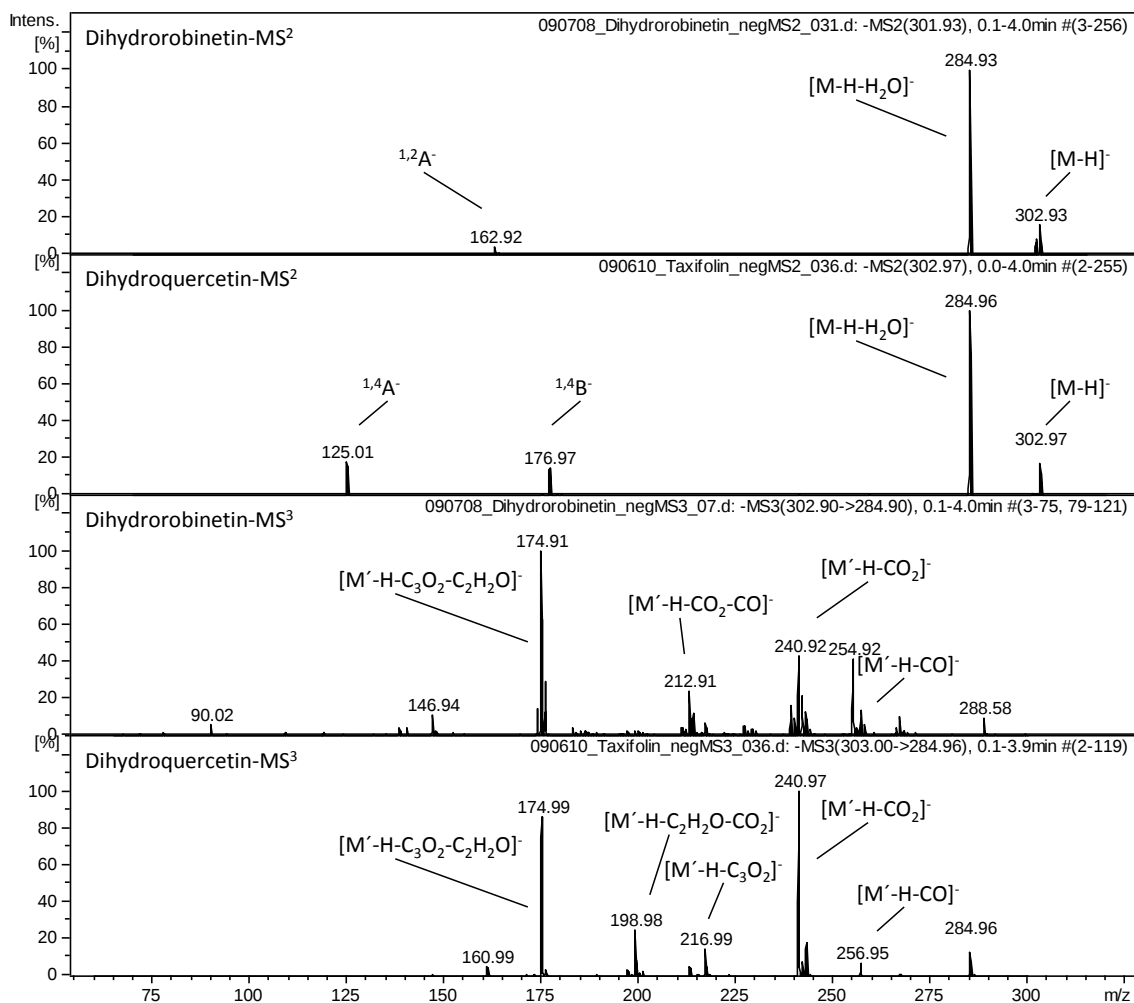


Abbildung 10 NI-Spektrenvergleich (Flavanonole) Dihydorobinetin-Dihydroquercetin

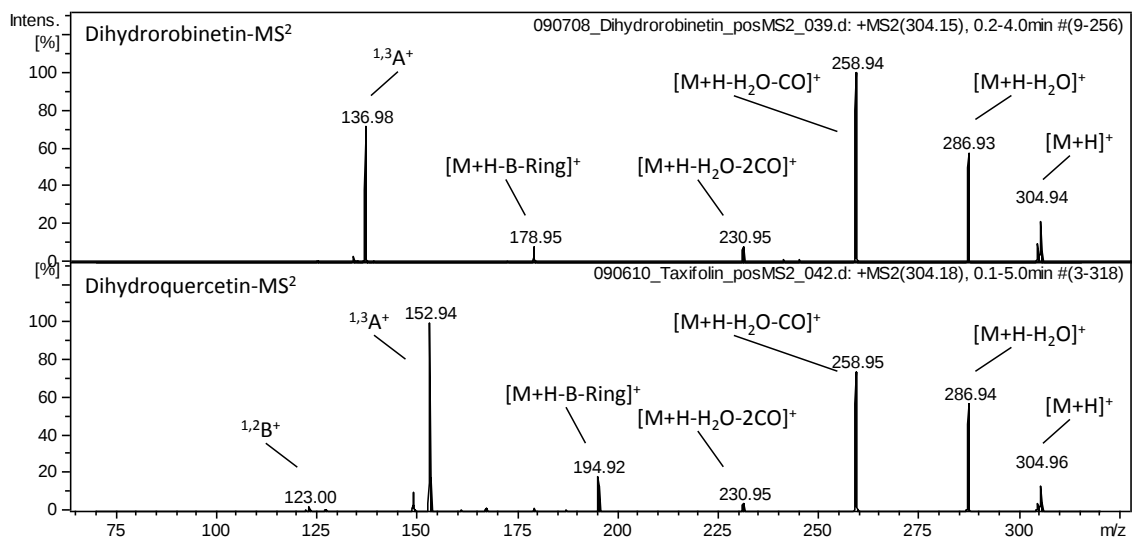


Abbildung 11 PI-Spektrenvergleich (Flavanonole) Dihydorobinetin-Dihydroquercetin

Fragmention	Neutralverlust	Flavanone		Flavanonole		
		2	3	5*	6*	7*
[M-H] ⁻	(Da)	269	271	287 ^a /269	303 ^a /285	303 ^a /285
^{0,3} A ⁻		-	-	-	119	-
^{0,3} B ⁻		-	-	-	183	-
^{0,4} A ⁻ / ^{1,3} A ⁻ -CO ₂		121	107	-	-	-
^{1,2} A ⁻		179	-	163 ^a	163 ^a	-
^{1,2} B ⁻		-	-	-	-	-
^{1,3} A ⁻		165	151	135 ^a	-	-
^{1,3} B ⁻		-	119	-	-	-
^{1,4} A ⁻		139	-	-	109	125 ^a
^{1,4} B ⁻		-	-	-	-	177 ^a
[M-H-H ₂ O] ⁻	18	251	-	269 ^a /251	285 ^a /267	285 ^a
[M-H-CO] ⁻	28	241	-	259 ^a /241	257	257
[M-H-HCHO] ⁻	30	-	-	-	255	-
[M-H-C ₂ H ₂ O] ⁻	42	227	-	227	243	243
[M-H-CO ₂] ⁻	44	225	-	243 ^a /225	241	241
[M-H-2CO] ⁻	56	213	-	-	229	-
[M-H-C ₃ O ₂] ⁻	68	201	-	201	217	217
[M-H-CO ₂ -CO] ⁻	72	197	-	197	213	213
[M-H-C ₂ H ₂ O-CO ₂] ⁻	86	183	-	-	199	199
[M-H-2CO ₂] ⁻	88	181	-	181	197	197
[M-H-C ₃ O ₂ -C ₂ H ₂ O] ⁻	110	159	-	-	175	175
[M-H-B-Ring] ⁻		191	177	161	-	-
[B-Ring] ⁻			93	-	-	-
weitere Ionen		147 178	-	165 ^a	255, 239 214	-

2 5,7-Di-OH-8-Me-Flavanon

^a im MS²

3 Naringenin

* MS² und MS³ Daten; im MS² dominiert der H₂O Verlust

5 Dihydrofisetin

6 Dihydrorobinetin

7 Dihydroquercetin

Tabelle 5 NI-Fragmente der Flavanone und Flavanonole

Fragmention	Neutralverlust	Flavanone		Flavanonole		
		2	3	5	6	7
$[M+H]^+$	(Da)	271	273	289	305	305/287 ^b
$^{0,2}A^+$		165	-	-	-	-
$^{0,2}B^+$		105	-	-	-	-
$^{1,2}A^+$		-	-	-	-	-
$^{1,2}B^+$		-	-	-	-	123
$^{1,3}A^+$		167	153	137	137	153
$^{1,3}B^+$		103	121	-	-	-
$^{1,4}A^+$		-	-	-	-	127
$^{0,4}A^+ / ^{1,3}A^+-CO_2$		-	-	-	-	-
$^{0,4}B^+$		-	-	-	-	-
$^{0,4}B^+-H_2O$	$^{0,4}B^+-18$	-	147	-	-	179
$^{0,2}A^+-CO$	$^{0,2}A^+-28$	-	-	-	-	-
$^{1,3}A^+-CO_2$	$^{1,3}A^+-44$	-	-	-	-	-
$^{1,3}B^+-2H^+$	$^{1,3}B^+-2$	-	119	-	-	-
$[M+H-OH]^{+*}$	17	-	-	-	-	-
$[M+H-H_2O]^+$	18	-	-	271	287	287
$[M+H-H_2O-H]^{+*}$	19	-	-	-	-	-
$[M+H-CO]^+$	28	-	-	-	-	259 ^b
$[M+H-CHO]^{+*}$	29	-	-	260	-	-
$[M+H-C_2H_2O]^+$	42	229	231	-	-	-
$[M+H-CO_2]^+$	44	-	-	-	-	-
$[M+H-H_2O-CO]^+$	46	-	-	243	259	259
$[M+H-2CO]^+$	56	215	-	-	-	231 ^b
$[M+H-C_2H_2O-C_2H_2]^+$	68	-	-	-	-	-
$[M+H-H_2O-2CO]^+$	74	-	-	215	231	231
$[M+H-2C_2H_2O]^+$	84	-	189	-	-	-
$[M+H-2CO-C_4H_4O_2]^+$	140	131	-	-	-	-
$[M+H-B-Ring]^+$		193	179	179	179	195
weiter Ionen		-	-	-	-	149

^b MS³

Tabelle 6 PI-Fragmente der Flavanone und Flavanonole

Flavone

Abbildung 12 und Abbildung 13 zeigen die NI- und PI-Spektren der zwei Flavone Apigenin und Luteolin. Diese Flavone weisen zwar nicht dasselbe Molekulargewicht auf, jedoch zeigen sie eine sehr ähnliche Fragmentierung.

Das Molekulargewicht von Apigenin (13) und Luteolin (15) unterscheidet sich nur durch eine Hydroxygruppe, da Luteolin zwei OH-Gruppen am B-Ring besitzt und Apigenin nur eine. Das Bruchstück $^{1,3}\text{B}^-$ verdeutlicht diesen Unterschied. Die Fragmente $^{0,4}\text{A}^-$ (m/z 107) und $^{1,3}\text{A}^-$ (m/z 151) kommen bei beiden Flavonen vor, genauso wie der Neutralverlust an kleineren Molekülen. Dabei bilden sich die Ionen $[\text{M}-\text{H}-2\text{CO}]^-$ m/z 229 und $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2-\text{CO}]^-$ m/z 213 nur bei Luteolin aus.

Tabelle 7 und Tabelle 8 beinhalten die Fragmente der vermessenen Flavone. Auffällig sieht man hier die Unterschiede der m/z Verhältnisse und die Auswirkung der Stellung einer OH-Gruppe auf die Ausbildung oder Nichtausbildung eines Ions. Die drei Monohydroxyflavone 5-OH- (8), 6-OH- (9) und 7-OH-Flavon (10) veranschaulichen dies. Das Fragment $^{0,4}\text{A}^-$ kommt nur bei 5-OH- und 7-OH-Flavon vor, genauso wie $^{1,3}\text{A}^-$. Die Ionen $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_2\text{H}_2\text{O}]^-$, $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_3\text{O}_2]^-$ und $[\text{M}-\text{H}-\text{CO}_2-\text{CO}]^-$ sind wiederum nur bei 7-OH-Flavon detektierbar. Vermutlich bilden sich all diese Bruchstücke nur bei 7-OH-Flavon aus, da die Position 7 in einer para-Stellung zur Ketogruppe am C-Ring steht und es so zu einem Mesomerieeffekt kommen kann. Diese Resultate zeigen, dass die drei genannten Monohydroxyflavon-Isomere (sowie auch das im Folgenden beschriebene 3-OH-Flavon) eindeutig anhand ihrer Massenspektren unterschieden werden können.

