

MASSENSPEKTROMETRISCHE UNTERSUCHUNG EINIGER NATÜRLICHER C-GLUKOSYL-VERBINDUNGEN

A. PROX

aus dem Organisch-chemischen Institut der Technischen Hochschule München.

(Received in Germany 18 November 1967; accepted for publication 27 November 1967)

Zusammenfassung—C-Glukosyl-Verbindungen aromatischer Aglykone zerfallen unter Elektronenbeschuss durch primäre Spaltungen im Glukoserest. Aus der Art der dabei gebildeten Fragmentionen lassen sich Rückschlüsse auf die Verknüpfungsstelle zwischen Zucker und Aglykon ziehen. Ist der Zucker Substituent eines aromatischen Rings, dann beeinflussen dessen weitere Substituenten die Fragmentierung in charakteristischer Weise. Dadurch können beispielsweise C-6- und C-8-Glukosylflavone unterschieden werden. Die isomeren O-Glukoside zerfallen unter Eliminierung des Zuckers und zeigen praktisch nur das Massenspektrum des Aglykons.

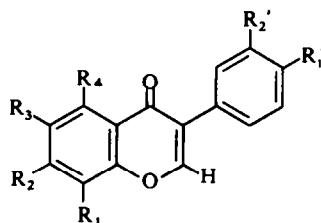
Abstract—Under electron impact C-glucosyl compounds of aromatic aglycones show initial fragmentation of the glucose moiety. The type of fragment ions formed under these conditions indicates the position of the linkage between the sugar and the aglycone. When the sugar is bound to an aromatic ring, the other substituents influence the fragmentation in a characteristic manner. Thus for example one can distinguish between C-6- and C-8-glucosyl flavones. On the other hand the isomeric O-glucosides eliminate the sugar moiety and give only the mass spectra of the aglycones.

Bei der Strukturaufklärung organischer Naturstoffe hat sich die Massenspektrometrie immer dann als besonders hilfreich und wertvoll erwiesen, wenn diese Verbindungen leicht fragmentierende aliphatische oder alicyclische Gruppen mit ladungsstabilisierenden aromatischen oder hetero-aromatischen Ringsystemen im gleichen Molekül vereinigen.¹ Aus dem beobachteten schrittweisen Zerfall liessen sich nicht allein bestimmte Teile der betreffenden Verbindungen erkennen, sondern vielfach weitgehende Aussagen über ihre Struktur ableiten. Der ausserordentlich geringe Substanzbedarf zur Aufnahme auch von hochaufgelösten Massenspektren kommt den häufig grossen Schwierigkeiten bei der Isolierung grösserer Substanzmengen aus natürlichen Quellen in idealer Weise entgegen, wenn man erwarten kann, dass diese Verbindungen einer solchen Untersuchung unmittelbar und ohne vorherige Derivatisierung zugänglich sind. Die Darstellung von Derivaten ist besonders bei Verbindungen unbekannter Struktur mit einem grosseren Substanzaufwand verbunden und birgt stets das Risiko von Stoffgemischen in sich. Lediglich die O-Trimethylsilylderivat bilden hier eine gewisse Ausnahme, da sie häufig auf sehr mildem Wege zugänglich sind,² und vielfach die Trennung und Reinigung mit Hilfe der Gas-chromatographie ermöglichen. Ihre Verwendung zur massenspektrometrischen Molekulargewichtsbestimmung bei Polyhydroxyverbindungen wurde schon vor längerer Zeit beschrieben.³

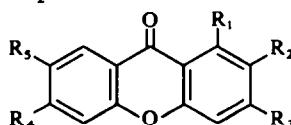
Zu dieser Gruppe von eingangs genannten Verbindungen zählen auch die Glykoside aromatischer oder hetero-aromatischer Aglykone. Während freie O-Glykoside bislang nur in wenigen Fällen untersucht wurden,^{4,5} führten hochauflösende Unter-

suchungen von N-Glykosiden zur vollständigen Strukturaufklärung unbekannter Nukleoside⁶ und Antibiotica.⁷ Permethylierte^{8,9} und vor allem peracetylierte O-Glykoside¹⁰⁻¹⁴ wurden von verschiedenen Seiten intensiv bearbeitet.

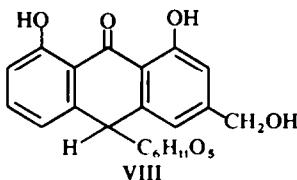
Demgegenüber wurden nach unserem Wissen C-Glykosylverbindungen bisher weder in freier noch in geschützter Form massenspektrometrisch untersucht. Die Zahl der isolierten und aufgeklärten, natürlichen C-Glykoside ist in den letzten Jahren ständig angestiegen.^{15,16} Ihre Strukturaufklärung auf chemischen und spektroskopischen Wege erfordert jedoch eine relativ grosse Substanzmenge, da oft schon die sichere Unterscheidung von C- und O-Glykosiden Schwierigkeiten bereiten kann.^{16b} Bei der sauren Spaltung flavonoider C-Glykosylverbindungen kann darüber hinaus Isomerisierung eintreten.^{17,18} Wie im folgenden noch gezeigt wird, lassen sich C-Glykosylverbindungen massenspektrometrisch unmittelbar analysieren und von den isomeren O-Glykosiden sicher unterscheiden. Schon an dieser Stelle soll jedoch darauf hingewiesen werden, dass in der vorliegenden Arbeit nur natürliche C-Glykoside untersucht wurden, bei denen die Glukose stets in der Pyranoseform vorlag.



I: R ₁ = -Glukosyl;	R ₂ = OH	R ₃ = H;	R ₄ = OH
R' ₁ = OH;	R' ₂ = H;		
II: R ₁ = -Glukosyl;	R ₂ = OH;	R ₃ = H;	R ₄ = OH
R' ₁ = OH;	R' ₂ = OH		
III: R ₁ = -Glukosyl;	R ₂ = OH;	R ₃ = H;	R ₄ = OH
R' ₁ = OH;	R' ₂ = OCH ₃		
IV: R ₁ = H;	R ₂ = OH;	R ₃ = -Glukosyl;	R ₄ = OH
R' ₁ = OH;	R' ₂ = H		
V: R ₁ = H;	R ₂ = OCH ₃ ;	R ₃ = -Glukosyl;	R ₄ = OH
R' ₁ = OH;	R' ₂ = H		
VI: R ₁ = H;	R ₂ = OCH ₃ ;	R ₃ = -Glukosyl;	R ₄ = OH
R' ₁ = OH;	R' ₂ = OH		
IX: R ₁ = -Glukosyl;	R ₂ = OCH ₃ ;	R ₃ = H;	R ₄ = OCH ₃
R' ₁ = OCH ₃ ;	R' ₂ = H		
X: R ₁ = -Glukosyl;	R ₂ = OCH ₃ ;	R ₃ = H;	R ₄ = OCH ₃
R' ₁ = OCH ₃ ;	R' ₂ = OCH ₃		
XI: R ₁ = H;	R ₂ = OH;	R ₃ = H;	R ₄ = OH
R' ₁ = OH;	R' ₂ = H		
XIII: R ₁ = H;	R ₂ = O-Glukosyl;	R ₃ = H;	R ₄ = OH
R' ₁ = OH;	R' ₂ = H		
XIV: R ₁ = H;	R ₂ = O-Glukosyl;	R ₃ = H;	R ₄ = OH
R' ₁ = OH;	R' ₂ = OH		

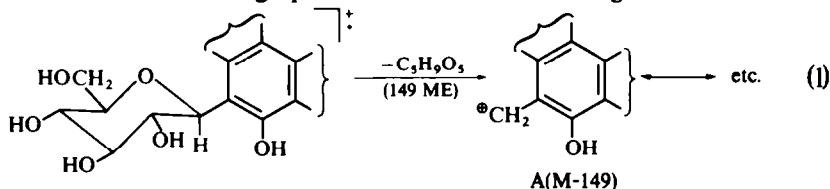


VII: R ₁ = OH;	R ₂ = -Glukosyl;	R ₃ = OH;	R ₄ = OH;	R ₅ = OH
XII: R ₁ = OH;	R ₂ = -Glukosyl;	R ₃ = OCH ₃ ;	R ₄ = OCH ₃ ;	R ₅ = OCH ₃

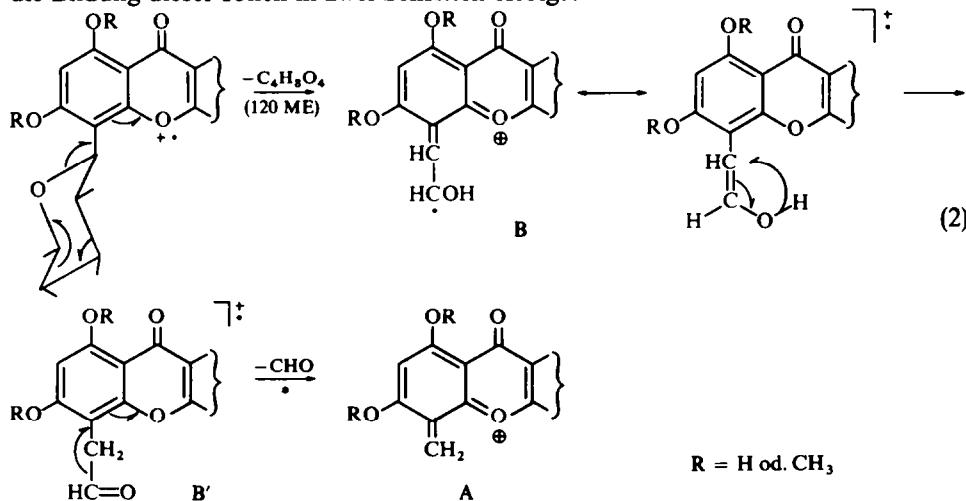


Aufgrund ihres massenspektrometrischen Verhaltens sollen die hier untersuchten C-Glukosylverbindungen in zwei Gruppen unterteilt werden. Die erste Gruppe umschliesst mit Vitexin (I),¹⁷ Orientin (II),¹⁹ Scoparin (III),²⁰ Saponaretin (Isovitexin) (IV),¹⁷ Swertisin (V),²¹ Swertiajaponin (VI)²¹ und Mangiferin (VII)²² Verbindungen, bei denen die Glukose C-Substituent eines aromatischen Rings ist. In Orthostellung zum Zucker wird bei allen bisher isolierten C-Glykosiden dieses Typs mindestens eine phenolische Hydroxylgruppe gefunden. Diese kann wie beispielsweise im Swertisin (V) und Swertiajaponin (VI) auch als Methyläther vorliegen. Die zweite Gruppe umfasst jene C-Glukoside, bei denen der Zucker mit einem nicht-aromatischen C-Atom des Aglykons verknüpft ist. Zu dieser Gruppe zählt das Aloin (Barbaloïn) (VIII).²³ Die Diskussion der massenspektrometrischen Zerfälle folgt dieser Einteilung.

