

Ionilähteessä syntyvien ionisuhteiden hyödyntäminen flavonoliglykosidien karakterisoinnissa ja kvantitoinnissa

Tiia Myllymäki
Pro gradu -tutkielma
Luonnonyhdistekemia
Kemian laitos
Turun yliopisto
Helmikuu 2025

TURUN YLIOPISTO

Kemian laitos

MYLLYMÄKI TIIA: Ionilähteessä syntyvien ionisuhteiden hyödyntäminen flavonoliglykosidien karakterisoinnissa ja kvantitoinnissa

Pro gradu -tutkielma, 64 s., 4 liitettä

Kemia

Helmikuu 2025

Turun yliopiston laatu järjestelmän mukaisesti tämän julkaisun alkuperäisyys on tarkastettu Turnitin Originality Check -järjestelmällä.

Flavonolit ovat kasvien erikoistuneita metaboliitteja, joiden on esimerkiksi antioksidanttiaktiivisuutensa vuoksi todettu olevan ihmisen terveydelle hyödyllinen luonnonyhdisteiden ryhmä. Analyysimenetelmistä erityisesti nestekromatografi-massaspektrometriset (LC-MS) menetelmät ovat osoittautuneet tehokkaiksi välineiksi näiden yhdisteiden tutkimisessa. On huomattu, että flavonolit tuottavat massaspektrometrin ionilähteessä fragmentoituttuaan aglykoni-ioneja sekä aglykoniradikaali-ioneja, kun käytetään negatiivista ionisaatiota. Glykosylaation kohdan ja tyyppin on osoitettu vaikuttavan näiden ionien muodostumiseen, mikä viittaa siihen, että aglykoni-ionien ja aglykoniradikaali-ionien välistä suhdetta voitaisiin käyttää työkaluna yhdisteen rakenteen selvittämiseen. Ionilähteen ja ioninohjaimen välisten asetusten, kuten kartiojännitteen vaikutusta näihin ionisuhteisiin ei kuitenkaan ole vielä täysin tutkittu.

Tutkimuksessa selvitettiin yhdisteiden rakenteesta johtuvia syitä aglykoni-ionien ja aglykoniradikaali-ionien muodostumiseen. Haluttiin tutkia kartiojännitteen vaikutusta flavonoliglykosidien ionisuhteisiin kolmoiskvadrupolimassaspektrometrillä, sekä yhdisteen rakenteen vaikutusta siihen, kuinka aglykoni-, aglykoniradikaali-ioni ja hapettunut aglykoni-ioni fragmentoituvat. Työssä pyrittiin selvittämään, miten pitoisuus vaikuttaa aglykoni- ja aglykoniradikaalien väliseen suhteeseen sekä tarkasteltiin laskennallisen mallin avulla sitä, kuinka kasviuutteissa esiintyvien yhdisteiden vasteet vaikuttavat syntyviin ionisuhteisiin.

Tutkimus osoitti, että rakenteen lisäksi kartiojännite vaikuttaa merkittävästi syntyneisiin ionisuhteisiin. Tutkimus antoi lupaavia tuloksia ionisuhteiden hyödyntämisestä kasviuutteiden karakterisointiin yhdisteryhmätasolla. Tutkimustulosten avulla voidaan yhdisteryhmäspesifistä MRM-analytiikkaa hyödyntää kasveissa esiintyvien yhdisteiden rakenteen tutkimiseen.

Asiasanat: flavonoli, massaspektrometri, ionilähde, MRM-menetelmä, ionisuhde, aglykoni-ioni, aglykoniradikaali-ioni

Sisällysluettelo

1	Johdanto.....	1
1.1	Flavonolit ja niiden rakenne.....	1
1.2	LC-MS-menetelmät flavonolien analytiikassa.....	2
1.3	Sähkösumutusionisaatio.....	4
1.4	Flavonoliglykosidien fragmentoituminen massaspektrometrilla.....	6
1.5	Yhdisteryhmäspesifiset MRM-menetelmät.....	7
1.6	Työn tarkoitus.....	8
2	Materiaalit ja menetelmät.....	9
2.1	Käytetyt reagenssit ja liuottimet.....	9
2.2	Näytteet ja näytteenkäsittely.....	9
2.3	Käytetyt menetelmät.....	18
2.3.1	UPLC-MS/MS.....	18
2.3.2	UPLC-DAD.....	20
2.4	Ionisuhteiden mittaaminen.....	20
2.5	Liukoisuustestit.....	22
2.6	Pitoisuuden vaikutus ionisuhteisiin.....	22
3	Tulokset ja niiden käsittely.....	24
3.1	Ionisuhteet.....	24
3.2	Aglykoni-ionien fragmentoituminen.....	32
3.3	Liukoisuus.....	43
3.4	Pitoisuuden vaikutus ionisuhteisiin.....	45
3.5	Syntyvien ionisuhteiden laskennallinen mallinnus.....	54
4	Yhteenveto ja johtopäätökset.....	55
5	Viiteluettelo.....	58
	Liitteet.....	65

LYHENTEET

CE	collision energy törmäysenergia
CID	collision induced dissociation törmäysindusoidissosiaatio
CV	cone voltage kartiojännite
DAD	diode array detector diodirividetektor
DBE	double bond equivalent kaksoissidosekvivalentti
ESI	electrospray ionization sähkösumutusionisaatio
HR-MS	high-resolution mass spectrometry korkean resolution massaspektrometria
ISF	in-source fragmentation ionilähteessä fragmentoituminen
LC	liquid chromatography nestekromatografia
MS	mass spectrometry massaspektrometria
MS/MS	tandemmassspectrometry tandemmassaspektropetria
MRM	multiple reaction monitoring usean reaction seuranta
NMR	nuclear magnetic resonance ydinmagneettinen resonanssi
PRM	parallel reaction monitoring rinnakkaisten reaktioiden seuranta
RDA	retro-Diels-Alder
RP	reverse phase käänteisfaasi

U(H)PLC

ultra high-performance liquid chromatography
erittäin korkean erotuskyvyn nestekromatografia

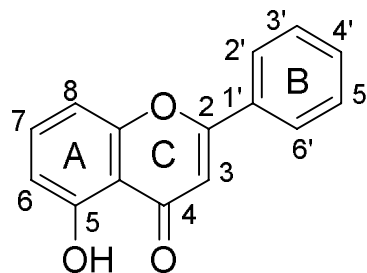
UV

ultraviolet
ultravioletti

1 Johdanto

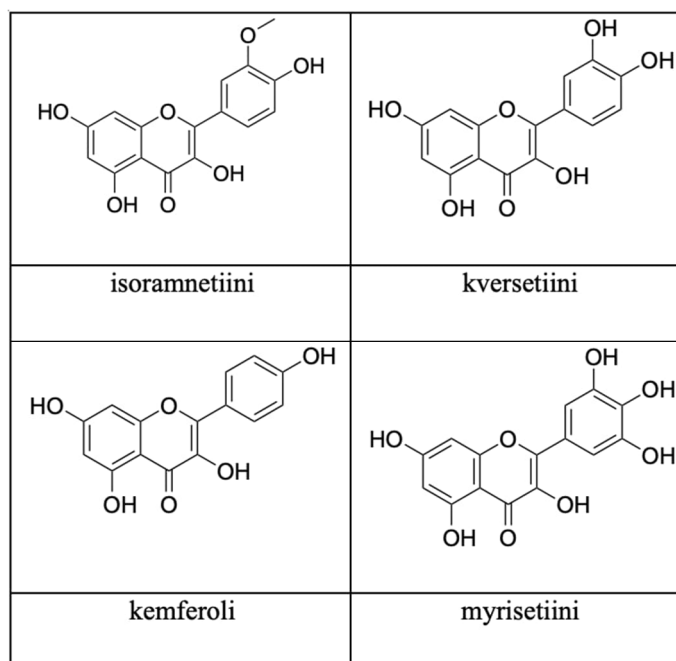
1.1 Flavonolit ja niiden rakenne

Flavonolit ovat luonnossa esiintyviä polyfenolisia yhdisteitä, jotka kuuluvat flavonoidien pääryhmään. Ne ovat kasvien erikoistuneita metaboliitteja, joilla on useita tehtäviä. Näihin tehtäviin kuuluu muun muassa kasvin suojaaminen ultraviolettisäteilyltä ja oksidatiivisilta vaurioilta sekä kasvien pigmentoinnin tukeminen.^{1,2} Flavonolit ovat tieteelle kiinnostava luonnonyhdisteiden ryhmä niiden antioksidanttisten ominaisuuksien ansiosta, joiden on todettu olevan myös ihmisen terveydelle hyödyllisiä.³ Flavonoleille tunnusomaista on C6-C3-C6 hiilirunko, jossa kaksi bentseenirengasta (A ja B) ovat yhdistetty toisiinsa heterosyklisellä pyraanirenkaalla (C).^{4,5} Flavonolien runko on 3-hydroksiflavoni (kuva 1.), johon on kiinnittynyt useita hydroksyyliiryhmiä (-OH) renkaiden eri kohtiin.⁶ Hydroksyyliiryhmien vaihteleva määrä ja liittymiskohta luo laajan joukon rakenteellisesti erilaisia biologisesti aktiivisia yhdisteitä.^{5,6}



Kuva 1. 3-hydroksiflavoni.

Flavonoleja esiintyy kahdessa muodossa: aglykoneina ja glykosideina. Yleisimpiä flavonoliaglykoneja ovat isoramnetiini, kversetiini, kemferoli ja myrisetiini (kuva 2.).⁷



Kuva 2. Yleisimmät flavonoliaglykonit.⁸

Glykosideissa aglykoniin on liittynyt yksi tai useampi sokeri, joista yleisimpiä ovat glukoosi, galaktoosi ja ramnoosi.⁹ Glykosylaatio on voinut tapahtua hiilestä (*C*-glykosidit) tai hydroksyyli ryhmästä (*O*-glykosidit).¹⁰ Yleisimmin flavonolit esiintyvät 3-*O*- tai 7-*O*-glykosideina, jolloin glykosylaatio on tapahtunut *C*-7 tai *C*-3 asemassa olevasta hydroksyyli ryhmästä.^{10,11}

Hydroksyyli ryhmien ja erilaisten sokereiden lisäksi flavonolien rakenne voi sisältää metyyli ryhmiä. Yksi tai useampi flavonolin hydroksyyli ryhmä voi metyloitua muodostaen metyylieettereitä.¹² Metyloituneet rakenteet vähentävät flavonolien reaktiivisuutta ja vesiliukoisuutta sekä vaikuttavat niiden biologiseen aktiivisuuteen.^{12,13} Esimerkiksi aiemmin mainittu yleisimpiin flavonoliaglykoneihin kuuluva isoramnetiini on kversetiinin 3'-metyloitunut muoto.¹⁴

1.2 LC-MS-menetelmät flavonolien analytiikassa

Flavonoliglykosidien rakenteellinen monipuolisuus luo omat haasteensa niiden analysoimiseen, jonka vuoksi tutkimukseen tarvitaan edistyneitä menetelmiä. Flavonoliglykosidien tutkimiseen soveltuvia menetelmiä on esimerkiksi HPLC-UV, perustuen yhdisteiden erotteluun niiden rasvaliukoisuuden mukaan sekä havaitsemiseen aglykoniosien valon absorptio-ominaisuuksien ansiosta.¹³ Tämä menetelmä ei kuitenkaan anna tietoa yhdisteen tarkasta rakenteesta tai substituenteista, sillä esimerkiksi sokerit ovat huonoja kromoforeja.¹⁵ NMR-spektroskopian avulla voidaan saada hyvinkin tarkkaa tietoa flavonoliglykosidien rakenteista, mutta menetelmä tarvitsee

suhteellisen paljon puhdasta näytettä eikä sen herkkyys riitä pienten pitoisuuksien havaitsemiseen monimutkaisista kasviuutteista.¹⁶

Flavonoliglykosidien rakenteiden tutkimiseen käytetyistä analyysimenetelmistä nestekromatografia-massaspektrometriset (LC-MS) menetelmät ovat yleisiä. Ne mahdollistavat yhdisteiden erottelun ensin toisistaan nestekromatografilla perustuen niiden kokoon ja polariteettiin, jonka jälkeen massaspektrometrilta saadun datan perusteella yhdisteet pystytään tunnistamaan tai niiden rakennetta tutkia tehokkaasti. LC-MS-menetelmät ovat erityisen hyödyllisiä monimutkaisten flavonoliseoksien analysoimisessa luonnonyhdisteistä, koska ne mahdollistavat erilaisia sokeri- ja hydroksyyliiryhmiä sisältävien glykosidien erottamisen toisistaan.¹⁷