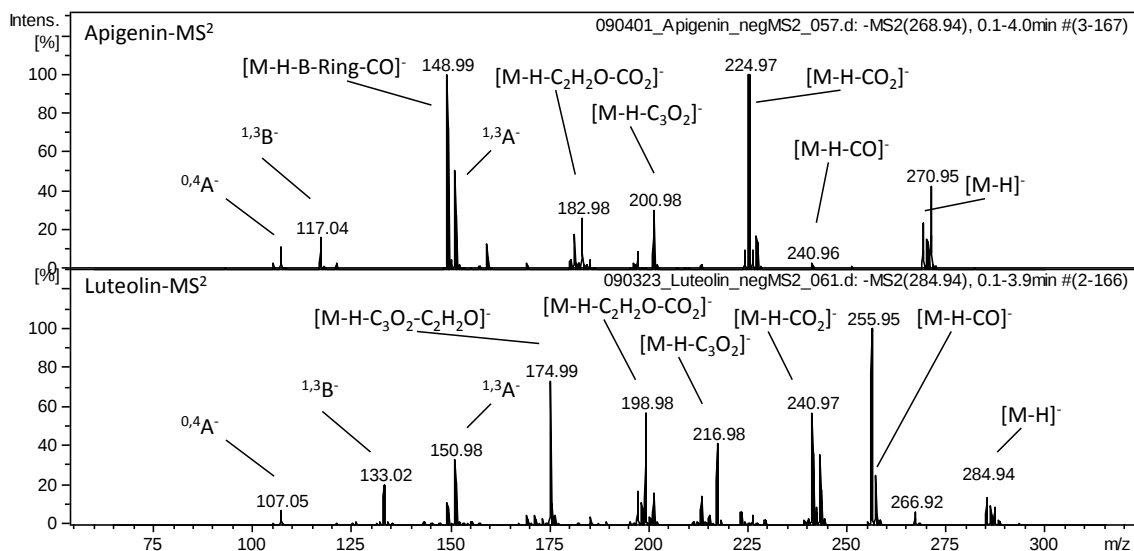


Abbildung 12 NI-Spektrenvergleich (Flavone) Apigenin-Luteolin

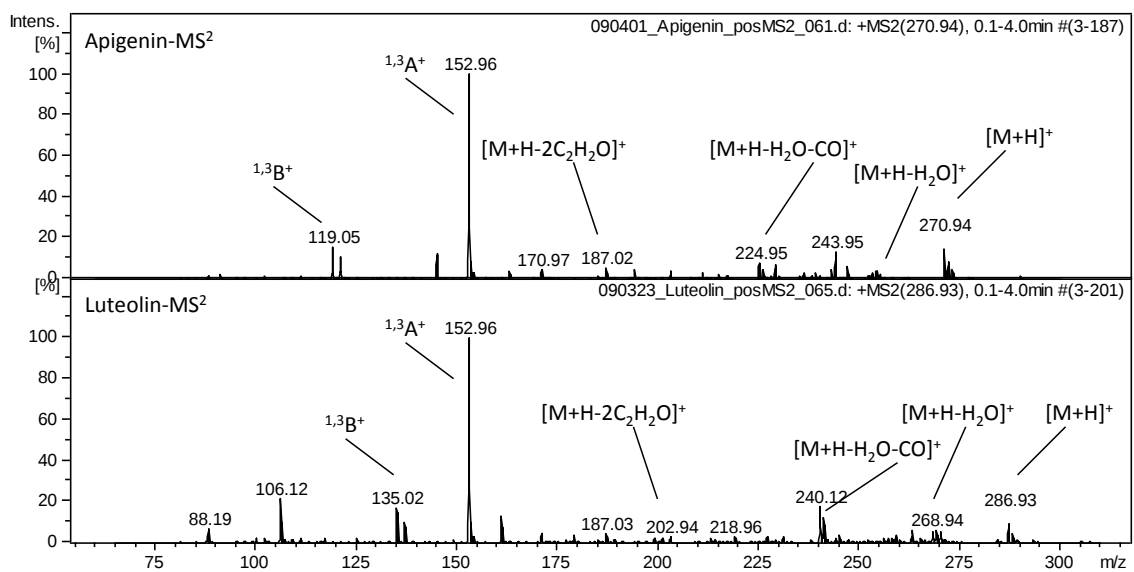


Abbildung 13 PI-Spektrenvergleich (Flavone) Apigenin-Luteolin

Fragmentation	Neutralverlust	Flavone					
		8	9	10	11	13	15
[M-H] ⁻	(Da)	237	237	237	253	269	285
^{0,3} A ⁻		-	-	-	-	-	-
^{0,3} B ⁻		-	-	-	-	-	-
^{0,4} A ⁻ / ^{1,3} A ⁻ -CO ₂		91	-	91	107	107	107
^{0,4} B ⁻		-	-	-	-	-	-
^{1,2} A ⁻		-	-	-	-	-	-
^{1,2} B ⁻		-	-	-	-	-	-
^{1,3} A ⁻		135	-	135	151	151	151
^{1,3} B ⁻		-	-	-	-	117	133
^{1,4} A ⁻		-	-	-	-	-	-
^{1,4} B ⁻ +2H		-	-	-	-	-	-
[M-H-H ₂ O] ⁻	18	-	-	-	-	-	267
[M-H-CO] ⁻	28	209	209	209	-	241	257
[M-H-C ₂ H ₂ O] ⁻	42	-	-	195	211	227	243
[M-H-CO ₂] ⁻	44	193	193	193	209	225	241
[M-H-2CO] ⁻	56	181	181	181	-	-	229
[M-H-C ₃ O ₂] ⁻	68	-	-	169	185	201	217
[M-H-CO ₂ -CO] ⁻	72	-	-	165	181	-	213
[M-H-C ₂ H ₂ O-CO ₂] ⁻	86	-	-	-	167	183	199
[M-H-2CO ₂] ⁻	88	-	-	-	165	181	197
[M-H-C ₃ O ₂ -C ₂ H ₂ O] ⁻	110	-	-	-	143	159	175
[M-H-B-Ring-CO] ⁻		-	-	-	-	149	149
[B-Ring] ⁻		-	-	-	-	-	-

8 5-OH-Flavon

9 6-OH-Flavon

10 7-OH-Flavon

11 Chrysin

13 Apigenin

15 Luteolin

Tabelle 7 NI-Fragmente der Flavone

Fragmentation	Neutralverlust	Flavone					
		8	9	10	11	13	15
$[M+H]^+$	(Da)	239	239	239	255	271	287
$^{0,2}A^+$		-	-	-	-	-	-
$^{0,2}B^+$		105	105	105	105	121	137
$^{1,2}A^+$		-	-	-	-	-	-
$^{1,3}A^+$		137	137	137	153	153	153
$^{1,3}B^+$		103	103	103	103	119	135
$^{1,4}A^+$		111	111	111	-	-	-
$^{0,4}A^+ / ^{1,3}A^+-CO_2$		-	93	-	-	109	109
$^{0,4}B^+$		-	-	-	147	163	179
$^{0,4}B^+-H_2O$	$^{0,4}B^+-18$	129	129	129	129	145	161
$^{1,3}A^+-CO$	$^{0,2}A^+-28$	109	109	109	-	-	-
$^{0,4}A^++2H$		-	-	-	-	111	111
$^{1,3}B^+-2H^+$	$^{1,3}B^+-2$	-	-	-	-	-	-
$[M+H-OH]^{+*}$	17	-	-	-	-	254	270
$[M+H-H_2O]^+$	18	221	221	-	-	253	269
$[M+H-H_2O-H]^{+*}$	19	-	-	-	-	252	268
$[M+H-CO]^+$	28	211	211	211	227	243	259
$[M+H-CHO]^{+*}$	29	210	-	-	-	-	258
$[M+H-C_2H_2O]^+$	42	-	197	197	213	229	245
$[M-H-C_2H_3O]^{+*}$	43	-	-	-	-	228	244
$[M+H-CO_2]^+$	44	-	-	-	-	-	-
$[M+H-H_2O-CO]^+$	46	193	193	-	209	225	241
$[M+H-2CO]^+$	56	183	183	183	199	215	231
$[M+H-C_2H_2O-C_2H_2]^+$	68	171	171	171	187	203	219
$[M+H-H_2O-2CO]^+$	74	165	165	165	-	-	213
$[M+H-2C_2H_2O]^+$	84	155	155	155	171	187	203
$[M+H-2CO-C_4H_4O_2]^+$	140	-	-	-	-	-	-
$[M+H-B-Ring]^+$		-	-	-	-	-	-
weitere Ionen		-	-	-	231	-	-

Tabelle 8 PI-Fragmente der Flavone

Flavonole

Abbildung 14 und Abbildung 15 präsentieren die NI- und PI-Spektren der Flavonole Kämpferol (21) und Quercetin (24). Sie unterscheiden sich genauso wie Apigenin von Luteolin lediglich durch eine Hydroxygruppe, wobei Quercetin am B-Ring eine mehr besitzt als Kämpferol. Da der A- und C-Ring gleichwertig substituiert sind, bilden sich bei beiden Flavonolen die gleichen Fragment-Ionen, wie z.B. die Fragmente $^{0,4}A^-$ bei m/z 107 und $^{1,3}A^-$ bei m/z 151. Die Abspaltung von diversen kleineren Molekülen ist ebenfalls gleich und unterscheidet sich durch deren m/z Verhältnisse um das Molekulargewicht von einer Hydroxygruppe. Bei Quercetin kommt es zusätzlich zu einer Bildung der Fragment-Ionen $^{1,2}A^-$ bei m/z 179 und $^{1,2}B^-$ bei m/z 121.

In den fragmentreicheren PI-Spektren verhält es sich ähnlich wie im NI-Modus. Die Fragment-Ionen, die den A-Ring beinhalten haben dieselben m/z Verhältnisse während die Fragment-Ionen, die den B-Ring beinhalten eine m/z Verschiebung von der Masse einer Hydroxygruppe zeigen.

Tabelle 9 und Tabelle 10 geben eine Übersicht über die Produktionsbildung der vermessenen Flavonole. Hier sieht man die strukturellen Übereinstimmungen der einzelnen Flavonole zueinander, da sich bei gleichem Substitutionsmuster an einem der Ringe auch die gleichen Fragment-Ionen bilden. Sowohl bei der NI, als auch bei der PI, kommt es zur Bildung von charakteristischen Ionen, da diese nur bei einem Flavonol detektiert wurden. So findet man zum Beispiel die Fragmente $^{0,3}A^-$ nur bei Kämpferol (m/z 135), $^{1,3}B^-$ bei Fisetin (m/z 149) und $^{0,4}B^+$ bei Robinetin (m/z 211).

Im PI-Modus fällt auf, dass alle 7 vermessenen Flavonole Fragment-Ionen vom Typ $^{0,2}A^+$, $^{1,3}A^+$ und $^{0,2}B^+$ ausbilden. Durch Identifikation dieser charakteristischen Ionen im MS²-Spektrum lässt sich eindeutig die Anzahl der Hydroxygruppen am A- und B-Ring bestimmen.