Die C-Glukosylverbindungen I–VII und XII zeigen in ihren Massenspektren bei $M - C_5H_9O_5$ ($M - 149$) das Base-Ion. Es entspricht dem Benzylkation A des Aglykons, das formal durch Spaltung des Pyranoseringes unter Erhalt seines C-1-Atoms am Aglykon entstanden ist. (Siehe Massenspektren in Abb. 1–4). Bei diesem Prozess wird ein Wasserstoffatom vom abgespaltenen Zuckerrest übertragen:



Deuterierungsversuche ergaben, dass dieses H-Atom von einer der in dem Zucker enthaltenen Hydroxylgruppen stammt. Metastabile Ionen in den Massenspektren der Verbindungen I–III, IX und X zeigen, dass zumindest in den C-8-Glukosylflavonen die Bildung dieser Ionen in zwei Schritten erfolgt:



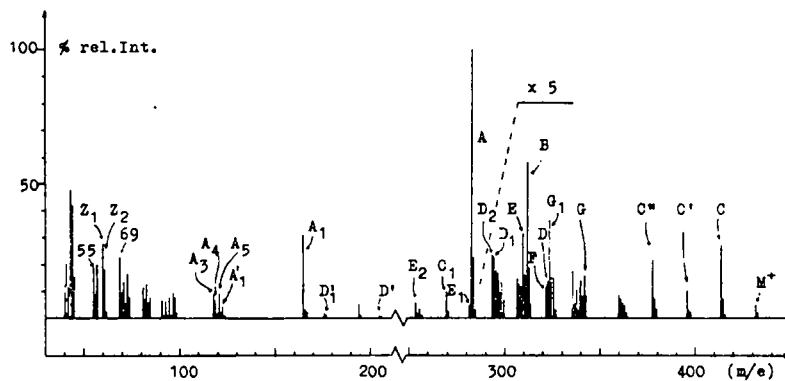


ABB. 1 Massenspektrum des Vitexins I (70 eV).

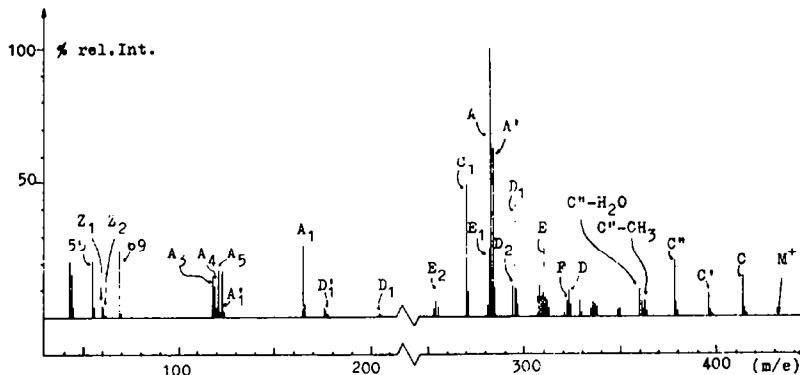


ABB. 2 Massenspektrum des Saponaretins IV (70 eV).

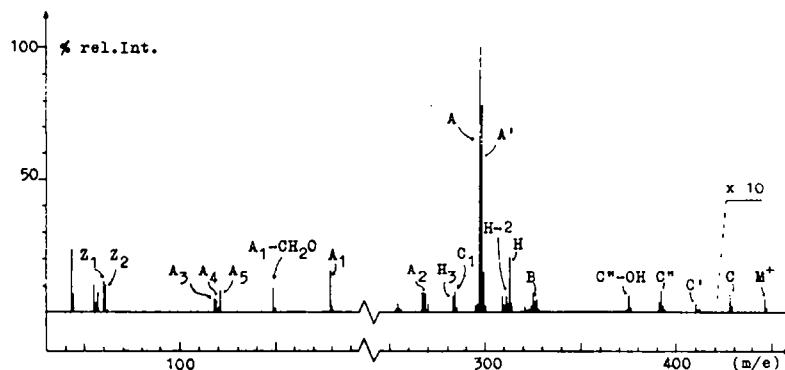


ABB. 3 Massenspektrum des Swertisins V (70 eV).

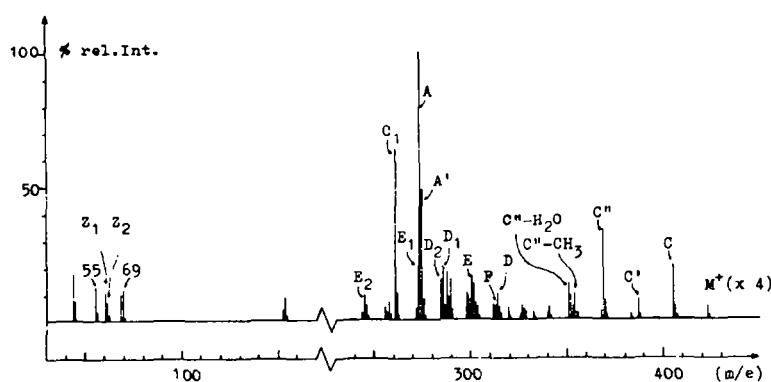


ABB. 4 Massenspektrum des Mangiferins VII (70 eV).

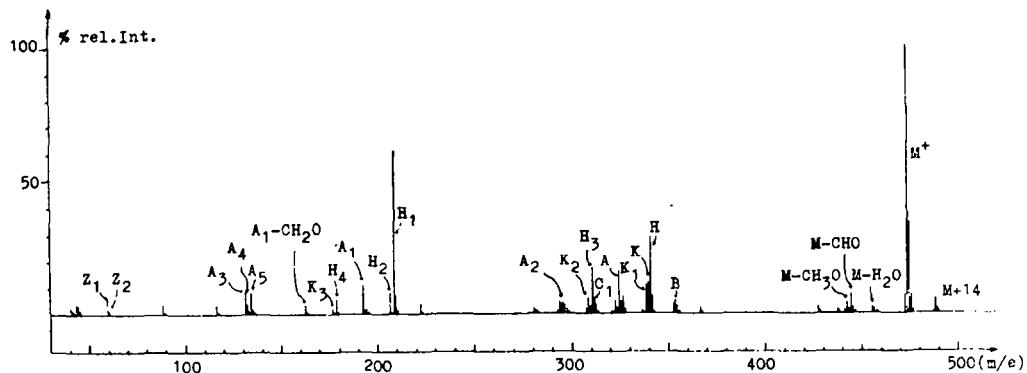


ABB. 5 Massenspektrum des Vitexin-O-4',5,7-trimethyläthers IX (70 eV).

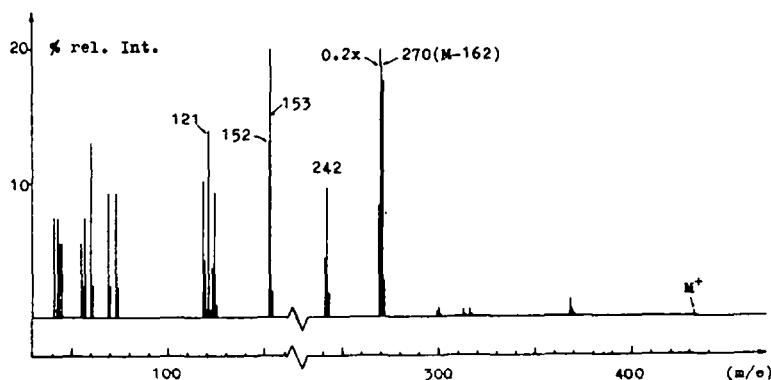
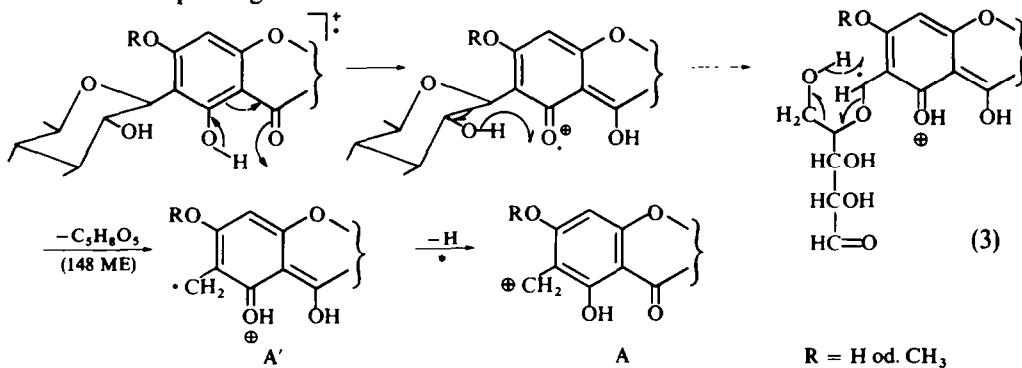


ABB. 6 Massenspektrum des Apigenin-7-O- β -D-glucosids XIII (70 eV).