Flavonolien LC-MS-analytiikassa käytetään yleensä käänteisfaasikromatografiaa.¹⁸ Käänteisfaasikromatografiassa käytetään tyypillisesti poolitonta kiinteää faasia ja poolista liikkuvaa faasia.^{18,19} Käänteisfaasikolonne sisältää usein silikapartikkeleja, joihin on liitetty kovalenttisesti eri mittaisia hiilivetyketjuja.¹⁹ Flavonolit ovat kohtalaisen poolisia yhdisteitä. Aglykonit ovat vähemmän poolisia, jolloin ne pidättyvät kolonnissa hyvin. Sokerit lisäävät flavonolien vesiliukoisuutta, jolloin yhdisteet eluotuvat liukoisuusominaisuuksiensa mukaan.²⁰ Käänteisfaasikromatografiassa liikkuvina faaseina käytetään vettä sekä vähemmän poolista liuotinta kuten asetonitriiliä. Nämä liuottimet ovat myös hyvin yhteensopivia sähkösumutus-ionisaation (ESI) kanssa, jolloin kaasufaasissa olevat ionit pääsee saumattomasti siirtymään nestekromatografilta massa-analyysiin.²¹

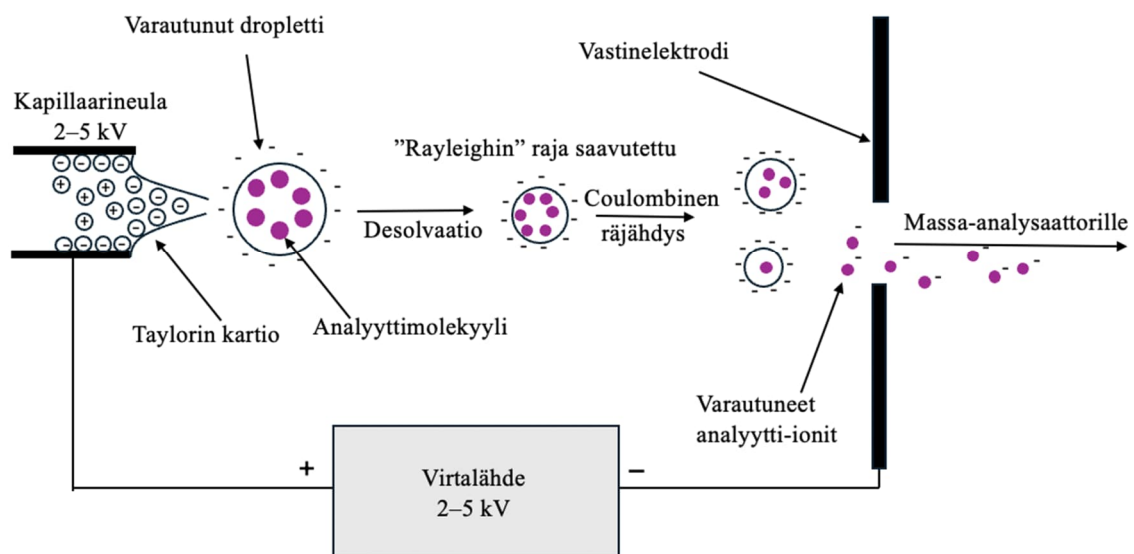
Flavonoliglykosidien massa-analyyseissa voidaan käyttää negatiivista tai positiivista ionisaatiota. Negatiivisessa ionisaatiossa anionit syntyvät, kun yhdiste deprotonoituu luovuttaessaan vetyionin. Tämä on toimiva ionisaatiotapa happamille yhdisteille, joissa on paljon hydroksyyli- tai fenoliryhmiä, kuten flavonoleissa.²² Nämä funktionaaliset ryhmät deprotonoituvat helposti muodostaen vahvoja ja vakaita $[M-H]^-$ ioneja.^{22,23} Massaspektrometri erottelee syntyneet ionit toisistaan massa-varaussuhteiden (m/z) perusteella. Negatiivinen ionisaatio tuottaa usein yksinkertaisemman fragmentoitumisen verrattuna positiiviseen ionisaatioon, jolloin spektrien tulkitseminen ja yhdisteiden rakenteiden tunnistaminen on helpompaa, kun voidaan keskittyä yhdisteen pääfragmentteihin.^{23,24}

Erityisesti tandemmassaspektrometriset (MS/MS) -menetelmät yhdistettynä sähkösumutus-ionisaatioon (ESI) ovat osoittautuneet tehokkaiksi välineiksi flavonoliglykosidien tutkimisessa ja karakterisoinnissa.²⁵ Tandemmassaspektrometrisissa menetelmissä kaksi peräkkäistä massa-analyysia antavat tarkemman kuvan monimutkaisista yhdisteistä. Valittu ioni voidaan eristää ensimmäisellä massa-analysointivaiheella ja pilkkoa törmäyskammiossa yhä pienemmiksi fragmenteiksi,

jotka analysoidaan toisella massa-analyysaattorilla.^{25,26} MS/MS-menetelmä on spesifinen ja herkkä, jolloin yhdisteiden karakterisointi helpottuu.²⁷

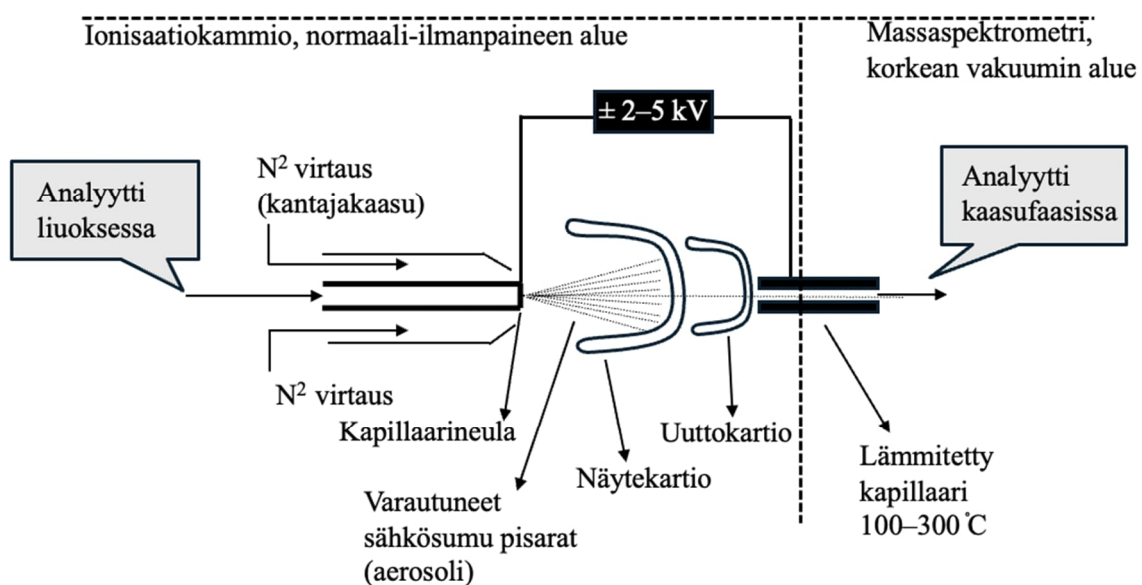
1.3 Sähkösumutusionisaatio

Sähkösumutusionisaatiossa analyyyttiä sisältävä liuotin kuljetetaan suihkekapillaarin läpi, jonka jännite on noin 2–5 kV.^{28,29} Ionilähteen voimakas sähkökenttä aiheuttaa varautuneiden ionien siirtymisen liuotinsumun pinnalle, jolloin pinnan ollessa varautunut sen virtausnopeus kasvaa suuremmaksi kuin virtaus liuotinsumun sisällä. Tästä seuraa liuotinsumun kapeneminen ja niin kutsutun Taylor-kartion muodostuminen.³⁰ Kun sumu kaventuu, sen sisäiset hylkimisvoimat kasvavat, mikä aiheuttaa liuotinsumun hajoamisen hyvin pieniksi pisaroiksi. Pisarat desolvatoituvat kuivauskaasun vaikutuksesta, kun ne kulkevat ilmanpainealueen läpi kohti vastinelektrodi.^{30,31} Kun liuotin haihtuu varautuneen pisaran pinnalta sen varaustiheys kasvaa. Sähköstaattinen repulsio kasvaa samalla, kun varaustiheys kasvaa. Pisara hajoaa yhä pienemmäksi, kun sähköstaattinen repulsio ylittää konservatiiviset voimat.²⁹ Prosessia toistetaan niin pitkään, kunnes pisaran pinnalla oleva varaustiheys on niin suuri, että pisara alkaa emittoida kaasufaasi-ioneja.²⁸ Ilmanpaineionilähteeltä kaasufaasissa olevat ionit kerätään massa-analyysaattorille. Keräämiseen käytetään kartiota ja linssijä.³⁰ Kartion ja linssien välistä kulkee verhokaasu, joka on usein lämmitettyä typpikaasua. Kun kaasufaasissa olevat klusteri-ionit törmäävät typpikaasuun, ainoastaan ioni fokusoidaan massa-analyysaattorille, koska heikoilla sähköstaattisilla voimilla kiinnitetyt liuotinmolekyylit usein lohkeavat. Klusteri-ioneja - näytteen itsensä kanssa muodostuneita - voi myös esiintyä, eivätkä ne aina hajoa täysin.^{30,31}



Kuva 3. Sähkösumutusionisaation toimintaperiaate.²⁸

Sähkösumutusionisaatio on niin kutsuttu pehmeä ionisaatiotekniikka, joka tuottaa pääsosan molekyyli-ioneja eikä juurikaan fragmentoi niitä.³² Ionisaatiotekniikan tapa tuottaa vähäinen määrä karakteristisia fragmentteja on tarkoituksenmukaista tilanteissa, joissa halutaan säilyttää analysoitavan molekyylin rakenne ehjänä. Kuitenkin, koska tekniikka tuottaa vain vähän karakteristisia fragmentteja täytyy sen käyttöä tehostaa eri tavoin esimerkiksi rakenneanalyysissä.³¹ Esimerkiksi kolmoiskvadrupolimassaspektrometrillä sähkösumutus rajapinta-alueella voidaan säätää kartiojännitettä (CV). Kartiojännite on potentiaaliero näyte- ja uuttokartion välillä, jotka sijaitsevat massaspektrometrin ionilähteessä (Kuva 4). Tämä jännite säätelee ionien liikettä, kun ne siirtyvät normaalipaineisesta ionisaatioalueesta massa-analysaattorin vakuumpaineeseen.³³ Kartiojännite lisää ionien sisäistä energiaa, joka edistää ionin siirtymistä vakuumialueelle ja samalla saattaa edistää fragmentaatiota jo ionilähteessä ennen massa-analysaattoria ja törmäyskammiota.³⁴



Kuva 4. Analyytin kulkeutuminen ionisaatiokammioista normaali-ilmanpaineen alueen läpi massaspektrometrin vakuumialueelle.³²

Yhdisteen fragmentoiminen ionilähteessä (ISF) on hyödyllinen tapa, kun yhdisteestä halutaan saada aikaan sille tunnusomaiset fragmentit, jotka voidaan ohjata eteenpäin ensimmäiselle massa-analysaattorille. Näitä tunnusomaisia fragmentteja voidaan pilkkoa yhä pienemmiksi fragmentti-ioneiksi törmäysindusoidulla dissosiaatiolla (CID) esimerkiksi kolmoiskvadrupolimassaspektrometrin törmäyskammiossa. Kun ionit törmäyvät kaasuhiukkasiin törmäyskammiossa ne saavat lisää energiaa ja hajoavat edelleen pienemmiksi ja tuottavat yhdisteelle karakteristisia fragmentteja. Dissosiaation tasoa voidaan kontrolloida säätämällä törmäyskammiossa olevaa törmäysenergiaa (CE).^{30,35}