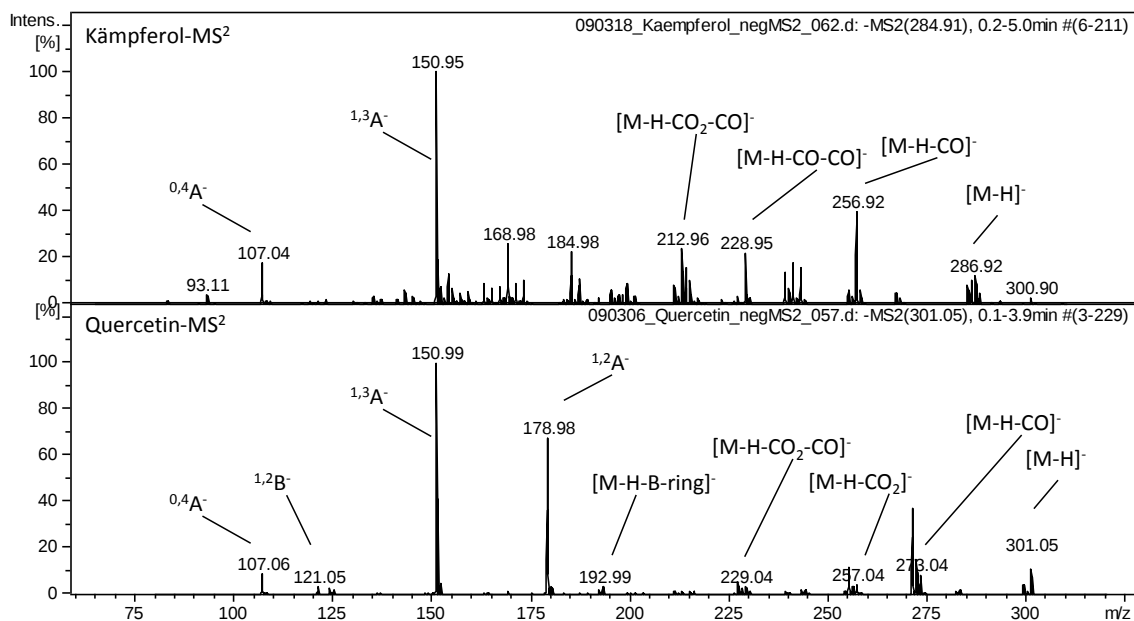


Abbildung 14 NI-Spektrenvergleich (Flavonole) Kämpferol-Quercetin

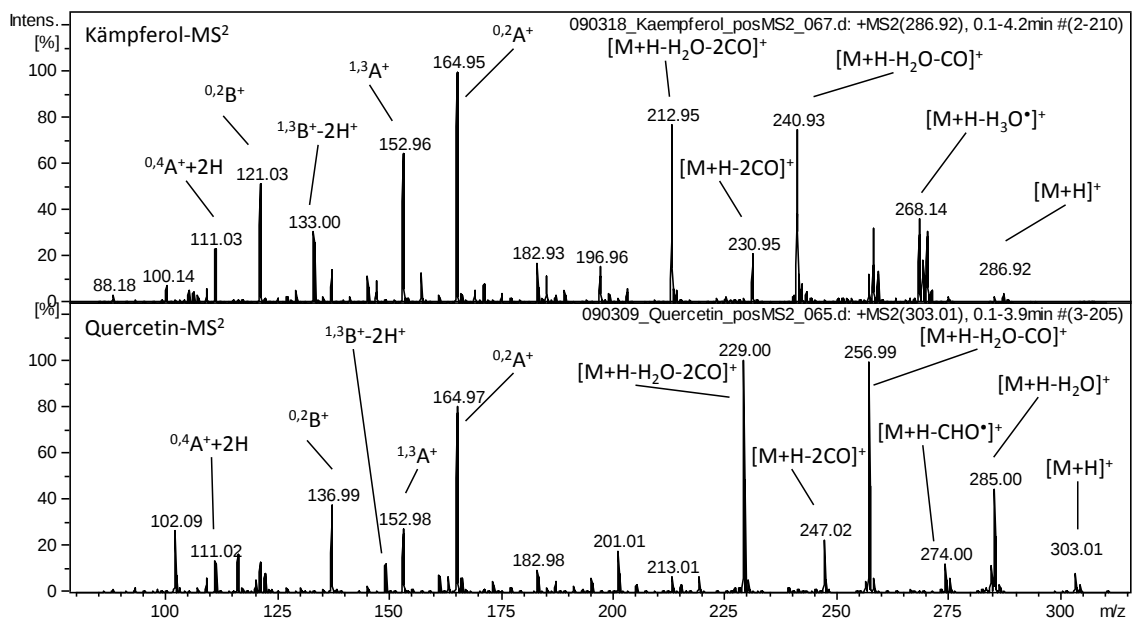


Abbildung 15 PI-Spektrenvergleich (Flavonole) Kämpferol-Quercetin

Fragmention	Neutralverlust	Flavonole						
		19	20	21	22	24	25	29
[M-H] ⁻	(Da)	237	269	285	285	301	301	317
^{0,3} A ⁻		-	-	135	-	-	-	-
^{0,3} B ⁻		-	-	-	-	-	-	-
^{0,4} A ⁻ / ^{1,3} A ⁻ -CO ₂		-	-	107	91	107	91	107
^{0,4} B ⁻		-	-	-	-	-	-	-
^{1,2} A ⁻		-	179	-	163	179	163	179
^{1,2} B ⁻		-	-	-	121	121	137	137
^{1,3} A ⁻		-	151	151	135	151	135	151
^{1,3} B ⁻		-	-	-	149	-	-	-
^{1,4} A ⁻		-	-	-	-	-	109	125
^{1,4} B ⁻		-	-	-	-	-	-	-
[M-H-H ₂ O] ⁻	18	-	-	-	267	283	283	299
[M-H-CO] ⁻	28	209	241	257	257	273	273	289
[M-H-HCHO] ⁻	30	-	239	255	255	271	-	287
[M-H-C ₂ H ₂ O] ⁻	42	-	227	243	-	-	-	-
[M-H-CO ₂] ⁻	44	193	225	241	241	257	257	-
[M-H-2CO] ⁻	56	181	213	229	229	-	245	-
[M-H-C ₃ O ₂] ⁻	68	-	-	217	-	-	-	-
[M-H-CO ₂ -CO] ⁻	72	-	197	213	213	229	229	245
[M-H-C ₂ H ₂ O-CO ₂] ⁻	86	-	183	199	-	215	-	-
[M-H-2CO ₂] ⁻	88	-	181	197	197	-	-	-
[M-H-C ₃ O ₂ -C ₂ H ₂ O] ⁻	110	-	-	-	175	-	-	-
[M-H-B-Ring] ⁻		-	-	-	177	193	-	193
weitere Ionen		-	-	-	-	-	153	271

19 3-OH-Flavon

24 Quercetin

20 Galangin

25 Robinetin

21 Kämpferol

29 Myricetin

22 Fisetin

Tabelle 9 NI-Fragmente der Flavonole

Fragmentation	Neutralverlust	Flavonole						
		19	20	21	22	24	25	29
$[M+H]^+$	(Da)	239	271	287	287	303	303	319
$^{0,2}A^+$		133	165	165	149	165	149	165
$^{0,2}B^+$		105	105	121	137	137	153	153
$^{1,2}A^+$		-	181	-	-	-	165	-
$^{1,3}A^+$		121	153	153	137	153	137	153
$^{1,3}B^+$		119	119	-	-	-	-	-
$^{1,4}A^+$		-	-	-	111	-	111	-
$^{0,4}A^+ / ^{1,3}A^+-CO_2$		-	109	109	93	109	-	109
$^{0,4}B^+$		-	-	-	-	-	211	-
$^{1,4}B^+-H_2O$	$^{1,4}B^+-18$	-	129	-	161	-	177	-
$^{0,2}A^+-CO$	$^{0,2}A^+-28$	105	137	137	121	137	121	137
$^{0,4}A^++2H$		-	-	111	-	111	-	111
$^{1,3}B^+-2H^+$	$^{1,3}B^+-2$	-	-	133	149	149	165	165
$[M+H-OH]^{**}$	17	-	254	270	270	286	286	-
$[M+H-H_2O]^+$	18	221	253	269	269	285	285	301
$[M+H-H_2O-H]^{**}$	19	-	252	268	268	284	284	300
$[M+H-CO]^+$	28	211	243	259	259	275	275	291
$[M+H-CHO]^{**}$	29	210	242	258	258	274	274	290
$[M+H-HCHO]^+$	30	-	-	257	-	-	-	-
$[M-H-CH_3OH]^+$	32	-	-	255	-	-	-	-
$[M+H-C_2H_2O]^+$	42	-	229	245	-	-	-	-
$[M-H-CH_3-CO]^+$	43	-	-	244	-	-	-	-
$[M+H-CO_2]^+$	44	-	227	243	-	-	-	-
$[M+H-H_2O-CO]^+$	46	193	225	241	241	257	257	273
$[M+H-2CO]^+$	56	183	215	231	231	247	247	263
$[M+H-C_2H_2O-C_2H_2]^+$	68	171	203	-	-	-	-	-
$[M+H-H_2O-2CO]^+$	74	-	197	213	213	229	229	245
$[M+H-2C_2H_2O]^+$	84	155	187	203	203	219	219	235
$[M+H-2CO-C_4H_4O_2]^+$	140		131	147	147	163	-	179
$[M+H-B-Ring]^+$		-	-	-	179	-	-	-

Tabelle 10 PI-Fragmente der Flavonole

3.2 Methoxylierte Flavonoid-Aglyka

Generell agieren diese Flavonoide gleich den nicht methoxylierten Aglyka. Charakteristisch ist der mögliche Verlust der Methyl-Gruppe und Ausbildung eines $[M-H-CH_3]^{\bullet}$ Radikalions. Dabei kommt es darauf an, an welchem Ring die CH_3 -Gruppe vorkommt, denn so kann z.B. Rhamnetin von Isorhamnetin unterschieden werden. Bei Isorhamnetin, dem 3'-O-Methylquercetin, kommt im NI-MS²-Spektrum nur der Verlust der CH_3 -Gruppe vor, während Rhamnetin, das 7-O-Methylquercetin, neben dem mit deutlich geringerer Intensität auftretenden Methyl-Verlust auch zahlreiche weitere Fragment-Ionen bildet, die zum Teil die Methylgruppe beinhalten.

Abbildung 16 und Abbildung 17 zeigen die Spektren von Rhamnetin (27) und Isorhamnetin (26) bei NI und PI. Wie bereits erwähnt, kann man zwischen diesen beiden Flavonoiden bereits im NI-MS² aufgrund der Intensität des Methyl-Verlustes unterscheiden. Im MS² zeigt sich, dass die CH_3 -Gruppe am A-Ring des Rhamnetin deutlich stabiler ist. Die Fragmente $^{0,4}A^-$ und $^{1,3}A^-$ sind jeweils um 15 Da zu denen von Isorhamnetin verschoben, wobei diese Ionen erst im MS³ von Isorhamnetin anzutreffen sind. Auffällig ist, dass sich die MS³-Spektren der durch den Methyl-Verlust gebildeten $[M-H-CH_3]^{\bullet}$ Ionen von den MS³-Spektren der $[M-H]^-$ Ionen der entsprechenden Aglyka in der Art und Intensität der gebildeten Fragment-Ionen typischerweise deutlich unterscheiden (siehe z.B. Abbildung 14 und Abbildung 16). Dies liegt an dem grundlegend unterschiedlichen Verhalten von Ionen mit gerader und ungerader Anzahl an Elektronen.

Im PI-Modus hingegen kommt es zu einer vollständigen Fragmentierung beider methoxylierter Flavonoide. Als markantes Unterscheidungsmerkmal dient auch hier das $^{0,2}A^+$ Fragment, da bei Rhamnetin dieses Bruchstück weiterhin methoxyliert vorliegt. Interessant ist auch der Intensitätsunterschied zwischen den beiden Flavonoiden bei m/z 302. Dieses m/z Verhältnis stellt das demethylierte Aglykon dar. Durch die hohe Intensität dieses Ions bei Isorhamnetin konnte auch hier ein MS³-Spektrum gewonnen werden. Im Wesentlichen ist auch hier dieselbe Fragmentierung wie im MS² aufgetreten, lediglich die Intensitäten der Peaks sind verschieden.

In Tabelle 11 - 14 sind die Fragment-Ionen der methoxylierten Aglyka zusammengefasst.