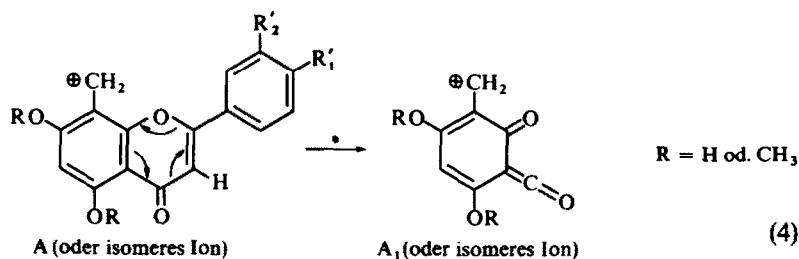
Der erste Schritt ist die Eliminierung von $C_4H_8O_4$ (120 ME) aus den Molekularionen zu den Ionen B (M-120). Der Verlust der C-Atome 3, 4, 5 und 6 der Glukose erscheint dabei sehr plausibel. Die Ionen B werden, wenn auch mit unterschiedlicher Intensität, praktisch in den Massenspektren aller hier untersuchter C-Glukosylverbindungen einschliesslich dem Aloin VIII nachgewiesen. Beim Saponaretin IV und Mangiferin VII, in deren Massenspektren diese Ionen nur mit sehr geringer Intensität auftreten, lässt sich ein analoger Prozess nach einer vorausgegangenen Wasserabspaltung formulieren.

Der zweite Schritt, der Verlust von CHO aus den Ionen B, ist durch metastabile Ionen gekennzeichnet. Ionen analoger Struktur und gleichen Zerfallsverhaltens wie die Ionen B wurden beispielsweise auch für die Fragmentierung von Flavanonolen diskutiert.²⁴

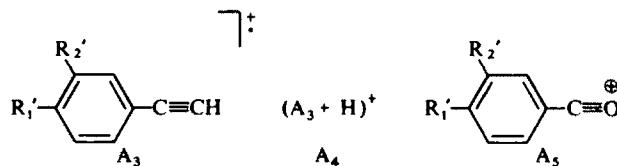
Die Bildung der Ionen A kann aber auch auf einem weiteren Weg erfolgen. Immer dann, wenn eine der zur Glukose orthoständigen Hydroxylgruppen einer Carbonylgruppe am aromatischen Ring benachbart ist, beobachtet man Spaltung des Pyranosiers unter doppelter Wasserstoff-Umlagerung. Aufgrund eines tautomeren Gleichgewichts können diese Hydroxylgruppen auch als Carbonylgruppen und damit als zusätzliche H-Acceptoren fungieren. Dies gilt für die OH-Gruppen in 5-Stellung der Verbindungen IV-VI und in 3-Stellung beim Mangiferin VII und seinem O-1, 6, 7-Trimethyläther XII. Der folgende Mechanismus ist für diese charakteristische Spaltung denkbar:



Die Radikalionen A' verlieren, wie anhand metastabiler Ionen gefunden wird, ein H-Atom und gehen in die Benzylionen A über. Die grössere Intensität der Ionen A' in den Massenspektren von V, VI und XII ($R = CH_3$) sprechen für den vorgeschlagenen Mechanismus. Die doppelte H-Umlagerung gestattet die unmittelbare Unterscheidung der C-6- und C-8-Glukoside der hier untersuchten Flavone. Ihre Beobachtung im Massenspektrum des Mangiferins VII und seines O-1, 6,7-Trimethyläthers XII lässt auf eine analoge Struktur schliessen. Sie wurde erst kürzlich durch die Synthese eines Abbauproduktes bewiesen.^{22b,c} Wie im folgenden noch beschrieben wird, zeigen die Massenspektren von Saponaretin IV und Mangiferin VII grosse Ähnlichkeit, die auf die Unabhängigkeit vieler Zerfälle von der Struktur des aromatischen Aglykons schliessen lässt. (s. Abb. 2 und 4). Der weitere Zerfall der Benzylionen A ist besonders für die C-Glukosylflavone charakteristisch. Er entspricht formal einem Retro-Diels-Alder-Zerfall (RDA), wier er auch in den Massenspektren der Flavone selbst beobachtet wird.^{24, 25}

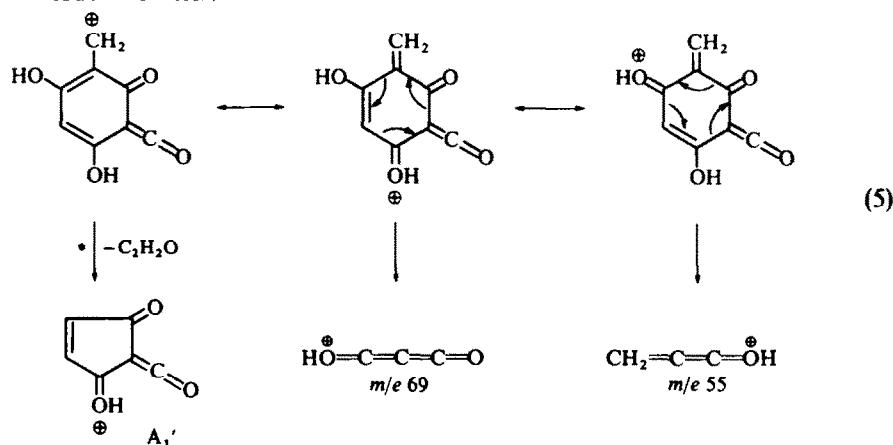


Für diesen Prozess wird in den meisten Fällen eine metastabile Bande gefunden. Er verläuft im Gegensatz zu dem entsprechenden Zerfall des Apigenins XI²⁴ ohne Wasserstoffumlagerung. Auch die anderen aus der Spaltung des Flavonringssystems resultierenden Ionen werden in den Massenspektren der C-Glukosylflavone beobachtet:



Die Ionen A_1 können in verschiedener Weise weiter zerfallen. Bei den Methoxyverbindungen ($R = CH_3$) findet dabei, wie anhand metastabiler Ionen gefunden wird, Eliminierung einer (der) Methoxygruppe als CH_2O statt. Metastabile Ionen in den Massenspektren der OH-freien Verbindungen ($R = H$) belegen den Zerfall der Ionen A_1 durch Eliminierung von Keten C_2H_2O .

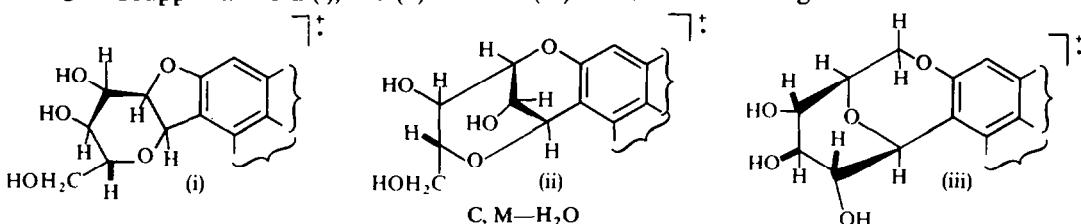
Die Ionen m/e 69 (C_3HO_2) und m/e 55 ($\text{C}_3\text{H}_3\text{O}$) treten mit Ausnahme der Verbindungen IX und X in den Massenspektren aller hier untersuchten C-Glukoside auf. Man muss daher annehmen, dass sie auch aus anderen Ionen, als hier angedeutet, gebildet werden können.²⁶



Eine in ihrer Intensität und Schärfe charakteristische metastabile Bande in den Massenspektren der Verbindungen V, VI und XII beschreibt die Abspaltung einer Methoxygruppe aus den Benzylionen A als CH_2O ($\text{R} = \text{CH}_3$ in Gl.3) unter Bildung der Ionen A₂ (M-179). Aus dem völlig gleichen Verhalten der Verbindung XII zu

schliessen, sollte es sich dabei gleichfalls um die zur Glukose orthoständigen Methoxygruppe handeln. Zusammen mit der beobachteten, doppelten Protonenumlagerung lässt sich daraus auf eine bestimmte Substituentenanordnung am aromatischen Ring schliessen.

Die Molekularionen der C-Glukosylverbindungen erscheinen vielfach nur mit sehr geringer Intensität. Beim Saponaretin IV wurde kein entsprechendes Signal gefunden.* An Stelle dessen beobachtet man jedoch stets ein charakteristisches $M\text{-H}_2\text{O}$ -Ion. Auffallend ist, dass starke Wasserabspaltung immer dann eintritt, wenn die Glukose in ortho-Stellung zu einer nicht über eine Wasserstoffbrücke gebundenen Hydroxylgruppe des Aglykons steht, wie zum Beispiel in den Verbindungen I-IV und VII. Liegt diese OH-Gruppe veräthert vor, wie in den Verbindungen V, VI und XII, tritt nur geringe H_2O -Abspaltung ein. In den Verbindungen IX und X ist sie gegenüber anderen Zerfällen völlig untergeordnet. Für die Abspaltung von Wasser aus den M^+ -Ionen wird in den Spektren von I-IV und VII keine metastabile Bande gefunden. Dies lässt zumindest teilweise einen thermischen Prozess vermuten. Die zunehmende Intensität dieser und einer Reihe weiterer Ionen mit steigender Ionenquellentemperatur deutet in die gleiche Richtung†. Eine intramolekulare Wasserabspaltung im Zucker scheint nach den Massenspektren der Verbindungen IX und X nur zu einem geringen Teil an dem Auftreten der $M\text{-H}_2\text{O}$ -Ionen beteiligt zu sein. Die Beobachtungen sprechen vielmehr für eine bevorzugte Wasserabspaltung zwischen der nicht chelatisierten Hydroxylgruppe des Aglykons und einer Hydroxylgruppe der Glukose unter Ringschluss. Für einen derartigen Prozess kommen die OH-Gruppen am C-2 (i), C-3 (ii) und C-6 (iii) der Glukose in Frage:



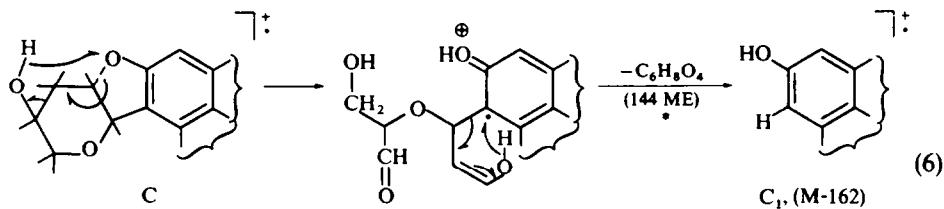
Zwischen diesen Möglichkeiten kann nicht unterschieden werden. Sterische Gründe sprechen mehr für (i). Bei den Verbindungen V, VI und XII ist eine analoge Wasserabspaltung nur mit der durch eine Wasserstoffbrücke gebundenen Hydroxylgruppe denkbar und dadurch offenbar erschwert. Die geringe Ketenabspaltung aus den M^+ -Ionen von 3-Acetyl-2-hydroxy-naphthochinonen wurde gleichfalls mit einer derartigen Wasserstoffbrücke erklärt.²⁷ Aus der Temperaturabhängigkeit der Ionenintensitäten liess sich eine Reihe von Fragmentionen auf die primäre H_2O -Abspaltung zurückführen. Sie fallen in den Massenspektren der Verbindungen IV und VII durch ihre grösse Intensität auf. Sie allein gestatten aber noch keine sichere Unterscheidung der isomeren C-Glukosylverbindungen. Die folgenden Mechanismen sollen ihre mögliche Bildung lediglich andeuten.