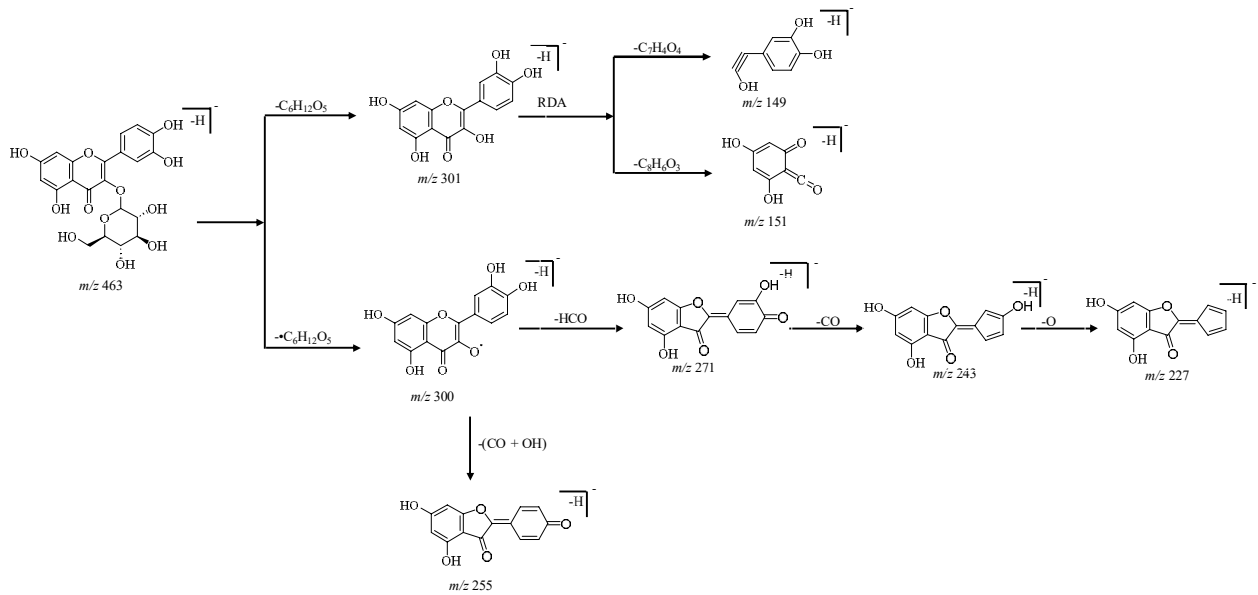
1.4 Flavonoliglykosidien fragmentoituminen massaspektrometrilla

Flavonolien fragmentoituminen massaspektrometrilla antaa arvokasta tietoa yhdisteen rakenteesta, joka mahdollistaa flavonoliglykosidien tarkemman karakterisoinnin. Fragmentaation seurauksena spektrissä havaittavat m/z -arvot antavat tarkkaa tietoa yhdisteen aglykonin rakenteesta ja siihen liittyneiden substituenttien kuten sokerien tyypistä sekä liittymiskohdista.^{23, 25}

Flavonoliglykosidien *O*-glykosididisidokset katkeavat herkästi, jolloin spektristä voidaan havaita aglykoni-ioni sekä päätellä irronneen sokerin tyyppi molekyyli-ionin ja aglykoni-ionin m/z -arvojen erotuksesta. *C*-glykosididisidokset ovat vakaampia ja tarvitsevat katketakseen enemmän energiaa. Tämän vuoksi *C*-glykosidien fragmentaatioissa aglykoniin kiinnittyneestä sokerista lohkeaa osa, mutta loppuosa pysyy kiinni.³⁶ Aglykonissa olevat metyyliiryhmät irtoavat helposti, jolloin spektristä havaitaan $[M-H-CH_3]^-$ -ioni.³⁷ Aglykonin fragmentoituessa siitä lohkeaa osa, esimerkiksi CO tai H₂O tai se voi noudattaa Retro-Diels-Alder (RDA) -fragmentaatiota.³⁸

RDA on yleinen fragmentoitumistapa fenolisilla yhdisteillä, kuten flavonoleilla. Fragmentoitumisen tuottamat selkeät yhdisteelle tyypilliset fragmentaatiokaavat tekevät yhdisteen aglykonirakenteen tunnistamisesta helppoa. Fragmentaatio tapahtuu flavonoleilla C-renkaan hiilihiili kaksoissidoksesta, hajottaen rakenteen kahteen osaan muodostaen karakteriset fragmentit A- ja B-renkaille.³⁹

Esimerkiksi kversetiini-3-*O*-glukosidin fragmentoituessa (Kuva 5) ensimmäisenä *O*-glykosididisidos katkeaa. Sidoksen katkeaminen tuottaa deprotonoituneen aglykoni-ionin m/z -arvolla 301 sekä deprotonoituneen aglykoniradikaali-ionin m/z -arvolla 300. Aglykonin fragmentoituminen voi tapahtua noudattaen RDA-fragmentaation periaatteita tai se voi fragmentoitua C-renkaan 3- tai 4- asemassa olevan hiilen kohdalta. *O*-glykosidit tuottavat helposti tunnistettavia ja selkeitä aglykonifragmentteja.⁴⁰



Kuva 5. Kversetiini-3-*O*-glukosidin fragmentaatiokaavio negatiivisella ionisaatiolla.⁴⁰

On huomattu, että flavonoliglykosidien kyky tuottaa fragmentoiduttuaan aglykoni-onia ja aglykoniradikaali-onia on liitännäinen yhdisteen rakenteeseen.⁴¹ B-renkaan hydroksyyli-substitutioiden määrän, sokerin tyypin ja liittymiskohdan tiedetään vaikuttavan merkittävästi siihen, kumpaa aglykoni-onia yhdiste tuottaa enemmän.^{41, 42} Aglykoniradikaali-onia havaitaan *O*-glykosideilla, kun glykosidisidos katkeaa. On todettu, että 3-*O*-glykosidit tuottavat herkemmin aglykoniradikaali-onia, kun taas 7-*O*-glykosidit aglykoni-onia. Vertailemalla syntyneiden aglykoni-ionien suhteita on ajateltu saatavan selvyyttä yhdisteen rakenteesta ja sokerien liittymiskohdasta.⁴³

1.5 Yhdisteryhmäspesifiset MRM-menetelmät

Yhdisteryhmäspesifinen MRM-menetelmä on tehokas työkalu tunnistamaan haluttuja yhdisteryhmiä niiden tunnusomaisten fragmenttien avulla.⁴⁴ Kolmoiskvadrupolimassaspektrometrillä MRM-menetelmä hyödyntää kartiojännitettä ja törmäysenergiaa sopivien ionien akkumuloimiseksi.⁴³ Säättämällä kartiojännitettä tuotetaan yhdisteryhmäspesifistä ionia ennen ensimmäistä kvadrupolia, joka kuljettaa ainoastaan valitun ionin törmäyskammioon. Törmäysenergiaa säättämällä akkumuloidaan yhdisteryhmäspesifisestä ionista syntyvää spesifiä fragmenttia, joka kulkee toisen kvadrupolin läpi detektorille muiden ionien suodattuessa pois. Tällä tavalla kartiojännitettä ja törmäysenergiaa optimoimalla saadaan luotua selektiivinen ja herkkä menetelmä tietyille yhdisteryhmälle.^{43,45}

Yhdisteryhmäspesifisen MRM-menetelmän avulla voidaan nopeasti tunnistaa monimutkaisista kasvinäytteistä esimerkiksi niiden sisältämät kemferoli-, kversetiini- ja myrisetiini johdannaiset. Koska menetelmät seuraavat aglykoni- ja aglykoniradikaali-ionien fragmentoitumista, voidaan pitää mahdollisena MRM-menetelmien antavan tietoa myös yhdisteen rakenteesta ja esimerkiksi sokerien liittymiskohdista, kun verrataan syntyneiden ionien suhdetta toisiinsa.^{43,46-47} Jos menetelmää halutaan hyödyntää yhdisteen rakenteellisten ominaisuuksien selvittämiseen, täytyy ottaa huomioon, että se on kehitetty yleispäteväksi yhdisteryhmälle eikä yksittäisille yhdisteille. Menetelmä on kehitetty valitsemalla yhdisteryhmälle sopivimmat parametrit aglykoni- ja aglykoniradikaali-ionien muodostamiseksi. Vielä ei kuitenkaan ole selvää, kuinka merkittävästi kartiojännite vaikuttaa näiden ionien suhteeseen yksittäisillä yhdisteillä ja voiko menetelmän antamia ionisuhteita pitää luotettavana työkaluna yhdisteen rakenteen arvioimiseen.

1.6 Työn tarkoitus

Flavonoliglykosidit ovat kasveissa esiintyviä bioaktiivisia yhdisteitä, joita tutkitaan yleisesti LC-MS-menetelmillä. Negatiivista ionisaatiota käytettäessä yhdisteet tuottavat aglykoni-onia ja aglykoniradikaali-onia, kun ne fragmentoituvat. Aiemmat tutkimukset ovat osoittaneet, että sokerin tyyppi sekä kiinnittymiskohta vaikuttavat kyseisten ionien muodostumiseen, mikä tekee ionien välisestä suhteesta mahdollisesti hyödyllisen työkalun yhdisteen rakenteen karakterisoinnin kannalta. Engström et al. on kehittänyt yhdisteryhmäspesifisiä MRM-menetelmiä, joiden toiminta perustuu tunnusomaisten fragmenttien seuraamiseen flavonolijohdannaisissa.⁴³ Nämä yhdisteryhmäspesifiset menetelmät seuraavat selektiivisesti aglykoni- ja aglykoniradikaali-ioneista syntyneitä fragmentteja. Vanhakylä ja Salminen ovat hyödyntäneet tutkimuksissaan tätä yhdisteryhmäspesifistä MRM-analytiikkaa mallintaessaan kasvien polyfenolikoostumuksia.^{46,47} Saman kasvisuvun lajien huomattiin tuottavan flavonoliglykosideilla eri suhteessa aglykoni- ja aglykoniradikaali-onia.^{46,47} Vaikka menetelmät ovat tehokkaita tunnistamaan haluttuja yhdisteryhmiä, ne perustuvat tiettyihin kartiojännitteisiin ionien muodostumisen optimoimiseksi.

Tämän Pro gradu -tutkielman tavoitteena oli tutkia systemaattisesti, miten flavonoliglykosidin rakenne – erityisesti glykosylaation tyyppi ja sijainti – vaikuttaa aglykoni- ja aglykoniradikaali-ionien väliseen suhteeseen. Tutkimuksessa haluttiin lisäksi selvittää kolmoiskvadrupolimassaspektrometrin ionilähteen ja ioninohjaimen välisten asetusten vaikutusta näiden ionien muodostumiseen kartiojännitteiden optimoimisen avulla. Lisäksi selvitettiin yhdisteiden rakenteen vaikutusta aglykoni-, aglykoniradikaali-ionin ja hapettuneen aglykoni-ionin fragmentaatioon MS/MS-analytiikan avulla. Tutkimuksen avulla haluttiin saada tietoa, voiko syntyneiden aglykoni-ionien ja

aglykoniradikaali-ionien välisiä ionisuhteita käyttämällä saada luotettavan työkalun kasviuutteissa esiintyvien flavonoliglykosidiseosten nopeaan karakterisointiin yhdisteryhmätasolla. Luomalla selvä yhteys ionisuhteiden ja flavonoliglykosidirakenteiden välille voidaan nykyisten MRM-menetelmien käyttöä soveltaa ja tehostaa yhdisteryhmätason tunnistamiseen sekä yksinkertaistaa monimutkaisten kasviuutteiden analysointia.