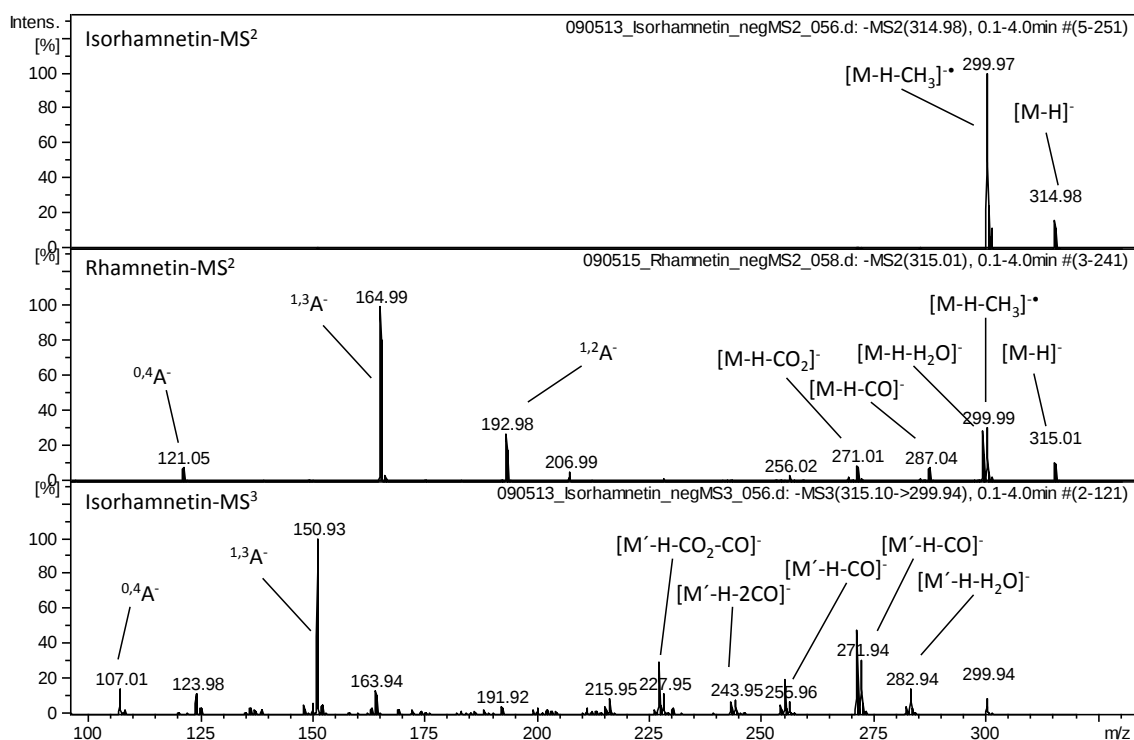


Abbildung 16 NI-Spektrenvergleich (methoxylierte Aglyka) Isorhamnetin-Rhamnetin

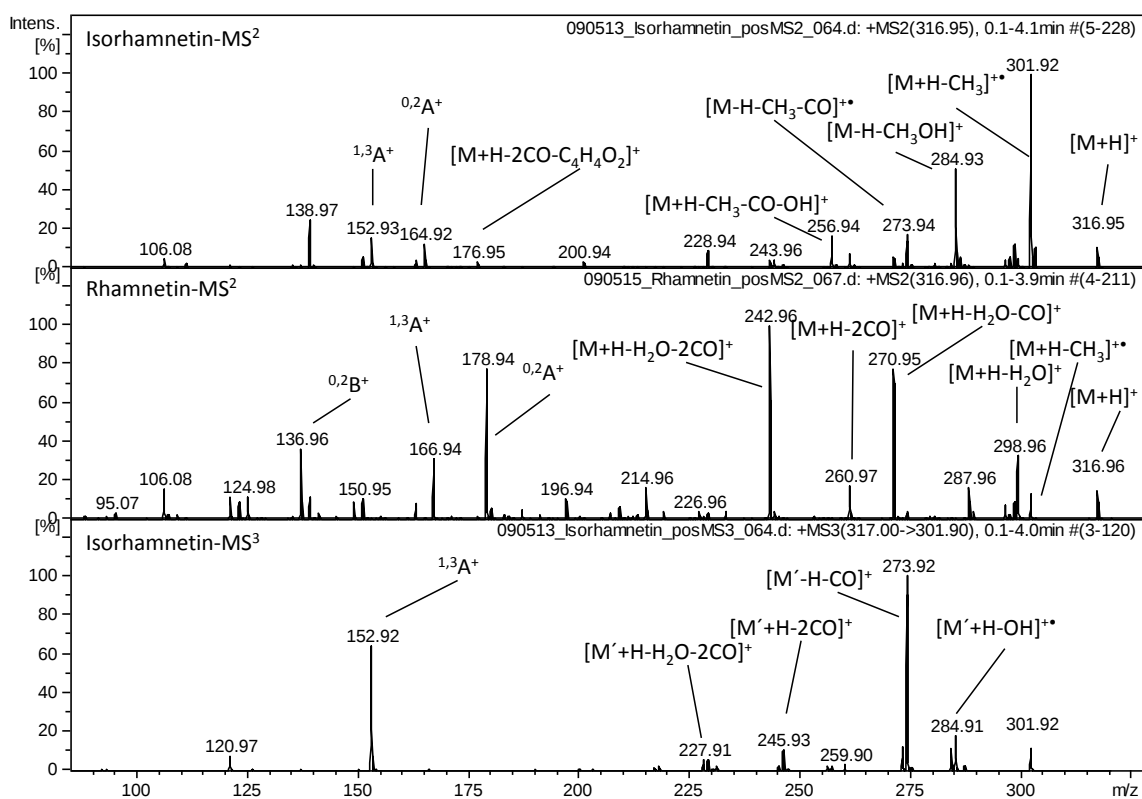


Abbildung 17 PI-Spektrenvergleich (methoxylierte Aglyka) Isorhamnetin-Rhamnetin

Fragmention	Neutralverlust (Da)	Flavanone		Flavone				
		1	4	12	14	16*	17*	18
[M-H] ⁻		253	301	267	283	299 ^a 284	299 ^a 284	343 ^a 328
^{0,4} A ⁻ / ^{1,3} A ⁻ -CO ₂		-	107	-	-	107	-	-
^{0,4} B ⁻		-	-	-	-	-	-	-
^{1,2} A ⁻		-	165	-	-	-	-	-
^{1,3} A ⁻		-	151	-	-	151	-	-
^{1,3} B ⁻		-	134 ^b	-	-	-	-	-
^{1,4} A ⁻		-	125	-	-	-	-	-
^{0,4} B-CO		-	152 ^b	-	-	-	-	-
[M-H-CH ₃] [•]	15	238	286	252	268	284 ^a	284 ^a	328 ^a , 313 ^{a,c} 313 ^c
[M-H-H ₂ O] ⁻	18	235	-	-	-	-	-	310
[M-H-CO] ⁻	28	225	-	224 ^b	-	256	256	285 ^{a,c} , 285 ^c
[M-H-C ₂ H ₂ O] ⁻	42	-	-	225	-	-	-	-
[M-H-CO ₂] ⁻	44	209	257 242 ^b	223	-	-	-	299 ^a
[M-H-2CO] ⁻	56	-	-	-	-	-	-	-
[M-H-C ₃ O ₂] ⁻	68	-	-	-	-	-	-	-
[M-H-CO ₂ -CO] ⁻	72	-	-	-	-	212	-	-
[M-H-C ₂ H ₂ O-CO ₂] ⁻	86	-	-	-	-	-	-	-
[M-H-2CO ₂] ⁻	88	-	-	-	-	-	-	-
[M-H-C ₃ O ₂ -C ₂ H ₂ O] ⁻	110	-	-	-	-	-	-	-
[M-H-B-Ring] ⁻		-	177	-	-	-	-	-
[M-H-CH ₃ -B-Ring] [•]		-	-	-	-	-	-	-
weitere Ionen		117,123 210,221	-	-	-	130 200	-	282 309

1 5-OMe-Flavanon

16 Diosmetin

^a MS²

4 Homoeriodictyol

17 Chrysoeriol

^b MS² demethylierte Fragmente

12 Tectochrysin

18 Tri-Me-Tricetin

^c Fragment-Ion -2CH₃[•]

14 Acacetin

^{*} MS³ Daten, MS² nur Methyl-loss

Tabelle 11 NI-Fragmente der methoxylierten Flavonoid-Aglyka 1

Fragmentation	Neutralverlust	Flavanone		Flavone				
		1	4	12	14	16	17	18
[M+H] ⁺	(Da)	255	303	269	285	301 286	301 286	345 300
^{0,2} A ⁺		-	-	-	-	-	-	-
^{0,2} B ⁺		-	-	105	135	-	-	-
^{0,3} A ⁺		-	137	-	-	-	-	-
^{1,3} A ⁺		151	153	167	153	-	-	153 ^b
^{1,3} B ⁺		-	-	-	133	-	-	-
^{0,4} B ⁺		-	-	-	177	-	-	-
^{0,4} B ⁺ -H ₂ O	^{0,4} B ⁺ -18	-	-	129	159	-	-	-
^{0,2} A ⁺ -CO	^{0,2} A ⁺ -28	-	-	-	-	-	-	-
[M+H-nCH ₃] ⁺ *	15	-	-	254	270	286 ^a	286 ^a	330/315/300
[M+H-OH] ⁺ *	17	-	-	-	-	-	-	-
[M+H-H ₂ O] ⁺	18	237	285	-	-	-	-	-
[M+H-H ₂ O-H] ⁺ *	19	-	-	-	266	-	-	-
[M+H-CO] ⁺	28	-	-	-	257	258 ^b	258 ^b	-
[M+H-CHO] ⁺ *	29	-	-	-	-	-	-	316/271 ^b
[M-H-CH ₃ OH] ⁺	32	-	-	237	-	-	-	313
[M+H-C ₂ H ₂ O] ⁺	42	-	261	227	243	-	-	-
[M-H-CH ₃ -CO] ⁺ *	43	-	-	226	242	258 ^a	258 ^a	-
[M+H-CO ₂] ⁺	44	-	-	-	-	-	-	301/256
[M+H-H ₂ O-CO] ⁺	46	-	-	-	-	-	-	299
[M+H-2CO] ⁺	56	-	-	213	-	-	245 ^a	-
[M+H-CH ₃ -CO-OH] ⁺ *	60	-	-	209	-	-	-	285
[M+H-C ₂ H ₂ O-C ₂ H ₂] ⁺	68	-	-	201	-	-	-	-
[M+H-H ₂ O-2CO] ⁺	74	-	-	-	-	-	-	-
[M+H-C ₂ H ₂ O-C ₂ H ₂ O] ⁺	84	-	219	-	-	-	-	-
[M+H-2CO-C ₄ H ₄ O ₂] ⁺	140	-	-	-	-	-	-	-
[M+H-B-Ring] ⁺		-	179	-	-	-	-	-
[B-Ring] ⁺		-	-	-	-	-	-	-
weitere Ionen		-	145	184 153	-	-	-	257 ^b

^a MS² ^b MS³

Tabelle 12 PI-Fragmente der methoxylierten Flavonoid-Aglyka 1

Fragmentation	Neutralverlust	Flavonole				Isoflavone	
		23*	26*	27	28	30	
[M-H] ⁻		299 284	315 300	315	315 300	267 ^a 252	[M-H] ⁻
^{0,3} A ⁻		-	-	-	-	119	^{0,3} A ⁻
^{0,3} B ⁻		-	-	-	-	132	^{0,3} B ⁻ -H
^{0,4} A ⁻ / ^{1,3} A ⁻ -CO ₂		107	107	121	107	-	^{0,4} A ⁻
^{0,4} B ⁻		-	-	-	-	-	^{0,4} B ⁻
^{1,2} A ⁻		-	-	193	-	-	^{1,2} A ⁻
^{1,2} B ⁻		-	-	-	-	-	^{1,2} B ⁻
^{1,3} A ⁻		151	151	165	151	135	^{1,3} A ⁻
^{1,3} B ⁻		-	-	-	-	-	^{1,3} B ⁻
^{1,4} A ⁻		-	125	-	-	-	^{1,4} A ⁻
^{1,4} B ⁻		-	-	-	-	-	^{1,4} B ⁻
						-	^{2,4} A ⁻
[M-H-CH ₃] ^{-*}	15	284 ^a	300 ^a	300	300 ^a	252 ^a	
[M-H-H ₂ O] ⁻	18	-	282	297	282	-	
[M-H-CO] ⁻	28	256	272	287	272	224	
[M-H-CO-H] ⁻	29	-	-	-	-	223	
[M-H-C ₂ H ₂ O] ⁻	42	-	-	-	-	-	
[M-H-CO ₂] ⁻	44	240	256	271	256	208	
[M-H-2CO] ⁻	56	228	244	-	244	196	
[M-H-CO-H-CO] ⁻	57	-	-	-	-	195	
[M-H-C ₃ O ₂] ⁻	68	-	-	-	-	-	
[M-H-CO ₂ -CO] ⁻	72	212	228	243	228	180	
[M-H-C ₂ H ₂ O-CO ₂] ⁻	86				-	-	
[M-H-2CO ₂] ⁻	88	-	-	-	212	-	
[M-H-C ₃ O ₂ -C ₂ H ₂ O] ⁻	110	-	-	-	-	-	
weitere Ionen		-	-	193	-	-	

23 Kämpferid **28** Tamarixetin ^a MS² ^b MS³ ^c ohne CH₃

26 Isorhamnetin **30** Formononetin * MS³ im MS² nur Methyl-loss

27 Rhamnetin

Tabelle 13 NI-Fragmente der methoxylierten Flavonoid-Aglyka 2

Fragmentation	Neutralverlust	Flavonole				Isoflavone	
		23	26	27	28	30	
[M+H] ⁺	(Da)	301	317 302	317	317 302	269 256	
^{0,2} A ⁺		165	165	179	165 ^a	-	^{0,3} A ⁺
^{0,2} B ⁺		135/121	151	137	-	-	^{0,3} B ⁺
^{1,2} A ⁺		-	-	-	-	-	^{1,2} A ⁺
^{1,3} A ⁺		153	153 ^{a,b}	167	153 ^{a,b}	137	^{1,3} A ⁺
^{1,3} B ⁺		-	-	-	165 ^a	133/118 ^c	^{1,3} B ⁺
^{0,4} A ⁺ / ^{1,3} A ⁺ -CO ₂		109	-	-	-	-	^{1,4} A ⁺
^{0,2} A ⁺ -CO	^{0,2} A ⁺ -28	137	137	-	137 ^a	163	^{0,4} B ⁺
^{0,4} A ⁺ +2H	^{0,4} A ⁺ +2	111	111	-	111 ^a	107 ^c	^{2,3} B ⁺
^{1,3} B ⁺ -2H	^{1,3} B ⁺ -2	-	163	-	163 ^a	-	
^{1,3} A ⁺ -CH ₃ [•]		-	-	-	-	-	
[M+H-CH ₃] ⁺⁺	15	286	302	302	302 ^a	254	
[M+H-OH] ⁺⁺	17	284	285 ^b	-	285 ^b	237 ^b	
[M+H-H ₂ O] ⁺	18	283	299/284 ^b	299	299 ^a /284 ^b	-	
[M+H-H ₂ O-H] ⁺⁺	19	282	298	298	-	-	
[M+H-CO] ⁺	28	273	274 ^b	289	274 ^b	241/226 ^b	
[M+H-CHO] ⁺⁺	29	272	288/273 ^b	288	288 ^a /273 ^b	225 ^b	
[M-H-CH ₃ OH] ⁺	32	269	285	-	285 ^a	237	
[M+H-C ₂ H ₂ O] ⁺	42	259	275/260 ^b	-	275 ^a /260 ^b	-	
[M-H-CH ₃ -CO] ⁺⁺	43	258	274	274	274 ^a	226	
[M+H-CO ₂] ⁺	44	257	273	273	273 ^a	-	
[M+H-H ₂ O-CO] ⁺	46	255	271/256 ^b	271	271 ^a /256 ^b	-	
[M+H-2CO] ⁺	56	245	261/246 ^b	261	261 ^a /246 ^b	213	
[M+H-CH ₃ -CO-OH] ⁺	60		257	-	257 ^a	-	
[M+H-H ₂ O-2CO] ⁺	74	227	243/228 ^b	243	243 ^a /228 ^b	195	
[M+H-2C ₂ H ₂ O] ⁺	84	217	218 ^b	233	233 ^a /218 ^b	-	
[M+H-2CO-C ₄ H ₄ O ₂] ⁺	140	161	177	177	177 ^a	-	
[M+H-B-Ring] ⁺		-	-	-	-	163	
weitere Ionen		271	-	-	-	154	

^a MS² ^b MS³ ^c ohne CH₃

Tabelle 14 PI-Fragmente der methoxylierten Flavonoid-Aglyka 2

3.3 Flavonoid-Glykoside

In Anlehnung an die Arbeiten von Cuyckens et al. [6] und March et al. [14] wurden die vermessenen Flavonoid-Glykoside interpretiert. Dabei sollen die Abbildung 18 und Abbildung 19 an Hand der Fragmentierung dreier Flavonoide mit unterschiedlicher Glykosylierung veranschaulichen, wie relativ einfach eine Identifizierung möglich ist. In dem Beispiel liegen ein Mono-, Di und C-glykosid mit dem Grundkörper Apigenin vor.