Metastabile Ionen in den Massenspektren der Verbindungen I, IV, V und VII

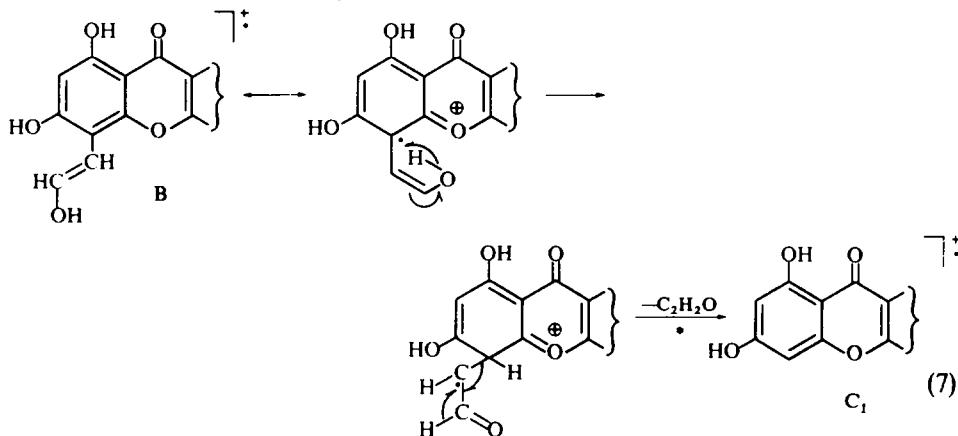
* Das Molekulargewicht dieser Verbindung kann mit Hilfe ihres O-Trimethylsilylderivats ohne Schwierigkeit bestimmt werden.

† Bei dem hier verwendeten Direkt einlass erfolgt die Wärmezufuhr zur Verdampfung der Probe mit Hilfe der Ionenquellenheizung.

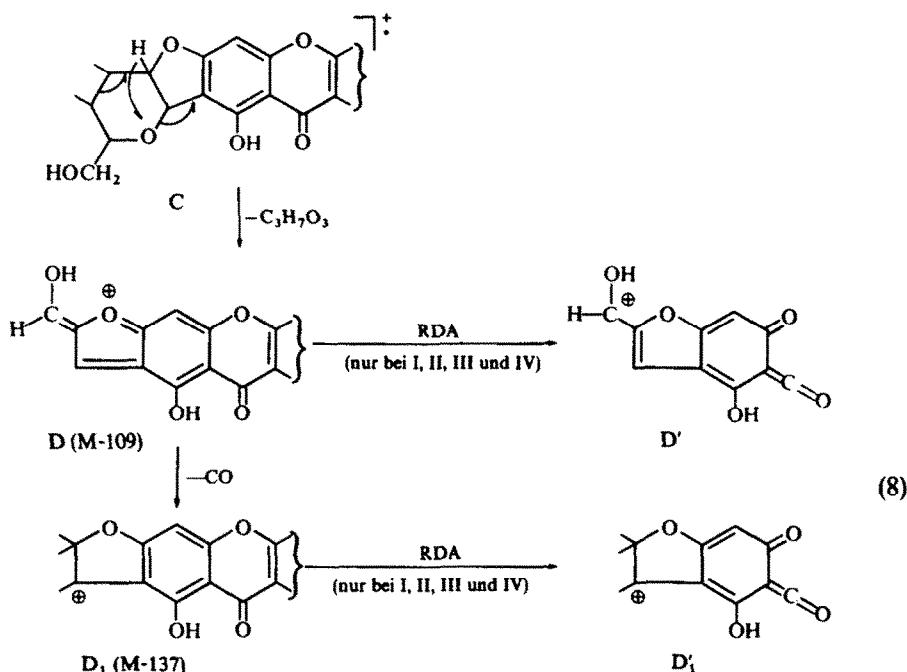
besagen, dass die Ionen C ($M-H_2O$) unter Verlust von $C_6H_8O_4$ (144 ME) zerfallen können. Summarisch entspricht das der Abspaltung der Glukose unter H-Umlagerung:



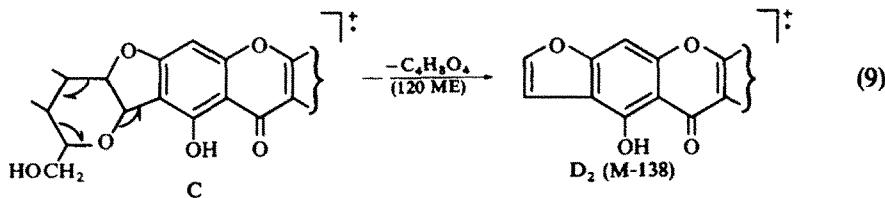
Die relative Intensität der Ionen C_1 ($M-162$) beträgt beim Saponaretin IV 61 %, dagegen beim Swertisin V nur 9 % (vgl. Abb. 2 und 3). Metastabile Ionen in den Massenspektren der C-8-Glukoside I, II und III lassen jedoch erkennen, dass die Ionen C_1 auch durch Keteneneliminierung aus den Ionen B (s. Gl. 2) entstehen können:



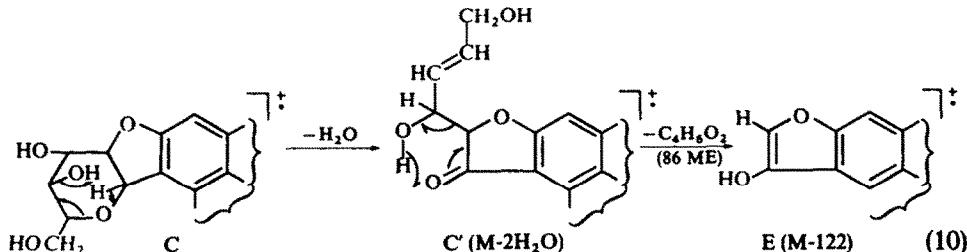
Auch $M-2H_2O$ (C') und $M-3H_2O$ (C'') zählen zu den charakteristischen Ionen, die sich offensichtlich in der Hauptsache von der primären H_2O -Abspaltung ableiten. Besonders das $M-3H_2O$ -Signal wird in den Massenspektren der Verbindungen I–VII und XII mit charakteristischer Intensität gefunden. Für ihre Bildung aus C lassen sich in den Massenspektren von den Verbindungen I–IV und VII keine metastabilen Ionen nachweisen. Dagegen ist der weitere Zerfall von C'' ($M-3H_2O$), metastabilen Ionen nach zu urteilen, für die verschiedenen Verbindungen charakteristisch. Während man bei den Monomethyläthern V und VI fast ausschließlich die Abspaltung von OH beobachtet, lässt sich bei den Verbindungen IV und VII sowohl die Eliminierung von H, OH, H_2O als auch CH_3 nachweisen. In den Massenspektren der Verbindungen I–III treten alle diese Ionen nur gering auf. Die Abspaltung von $C_3H_7O_3$ mit den Kohlenstoffatomen 4, 5 und 6 der Glukose aus dem Ion C führt zu dem Ion D ($M-109$). Nachfolgende Eliminierung von CO ergibt das Ion D_1 ($M-137$). Da in den Massenspektren der entsprechenden C-Glukosylflavone für beide Ionen ein durch einen Retro-Diels-Alder-Zerfall (RDA) gebildetes Fragmention nachgewiesen wird (D' bzw. D'_1) kann die abgespaltene CO-Gruppe nicht aus dem Flavonring herrühren, sondern nur das C-Atom 3 des Pyranoseringen sein. Gleichermaßen sollte man auch für die entsprechenden Ionen des Mangiferins VII erwarten. Der folgende Mechanismus ist dabei denkbar:



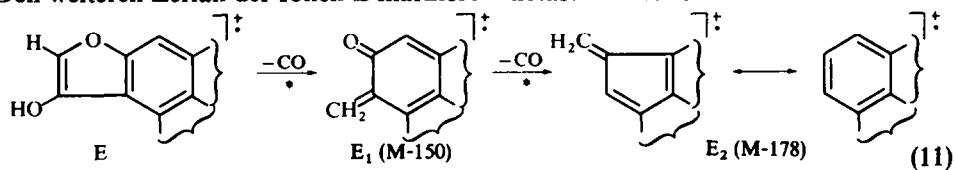
Man kann dabei annehmen, dass primäre Ringerweiterung zur CO-Eliminierung unter H-Umlagerung führt. Die Abspaltung von $\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$ (120 ME) analog zu dem in Gl. 2 formulierten Mechanismus ergibt das Ion D_2 (M-138):