2 Materiaalit ja menetelmät

2.1 Käytetyt reagenssit ja liuottimet

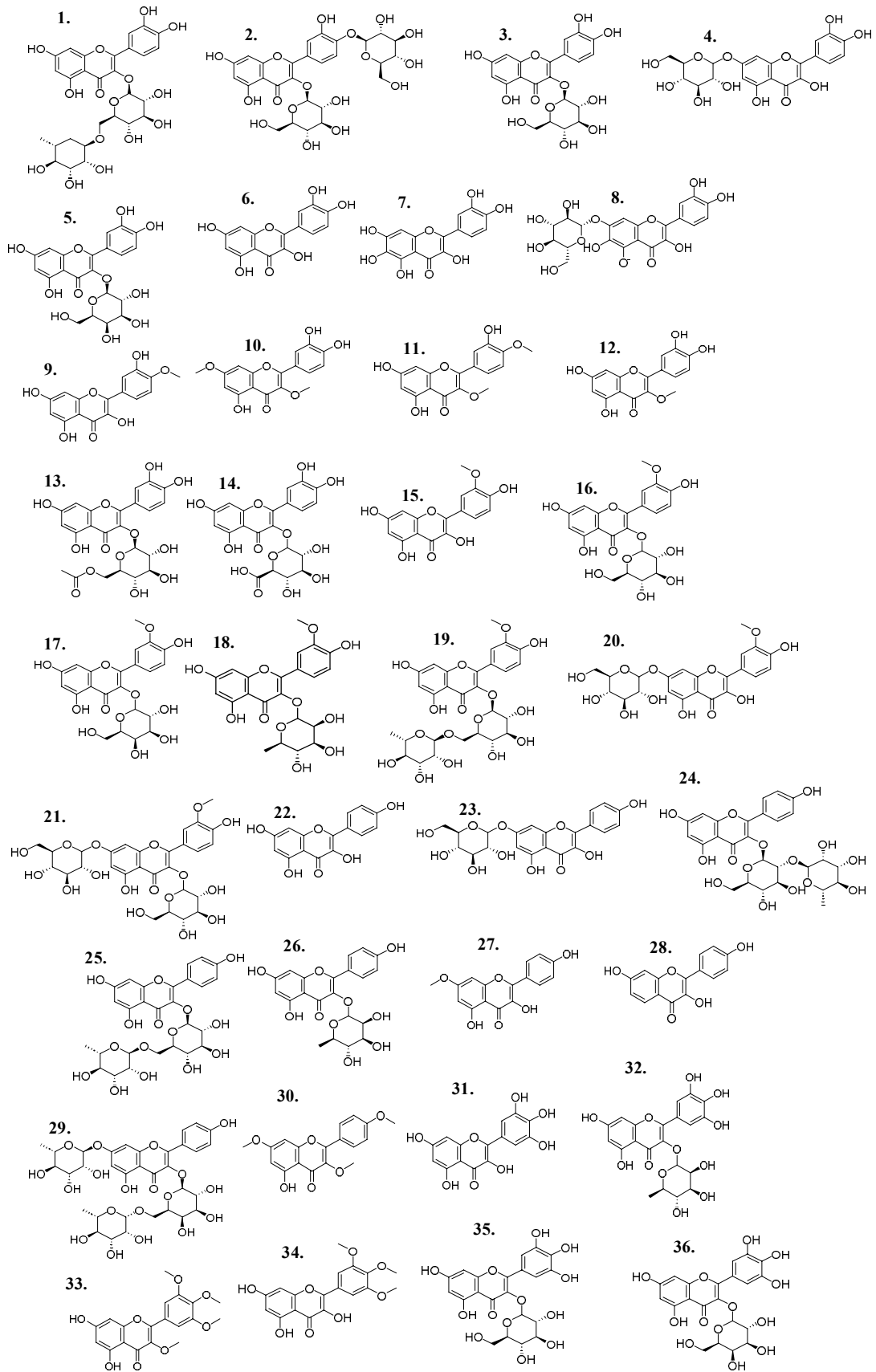
Analyyseihin käytettiin LC-MS laatuista asetonitriiliä, jonka oli valmistanut Honeywell (Michigan, USA). LC-MS-laatuksen muurahaishapon, jota käytettiin 0,1 % muurahaishappo-vesiseokseen oli valmistanut VWR (Helsinki, Suomi). Kaupallisten puhdasaineiden liuottamiseen käytetyn dimetyylisulfoksidin (DMSO) oli valmistanut Thermo scientific (Heysham, UK) ja puhdasaineiden sekä kasviuutteiden laimentamiseen käytetyn metanolin Sigma-Aldrich (Steinheim, Saksa). Työssä käytettiin ainoastaan ultrapuhdasta vettä, jonka puhdistamiseen käytettiin Millipore Synergy -laitetta (Merck KGaA, Saksa).

2.2 Näytteet ja näytteenkäsittely

Työssä käytettiin näytteinä kaupallisia puhdasaineita (Taulukko 1, kuva 6) sekä valmiina olevia kasviuutteita. Puhdasaineista isoramnetiini-7-*O*-glukosidin ja isoramnetiini-3,7-di-*O*-glukosidin sekä myrisetiini-tri-metyylieetterin ja myrisetiini-penta-metyylieetterin oli valmistanut Biosynth (USA). Kaikki loput puhdasaineet oli valmistanut Extrasynthese (Ranska). Kaupallisista puhdasaineista valmistettiin 0,5 mg/ml kantaliuokset punnitsemalla 1 mg puhdasainetta 2 ml eppendorffputkeen ja liuottamalla 2 ml:aan DMSO:ta.

Taulukko 1. Tutkimuksessa käytettyjen kaupallisten puhdasaineiden numero, yhdisteen nimi, massa ja molekyylikaava.

Puhdasaineet nro.	Yhdiste	Molekyyli massa (g/mol)	Molekyylikaava
1	Rutiini	610	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆
2	Kversetiini-3,4'-di- <i>O</i> -glukosidi	626	C ₂₇ H ₃₀ O ₇
3	Kversetiini-3- <i>O</i> -glukopyranosidi	464	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
4	Kversetiini-7- <i>O</i> -glukosidi	464	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
5	Hyperosidi (kversetiini-3- <i>O</i> -galaktopyranosidi)	464	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂
6	Kversetiini	302	C ₁₅ H ₁₀ O ₇
7	Kversetageetiini (6-hydroksikversetiini)	318	C ₁₅ H ₁₀ O ₈
8	Kversetageetiini-7- <i>O</i> -glukosidi	479	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃
9	Kversetiini-4'-metyylieetteri	316	C ₁₆ H ₁₂ O ₇
10	Kversetiini-3,7-dimetyylieetteri	330	C ₁₇ H ₁₃ O ₇
11	Kversetiini-3- <i>O</i> -metyylieetteri	316	C ₁₆ H ₁₂ O ₇
12	Kversetiini-3- <i>O</i> -(6"-asetyyli)glukosidi	506	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃
13	Kversetiini-3- <i>O</i> -glukuronidi	478	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃
14	Kversetiini-3,4'-di-metyylieetteri	330	C ₁₇ H ₁₄ O ₇
15	Isoramnetiini	316	C ₁₆ H ₁₂ O ₇
16	Isoramnetiini-3- <i>O</i> -glukosidi	478	C ₂₂ H ₂₁ O ₁₂
17	Isoramnetiini-3- <i>O</i> -galaktosidi	478	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂
18	Isoramnetiini-3- <i>O</i> -ramnosidi	462	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₁
19	Isoramnetiini-3- <i>O</i> -rutinosidi	624	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆
20	Isoramnetiini-7- <i>O</i> -glukosidi	478	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂
21	Isoramnetiini-3,7-di- <i>O</i> -glukosidi	640	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇
22	Kemferoli	286	C ₁₅ H ₁₀ O ₆
23	Kemferoli-7- <i>O</i> -glukosidi	448	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁
24	Kemferoli-7- <i>O</i> -neohesperidosidi	594	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
25	Kemferoli-3- <i>O</i> -rutinosidi	594	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅
26	Kemferoli-3- <i>O</i> -ramnosidi	432	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀
27	Ramnositriini (7-metyylikemferoli)	300	C ₁₆ H ₁₂ O ₆
28	Resokemferoli (5-deoksikemferoli)	270	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
29	Robiniini	740	C ₃₃ H ₄₀ O ₉
30	Kemferoli-tri-metyylieetteri	328	C ₁₈ H ₁₆ O ₆
31	Myrisetiini	318	C ₁₅ H ₁₀ O ₈
32	Myrisetiini-3- <i>O</i> -ramnosidi	464	C ₂₁ H ₁₉ O ₁₂
33	Myrisetiini-penta-metyylieetteri	374	C ₁₉ H ₁₈ O ₈
34	Myrisetiini-tri-metyylieetteri	360	C ₁₈ H ₁₆ O ₈
35	Myrisetiini-3- <i>O</i> -glukosidi	480	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃
36	Myrisetiini-3- <i>O</i> -galaktosidi	480	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃



Kuva 6. Tutkimuksessa käytettyjen flavonoliaglykoni- ja flavonoliglykosidipuhdasaineiden rakenteet.

Kasviuutteet (taulukko 2) olivat valmiina pakastimessa. Uutteet laitettiin ravisteluun 3 h ajaksi, jonka jälkeen niistä tehtiin viisinkertainen laimennos pipetoimalla 40 µl uutetta eppendorffputkeen ja lisäämällä liuotinta 160 µl. Liuottimena käytettiin 30 % metanolin vesiliuosta. Laimentamisen jälkeen putket laitettiin ravisteluun kahden tunnin ajaksi.

Taulukko 2. Tutkimuksessa käytetyt kasviuutteista tunnistetut flavonolijohdannaiset ja niiden retentioaika, UV-spektrissä havaitut maksimit, molekyyli-paino, arivoitu molekyylikaava, deprotonoituneen molekyyli-ionin havaittu m/z -arvo, spektrissä havaittujen muiden tärkeimpien fragmenttien m/z -arvot, laskettu massa, mitattu massa, virhe ja kaksoissidosekvivalentti (DBE).

Uutteen yhdiste nro.	RT	UV-max	M	Molekyylikaava	m/z [M-H] ⁻	Muita m/z -arvoja	Tarkka massa, laskettu	Tarkka massa, mitattu	Virhe (ppm)	DBE
1	2,93	254–352	640	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₈	639,1213	461 (100), 295, 191 593 (40), 447 (55),	640,1266	640,1261	1,632	14
2	3,17	265–346	624	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₇	623,1261	285,175 609, 461, 447 (80),	624,1317	624,1312	1,694	14
3	4,39	265–342	786	C ₃₆ H ₃₄ O ₂₀	785,1576	285 (200)	786,1632	786,1627	0,705	20
4	3,67	354	480	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	479,0835	317 (80), 191 (10)	480,0897	480,0892	0,89	12
5	4,06	255–353	478	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	477,0676	301 (100), 271	478,0741	478,0736	0,328	13
6	4,29	255–354	506	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	505,0995	341, 300 (50)	506,1053	506,1048	1,438	13
7	4,39	265–347	462	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461,0731	447, 285 (100)	462,0792	462,0787	1,151	13
8	3,19	265–344	610	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1471	447, 285, 145	610,1524	610,1519	1,596	13
9	3,21	265–347	756	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	755,205	579, 447, 285, 175	756,21	756,2095	1,329	14
10	4,38	265–347	448	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0936	284 (50)	448,0999	448,0994	0,638	12
11	3,4	255–358	788	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₂	787,1944		788,1998	788,1993	0,666	14
12	3,6	255–354	756	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	755,2043	625	756,2100	756,2095	0,375	14
13	3,68	267–350	772	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	771,1993	285	772,2049	772,2044	0,413	14
14	3,597	255–353	626	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	625,1419	463, 300	626,1473	626,1468	1,404	13
15	4,07	255–354	478	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	477,0675	301 (100)	478,0741	478,0736	0,034	13
16	4,48	254–353	478	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477,1042	314, 151	478,1104	478,1099	0,651	12
17	4,66	268–348	490	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	489,1041	285 (60)	490,1104	490,1099	0,472	13
18	3,58	255–354	626	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	625,1420	300, 133	626,1473	626,1468	1,516	13
19	3,742	255–354	596	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	595,1314	300	596,1368	596,1363	1,516	13
20	3,898	255–354	610	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1469	300	610,1524	610,1519	1,448	13
21	3,93	254–354	770	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀	769,2206		770,2256	770,2251	1,148	14
22	4,026	255–353	464	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0888	300 (90)	464,0948	464,0943	1,189	12

23	4,29	254–354	624	$C_{28}H_{32}O_{16}$	623,1624	447, 315	624,1680	624,1675	1,095	13
24	3,59	255–354	756	$C_{33}H_{40}O_{20}$	755,2048		756,2100	756,2095	1,051	14
25	3,81	265–347	740	$C_{33}H_{40}O_{19}$	739,2099	689, 284	740,2151	740,2146	1,053	14
26	3,94	254–354	770	$C_{34}H_{42}O_{20}$	769,2202	609	770,2256	770,2251	0,667	14
27	4,13	265–348	594	$C_{28}H_{30}O_{15}$	593,1521	284	594,1575	594,1570	1,495	13
28	2,83	354–255	934	$C_{39}H_{50}O_{26}$	933,2527	785, 600, 438, 299, 137 (10)	934,2574	934,2569	1,056	15
29	2,96	266–348	918	$C_{39}H_{50}O_{25}$	917,2583	771 (20), 625, 438, 217	918,2625	918,2620	1,614	15
30	3,33	255–354	772	$C_{33}H_{40}O_{21}$	771,1999	623, 313, 226	772,2049	772,2044	1,269	14
32	3,884	254–353	624	$C_{28}H_{32}O_{16}$	623,1623	461, 284, 159	624,1680	624,1675	0,918	13
32	2,954	266–348	918	$C_{39}H_{50}O_{25}$	917,2587	771 (15), 625, 159 446, 323 (40), 214, 177 (45), 159 (60)	918,2625	918,2620	2,017	15
33	3,544	255–353	610	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609,1471		610,1524	610,1519	1,597	13
34	3,791	265–347	594	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593,1523	431 (15), 353, 159	594,1575	594,1570	1,883	13
35	3,176	254–351	610	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609,1470	489 (10)	610,1524	610,1519	1,481	13
36	4,024	255–353	464	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463,0888	300 (80), 183	464,0948	464,0943	1,384	12
37	4,247	247–265	594	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593,1523	447, 285, 191	594,1575	594,1570	1,832	13
38	3,935	255–354	610	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609,1472	301	610,1524	610,1519	1,711	13
39	4,063	255–353	464	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463,0889	300 (50)	464,0948	464,0943	1,513	12
40	4,324	255–354	506	$C_{23}H_{22}O_{13}$	505,0995	341, 300 (40), 191 505 (70), 463 (20), 300 (15)	506,1053	506,1048	1,418	13
41	4,29	288–354	608	$C_{27}H_{27}O_{16}$	607,1312		608,1368	608,1363	1,239	14
42	2,863	266–347	756	$C_{33}H_{40}O_{20}$	755,2055	593 (30), 446	756,2100	756,2095	1,925	14
43	3,301	265–347	798	$C_{35}H_{53}O_{22}$	797,2163	635, 446, 255, 175	798,2205	798,2200	2,206	15
44	3,421	265–347	798	$C_{35}H_{53}O_{22}$	798,2163	635, 446, 255, 175 599, 431 (40), 313 (60)	798,2205	798,2200	2,206	15
45	3,932	267–350	746	$C_{34}H_{34}O_{19}$	745,1632		746,1683	746,1678	1,42	18
46	4,431	254–353	478	$C_{22}H_{22}O_{12}$	477,1046	447, 314	478,1104	478,1099	1,532	12