Das Mono-O-Glykosid Apigenin-7-O-glukosid (32) und das Mono-C-Glykosid Apigenin-8-glukosid (43) weisen ein gleiches Molekulargewicht auf. Da es bei C-Glykosiden zu keiner vollständigen Deglykosylierung kommt, kann man hier leicht zwischen diesen beiden Flavonoiden unterscheiden. Zusätzlich zum Bruchstück $^{0,2}\text{X}^-$ m/z bei 311, zeigen Fragment-Ionen $^{0,1}\text{X}^- + 2\text{H}^+$ bei m/z 283 und $^{0,3}\text{X}^-$ bei m/z 341 eine Fragmentierung (cross-ring cleavage) der Pyranose an. Ebenfalls im NI-Modus vermessen, zeigen Apigenin-7-O-glukosid und Apigenin-7-O-neohesperidosid (48) ein sehr ähnliches Muster ihrer Fragmentbildung. Während m/z 431 beim Mono-Glykosid das Vorläuferion darstellt, repräsentiert es beim Di-glykosid den Verlust der Deoxyhexose (Y_1^-). In den ebenfalls sehr Peak-armen PI-Spektren fällt auf, dass es bei den O-Glykosiden zu keiner Radikalionenbildung des Aglykons kommt, sondern nur ein Y_0^+ Ion entsteht. Beim C-Glykosid kommt es hingegen zu einer ausgiebigen Fragmentierung der Pyranose, sowie zu zahlreichen Wasserverlusten. Gleich dem NI-Modus bildet sich auch hier kein Y^+ Ion.

Tabelle 15 bis Tabelle 20 beinhalten die Daten der vermessenen Mono- und Di-O-Glykoside, sowie die der C-Glykoside. Interessant ist, dass das theoretische Fragment $^{0,3}\text{X}^-$ (-90 Da) bei den O-Glykosiden in beiden Modi nicht gebildet wurde, sondern nur sporadisch im NI-Modus das Fragment $^{0,2}\text{X}^-$ (120 Da).

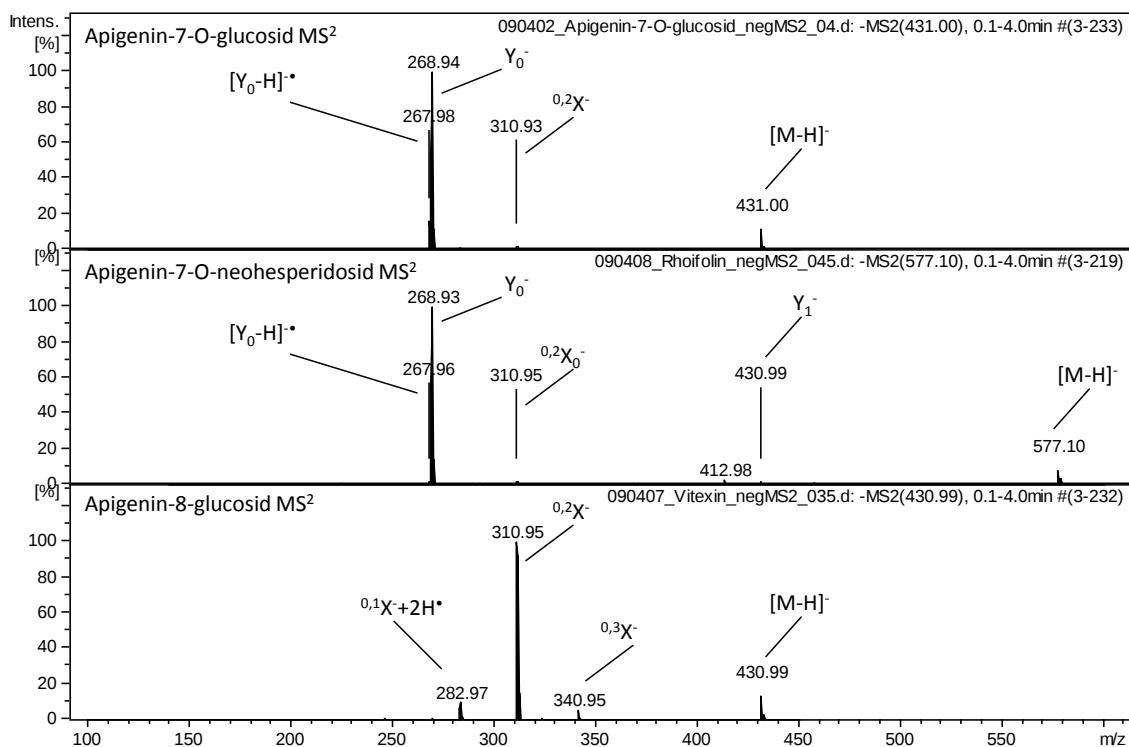


Abbildung 18 NI-Spektrenvergleich dreier Glykoside

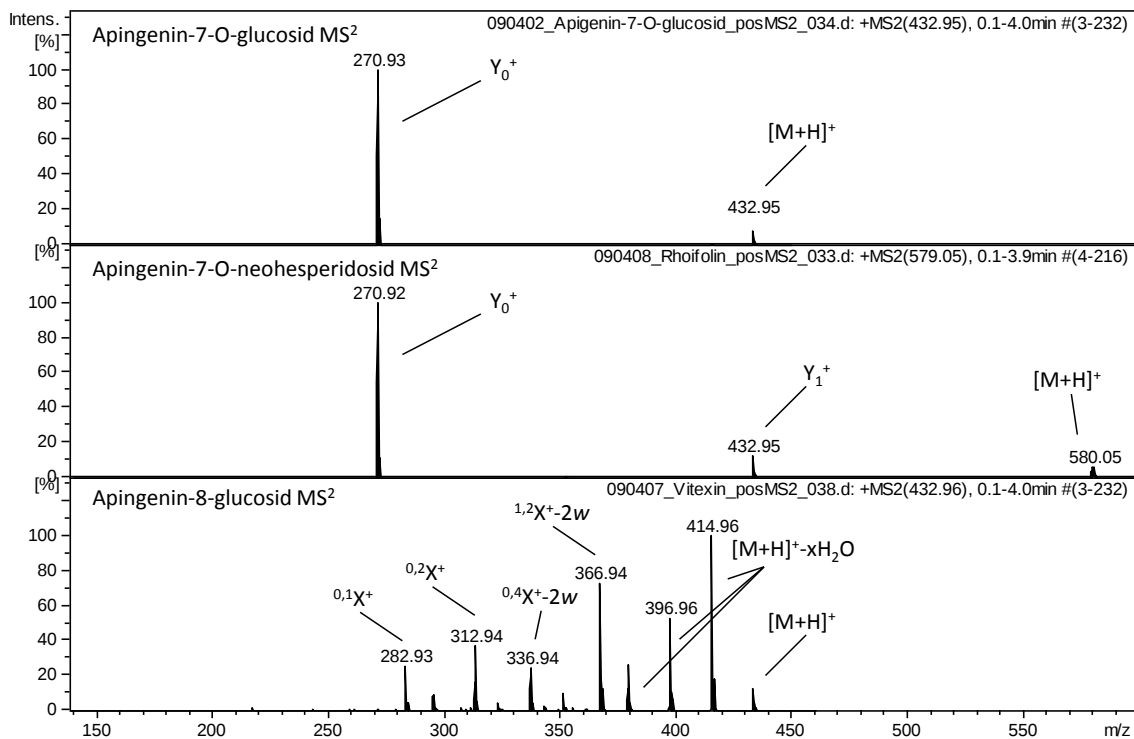


Abbildung 19 PI-Spektrenvergleich dreier Glykoside

Monoglykoside

Fragmention	Neutralverlust	Flavonoide											
		31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
$[M-H]^-$	(Da)	429	431	433	447	447	447	447	449	463	463	463	477
Y_0^-		267	269	271	285	285	285	301	287	301	301	317	315 300
$[Y_0-H]^-$		-	268	-	284	-	284	300	-	300	300	316	314 299
$^{0,2}X^-$	120	-	311	-	327	-	327	-	-	343	-	-	357
$^{0,3}X^-$	90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$^{1,2}A_0^-$		-	-	-	-	-	-	179	-	179	179	179	179
$^{1,3}A_0^-$		-	-	-	151	-	-	151	151	151	151	151	151
$[Y_0-HCHO]^-$		-	-	-	255	-	-	-	-	271	271	-	285

31 Formononetin-7-O-glukosid

37 Quercetin-3-O-rhamnosid

32 Apigenin-7-O-glukosid

38 Eriodictyol-7-O-glukosid

33 Naringenin-7-O-glukosid

39 Quercetin-3-O-galaktosid

34 Kämpferol-3-O-glukosid

40 Quercetin-3-O-glukosid

35 Luteolin-4'-O-glukosid

41 Myricetin-3-O-rhamnosid

36 Luteolin-7-O-glukosid

42 Isorhamnetin-3-O-glukosid

Tabelle 15 NI-Fragmente der Flavonoid-O-monoglykoside

Fragmention	Neutralverlust	Flavonoide											
		31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42
$[M+H]^+$	(Da)	431	433	435	449	449	449	449	451	465	465	465	479
Y_0^+		269	271	273	287	287	287	303	289	303	303	319	317
$[Y_0-H]^+$		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$^{0,2}X^+$	120	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$^{0,3}X^+$	90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$^{0,4}X^+ / ^{1,3}X^+ / ^{2,4}X^+$	60	-	-	-	-	-	-	-	391	-	-	-	-
$[M+H-H_2O]^+$	18	-	415	417	-	-	-	-	433	-	-	-	-
$^{1,3}A_0^+$		-	-	153	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 16 PI-Fragmente der Flavonoid-O-monoglykoside

Diglykoside

Fragmentation	Flavonoide								
	47	48	49	50	51	52	53	54	55
$[M-H]^-$	563	577	593	595	595	609	609	609	623
Y_0^-	269	269	285	301	287	301	285 ($^{7,3'}Y_0^-$) 447 ($^7Y_0^-/^{3'}Y_0^-$)	301/286	315/300
$[Y_0-H]^{*-}$	268	268	284	300	286	300	-	-	314/299
Y_1^-	431	431	-	463	449	463	-	-	-
$Y_1^{0,2}X_0^-$	-	311	327	343	-	343	-	343	-
$^{0,2}X_0^-$	443	457	473	-	475	-	-	489	-
$^{1,3}X_0^-$	-	-	387	-	-	-	-	-	-
Z_1^-	-	-	429	-	-	-	-	-	-
$^{1,2}A_0^-$	-	-	-	179	-	179	-	-	-
$^{1,3}A_0^-$	-	-	-	-	-	-	-	-	-

47 Apigenin-7-O-apiosylglukosid

52 Quercetin-3-O-rutosid

48 Apigenin-7-O-neohesperidosid

53 Luteolin-3',7-di-O-glukosid

49 Kämpferol-7-O-neohesperidosid

54 Hesperetin-7-O-neohesperidosid

50 Quercetin-3-O-arabinoglukosid

55 Isorhamnetin-3-O-rutosid

51 Eriodictyol-7-O-neohesperidosid

Tabelle 17 NI-Fragmente der Flavonoid-O-diglykoside

Fragmentation	Flavonoide								
	47	48	49	50	51	52	53	54	55
$[M+H]^+$	565	579	595	597	597	611	611	611	625
Y_0^+	271	271	287	303	289	303	287 ($^{7,3'}Y_0^+$) 449 ($^7Y_0^+/^{3'}Y_0^+$)	303	317
$[Y_0+H]^{*+}$	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Y_1^+	433	433	449	465	451	465	-	465	479
$^{0,2}X_0^+$	-	-	-	-	477	-	-	491	-
$[M-Hex+H]^+$	-	-	-	435	435	449	-	449	463

Tabelle 18 PI-Fragmente der Flavonoid-O-diglykoside

C-Glykoside

Fragmention	Neutralverlust	Flavonoide					
		43	44	45	46	56	57
$[M-H]^-$	(Da)	431	431	447	447	577	593 ^e /431 ^f
$[M-H]^- - xH_2O$	18-54	-	1x	2x	3x	-	-
$^{0,4}X^-$ ^a	60	-	-	387	-	-	-
$^{0,4}X^- - w$ ^b	78	-	353	369	369	-	353 ^f
$^{0,3}X^-$ ^c	90	341	341	357	357	-	503 ^e /341 ^{e,f}
$^{0,3}X^- - w$ ^d	108	-	323	339	-	-	323 ^{e,f}
$^{0,2}X^-$	120	311	311	327	327	-	473 ^e /311 ^{e,f}
$^{0,2}X^- - w + 2H$	136	-	-	-	-	-	295 ^e
$^{0,2}X^- - w$	138	-	-	-	-	-	293 ^e
$^{0,1}X^- + 2H^\bullet$	148	283	283	299	299	-	283 ^{e,f}
$^{0,1}X^- + H^\bullet$	149	-	-	298	-	-	-
$^{0,1}X^-$	150	-	-	297	297	-	281 ^e
$Z_1^\bullet$	163	-	-	-	-	414	-
$^{0,2}X_0^-$	120	-	-	-	-	457	-
$^{0,2}X_0 Z_1^-$	-	-	-	-	-	293	-
$^{1,4}X_0^-$	-	-	-	-	-	341	-
$^{0,2}X_0 Y_1^-$	-	-	-	-	-	311	-
Y^-	162	-	-	285	285	-	431 ^e /269 ^e
$Y^- - H^\bullet$	163	-	-	-	-	-	430 ^e