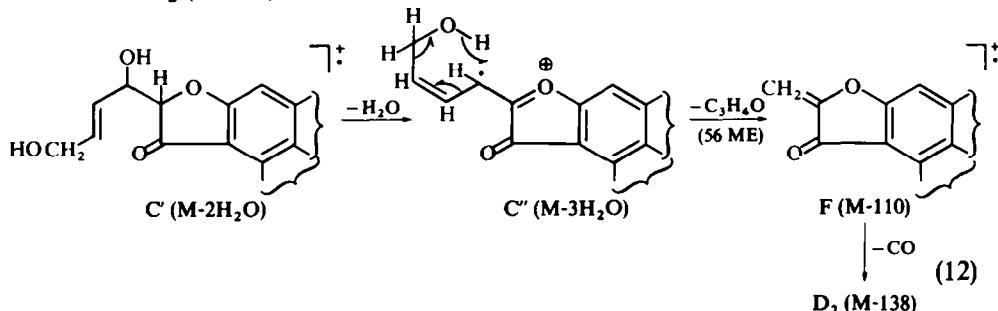
Eine weitere Reihe von Ionen leitet sich gleichfalls durch den Verlust der C-Atome 3, 4, 5 und 6 der Glukose aus den Ionen C ab. Dabei bleibt jedoch ein Sauerstoffatom in den resultierenden Ionen E erhalten. Für die Bildung dieser Ionen wird eine 1,4-Eliminierung von $\text{H}_2\text{O}^{28,29}$ unter gleichzeitiger Ringöffnung und nachfolgender Fragmentierung unter H-Umlagerung vorgeschlagen:



Den weiteren Zerfall der Ionen E markieren metastabile Ionen:

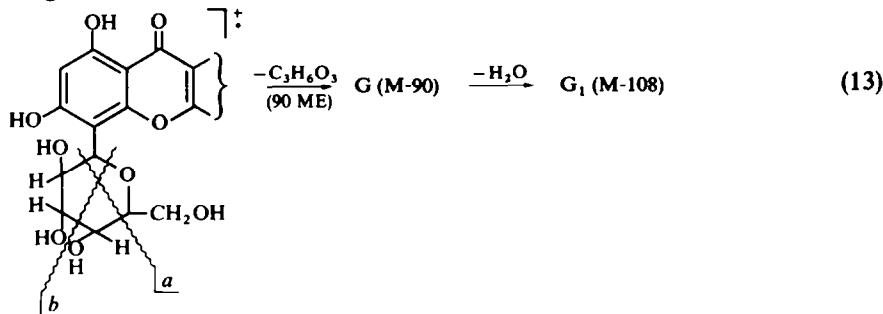


Das oben formulierte Ion C' (M-2H₂O) kann durch Abspaltung eines weiteren H₂O in das Ion C'' (M-3H₂O) zerfallen, das durch weiteren Verlust von C₃H₄O unter H-Umlagerung das Ion F (M-110) ergibt. Durch Eliminierung von CO kann dieses in das Ion D₂ (M-138) weiter zerfallen:



Für die Ionen C' und C'' lassen sich andere Strukturen, die beispielsweise durch eine thermische Dehydratisierung aus C entstanden sein können, nicht ausschliessen.

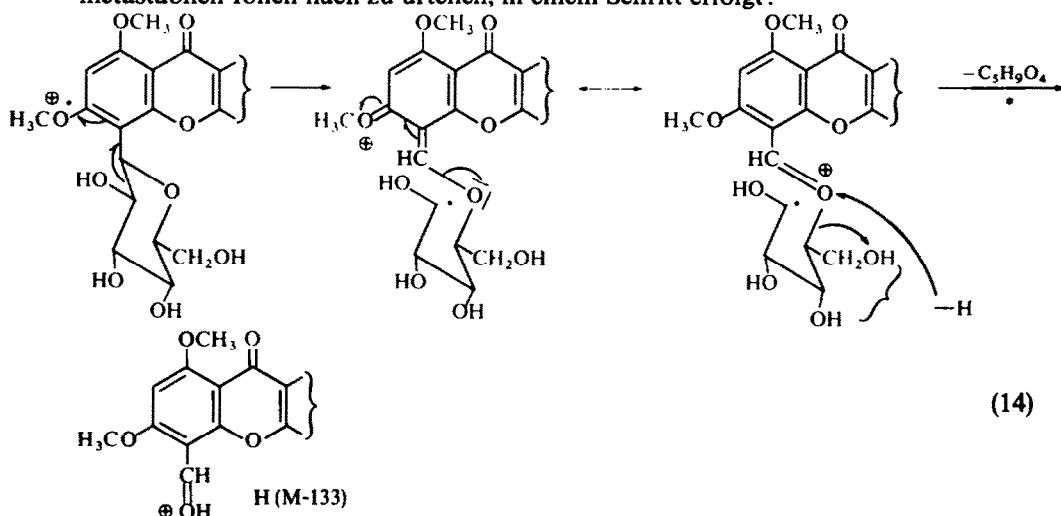
In den Massenspektren der C-8-Glukosylflavone I, II und III wird ein Ion G (M-90) entsprechend einem Verlust von C₃H₆O₃ beobachtet. Man kann annehmen, dass das Ion G₁ (M-108) daraus durch weitere Abspaltung von Wasser, gleichbedeutend einem Verlust von C₃H₈O₄ aus dem M⁺-Ion, gebildet wird. Für die Abspaltung von C₃H₆O₃ kommen die C-Atome 2, 3, 4 (a) oder 4, 5, 6 (b) des Pyranoseringes in Frage, wenn ein derartiges Bruchstück in einem Schritt verloren geht. Ähnliche Ringspaltungen wurden auch bei peracetylierten¹¹ und permethylierten Hexosen⁹ beobachtet. Die vorliegenden Ergebnisse erlauben noch keine Entscheidung zwischen diesen Möglichkeiten:



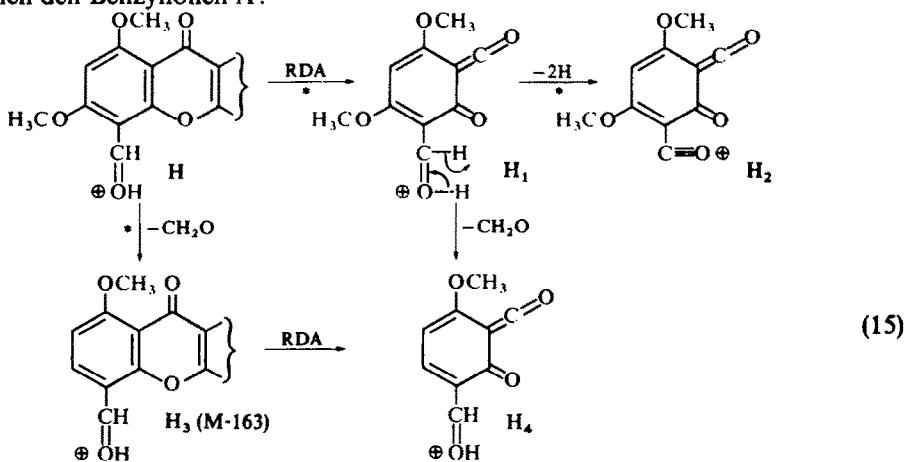
Die beiden untersuchten C-Glukosylverbindungen mit permethyliertem Aglykon IX und X gehören der Reihe der C-8-Glukosylflavone an.* Das Molekularion ist im Gegensatz zu den oben beschriebenen Verbindungen in beiden Fällen Base-Peak im

* Beide Verbindungen waren zu ca. 6% mit einer Komponente verunreinigt, die eine Methylgruppe mehr enthielt.

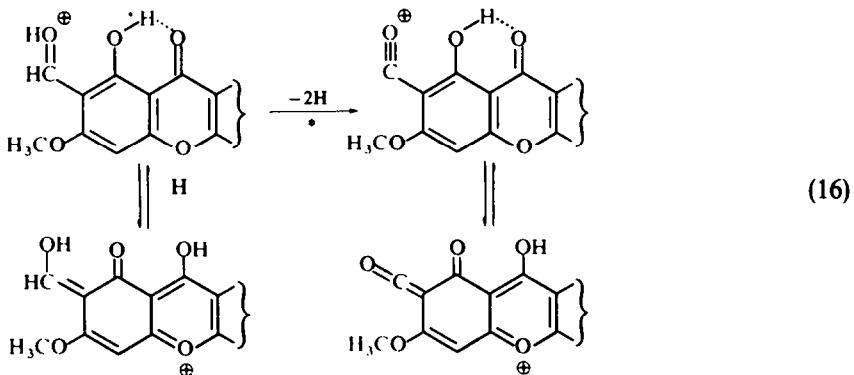
Spektrum. Metastabile Ionen kennzeichnen die Abspaltung eines H-Atoms aus dem M^+ -Ion, die sowohl von einer CO- als auch CH_2O -Eliminierung gefolgt wird. Auch für die simultane Abspaltung von CHO, sowie für den Verlust von H_2O aus dem M^+ -Ion werden metastabile Banden beobachtet. Auf die geringe Intensität der Wasserabspaltung wurde bereits oben hingewiesen. Die sich daraus ableitenden Ionen fehlen in den Massenspektren dieser Derivate. Davon unabhängig werden jedoch einige Zerfälle beobachtet, die diese Verbindungen von den C-Glukosiden freien Hydroxylgruppen im Aglykon deutlich unterscheiden. Der wichtigste Prozess ist die Abspaltung von $C_5H_9O_4$ (133 ME) aus den Molekularionen, die, charakteristischen metastabilen Ionen nach zu urteilen, in einem Schritt erfolgt:



Nach neueren Untersuchungen sollte in dem vorgeschlagenen Mechanismus keine spezifische Wasserstoffumlagerung zu erwarten sein.³⁰ Die Ionen H werden auch in den Massenspektren der Methoxyverbindungen V, VI und XII beobachtet. In den Spektren der C-Glukoside mit freien Hydroxylgruppen im Aglykon treten sie dagegen kaum auf. Die analogen Ionen wurden auch beim Zerfall von Nukleosiden beobachtet.⁶ In ihrem weiteren Zerfall verhalten sich diese Hydroxybenzylionen H ähnlich den Benzylionen A:

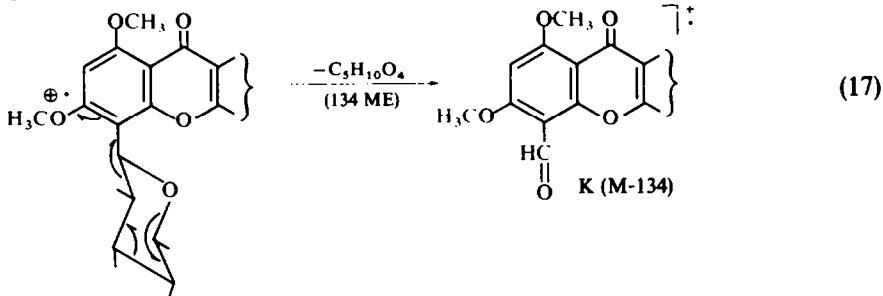


Der Retro-Diels-Alder-Zerfall (RDA) zu den Ionen H_1 wird von entsprechenden metastabilen Ionen gesichert. Im Gegensatz zu den Fragmentionen aus analogen Zerfällen (s.z. B. Gl. 4) erscheinen die Ionen H_1 mit sehr grosser Intensität (zweitintensivstes Ion im Spektrum). Möglicherweise ist die Aufhebung der Tautomerie zwischen der OH-Gruppe in 5-Stellung und der Carbonylgruppe des Flavonrings mit dafür verantwortlich. Eine charakteristische metastabile Bande belegt die Abspaltung von zwei Wasserstoffatomen aus dem Ion H im Spektrum des Swertisins V. Ein entsprechender RDA-Zerfall tritt, wenn, dann nur in wesentlich geringerem Masse ein:



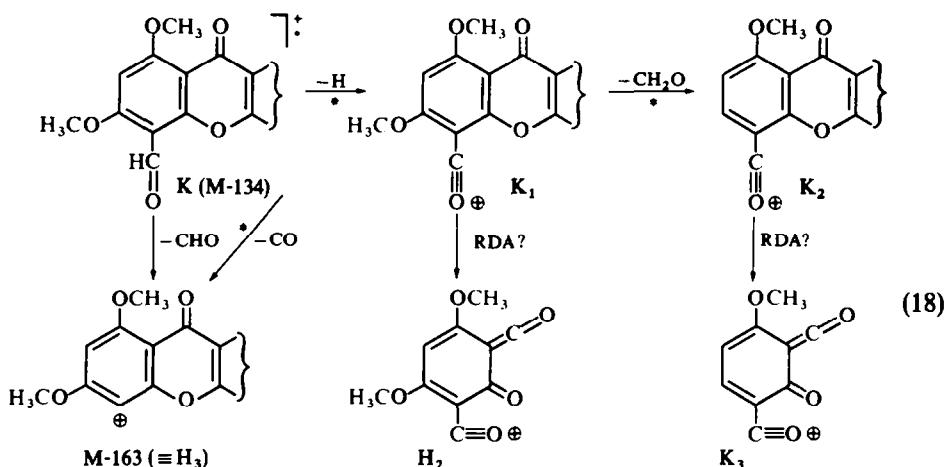
Die beobachtete Eliminierung von zwei Wasserstoffatomen aus den Ionen H_1 (in Gleichung 15) bzw. H im Fall des Swertisins V findet ihre Parallele in der Bildung der $(M-3)$ -Ionen beim Benzylalkohol und den Hydroxybenzylalkoholen.³¹

Neben der in Gleichung 14 beschriebenen Fragmentierung unter Wasserstoffumlagerung findet auch Spaltung zu den entsprechenden "Aldehyd-Ionen" K statt:



Wie anhand metastabiler Ionen nachgewiesen werden kann, entsprechen sie in ihrem Zerfallsverhalten aromatischen Aldehyden.^{32, 33} Nach den verschiedenen Wegen zu urteilen, die zu den Ionen H_3 führen, kommen diesen bei gleicher elementarer Zusammensetzung verschiedene Strukturen zu. Dabei sollte das aus den Ionen K entstandene Spezies keine cyclische Struktur, wie angegeben, besitzen:³³

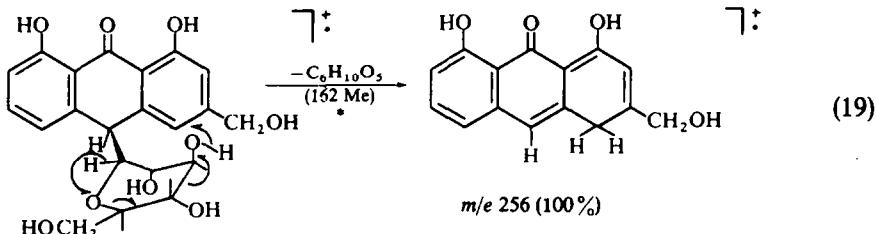
Die Spaltung des Pyranoseringes unter Eliminierung von $C_4H_8O_4$ (120 ME) wurde schon oben beschrieben (s.a. Gl. 2). Die Fragmentionen A ($M-149$) und C_1 ($M-162$), die aus dem weiteren Zerfall der dabei gebildeten Ionen B ($M-120$) hervorgehen (vgl. Gl. 2 und 7), erscheinen in den Massenspektren von IX und X mit charakteristischer Intensität. Gleiches gilt auch für die Ionen A_3 , A_4 und A_5 aus dem Zerfall des Flavonrings. Der weitere Zerfall der Benzylionen A nach einem Retro-Diels-Alder-Prozess führt im Vergleich zu den Verbindungen I–VI auch hier zu intensiveren Ionen.



Dies deckt sich mit den Beobachtungen beim analogen Zerfall der Ionen H im Massenspektrum des Vitexin-O-4',5,7-trimethyläthers IX und des Swertisins V.

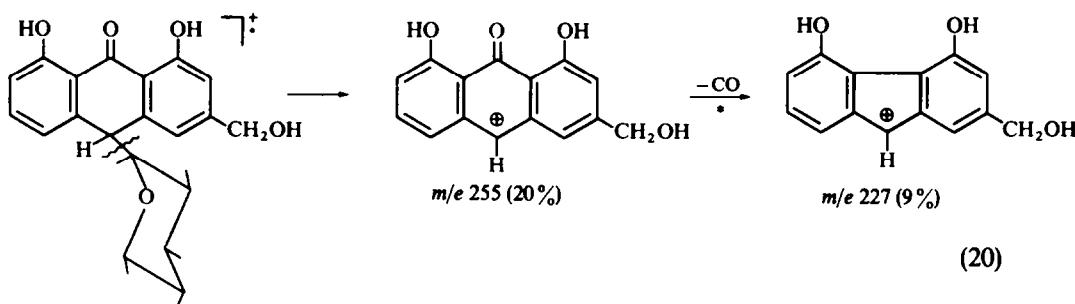
Apigenin-0-7- β -D-glucopyranosid XIII und Luteolin-0-7- β -D-glucopyranosid XIV, die man als O-Isomere der C-Glukosylflavone Vitexin I und Orientin II betrachten kann, verhalten sich massenspektrometrisch völlig anders (s. Abb. 6). Neben einem sehr kleinen Signal für das Molekularion findet man praktisch nur das Massenspektrum des Aglykons. Die Eliminierung der Glukose als $C_6H_{10}O_5$ (162 ME) erfolgt möglicherweise zum Teil schon thermisch. Ein "Abbau" des Zuckers am Aglykon, wie er für die erste Gruppe von C-Glukosylverbindungen charakteristisch ist, wird hier nicht beobachtet. Zur massenspektrometrischen Untersuchung dieser Verbindungen haben sich ihre Acetylderivate als sehr vorteilhaft erwiesen.¹⁴ Der Zerfall von Flavonen ist bereits ausführlich beschrieben worden, so dass auf eine weitere Diskussion der Spektren hier verzichtet werden kann.²⁴

Im Massenspektrum des Aloins VIII (s. Abb. 7) erscheint der Base-Peak ebenfalls bei M-162 entsprechend einer Eliminierung der Glukose als $C_6H_{10}O_5$ unter Wasserstoffumlagerung:

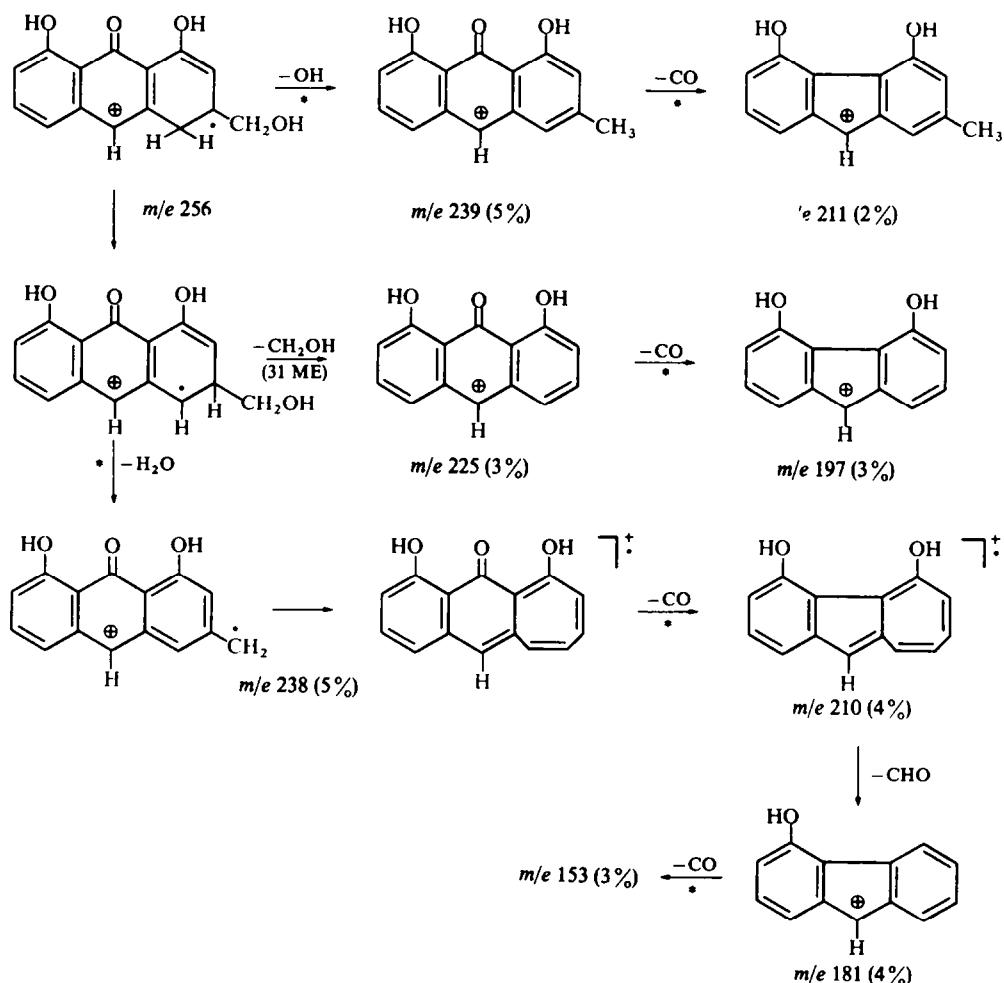


In Analogie zu den Nukleosiden⁶ einerseits und dem β -Phenyläthanol³⁴ bzw. 1-Phenylpropan-1,2-diol³⁵ andererseits kann man auch hierbei Umlagerung eines Hydroxylwasserstoffs vom abgespaltenen Zucker erwarten. Für diesen Zerfall tritt eine schwache metastabile Bande auf. Der weitere Zerfall des "Aglykon-Ions" m/e 256 lässt sich anhand metastabiler Ionen weitgehend verfolgen. Er ist in Schema 1 wiedergegeben. Die dort formulierten Fragmentierungen sollen die Bildung der

beobachteten Ionen nur veranschaulichen. Die einfache Spaltung der glykosidischen C—C-Bindung führt zum Ion m/e 255, das anschliessend CO verliert:

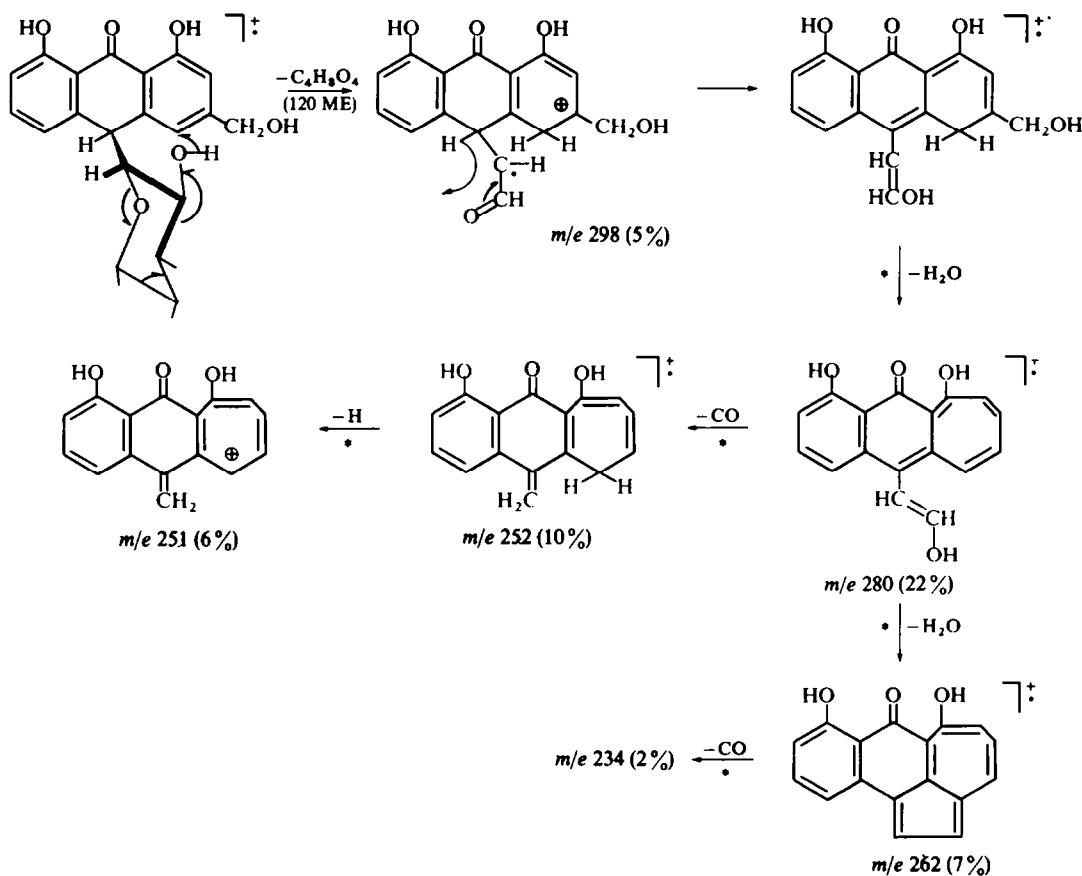


SCHEMA 1



Eine Reihe von intensiven Fragmentionen im Massenspektrum des Aloins VIII lässt sich anhand metastabiler Ionen auf das Ion m/e 298 zurückführen. Seiner elementaren Zusammensetzung nach entsteht letzteres durch Verlust von $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_4$ (120 ME) aus dem Molekularion. In Analogie zur ersten Gruppe von C-Glukosylverbindungen kann man für seine Bildung gleichfalls Spaltung des Pyranoseringes unter Eliminierung seiner C-Atome 3, 4, 5 und 6 annehmen. Diese Fragmentierung könnte durch eine ähnliche Wasserstoffumlagerung, wie sie für die Eliminierung der Glukose unter Bildung von m/e 256 in Gleichung 19 vorgeschlagen wurde, eingeleitet werden. Das dabei gebildete Fragmention m/e 298 kann sich durch Umlagerung eines weiteren Wasserstoffatoms stabilisieren. Wasserabspaltung unter gleichzeitiger Ringerweiterung analog zu dem in Schema 1 vorgeschlagenen Zerfall ergibt das Ion m/e 280. Dies verliert in zwei aufeinander folgenden Schritten CO und Wasserstoff unter Bildung der Ionen m/e 252 und m/e 251. Weitere Wasserabspaltung aus dem Ion m/e 280, möglicherweise unter Ringschluss, führt zum Ion m/e 262, das durch eine anschließende CO-Eliminierung in das Ion m/e 234 weiter zerfällt:

SCHEMA 2



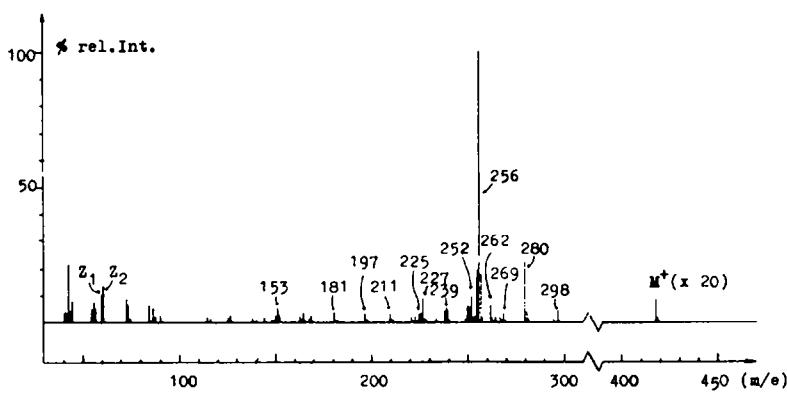


ABB. 7 Massenspektrum des Aloins VIII (70 eV).

Mit etwa gleicher Intensität wie das Ion m/e 298 wird im Massenspektrum des Aloins auch ein Fragmention m/e 269 nachgewiesen, das formal einer Abspaltung von $C_5H_9O_5$ (149 ME) aus dem Molekularion entspricht. Möglicherweise entsteht es durch Abspaltung von CHO aus dem Ion m/e 298 (s. a. Gl. 2). Wie diese Ionen erkennen lassen, zerfällt auch das Aloin unter Fragmentierung des Glukoseringes und unterscheidet sich darin von den oben beschriebenen O-Glukosiden.

Die Annahme einer bevorzugten Lokalisierung der Ladung³⁶ im aromatischen Aglykon erklärt das unterschiedliche Verhalten der untersuchten C-Glukosylverbindungen unter Elektronenbeschuss. Sie lässt beim Aloin VIII in erster Linie den Bruch der Glykosidbindung als benzylische C—C-Spaltung erwarten.³⁷ Analog den in meta-Stellung alkylsubstituierten Phenolen³⁸ erfolgt diese Fragmentierung bevorzugt unter Wasserstoffumlagerung. Im Gegensatz dazu zerfallen die C-Glukoside, bei denen die Glukose Substituent eines aromatischen Rings ist, hauptsächlich unter primärer Fragmentierung des Pyranoseringes. In Abhängigkeit von den weiteren Substituenten des aromatischen Rings entstehen dabei die stabilen Benzyl- bzw. Hydroxybenzylionen des Aglykons (A und H). Eine Spaltung der Glykosidbindung dagegen führt zu den energetisch weniger günstigen Phenylkationen³³ und ist bei den meisten dieser Verbindungen unterdrückt. Soweit aus ihren Massenspektren erkennbar, ist auch die entsprechende Eliminierung der Glukose unter Wasserstoffumlagerung nur auf indirektem Wege, beispielsweise nach einer vorausgegangenen Wasserabspaltung, möglich. Der charakteristische Retro-Diels-Alder-Zerfall der Flavone wird bei ihren C-Glukosiden erst auf der Stufe der Benzyl- bzw. Hydroxybenzylionen, das heißt nach dem Abbau des Zuckers, beobachtet. Die Bildung der weiteren Ionen aus dem Zerfall des Flavonrings A₃, A₄ und A₅ ist dagegen auch aus den Molekularionen denkbar.