47	3,249	266–347	886	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₃	885,2686	739, 595	886,2727	886,2722	1,739	15
48	3,615	255–354	756	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	755,2045	625 (40), 563 609 (20), 579 (20),	756,2100	756,2095	0,667	14
49	3,209	265–347	756	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	755,2049	446, 285	756,2100	756,2095	1,223	14
50	2,79	254–352	788	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₂	787,1952	593, 415, 285 487 (20), 415 (60),	788,1998	788,1993	1,708	14
51	2,814	265–343	934	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₆	933,2531	285	934,2574	934,2569	1,452	15
52	3,283	252–351	640	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₇	639,1578	595, 477 (20)	640,1629	640,1624	1,811	13
53	3,742	255–353	596	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	595,1316	463, 300 (15)	596,1368	596,1363	1,953	13
54	3,855	265–352	616	C ₂₈ H ₂₄ O ₁₆	615,1000	463, 341	616,1056	616,1051	1,337	17
55	4,335	254–354	624	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	623,1626	315 (10)	624,1680	624,1675	1,271	13
56	4,383	265–348	448	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0939	284 (40), 151	448,0999	448,0994	1,354	12
57	4,487	254–354	478	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477,1044	314 (20)	478,1104	478,1099	1,154	12
58	4,293	254–353	506	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	505,0996	341, 300 (40)	490,1104	490,1099	1,576	13
59	3,853	261–353	616	C ₂₃ H ₂₄ O ₁₆	615,1000	463 (10), 300	616,1056	616,1051	1,402	17
60	4,314	255–354	434	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433,0778	300 (80)	434,0843	434,0838	0,313	12
61	3,771	265–348	886	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₃	885, 2689		886,2727	886,2722	1,897	15
62	4,249	254–353	770	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀	769,2207	593 (10), 447 (10), 285	770,2256	770,2251	1,33	14
63	3,302	254–353	786	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₁	785,2161	623 (40), 401 (10), 161	786,2205	786,2200	1,985	14
64	4,249	265–347	594	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1521	285	594,1575	594,1570	1,461	13
65	4,521	254–353	492	C ₂₂ H ₂₀ O ₁₃	491,0837	315 (100)	492,0897	492,0892	1,255	13
66	4,326	255–353	434	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₁	433,0777	300 (100)	434,0843	434,0838	0,22	12
67	4,445	255–348	448	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0937	300 (70)	448,0999	448,0994	0,996	12
68	4,524	266–355	586	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₅	585,0894	301 (100)	586,0951	586,0946	1,413	17
69	3,625	254–354	626	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	625,1418	463, 301	626,1473	626,1468	1,228	13
70	3,689	267–350	772	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	771,1995	639, 479, 285	772,2049	772,2044	0,751	14

71	3,768	253–357	802	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₂	801,2107	741, 595, 493	802,2154	802,2149	1,553	14
72	3,501	265–354	758	C ₃₂ H ₃₈ O ₂₁	757,1839	301	758,1893	758,1888	0,804	14
73	3,85	265–348	740	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	739,2101	609, 399, 285	740,2151	740,2146	1,323	14
74	3,399	255–358	788	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₂	787,1948	475	788,1998	788,1993	1,225	14
75	3,849	255–349	594	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1523	447 (10)	594,1575	594,1570	1,933	13
76	4,119	262–342	578	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	577,1573	431 (20), 285	578,1626	578,1621	1,544	13
77	4,698	264–344	722	C ₃₃ H ₃₈ O ₁₈	721,1995	619 (10), 431, 285	722,2046	722,2041	1,363	15
78	4,889	264–344	606	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₅	605,1523	431 (100), 285 (10)	606,1575	606,1570	1,779	14
79	3,97	257–349	464	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0882	316 (40)	464,0948	464,0943	0,045	12
80	4,42	257–357	448	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0935	300 (50) 316 (45), 301 (20), 225 (20)	448,0999	448,0994	0,392	12
81	3,667	257–356	480	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	479,0836		480,0897	480,0892	0,911	12
82	4,038	259–349	464	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,0890	316 (40), 300 (20)	464,0948	464,0943	1,665	12
83	4,18	270–359	602	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₆	601,0845	483 (10), 317 (100)	602,0900	602,0895	1,701	17
84	4,58	348	506	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	505,0995	417, 316 (60), 284	506,1053	506,1048	1,438	13
85	4,85	344	506	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	505,0995	461, 316 (80), 181	506,1053	506,1048	1,378	13
86	3,68	354	480	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	479,0833	316 (45), 225	480,0897	480,0892	0,41	12

2.3 Käytetyt menetelmät

2.3.1 UPLC-MS/MS

Kasviuutteet ja puhdasaineet analysoitiin Xevo kolmoiskvadrupolimassaspektrometriin (TQ, Waters Corp., Milford, MA, USA) yhdistetyllä ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografialaitteistolla (UPLC, Waters Corp., Milford, 22 MA, USA). Käytetty kolonni oli Acquity UPLC BEH Phenyl 1,7 μm , 100 mm \times 2,1 mm (Waters Corp., Wexford, Ireland). Injektio-tilavuus oli 5 μl ja virtausnopeus 0,5 ml/min. Eluenteina käytettiin asetonitriiliä (A) ja 0,1 % muurahaishappo-vesiliuosta (B). Käytettiin lineaarista gradientteluutiota, jossa mukana oli isokraattisia vaiheita. Eluutio on kuvattu taulukossa 3.

Taulukko 3 Tutkimuksessa käytetty eluutio ja sen vaiheet.

aika (min)	asetonitriili (A, %)	muurahaishappo-vesiliuos (B, %)
0–0,5	0,1	99,9
5	30,0	70,0
6	35,0	65,0
6,1	90,0	10,0
8,1	90,0	10,0
8,2	0,1	99,9
9,5	0,1	99,9

MS-laitteistossa käytettiin sähkösumutus-ionisaatiolähdettä (ESI), jonka kapillaarijännite oli 1,8 kV ja ionilähteen lämpötila 150 °C. Haihdutus- ja suojakaasuna käytettiin typpeä ja törmäyskaasuna argonia. Haihdutuskaasun lämpötila oli 650 °C ja virtausnopeus 1000 l/h. Suojakaasun virtausnopeus oli 100 l/h.

Massaspektrometrilta dataa kerättiin seitsemän minuutin ajan. Menetelminä käytettiin täysskannaus (full scan) -menetelmää, jossa keskityttiin flavonoliglykosidien aglykoniosien fragmentaatioon massa-alueella m/z 100–365. Mittaus tehtiin käyttämällä negatiivista ionisaatiota ja 13:a kartiojännitettä välillä 30–150. Lisäksi käytettiin Engström et al. kehittämiä yhdisteryhmäspesifisiä MRM-menetelmiä kemferolille, kversetiinille ja myrisetiinille.⁴³ MRM-menetelmissä oli käytössä omat menetelmät kullekin yhdisteryhmälle pinenemmille yhdisteille (S), kuten monoglykosideille ja suuremmille yhdisteille (N), joissa sokereita on useampia (taulukko 4).

Taulukko 4 Yhdisteryhmäspesifisissä MRM-menetelmissä käytetyt prekursori-ionit, kartiojännitteet ja törmäysenergiat kemferoli-, kversetiini-, ja myrisetiini johdannaisille.

Yhdisteryhmä	prekursori-ioni	Kartiojännite (S)	kartiojännite (N)	Törmäysenergia
Kemferoli	285	50	70	25
	284	50	70	25
Kversetiini	301	60	85	20
	300	60	85	25
Myrisetiini	317	50	80	20
	316	50	80	20

Kaikki näytteet analysoitiin myös korkean resoluution QExactive Orbitrap UPLC-MS/MS-laitteistolla. Laitteisto koostui Acquityn erittäin korkean paineen nestekromatografista (Waters Corp., Milford, USA) ja kvadrupoli-orbitrap-massaspektrometrilla (Thermo Fischer Scientific, Bremen, Saksa). Nestekromatografissa oli Acquity UPLC, BEH Phenyl -kolonni, jonka mitat olivat 2,1 x 100 mm ja partikkelikoko 1,7 µm. Orbitrap-MS-laitteistolla käytettiin lämmitettyä sähkösumutusionisaatiolähdettä (HESI). Negatiivisessa ionisaatiossa sumutusionisaatio oli -3,0 kV ja kapillaarin lämpötila 380 °C.

Näytteet analysoitiin käyttämällä negatiivista ionisaatiota. Valitut ionit mitattiin *m/z*-arvoilla välillä 100–1000. Virtausnopeus oli 0,5 ml/min ja ajoliuksina käytettiin asetonitriiliä (A) ja 0,1 % muurahaishappo-vesiliuosta (B). Käytettiin lineaarista gradientteluutiota, jossa mukana oli isokraattisia vaiheita. Eluutio on kuvattu taulukossa 3. Injektio tilavuus oli 5 µl ja dataa kerättiin seitsemän minuutin ajalta. Suoja- ja apukaasuna oli typpi, jonka virtausnopeus oli suojakaasulla 60 ja apukaasulla 20. UV-dataa mitattiin 9,5 minuutin ajan välillä 190–500 nm.

Ensimmäinen menetelmä oli täysskannaus/datasta riippuvaista MS² (Full MS/dd MS² (TOPN)) -menetelmä. Menetelmässä käytettiin normalisoituna ionilähde-energiana 35 eV:a. Täysskannauksen resoluutio oli 70 000 ja AGC-arvo 3x10⁶. dd MS² (TopN) -mittauksessa resoluutio oli 17 500, AGC-arvo 1x10⁵ ja TopN arvo oli 5. TopN mittauksessa viisi intensiivisintä ionia valittiin täysskannauksen jälkeen törmäyskammioon, jossa käytettiin törmäysenergiana 30 eV:a. Menetelmää käytettiin kasviuutteissa esiintyvien flavonolijohdosten karakterisointiin.

Toisena menetelmänä käytettiin rinnakkaisten reaktioiden seuranta (parallel reaction monitoring, PRM) -menetelmää. Menetelmässä seurattiin aglykoni-ionien, aglykoniradikaali-ionien ja hapettuneiden aglykoni-ionien fragmentaatiota. Fragmentaatioiden seuraamista varten luotiin inklusiolista (taulukko 6), johon kirjattiin fragmentoitavien ionien tarkat massat. Normalisoituna ionilähde-energiana käytettiin 60 eV:a ja törmäysenergiana 40 eV:a. Resoluutio oli 17 500 ja AGC-arvo 1x10⁵.

Taulukko 6. Inklusiolistassa käytetyt tarkat massat kemferolin, kversetiinin, isoramnetiinin ja myrisetiinin aglykoni-, aglykoniradikaali ja hapettuneelle aglykoni-ionille.