43 Apigenin-8-glukosid

^a $^{0,4}X^- / ^{1,3}X^- / ^{2,4}X^-$

44 Apigenin-6-glukosid

^b $^{0,4}X^- - w / ^{1,3}X^- - w / ^{2,4}X^- - w$

45 Luteolin-6-glukosid

^c $^{0,3}X^- / ^{1,4}X^-$

46 Luteolin-8-glukosid

^d $^{0,3}X^- - w / ^{1,4}X^- - w$

56 Vitexin-2"-O-rhamnosid

^e MS² O-Glc + C-Glc Fragmente

57 Isovitexin-7-O-glukoside

^f MS³ nur C-Glc Fragmentew H₂O

Tabelle 19 NI-Fragmente der Flavonoid-C-Glykoside

Fragmentation	Neutral- verlust	Flavonoide					
		43	44	45	46	56	57
$[M+H]^+$	(Da)	433	433	449	449	579 ^d /433 ^e	595 ^f /433 ^g
$[M+H]^+-xH_2O$	18-72	1-3x	1-4x	1-4x	1-3x	1-3x ^e	1-4x ^{f,g}
$^{1,2}X^+-2w$	66	367	367	383	383	367 ^{d,e}	529 ^f /367(C-Glc) ^{f,g}
$[M-3H_2O-CO]^+$	82	351	-	-	367	351 ^{d,e}	-
$^{1,2}X^+-3w$	84	-	249	365	-	-	349 ^{f,g}
$^{0,3}X^+{}^b$	90	343	-	-	359	343 ^d	-
$^{0,4}X^+-2w{}^a$	96	337	337	353	353	337 ^{d,e}	499/337 (C-Glc) ^{f,g}
$^{0,3}X^+-w{}^c$	108	-	-	-	-	-	-
	110	323	323	-	339	323 ^{d,e}	-
	112	-	-	-	-	-	-
$^{0,2}X^+$	120	313	313	329	329	459 ^d /313 ^{d,e}	474 ^f /313(C-Glc) ^{f,g}
$^{0,2}X^+-2H^{\bullet}$	122	311	-	-	327	311 ^e	-
	124	-	309	325	-	-	309 ^{f,g}
	125	-	-	-	-	-	-
	136	-	-	-	-	-	-
$^{0,2}X^+-w$	138	295	295	311	311	295 ^{d,e}	295 ^g
$^{0,1}X^++2H^{\bullet}$	148	-	-	-	-	-	-
$^{0,1}X^++H^{\bullet}$	149	284	284	300	300	-	-
$^{0,1}X^+$	150	283	283	299	299	283 ^{d,e}	283 ^{f,g}
Y^+		-	271	287	287	-	433 ^f (O-Glc)
Y_1^+		-	-	-	-	433 ^d	-
$^{0,2}X_0 Y_1^+$		-	-	-	-	313 ^d	-
Z_1^+		-	-	-	-	415 ^d	-
Y_0^+		-	-	-	-	271 ^{d,e}	271 ^{f,g}

^a $^{0,4}X^+-2w$ / $^{1,3}X^+-2w$ / $^{2,4}X^+-2w$

^e MS³ (X_0^+ -Fragmente)

^b $^{0,3}X^+$

^f MS² O-Glc + C-Glc Fragmente

^c $^{0,3}X^+-w$ / $^{1,4}X^+-w$

^g MS³ nur C-Glc Fragmente

^d MS²

Tabelle 20 PI-Fragmente der Flavonoid-C-Glykoside

4 MS/MS Flavonoid-Datenbank

Mit dem Bruker Daltonics „Compass LibraryEditor“ (Version 4.0 (Build 234)) wurde die Datenbank aufgebaut und editiert.

In das Programm können alle wichtigen Informationen für eine Substanz eingetragen werden - diese sind Substanznamen, CAS-Nummer, Summenformel, die daraus errechnete nominale, monoisotopische und durchschnittliche Masse, sowie einen Kommentar, in dem man zum Beispiel Synonyma einträgt. Die Strukturformel kann mittels eines mol-Files zusätzlich hochgeladen werden.

Eine einfache Möglichkeit, die Datenbank mit Spektren zu beladen, bietet die Funktion „Add to Library...“ in der DataAnalysis Software. Um die Datenmenge gering zu halten und das Hintergrundrauschen nicht in die Datenbank mit zu übernehmen, wurden alle MS^n -Spektren einheitlich verarbeitet. Dabei wurden die Parameter *Relative intensity threshold (base peak)* auf 1% und *Absolute intensity threshold* auf 1 gesetzt. Bei den MS^1 -Spektren wurde individuell vorgegangen. Somit beinhaltet die Datenbank zu jedem Flavonoid-Glykosid ein MS^1 -, zwei MS^2 - und zwei MS^3 -Spektren, aufgenommen jeweils im negativ und positiv Modus. Die Daten zu den Aglyka beschränken sich zumeist auf MS^1 und zwei MS^2 -Einträge pro Modus. Bei den methoxylierten Aglyka wurden situationsabhängig zusätzlich MS^3 -Spektren generiert.

Die Datenbank kann auf alle gespeicherten Parameter durchsucht werden - sogar das Kommentarfeld wird berücksichtigt. Das bringt den Vorteil, dass man sich bei der Suche nicht auf einen Substanznamen beschränken muss, sondern auch Trivialnamen mit einbeziehen kann.

Abbildung 20 zeigt einen Screenshot der Datenbankoberfläche.

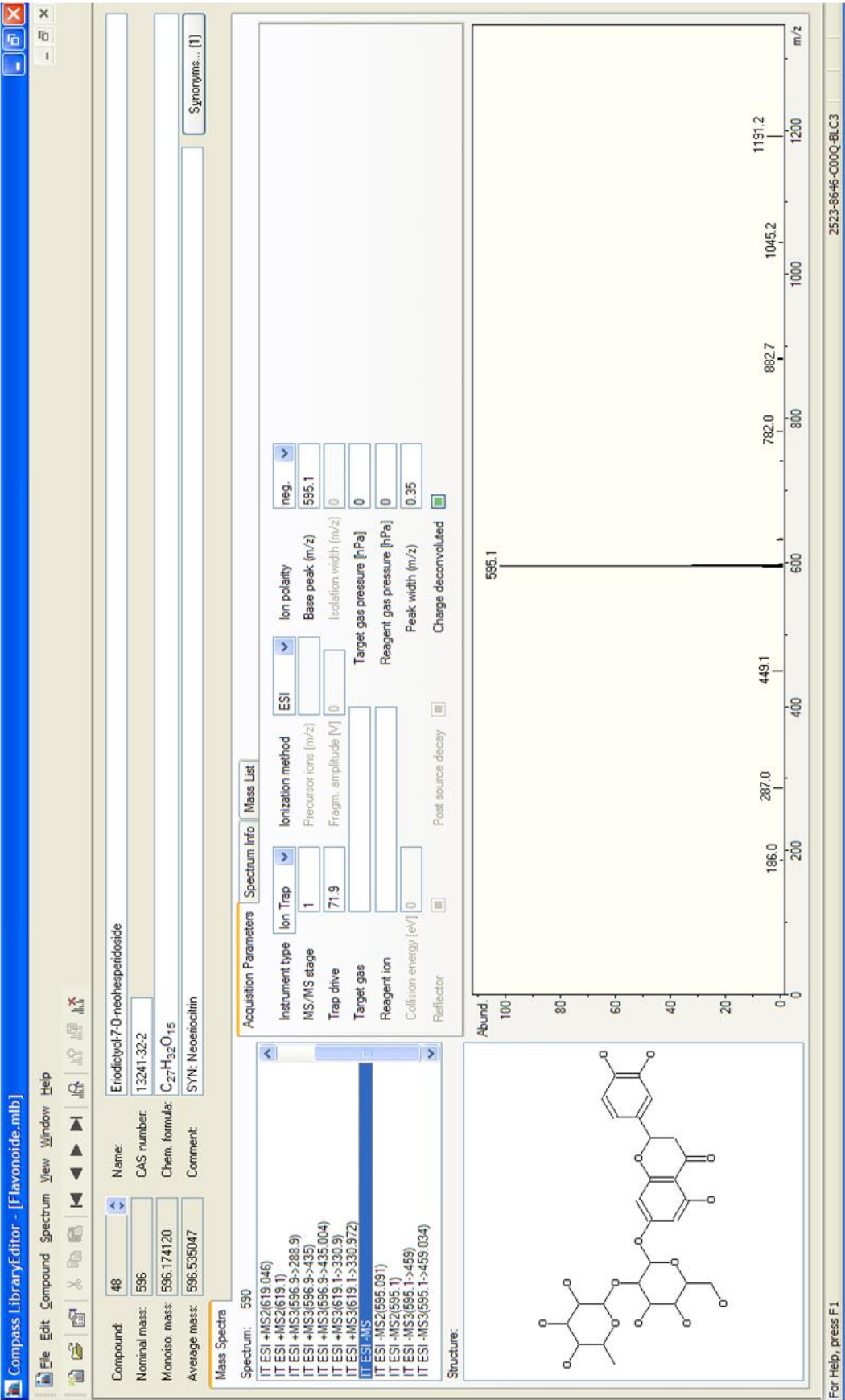


Abbildung 20 Datenbank Screenshot

Um einen unbekannten Inhaltsstoff zu identifizieren, nützt man die Option „Identify“ in der Compass DataAnalysis. Die Software gleicht nun alle Spektren der Datenbank mit dem gerade aufgenommenen Spektrum ab. Das Ergebnis ist eine Auflistung aller Referenzspektren, die aufgrund der Matching-Scores P, F, R und M am besten übereinstimmen. Alle vier Scores haben einen Maximalwert von 1000.

Der Score „P“ (Purity) spiegelt dabei die Übereinstimmung der Massen und Intensitäten des Datenbankspektrums mit dem gemessenen Spektrum wider. Dieser Score ist besonders relevant, wenn sowohl das gemessene als auch das Referenzspektrum von einer Reinsubstanz stammen. „F“ (Fit) zeigt an wie gut das Referenzspektrum mit dem gewonnenen Spektrum aufgrund der Massen und Intensitäten übereinstimmt. Enthält das zu identifizierende Spektrum weitere Massen, so werden diese nicht berücksichtigt. F ist für eine Identifizierung geeignet, wenn das Datenbankspektrum von einer Reinsubstanz stammt, das gemessene Spektrum aber Signale anderer Komponenten enthält. „R“ (RFit, ReverseFit) zeigt ebenfalls, wie gut die Massen und Intensitäten des erworbenen Spektrums mit den Datenbankspektren übereinstimmen. Hierbei werden zusätzliche Signale des Referenzspektrums nicht berücksichtigt. „P“ (ParameterMatch) berechnet eine Übereinstimmung aufgrund der Messparameter mit denen sowohl das Referenzspektrum als auch die Probe aufgenommen wurden. Die einzelnen Parameter, die für die Berechnung mit einbezogen werden sollen, können definiert werden.

Um die Zuverlässigkeit der Datenbank zu überprüfen wurde diese gegen sich selbst laufen gelassen. Abbildung 21 und Abbildung 22 zeigen dies anhand der MS³-Spektren von Luteolin-4'-O-glukosid, welches erwartungsgemäß auch als Nr.1-Hit gefunden wurde. Weiters sieht man die sehr hohe Ähnlichkeit zu Luteolin-7-O-glukosid im PI-Modus, welche eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Isomeren alleine aufgrund der MSⁿ-Spektren hier unmöglich macht.