Die Massendifferenzen der charakteristischen Ionen im Massenspektrum der C-Glukosylverbindungen zum Molekularion lassen in ihrer elementaren Zusammensetzung sofort auf die Fragmentierung der Glukose schließen. Über den Einfluss der Zuckerstruktur auf diese Zerfälle können keine Aussagen gemacht werden. Im Gegensatz zu den Nukleosiden⁶ werden in den Massenspektren aller hier untersuchter C-Glukosylverbindungen lediglich die Ionen m/e 60 ($C_2H_4O_2$) und m/e 61 ($C_2H_5O_2$) —in den abgebildeten Spektren mit Z₁ und Z₂ bezeichnet— mit nennenswerter

Intensität nachgewiesen. Da diese Fragmentionen beispielsweise in den Massenspektren der O-Methylglykoside sowohl der Pentosen als auch Hexosen in gleicher Weise als intensivste Bruchstücke gefunden werden,³⁹ wird man von Seiten seiner Fragmentionen kaum Informationen über die Struktur des Zuckers erwarten können.

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die C-Glukosylverbindungen im Massenspektrometer bei vorsichtiger Verdampfung über ein Direkteinlasssystem ausgezeichnet analysiert werden können. Aus ihrem Zerfall kann nicht allein auf die Art der glykosidischen Bindung, sondern vielfach auch auf die Verknüpfungsstelle zwischen Zucker und Aglykon geschlossen werden. Ist die Glukose mit einem aromatischen Ring verknüpft, dann wird dieser Zerfall von den zu ihr orthoständigen Substituenten in besonderer Weise beeinflusst. Dies eröffnet häufig die Möglichkeit durch gezielte Derivatisierung, etwa durch O-Methylierung mit Diazomethan,^{22c, 40} die abgeleiteten Strukturmerkmale zu bestätigen und zu sichern. Wie das Beispiel der C-Glukosylflavone zeigt, erhält man bei entsprechendem Zerfall der Aglykonionen weitgehenden Aufschluss über die Struktur dieser Verbindungen mit Hilfe der Massenspektrometrie.

Die verwendeten natürlichen C-Glukosylverbindungen waren mit Ausnahme von Swertiajaponin VI, das noch mit etwas Swertisin V nach dem Massenspektrum verunreinigt war, chromatographisch einheitlich. Die Darstellung von Vitexin-O-4', 5,7-trimethyläther IX und Scoparin-O-4',5,7-trimethyläther X erfolgte nach bekannten Verfahren⁴⁰ mit Hilfe von Diazomethan. Mangiferin-O-1,6,7-trimethyläther XII wurde gleichfalls mit Diazomethan auf dem von Roberts^{22c} beschriebenen Wege dargestellt.

Zur Aufnahme der Massenspektren wurden die Substanzen in Glaskapillaren über einen Direkteinlass in die Ionenquelle eines Massenspektrometers MS 9 eingefahren. Die Ionenquellentemperatur betrug 250°. Bei den thermischen Untersuchungen wurden auch Temperaturen von 280° und 310° angewandt. Es wurden Spektren bei 70 und 20 eV aufgenommen.

Alle im Text und in den Abbildungen erwähnten oder bezeichneten Ionen wurden hochauflösend bei einer Auflösung von 20.000 (10% Taldefinition) gemessen. Die Abweichung von den theoretischen Massenwerten war dabei stets kleiner als 1 mME. Die Berechnung der metastabilen Ionen erfolgte mit Hilfe eines Computerprogramms, das eine Abweichung der berechneten Werte nur von $\pm 0.2\%$ der Masse der eingegebenen metastabilen Ionen zulässt.

Danksagung—Herrn Professor Dr. F. Weygand danke ich sehr herzlich für die freundliche Unterstützung dieser Arbeit. Herrn Professor Dr. H. Wagner vom Institut für pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München gilt mein besonderer Dank für die grosszügige Überlassung der untersuchten Verbindungen. Swertisin und Swertiajaponin wurden dankenswerter Weise von Herrn Dr. M. Komatsu, Research Lab. Taisho Pharmaceut. Co. Ltd., Tokio, Japan, zur Verfügung gestellt. Für ihre geschickte Mitarbeit bei den massenspektrometrischen Untersuchungen danke ich Fräulein I. Schmid.

Dem Leibniz-Rechenzentrum der Bayerischer Akademie der Wissenschaften in München sei für die Überlassung von Rechenzeit freundlich gedankt.

Mein Dank gilt schliesslich dem Bundesministerium für Wissenschaftliche Forschung für eine Sachbeihilfe und der Stiftung Volkswagenwerk für das Massenspektrometer MS 9.

LITERATUR

¹ K. Biemann in L. Zechmeister, *Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe* Bd. 24, S. 4. Springer Verlag, Wien (1966).

- ² J. F. Klebe, H. Finkbeiner und D. M. White, *J. Am. Chem. Soc.* **88**, 3390 (1966).
³ B. T. Golding, R. W. Rickards und M. Barber, *Tetrahedron Letters* 2615 (1964).
⁴ G. Spiteller, *Z. Analyt. Chem.* **197**, 1 (1963).
⁵ M. v. Ardenne, R. Tümmler, E. Weiss und T. Reichstein, *Helv. Chim. Acta* **47**, 1032 (1964).
⁶ K. Biemann und J. A. McCloskey, *J. Am. Chem. Soc.* **84**, 2005 (1962).
⁷ S. Hanessian, D. C. DeJongh und J. A. McCloskey, *Biochem. Biophys. Acta* **117**, 480 (1966).
⁸ N. K. Kotchetkov, N. S. Wulfson, O. S. Chizhov und B. M. Zolotarev, *Tetrahedron* **19**, 2209 (1963).
⁹ H. Budzikiewicz, C. Djerassi und D. H. Williams, *Structure Elucidation of Natural Products* Vol. II; S. 222. Holden Day, San Francisco (1964).
¹⁰ R. I. Reed, W. H. Reid und J. M. Wilson, *Advances in Mass Spectrometry* (Edited by R. M. Elliott) S. 420. Pergamon Press, Oxford (1963).
¹¹ K. Biemann, D. C. DeJongh und H. K. Schnoes, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1763 (1963).
¹² D. C. DeJongh und K. Biemann, *Ibid.*, **85**, 2289 (1963).
¹³ T. C. Smale und E. S. Waight, *Chem. Commun.* 680 (1966).
¹⁴ I. A. Pearl und S. F. Darling, *Tetrahedron Letters* 1869 (1967).
¹⁵ H. Wagner, *Comparative Biochemistry: Flavanoid C-Glukosides* (Edited by T. Swain) S. 309. Pergamon Press, Oxford (1966).
¹⁶ ^a L. J. Haynes, *Adv. Carbohydrate Chem.* **18**, 227 (1963);
^b *Ibid.* **22**, 357 (1967).
¹⁷ R. M. Horowitz und B. Gentili, *Chem. & Ind.* 498 (1964).
¹⁸ T. R. Seshadri, *The Chemistry of Flavanoid Compounds* (Edited S. T. A. Geissman) S. 184. Pergamon Press, Oxford (1962).
¹⁹ B. H. Koeppen, *Z. Naturforschung* **19b**, 173 (1964);
Phytochem. **4**, 639 (1965).
²⁰ L. Hörhammer, H. Wagner, L. Rosprim, T. Mabry und H. Rösler, *Tetrahedron Letters*, 1707 (1965).
²¹ M. Komatsu und T. Tomimori, *Ibid.* 1611 (1966).
²² ^a Zitat 16b, S.360;
^b V. K. Bhatia, J. D. Ramanathan und T. R. Seshadri, *Tetrahedron* **23**, 1363 (1967);
^c P. E. Nott und J. C. Roberts, *Phytochem.* **6**, 741 (1967).
²³ H. Mühlmann, *Pharm. Acta Helv.* **27**, 17 (1952).
²⁴ H. Audier, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 2892 (1966).
²⁵ ^a R. I. Reed und J. M. Wilson, *J. Chem. Soc.*, 5949 (1963).
^b C. J. Bannes und J. L. Occolowitz, *Austral. J. Chem.* **17**, 975 (1964).
²⁶ J. H. Bowie, D. H. Cameron und D. H. Williams, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 5094 (1965).
²⁷ D. Becher, C. Djerassi, R. E. Moore, H. Singh und P. J. Scheuer, *J. Org. Chem.* **31**, 3650 (1966).
²⁸ C. G. McDonald, J. S. Shannon und G. Sugowdz, *Tetrahedron Letters* 807 (1963).
²⁹ H. Budzikiewicz, Z. Pelah und C. Djerassi, *Monatsh.* **95**, 158 (1964).
³⁰ C. Djerassi und C. Fenselau, *J. Am. Chem. Soc.* **87**, 5747 (1965).
³¹ J. S. Shannon, *Austral. J. Chem.* **15**, 265 (1962).
³² J. D. McCollum, und S. Meyerson, *J. Am. Chem. Soc.* **85**, 1739 (1963).
³³ P. Natalis und J. L. Franklin, *J. Phys. Chem.* **69**, 2943 (1965).
³⁴ J. A. Gilpin, *J. Chem. Phys.* **28**, 521 (1958).
³⁵ H. Audier, J. F. Dupin und J. Jullien, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 2811 (1966).
³⁶ H. Budzikiewicz, C. Djerassi und D. H. Williams, *Mass Spectrometry of Organic Compounds*, S. 9. Holden Day, San Francisco (1967).
³⁷ H. M. Grubb und S. Meyerson, *Mass Spectrometry of Organic Ions* (Edited by F. W. McLafferty) S. 453. Academic Press, New York (1963).
³⁸ J. L. Occolowitz, *Anal. Chem.* **36**, 2177 (1964).
³⁹ K. Heyns, H. F. Grützmacher, H. Scharmann und D. Müller, *Fortschritte d. Chem. Forschg.* **5**, 453 (1966).
⁴⁰ B. H. Koeppen, C. J. B. Smith und D. G. Roux, *Biochem. J.* **83**, 507 (1962).