	Kemferoli	Kversetiini	Isoramnetiini	Myrisetiini
Aglykoni-ioni	285,0401	301,035	315,0506	317,0299
Aglykoniradikaali-ioni	284,0323	300,0272	314,0428	316,0221
Hapettunut aglykoni	283,0245	299,0194	313,0350	315,0143

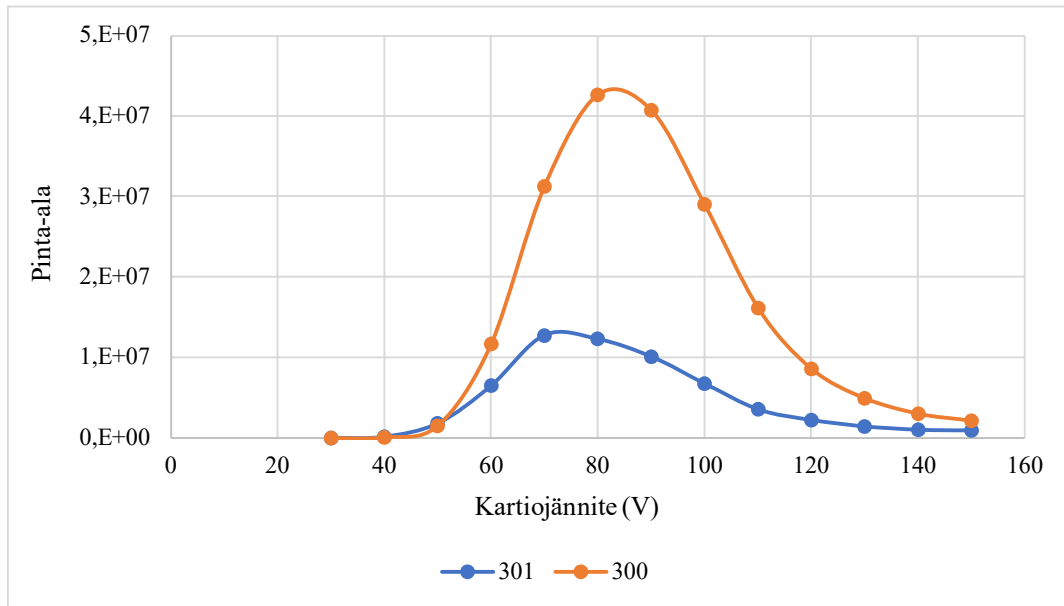
2.3.2 UPLC-DAD

Yhdisteiden liukoisuuden selvittämiseen käytettiin ultrakorkean erotuskyvyn nestekromatografia. Nestekromatografi oli Acquityn UPLC-laitteisto (Waters corporation, Milford, USA), joka koostui automaattisesta näytteenottojärjestelmästä, pumpusta, diodirividetektorista (DAD), kolonniuunista ja kolonnista (Acquity UPLC, BEH Phenyl), jonka mitat olivat 2,1 x 100 mm ja virtausnopeus oli 0,5 ml/min. Ajoliuksina käytettiin asetonitriiliä (A) ja 0,1 % muurahaishappo-vesiliuosta (B). Käytettiin lineaarista gradientteliuutiota, jossa mukana oli isokraattisia vaihteita. Eluutio on kuvattu taulukossa 3. UV-dataa kerättiin seitsemän minuutin ajan välillä 190–500 nm.

2.4 Ionisuhteiden mittaaminen

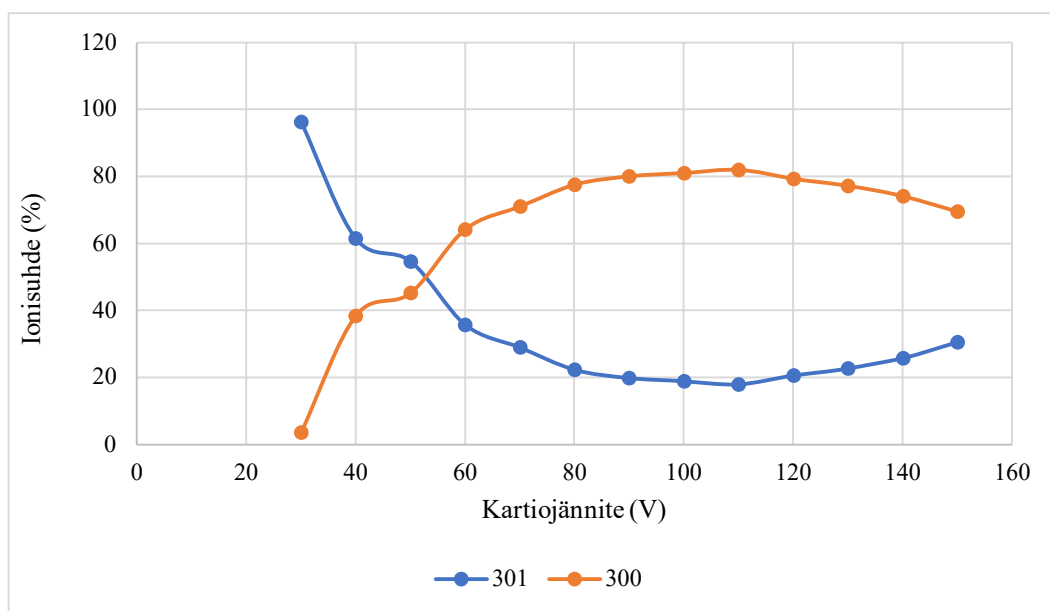
Täysskannausanalyysia varten kantaliuoksesta valmistettiin 50 µg/ml oleva laimennos pipetoimalla 150 µl kantaliuosta ja 1350 µl metanolia 2 ml eppendorf-putkeen. MRM-analyysia varten 5 µg/ml laimennos valmistettiin vastaavasti pipetoimalla 15 µl kantaliuosta ja 1485 µl metanolia 2 ml eppendorf-putkeen. Laimennokset jätettiin ravisteluun noin 2 tunnin ajaksi, jonka jälkeen ne suodatettiin 0,2 µm PTFE-suodattimella uusiin eppendorf-putkiin, siirrettiin vialeihin ja analysoitiin samana päivänä.

Saadusta täysskannaus datasta integroitiin aglykoni-ionien ja aglykoniradikaali-ionien pinta-alat jokaisella 13:lla kartiojännitteellä käyttämällä TargetLynx-ohjelmaa. Hapettunut aglykoni-ioni otettiin huomioon ja integroitiin niille näytteille, joilla sitä näytti syntyvän kaikilla kartiojännitteillä. Tehtiin kuvaajat, joissa esitetään pinta-ala kartiojännitteen funktiona (Kuva 1.).



Kuva 1. Rutiinin aglykoni- ja aglykoniradikaali-ionipiikkien pinta-alojen avulla piirretty kuvaaja.

Tehtiin myös toinen kuvaaja ionisuhteista laskemalla aglykoni- ja aglykoniradikaali-ionien prosentuaalinen suhde toisiinsa nähden (kuva 2).



Kuva 2. Rutiinin aglykoni- ja aglykoniradikaali-ionipiikkien ionisuhdekuvaaja.

MRM-menetelmillä mitatusta datasta integroitiin vastaavalla tavalla aglykoni-ionien ja aglykoniradikaali-ionien pinta-alat, mutta integrointi tehtiin MassLynx-ohjelman kokonaisionikromatogrammi-ikkunassa. Integrointi tehtiin erikseen käyttämällä pienille yhdisteille

luotuja MRM-menetelmiä sekä suuremmille yhdisteille luotuja menetelmiä. Lisäksi laskettiin yhteen pienille ja suurille yhdisteille luotujen menetelmien ionisuhteet.

2.5 Liukoisuustestit

Aiemmin valmistetuista 500 µg/ml DMSO:ssa olevista kantaliuoksista tehtiin 10-kertainen laimennos metanoli-vesiseoksiin. Metanolipitoisuudet olivat 15 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 50 % ja 100 % ja liuokset oli valmiiksi valmistettu toisen opiskelijan toimesta. Laimennos valmistettiin pipetoimalla eppendorf-putkeen 50 µl kantaliuosta ja 450 µl metanoli-vesiseosta, jonka jälkeen näyte jätettiin ravisteluun kahden tunnin ajaksi. Näytteet suodatettiin 20µm PTFE-suodattimella uuteen eppendorf-putkeen, jonka jälkeen näyte pipetoitiin vialeihin. Näytteet analysoitiin heti tuoreina, vuorokauden päästä ensimmäisestä analyysistä samasta vialista sekä vuorokauden pakastamisen jälkeen. Pakastettu näyte laitettiin sulamaan ravistelijaan kolme tuntia ennen analyysia ja suodatettiin uudelleen 20 µm PTFE-suodattimella.

Liukoisuutta tarkasteltiin kversetiini-3-*O*-glukuronidista, rutiinista, kversetiini-3,4'-di-*O*-glukosidista, kemferoli-7-*O*-neohesperidosidesta, kemferoli-3-*O*-ramnosidista, kemferoli-7-*O*-glukosidista sekä myrisetiini-3-*O*-galaktosidista. Yhdisteet valittiin siten, että jokaisesta aglykoniryhmästä valittiin mahdollisuuden mukaan erilaisia ionisuhteita tuottavat yhdisteet.

2.6 Pitoisuuden vaikutus ionisuhteisiin

Pitoisuuden vaikutusta syntyviin ionisuhteisiin tarkasteltiin valmistamalla laimennossarjat. Tehtiin 20:n pisteen laimennossarja, jonka suurin pitoisuus oli 25 µg/ml ja pienin pitoisuus 11 µg/ml (taulukko 8).

Taulukko 8. Laimennossarjan pisteiden pitoisuudet.

Laimennoksen numero	Pitoisuus (µg/ml)
1	25
2	16,667
3	11,111
4	7,407
5	4,938
6	3,292
7	2,195
8	1,463
9	0,975
10	0,650
11	0,434
12	0,289
13	0,193
14	0,128
15	0,086
16	0,057
17	0,038
18	0,025
19	0,017
20	0,011

Laimennossarjat tehtiin seuraaville yhdisteille: rutiini, kversetiini-3,4'-di-*O*-glukosidi, kemferoli-7-*O*-glukosidi, kemferoli-7-*O*-neohesperidosidi, kemferoli-3-*O*-ramnosidi, robiniini, myrisetiini-3-*O*-ramnosidi ja kversetiini-7-*O*-glukosidi. Yhdisteistä rutiini, kversetiini-3,4'-di-*O*-glukosidi, kemferoli-7-*O*-glukosidi ja kemferoli-7-*O*-neohesperidosidi yhdistettiin samaan seokseen pipetoimalla kunkin yhdisteen kantaliuosta 50 µl samaan eppendorf-putkeen. Kemferoli-3-*O*-ramnosidi, robiniini, myrisetiini-3-*O*-ramnosidi ja kversetiini-7-*O*-glukosidi yhdistettiin vastaavalla tavalla samaan seokseen. Molemmista seoksista valmistettiin laimennossarjat 1,5 laimennuskertoimella ja liuottimena käytettiin 40 % metanoli-vesiseosta. Ensimmäinen pitoisuus valmistettiin eppendorf-putkiin pipetoimalla yhdisteseosksesta muodostunutta kantaliuosta 300 µl ja liuotinta 1200 µl. Tästä liukosesta siirrettiin 1000 µl seuraavaan eppendorf-putkeen ja laimennettiin 500 µl:lla liuotinta. Loput liukset valmistettiin samalla tavalla siirtämällä 1000 µl edellistä liuosta eppendorf-putkeen ja laimentamalla 500 µl:lla liuotinta, kunnes saavutettiin pienin haluttu pitoisuus. Laimennossarjoista tehtiin kalibroitikuvaajat täyskannaus mittausten tuloksista integroimalla yhdisteiden aglykoni-ionien ja aglykoniradikaali-ionien pinta-alat TargetLynx ohjelmistolla. MRM-

mittauksista saaduista tuloksista kuvaajat tehtiin käyttämällä aglykoni-ionin ja aglykoniradikaali-ionin intensiteettejä.