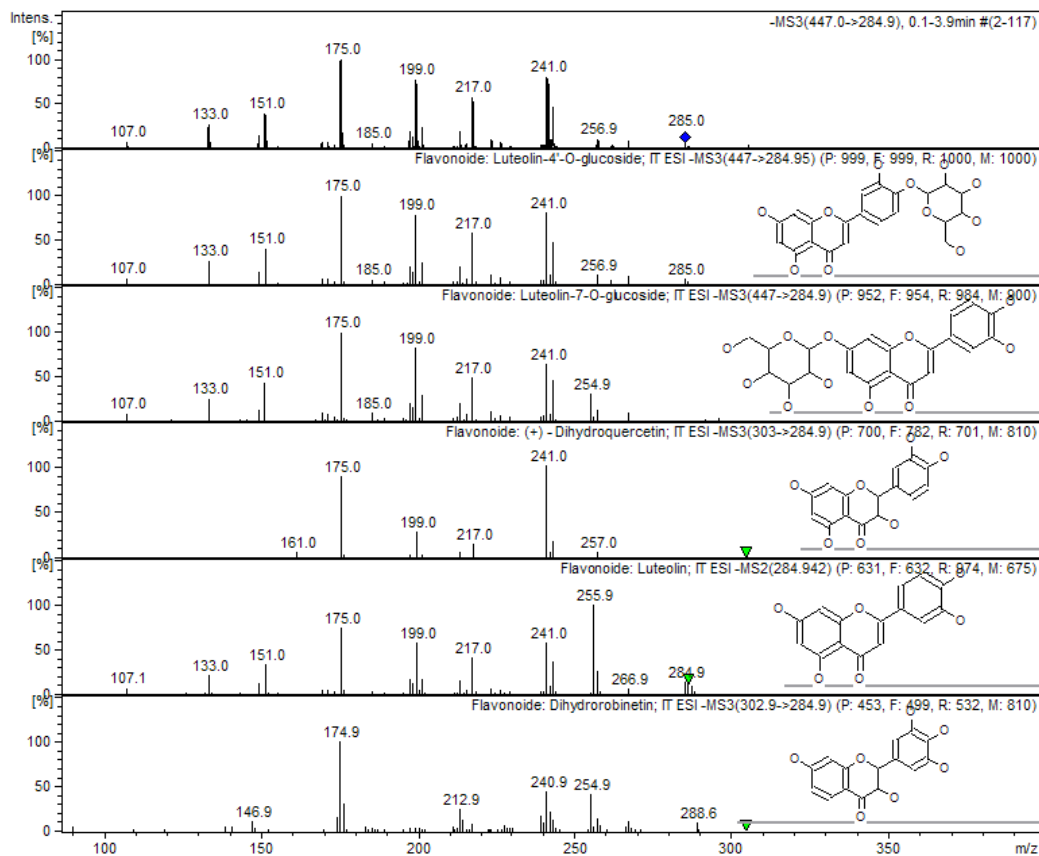


Abbildung 21 Datenbankmatching Luteolin-4'-O-glucosid NI-Modus

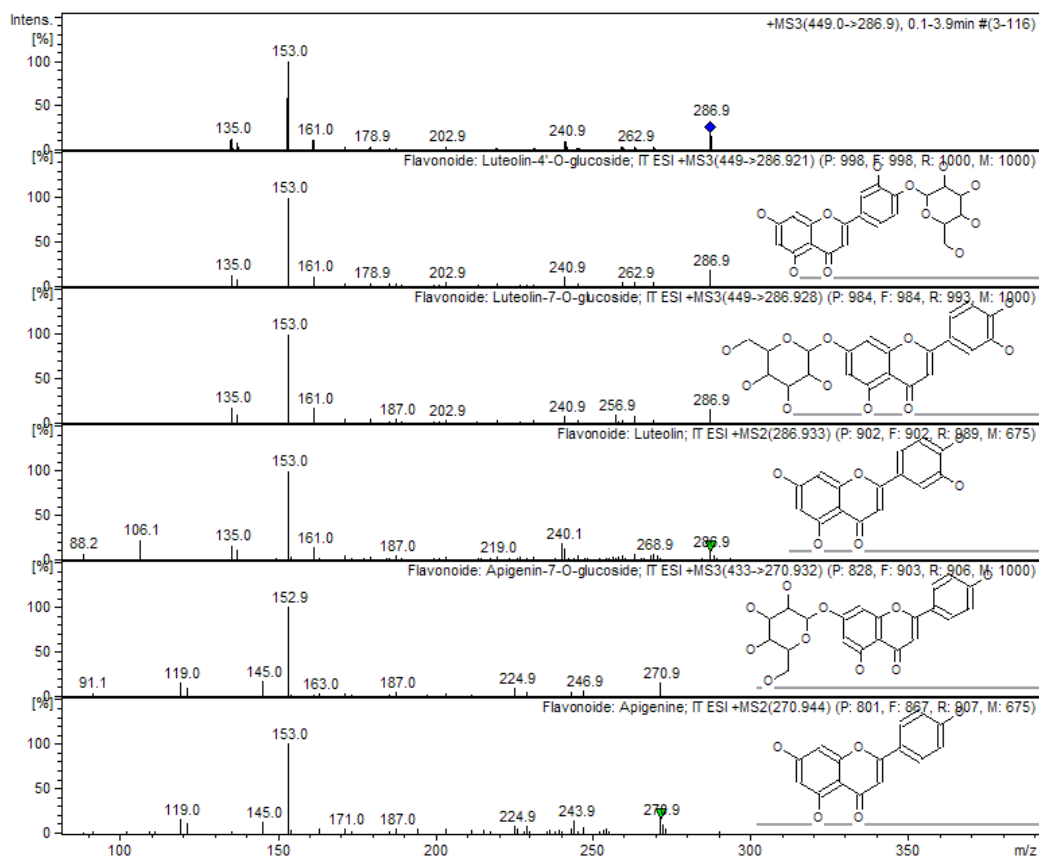


Abbildung 22 Datenbankmatching Luteolin-4'-O-glucosid PI-Modus

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels ESI-IT-MS eine Strukturanalyse aufgrund des unterschiedlichen Fragmentierungsverhaltens einzelner Flavonoide durchgeführt. Dabei konnten die Stärken und Schwächen dieser Analysenmethode aufgezeigt werden.

Obwohl sehr viele Flavonoide denselben Grundkörper besitzen, der sich in einzelnen Fällen nur durch die Stellung einer einzigen Hydroxygruppe unterscheidet, kann man zwischen ähnlichen Verbindungen differenzieren. Lässt man die Datenbank gegen sich selbst laufen, so sieht man, dass z.B. die drei isobaren Flavonoide Luteolin (15), Kämpferol (21) und Fisetin (22) unterschieden werden können. Zum einen liegt der Unterschied in den Grundkörpern, Flavon zu Flavonol, und zum anderen in der Position der Hydroxygruppen. Kämpferol trägt eine Hydroxygruppe am B-Ring, wo hingegen Fisetin zwei besitzt, dafür aber nur eine Hydroxygruppe am A-Ring. Die Tabelle 21 zeigt den Abgleich einiger isobarer Flavonoide in der Datenbank aufgrund des Identifizierungsparameters „P“.

Die extensive Annotierung der Spektren hat gezeigt, dass ein Auftreten der Hauptfragmente $^{ij}A^{\pm}$ und $^{ij}B^{\pm}$ alleine meist nicht zur vollständigen Unterscheidung zwischen den Flavonoiden herangezogen werden kann. Die Fragment-Ionen bei m/z 107 ($^{0,4}A^+$) und m/z 151 ($^{1,3}A^+$) im NI Modus spiegeln z.B. allgemein einen A-Ring mit zwei Hydroxygruppen wider. Flavonoide, die dieses Strukturmerkmal besitzen, können jedoch meist aufgrund der Oxidationsstufe, der Substituenten und des Fragmentierungsschemas des C-Rings unterschieden werden. Die Neutralverluste von z.B. H_2O , CO und CO_2 sind hier oft charakteristisch.

Bei den methoxylierten Flavonoiden ergibt sich bezüglich der Unterscheidung aufgrund der Position der Methylgruppe ein differenziertes Bild – bestimmte Isomere können sehr leicht, andere nahezu gar nicht unterschieden werden. Wie an dem positiven Beispiel von Rhamnetin und Isorhamnetin in Abbildung 16 und Abbildung 17 gezeigt, ist es hier leicht möglich festzustellen, ob die Methylgruppe am A- oder B-Ring lokalisiert ist. Hingegen weisen die Strukturisomere Isorhamnetin (3'-OMe) (26) und Tamarixetin (4'-OMe) (28) im NI MS^2 -Spektrum beide lediglich einen Methylverlust auf und liefern somit keine weitere Identifizierungsmöglichkeit. Erst im NI MS^3 -Spektrum kommt es zu

einer ausgiebigen Fragmentierung, die jedoch ebenfalls keine Differenzierung dieser beiden Isomere zulässt. Im PI Modus kommt es zwar schon im MS^2 -Spektrum zu einer informationsreicheren Fragmentierung beider Flavonoide, jedoch ist diese nahezu gleich. Auch die MS^3 -Spektren weisen keine markanten Unterschiede auf, wodurch die beiden Verbindungen auch hier nicht differenziert werden können. Die Tabelle 21 zeigt den Identifizierungsversuch der NI und PI MS^2 -Spektren anhand des Parameters „P“.

Die Analyse von Flavonoid-O-Glykosiden ist dahingegen schwierig, da sich zum Beispiel die Zuckerkomponenten lediglich als Hexose oder Pentose ansprechen lassen. So kann man weder im PI noch im NI Modus zwischen Quercetin-3-O-galaktosid (39) und Quercetin-3-O-glukosid (40) unterscheiden. Aber die Position, an welcher sich die Zuckerkomponente befindet, hat anscheinend einen gewissen Einfluss auf die Identifizierung. So kann die Datenbank im NI Modus aufgrund kleiner Unterschiede bei den Neutralverlusten zwischen Luteolin-4'-O-glukosid (35) und Luteolin-7-O-glukosid (36) unterscheiden (Tabelle 21).

Interessant ist die Möglichkeit der Ausbildung eines $[Y_0-H]^{\bullet}$ Radikals bei der Fragmentierung von O-Glykosiden im NI Modus. Dieses $[Y_0-H]^{\bullet}$ Radikal fragmentiert dann im MS^3 typischerweise völlig anders als das entsprechende Y_0^- Ion. Das Vorliegen eines intensiven $[Y_0-H]^{\bullet}$ Radikalions kann somit bewirken, dass es bei der Identifizierung das Aglykons eines O-Glykosides mittels der MS^3 -Daten zu einem sehr schlechten Datenbankmatch mit den MS^2 -Spektren des entsprechenden Aglykons kommt. Andererseits ist die Intensität des $[Y_0-H]^{\bullet}$ Radikalions oft von der Position des Zuckerrestes abhängig und kann somit zu einer Unterscheidung von Isomeren dienen.

Den Peak-armen Spektren der Flavonoid-O-Glykoside stehen die informationsreichen Flavonoid-C-Glykosid Spektren gegenüber. Bei den C-Glykosiden kommt es zu einer ausgiebigen Fragmentierung der Zuckerkomponente und aufgrund der stabilen C-C Bindung wird der Zucker nie zur Gänze abgespalten. Wie bei den O-Glykosiden ist auch hier die Position am Grundkörper entscheidend. Die Strukturisomere Luteolin-6-C-glukosid (45) und Luteolin-8-C-glukosid (46) sind durch die Referenzspektren der Datenbank sowohl im NI als auch im PI Modus eindeutig zu identifizieren. Tabelle 21 zeigt die Identifizierung anhand des Parameters „P“.

Wie bereits erwähnt, können die Hauptfragmente nicht zur vollständigen Differenzierung zwischen den Flavonoiden herangezogen werden, jedoch sind sie sehr hilfreich bei der Strukturanalyse oder Identifizierung einer unbekannten Verbindung, für die kein Referenzspektrum in der Datenbank vorhanden ist. Da die $^{ij}A^{\pm}$ und $^{ij}B^{\pm}$ Ionen in Abhängigkeit ihrer Anzahl an Hydroxygruppen immer das gleiche Molekulargewicht besitzen, kann wie mit einem Baukasten eine Struktur gezeichnet werden. Durch die Fragmentierung des C-Ringes sollte man die Oxidationsstufe in der Position 3 eruieren, um so zwischen z.B. Flavonen und Flavonolen unterscheiden zu können.

NI Modus

	Kämpferol	Luteolin	Fisetin		Isorhamnetin	Tamarixetin
Kämpferol	999	148	<100	Isorhamnetin	1000	992
Luteolin	144	1000	<100	Tamarixetin	989	998
Fisetin	<100	<100	999			

PI Modus

	Kämpferol	Luteolin	Fisetin		Isorhamnetin	Tamarixetin
Kämpferol	999	<100	<100	Isorhamnetin	997	987
Luteolin	185	1000	<100	Tamarixetin	990	1000
Fisetin	309	<100	1000			

NI Modus

	Lut-4'-O-glc	Lut-7-O-glc	Lut-6-C-glc	Lut-8-C-glc
Lut-4'-O-glc	999	952	<100	<100
Lut-7-O-glc	915	995	<100	<100
Lut-6-C-glc	<100	<100	1000	894
Lut-8-C-glc	<100	<100	896	1000

PI Modus

	Lut-4'-O-glc	Lut-7-O-glc	Lut-6-C-glc	Lut-8-C-glc
Lut-4'-O-glc	998	984	<100	<100
Lut-7-O-glc	976	993	<100	<100
Lut-6-C-glc	<100	<100	961	818
Lut-8-C-glc	<100	<100	789	1000

Tabelle 21 Identifizierungsversuch isobarer Flavonoide mittels Matching-Score "P"

Mittlerweile wurde die hier erstellte Massenspektrometrie Datenbank bereits in zahlreichen weiteren Projekten sehr erfolgreich für die Identifizierung und Charakterisierung von Flavonoiden in Extrakten verschiedener Heilpflanzen mittels LC-MS eingesetzt. So wurden z.B. im Rahmen der Untersuchung von vier verschiedenen medizinisch genutzten Sonnentau Arten (*Drosera anglica*, *D. intermedia*, *D. madagascariensis* und *D. rotundifolia*) mittels LC-MS 11 verschiedene Myricetin-, Quercetin- und Kämpferol-Derivate identifiziert, wobei 3 dieser Flavonoide neu für die untersuchten Spezies waren [17]. Die LC-MS Analyse wässriger Extrakte von *Dianthus versicolor* FISCH., die in der traditionellen Mongolischen Medizin bei Lebererkrankungen eingesetzt wird, führte zur Identifizierung von 26 Flavonoiden, darunter eine Serie seltener C- und O-glykosylierter Derivate [18]. In beiden Fällen wurden die mittels der Datenbank erstellten Strukturvorschläge entweder über den Vergleich mit Reinsubstanzen oder mittels NMR bestätigt.