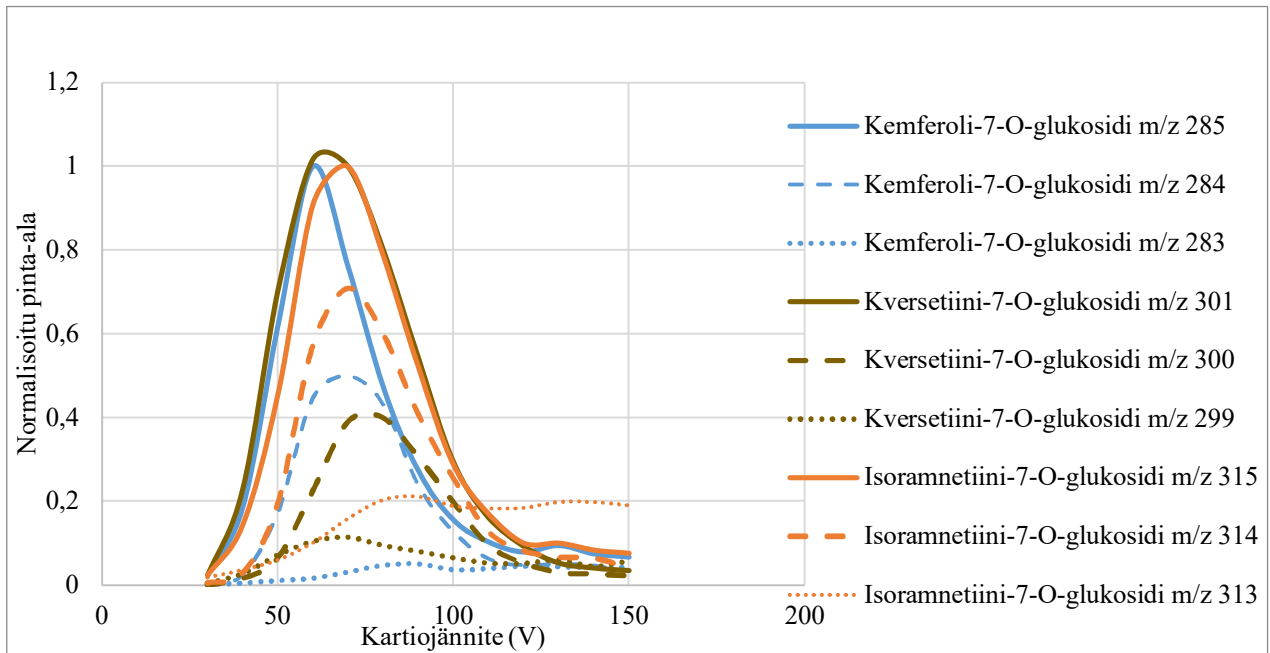
3 Tulokset ja niiden käsittely

3.1 Ionisuhteet

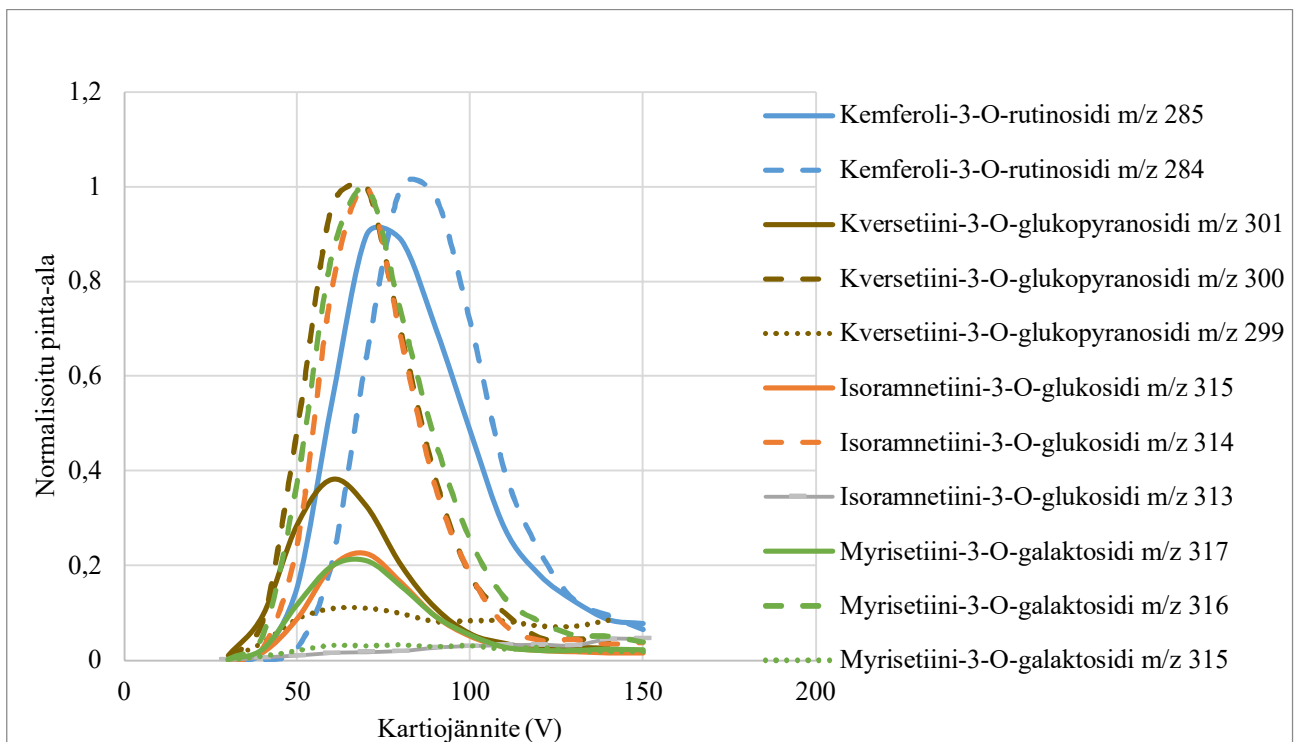
Ionisuhteita tarkasteltiin yhdisteryhmäspesifisten MRM-menetelmien ja täysskannausmittauksista saadun datan avulla. Ionisuhdekuvaajien lisäksi laskettiin ionisuhteet MRM-menetelmillä saaduista tuloksista pienikokoisille ja suurempikokoisille yhdisteille. MRM-menetelmän tuloksista laskettiin lisäksi pienten ja suurempien yhdisteiden ionisuhteista yhteistulos. Täysskannausmittauksista ionisuhde laskettiin käyttämällä kartiojännitettä, jossa ionisuhde näytti alkavan tasaantumaan alun suurienkin muutosten jälkeen. MRM-menetelmillä saatuja ionisuhteita verrattiin täysskannausmittauksista saatuihin ionisuhteisiin ja tarkasteltiin, onko MRM-menetelmissä käytetyt kartiojännitteet sopivia. Lisäksi verrattiin, oliko saadut tulokset saman suuntaisia täysskannausmittauksista saatujen ionisuhteiden kanssa.

Koska MRM-menetelmää ei ollut käytössä isoramnetiinijohdannaisille, ei näistä saatu luotettavia tuloksia. Vaikka isoramnetiini on kversetiinin metyloitunut muoto, ei kversetiinin yhdisteryhmäspesifinen MRM-menetelmä toiminut isoramnetiinin havaitsemiseen kunnolla. Osa isoramnetiinijohdannaisista integroitiin käyttämällä kversetiinin MRM-menetelmää, mutta kun tuloksia verrataan täysskannausmenetelmällä integroituihin isoramnetiinin aglykoni-ionin 315 ja aglykoniradikaali-ionin 314 antamiin tuloksiin, ovat ionisuhteet näillä selvästi toisistaan poikkeavat. Sama koski kaikkien flavonoliryhmien metyloituneita muotoja, joiden fragmentoituminen poikkesi niin paljon yhdisteen tavallisen aglykonin fragmentoitumisesta, ettei MRM-menetelmillä saatu luotettavia tuloksia. Myös muutamilla yhdisteillä, kuten resokemferolilla ja kversetageetiini-7-*O*-glukosidilla substituutiot vaikuttivat yhdisteiden fragmentaatioon, eikä näiltä saatu MRM-menetelmillä tuloksia.

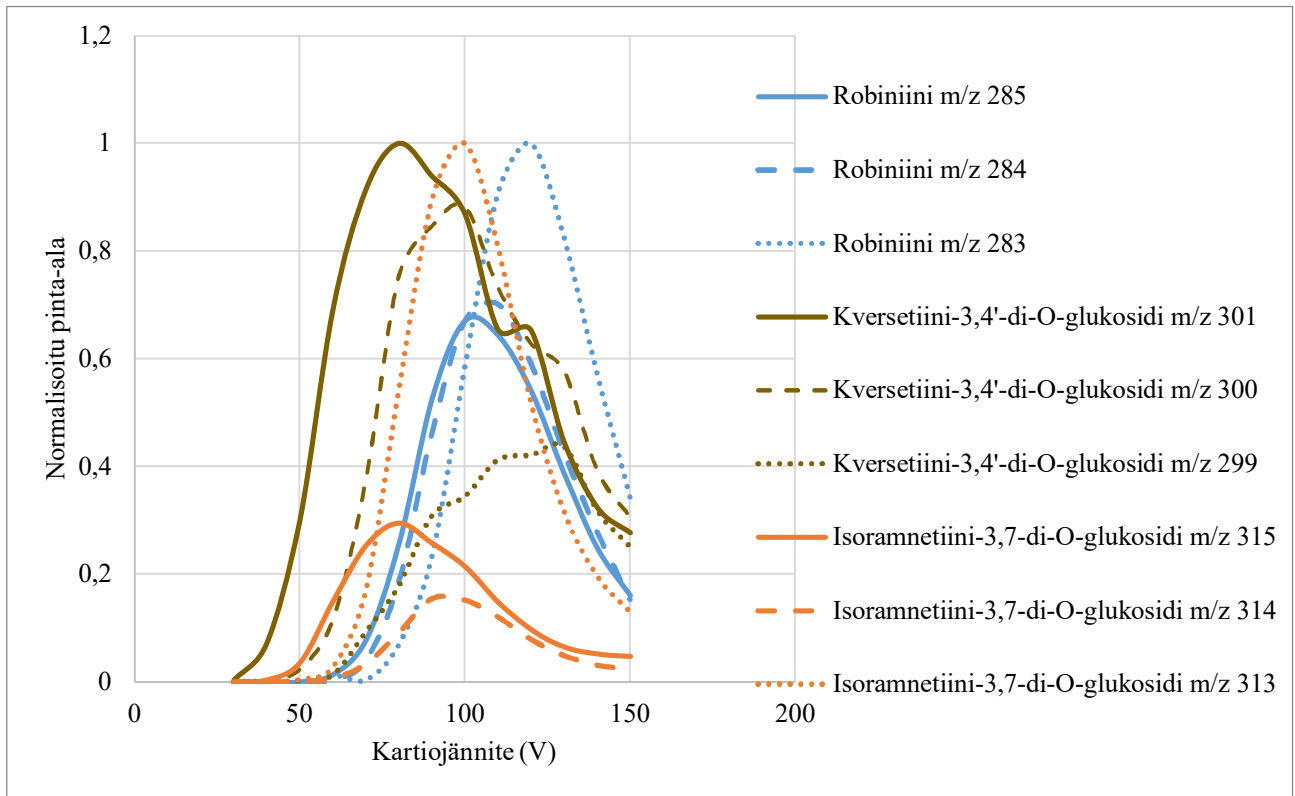
Ionisuhteita tarkastellessa huomattiin aglykoni- ja aglykoniradikaali-ionin lisäksi kolmas, kaksi massayksikköä kevyempi hapettunut aglykoni-ioni. Tämä ioni otettiin ionisuhdekuvaajassa huomioon niillä yhdisteillä, joilla sitä näytti syntyvän systemaattisesti useammalla kartiojännitteellä. Hapettunutta aglykoni-onia havaittiin 3-*O*-glykosideilla, mutta 7-*O*-glykosidit ja vielä runsaammin di-*O*-glykosidit, joissa sokeri oli liittynään useampaan eri kohtaan, näyttivät suosivan tämän muodostumista (kuvaajat 3–6).



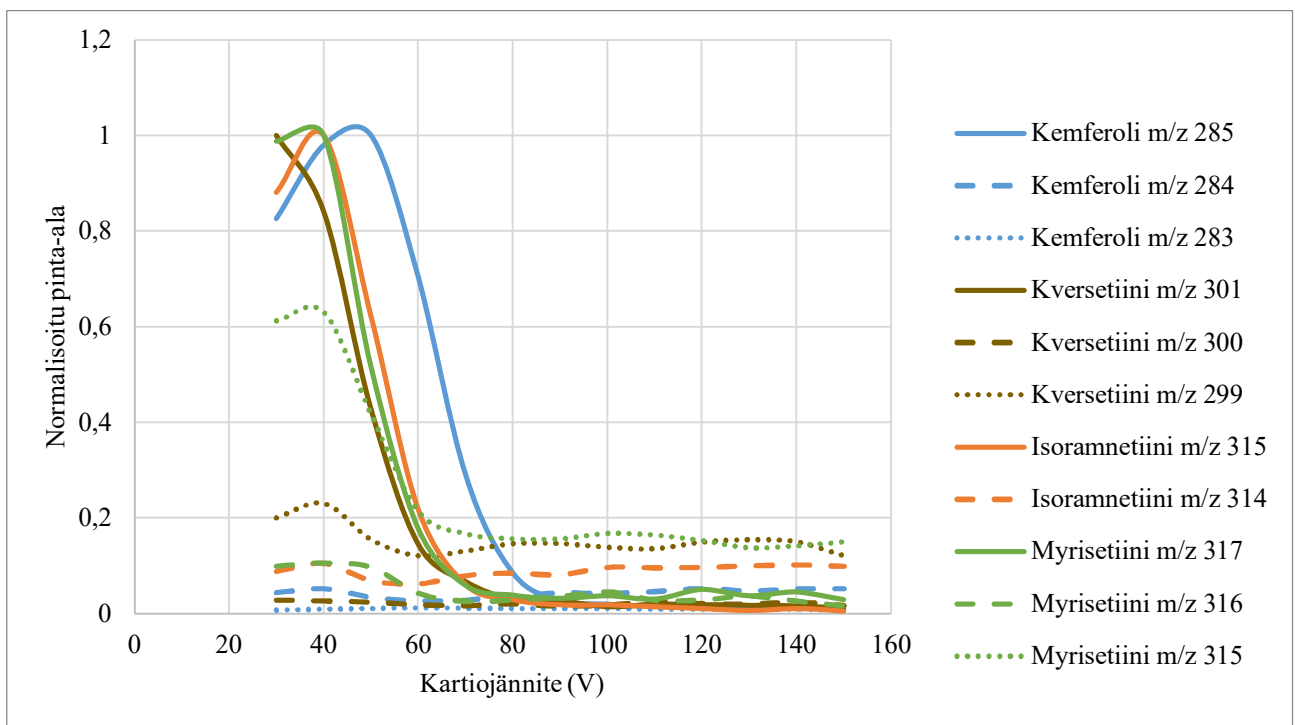
Kuvaaja 3. Kemferoli-7-*O*-glukosidin, kversetiini-7-*O*-glukosidin ja isoramnetiini-7-*O*-glukosidin aglykoni-ionien normalisoidut pinta-alat kartiojännitteen funktiona täysskannausmenetelmällä.