6 Zusammenfassung

Ziel dieser Arbeit war es, eine Massenspektrometrie Datenbank mit Flavonoid-Reinsubstanzen aufzubauen. Mit Hilfe der ElektroSpray-Ionisation (ESI) und einer Ionenfalle (IT) wurde mittels der Tandem-Massenspektrometrie Aufschluss über deren Molekulargewichte und Spaltprodukte erhalten. Da viele Flavonoide ein gleiches Molekulargewicht aufweisen, aber unterschiedlich fragmentieren, wurde versucht, aufgrund des Fragmentierungsmusters eine Strukturanalyse im negativen (NI) und positiven (PI) Modus durchzuführen. Der NI-Modus ist sensitiver im Bezug auf das S/N Verhältnis, dafür liefert der PI-Modus meist mehr Fragmente und komplettiert somit die Analysen. Bei dem Zerfall der Verbindungen kam es zur Bildung der in der Literatur beschrieben Hauptfragmente, die wichtige strukturelle Informationen liefern. Entscheidend für eine genauere Identifizierung eines Flavonoids mittels der Datenbank ist häufig der Verlust kleiner Neutalmoleküle, deren Ursprung meist der C-Ring ist.

Basierend auf diesen unterschiedlichen Fragmentierungsverhalten wurde festgestellt, dass man hydroxylierte Flavonoid-Aglyka gut voneinander unterscheiden kann. Hierbei wurden bei Testläufen mit der Datenbank sehr gute Identifizierungsergebnisse erzielt.

Strukturisomere methoxylierte Aglyka lassen sich dann sehr gut unterscheiden, wenn die Methoxygruppe entweder am A- oder am B-Ring hängt. Im Fall einer unterschiedlichen Positionierung am B-Ring, lassen sich die Spektren nahezu gar nicht voneinander unterscheiden.

Bei den Flavonoid-O-Glykosiden beschränkt sich die Zuordnung der Zuckerkomponenten, auf Hexosen, Deoxyhexosen oder Pentosen, da auch hier Strukturisomere nicht unterschieden werden können. Dafür lassen sich fallweise Stellungenisomere O-Glykoside mittels der Datenbank voneinander unterscheiden.

Leichter fällt die Differenzierung der Flavonoid-C-Glykoside, da die Position der Zuckerkomponente am Grundgerüst zu einer unterschiedlichen Spaltproduktbildung führt.

Durch die Datenbank ist es gelungen, eine schnelle Identifizierung von Flavonoiden mittels HPLC-MS Kopplung zu ermöglichen. Ist keine vollständige Identifizierung möglich, liefert die Datenbank dafür wesentliche Hinweise um weitere Strukturanalysen zu erleichtern.

7 Summary

In this study, a mass spectrometry database on an ESI-IT mass spectrometer was developed using commercial flavonoid references. Based on differences in the fragmentation behavior of the protonated and deprotonated molecular ions, even structurally similar flavonoids with the same molecular weight can be differentiated via multistage mass spectrometry. The negative mode (NI) is more sensitive with regard to the S/N ratio. The positive mode (PI), on the other hand, often produces more fragments and therefore provides important additional data for structural analyses.

Based on the literature, the main fragment ions formed upon collision-induced dissociation (CID) were identified. These ions typically provide important information on characteristic substructures. Crucial for the unambiguous identification of a flavonoid is also the pattern generated by small neutral losses that mainly originate from the C-ring. The analyses show that hydroxylated flavonoid aglycons are easier to identify than the methoxylated ones. Regioisomeric methoxylated flavonoids can be differentiated if the methoxy group is located at different rings. If they are situated at the same ring, they can usually not be distinguished.

The sugar components from flavonoid-O-glycosides can only be identified as hexoses, deoxyhexoses or pentoses. Nevertheless, structural isomeric O-glycosides were differentiated by the database in certain cases.

Flavonoid-C-glycosides, on the other hand, can be distinguished more easily, since the position of the carbohydrate residue has an influence on the cross-ring cleavage of the sugar moiety.

The database facilitates fast identification of flavonoids in complex samples by HPLC-MS analyses. Even for unknown flavonoids, which have no reference spectrum in the database, structural information for further analyses is generated.

8 Literaturverzeichnis

1. Higdon, J. *Flavonoids*. 2005 [cited; Available from: <http://lpi.oregonstate.edu/infocenter/phytochemicals/flavonoids/>].
2. Hänsel, R. and Sticher, O., *Pharmakognosie - Phytopharmazie*. 8., überarb. u. aktualisierte Aufl. ed. 2007, Heidelberg: Springer-Medizin-Verlag.
3. Manach, C., Scalbert, A., Morand, C., Remesy, C., and Jimenez, L., *Polyphenols: Food sources and bioavailability*. *Am. J. Clin. Nutr.*, 2004. **79**(5): p. 727-747.
4. Winkel-Shirley, B., *Flavonoid Biosynthesis. A Colorful Model for Genetics, Biochemistry, Cell Biology, and Biotechnology*. *Plant Physiology*, 2001. **126**(2): p. 485-493.
5. Fabre, N., Rustan, I., de Hoffmann, E., and Quetin-Leclercq, J., *Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry*. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2001. **12**(6): p. 707-715.
6. Cuyckens, F. and Claeys, M., *Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids*. *Journal of Mass Spectrometry*, 2004. **39**(1): p. 1-15.
7. de Rijke, E., Out, P., Niessen, W.M.A., Ariese, F., Gooijer, C., and Brinkman, U.A.T., *Analytical separation and detection methods for flavonoids*. *Journal of Chromatography A*, 2006. **1112**(1-2): p. 31-63.
8. de Rijke, E., Zappey, H., Ariese, F., Gooijer, C., and Brinkman, U.A.T., *Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments*. *Journal of Chromatography A*, 2003. **984**(1): p. 45-58.
9. Geng, P., Sun, J., Zhang, R., He, J., and Abliz, Z., *An investigation of the fragmentation differences of isomeric flavonol-O-glycosides under different collision-induced dissociation based mass spectrometry*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2009. **23**(10): p. 1519-1524.
10. Justesen, U., *Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry*. *Journal of Mass Spectrometry*, 2001. **36**(2): p. 169-178.
11. Kachlicki, P., Einhorn, J., Muth, D., Kerhoas, L., and Stobiecki, M., *Evaluation of glycosylation and malonylation patterns in flavonoid glycosides during LC/MS/MS metabolite profiling*. *J. Mass Spectrom.*, 2008. **43**(5): p. 572-586.
12. Kang, J., Hick, L.A., and Price, W.E., *A fragmentation study of isoflavones in negative electrospray ionization by MSn ion trap mass spectrometry and triple quadrupole mass spectrometry*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2007. **21**(6): p. 857-868.
13. Ma, Y.L., Li, Q.M., Van den Heuvel, H., and Claeys, M., *Characterization of flavone and flavonol aglycons by collision-induced dissociation tandem mass spectrometry*. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 1997. **11**(12): p. 1357-1364.
14. March, R.E., Lewars, E.G., Stadey, C.J., Miao, X.-S., Zhao, X., and Metcalfe, C.D., *A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry*. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2006. **248**(1-2): p. 61-85.
15. Tsimogiannis, D., Samiotaki, M., Panayotou, G., and Oreopoulou, V., *Characterization of Flavonoid Subgroups and Hydroxy Substitution by HPLC-MS/MS*. *Molecules*, 2007. **12**(3): p. 593-606.
16. Waridel, P., Wolfender, J.-L., Ndjoko, K., Hobby, K.R., Major, H.J., and Hostettmann, K., *Evaluation of quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry*.

- try and ion-trap multiple-stage mass spectrometry for the differentiation of C-glycosidic flavonoid isomers*. Journal of Chromatography A, 2001. **926**(1): p. 29-41.
17. Zehl, M., Braunberger, C., Conrad, J., Crnogorac, M., Krasteva, S., Vogler, B., Beifuss, U., and Krenn, L., *Identification and quantification of flavonoids and ellagic acid derivatives in therapeutically important Drosera species by LC–DAD, LC–NMR, NMR, and LC–MS*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2011: p. in press.
18. Obmann, A., Zehl, M., Purevsuren, S., Narantuya, S., Reznicek, G., Kletter, C., and Glasl, S., *Quantification of flavonoid glycosides in an aqueous extract from the traditional Mongolian medicinal plant Dianthus versicolor FISCH*. Journal of Separation Science, 2011. **34**(3): p. 292-298.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Flavan (2-Phenyl-chroman)	9
Abbildung 2 Grundkörper der Flavonoide.....	9
Abbildung 3 Biosynthese der Flavonoide [4].....	10
Abbildung 4 Schematischer ESI-IT-MS Aufbau	12
Abbildung 5 ElectroSpray Ionisation (ESI)	12
Abbildung 6 Fragmentierung mittels Ionenfalle	14
Abbildung 7 Flavonoid-Aglyka Fragmentierungsschema	15
Abbildung 8 Flavonoid-Glykosid Fragmentierungsschema [6].....	16
Abbildung 9 ESI-IT-Massenspektrometer.....	21
Abbildung 10 NI-Spektrenvergleich (Flavanonole) Dihydorobinetin-Dihydroquercetin ..	27
Abbildung 11 PI-Spektrenvergleich (Flavanonole) Dihydorobinetin-Dihydroquercetin..	27
Abbildung 12 NI-Spektrenvergleich (Flavone) Apigenin-Luteolin	31
Abbildung 13 PI-Spektrenvergleich (Flavone) Apigenin-Luteolin.....	31
Abbildung 14 NI-Spektrenvergleich (Flavonole) Kämpferol-Quercetin	35
Abbildung 15 PI-Spektrenvergleich (Flavonole) Kämpferol-Quercetin	35
Abbildung 16 NI-Spektrenvergleich (methoxylierte Aglyka) Isorhamnetin-Rhamnetin ...	39
Abbildung 17 PI-Spektrenvergleich (methoxylierte Aglyka) Isorhamnetin-Rhamnetin....	39
Abbildung 18 NI-Spektrenvergleich dreier Glykoside	45
Abbildung 19 PI-Spektrenvergleich dreier Glykoside	45
Abbildung 20 Datenbank Screenshot	52
Abbildung 21 Datenbankmatching Luteolin-4'-O-glukosid NI-Modus.....	54
Abbildung 22 Datenbankmatching Luteolin-4'-O-glukosid PI-Modus	54

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Vermessene Flavonoid-Aglyka	17
Tabelle 2 Vermessene Flavonoidmonoglykoside.....	19
Tabelle 3 Vermessene Flavonoidglykoside	20
Tabelle 4 MS Parameter.....	22
Tabelle 5 NI-Fragmente der Flavanone und Flavanonole	28
Tabelle 6 PI-Fragmente der Flavanone und Flavanonole	29
Tabelle 7 NI-Fragmente der Flavone.....	32
Tabelle 8 PI-Fragmente der Flavone	33
Tabelle 9 NI-Fragmente der Flavonole.....	36
Tabelle 10 PI-Fragmente der Flavonole	37
Tabelle 11 NI-Fragmente der methoxylierten Flavonoid-Aglyka 1.....	40
Tabelle 12 PI-Fragmente der methoxylierten Flavonoid-Aglyka 1	41
Tabelle 13 NI-Fragmente der methoxylierten Flavonoid-Aglyka 2.....	42
Tabelle 14 PI-Fragmente der methoxylierten Flavonoid-Aglyka 2	43
Tabelle 15 NI-Fragmente der Flavonoid-O-monoglykoside.....	46
Tabelle 16 PI-Fragmente der Flavonoid-O-monoglykoside	46
Tabelle 17 NI-Fragmente der Flavonoid-O-diglykoside	47
Tabelle 18 PI-Fragmente der Flavonoid-O-diglykoside.....	47
Tabelle 19 NI-Fragmente der Flavonoid-C-Glykoside	48
Tabelle 20 PI-Fragmente der Flavonoid-C-Glykoside.....	49
Tabelle 21 Identifizierungsversuch isobarer Flavonoide mittels Matching-Score "P"	57

Curriculum vitae



Persönliche Daten:	Name:	Michael Burgert
	Wohnort:	Hernalser Hauptstraße 79, 1170 Wien
	E- mail:	a0100004@unet.univie.ac.at
	Geburtsdatum:	12.12.1981
	Geburtsort:	Neunkirchen, NÖ
	Staatsbürgerschaft:	Österreich
	Familienstand:	ledig, keine Kinder
Schulbildung:	1987-2000	Volksschule, Realgymnasium, Matura
	2001-2011	Universität Wien, Studium Pharmazie
	SS 2009	Diplomarbeit am Department für
		Pharmakognosie
Berufserfahrung:	1996-2002	Ferialpraktikum als Elektriker und Schlosser bei MM Karton-Hirschwang
	Seit Sommer 2001	für JTS-Eventmarketing tätig
	August 2003	HNO Forschungslabor, AKH Wien
	September 2003	Forschungs- & Entwicklungslabor, MM Karton Frohnleiten
	Mai 2004-Juli 2005	Partyservice Delicatering
	seit März 2006	Allerheiligen Apotheke, 1200 Wien
Präsenzdienst:	Nov. 2000 -	
	Mai. 2001	ABC- Abwehrschule Wien
Ehrenamtliche		
Tätigkeit:	Seit 1993	Mitglied der Freiwilligen Feuerwehr Küb