Kuvaaja 4. Kemferoli-3-*O*-rutinosidin, kversetiini-3-*O*-glukopyranosidin, isoramnetiini-3-*O*-glukosidin ja myrisetiini-3-*O*-galaktosidin aglykoni-ionien normalisoidut pinta-alat kartiojännitteen funktiona täysskannausmenetelmällä.

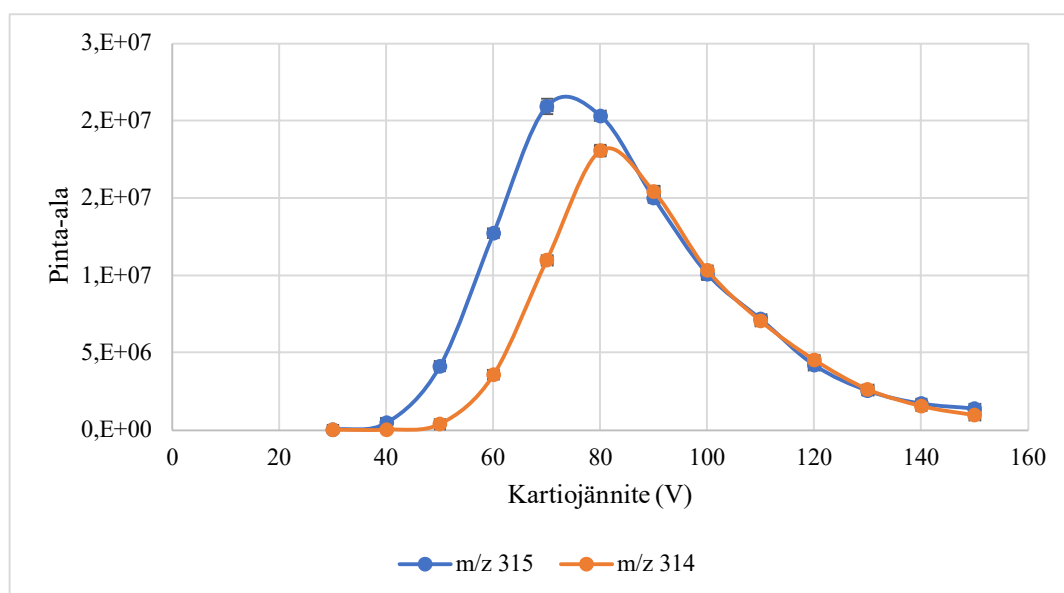


Kuvaaja 5. Robiniinin, kversetiini-3,4'-di-O-glukosidin ja isoramnetiini-3,7-di-O-glukosidin aglykoni-ionien normalisoidut pinta-alat kartiojännitteen funktiona täysskannausmenetelmällä.



Kuvaaja 6. Kemferolin, kversetiinin, isoramnetiinin ja myrisetiinin aglykoni-ionien normalisoidut pinta-alat kartiojännitteen funktiona täysskannausmenetelmällä.

Aiempien tutkimusten tuloksia tukien, 3-*O*-glykosidit suosivat selvästi aglykoniradikaali-ionin muodostumista. Kversetiini-, isoramnetiini- ja myrisetiini johdannaisilla ionisuhteiden välinen ero oli näissä selkeämpi ja kemferolijohdannaisilla ionisuhteet olivat tasaisemmat, kun käytettiin täysskannausmenetelmää. Lisäksi nähtiin, että isoramnetiini-3-*O*-rutinosidilla ja kemferoli-3-*O*-rutinosidilla ionisuhde oli muita 3-*O*-glykosideja tasaisempi ja vaadittu kartiojännite hieman suurempi (kuvaajat 4 ja 7). 7-*O*-glykosidit puolestaan suosivat aglykoni-ionin muodostumista ja ionisuhteet olivat myös tässä kemferolijohdannaisilla hieman tasaisemmat (kuvaaja 3). Di-*O*-glykosidit vaativat selvästi korkeampaa kartiojännitettä sokeriosien irtoamiseen. Näillä yhdisteillä kartiojännitteen kasvaessa myös hapettunutta aglykoni-onia alkoi muodostua merkittävästi (kuvaaja 5). Flavonoliaglykonit tuottivat enemmän aglykoni-onia ja radikaali-ionin osuus jäi hyvin matalalle. Myrisetiinillä ja kversetiinillä havaittiin hapettunutta aglykonia huomattavasti isoramnetiinia ja kemferolia enemmän, kun tarkasteltiin aglykoneja (kuvaaja 6).



Kuvaaja 7. Isoramnetiini-3-*O*-rutinosidin aglykoni- ja aglykoniradikaali-ionien integroidut pinta-alat kartiojännitteen funktiona täysskannausmenetelmällä.

Kemferolijohdannaisista nähtiin, että yhdisteryhmäspesifinen MRM-menetelmä ja täysskannausmenetelmä antoivat jokseenkin toisistaan poikkeavia tuloksia. Kemferoli-7-*O*-neohesperidosidin MRM-menetelmillä saatu ionisuhteiden summa oli 41:59, kun taas täysskannausmenetelmällä laskettu ionisuhde oli 98:2 (taulukko 9). Puolestaan kemferoli-3-*O*-ramnosidilla MRM-menetelmillä laskettu ionisuhteiden summa oli 7:93 ja täysskannausmenetelmällä saatu ionisuhde oli 39:61.

Kasviuutteista lasketuissa ionisuhteissa oli vielä suurempia eroja kemferolijohdannaisten kohdalla ja esimerkiksi MRM-menetelmällä selvästi aglykoniradikaali-ionivoittoinen ionisuhde saattoi olla päinvastainen täysskannausmenetelmällä (taulukko 10). Saatiin selville, että yhdisteillä, jotka tuottivat helpommin hapettunutta aglykoni-iona, oli myös enemmän eroa MRM-menetelmillä ja täysskannausmenetelmillä lasketuissa ionisuhteissa. Esimerkiksi robiniini antoi MRM-menetelmillä yhteenlasketuksi ionisuhteeksi 1:99, mutta täysskannausmenetelmällä aglykoni-ionin ja aglykoniradikaali-ionin suhde oli lähes 50:50. Robiniini tuotti aglykoni-iona ja aglykoniradikaali-iona enemmän hapettunutta aglykoni-iona kartiojännitteen kasvaessa. Tässä kuitenkin tulee huomata se, että kemferolin yhdisteryhmäspesifisissä MRM-menetelmissä kartiojännitteet oli pienemmille yhdisteille aglykoni-ionille ja aglykoniradikaali-ionille molemmille 50 V ja suuremmilla yhdisteillä aglykoni-ionilla 70 V ja aglykoniradikaali-ionilla 95 V. Tällöin esimerkiksi robiniinille optimoidun 100 V kartiojännitteen sijaan aglykoni-iona oli akkumuloitu 70 V kartiojännitteellä, joka aliarvioi ionin muodostumista ja antaa aglykoniradikaali-ionille huomattavasti enemmän painoarvoa. Kversetiini johdannaisilla ionisuhteet olivat MRM-menetelmillä ja täysskannausmenetelmällä laskettuna pääasiassa samansuuntaisia. Kversetiini-7-*O*-glukosidilla MRM-menetelmien yhteenlaskettu ionisuhde oli selvästi aglykoni-ionivoittoinen 91:9, kun täysskannausmenetelmän antama ionisuhde oli tasaisempi 67:33. Optimoitu kartiojännite yhdisteen aglykoni-ionin ja aglykoniradikaali-ionin akkumuloimiseksi olisi 80 V, kun MRM menetelmissä pienemmille yhdisteille on käytetty 70 V ja 60 V ja suuremmille yhdisteille 50 V ja 80 V. Kversetiini-3-*O*-glukuronidin kohdalla aglykoni-ionin ja aglykoni-radikaali-ionin suhde näytti 3-*O*-glykosideille poikkeavasti aglykoni-ioni voittoiselta. Mutta kun hapettunut aglykoni-ioni otettiin huomioon, sitä oli muodostunut huomattavasti eniten. Yhdiste oli todennäköisesti hapettunut liuottimessa ennen analyysia, jonka takia tulosta ei pidetä luotettavana.

Myrisetiini johdannaisilla ionisuhteet olivat hyvin samansuuntaiset MRM- ja täysskannausmenetelmillä. Täysskannaus hieman nosti aglykoni-ionin suhdetta, esimerkiksi myrisetiini-3-*O*-glukosidilla MRM-menetelmien yhteissuhde oli luokkaa 5:95, kun täysskannausmenetelmällä ionisuhteeksi saatiin 19:81.

Taulukko 3. Puhdasaineille lasketut ionisuheet MRM-menetelmällä pienille ja suuremmille yhdisteille sekä näiden yhteistulos, täysskannausmenetelmällä optimoitu kartiojännite sekä tätä kartiojännitettä käyttämällä laskettu ionisuhde.

Yhdiste	Ionisuhde S	Ionisuhde N	YHT	Opitimoitu kartiojännite	Ionisuhde optimoidulla kartiojännitteellä
Rutiini	15:85	18:82	17:83	80	22:78
Kversetiini-3,4'-di- <i>O</i> -glukosidi	10:90	50:50	46:54	100	50:20
Kversetiini-3- <i>O</i> -glukopyranosidi	16:84	20:80	17:83	80	22:78
Kversetiini-7- <i>O</i> -glukosidi	91:9	92:8	91:9	80	67:33
Hyperosidi	15:85	30:70	20:80	70	25:75
Kversetiini	99:1	89:11	98:2	40	97:3
Kversetageetiini	100:0	100:0	100:0	40	90:10
Kversetageetiini-7- <i>O</i> -glukosidi				70	70:30
Kversetiini-4'-metyylieetteri	32:67	65:35	37:63	40	99:1
Kversetiini-3,7-dimetyylieetteri				40	92:8
Kversetiini-3- <i>O</i> -metyylieetteri	0:100	2:98	0:100	40	99:1
Kversetiini-3- <i>O</i> -(6"-asetyyli)glukosidi	12:88	17:83	14:86	80	23:77
Kversetiini-3- <i>O</i> -glukuronidi	93:7	93:7	93:7	80	81:19
kversetiini-3,4'-di-metyylieetteri	63:37	40:60	54:46	40	99:1
Isoramnetiini	26:74	74:26	33:66	40	90:10
Isoramnetin-3- <i>O</i> -glukosidi	9:91	13:87	12:88	60	20:80
Isoramnetiini-3- <i>O</i> -galaktosidi	6:94	5:95	6:94	60	19:81
Isoramnetiini-3- <i>O</i> -ramnosidi	2:98	7:93	5:95	60	28:72
Isoramnetiini-3- <i>O</i> -rutosidi	13:87	1:99	2:98	80	53:47
Isoramnetiini-7- <i>O</i> -glukosidi	17:83	34:66	32:68	60	61:39
Isoramnetiini-3,7-di- <i>O</i> -glukosidi				100	59:41
Kemferoli	61:39	37:62	52:47	40	95:5
Kemferoli-7- <i>O</i> -glukosidi	69:31	65:35	67:33	80	52:48
Kemferoli-7- <i>O</i> -neohesperidoside	63:37	38:62	41:59	50	98:2
Kemferoli-3- <i>O</i> -rutosidi	25:75	5:95	6:94	90	42:58
Kemferoli-3- <i>O</i> -ramnosidi	6:94	11:89	7:93	70	39:61
Ramnositriini	3:97	68:32	6:94	30	91:9
Resokemferoli				40	95:5
Robiniini	30:70	1:99	1:99	100	50:50
Kemferoli-tri-metyylieetteri	0:100	0:100	0:100	30	91:9
Myrisetiini	77:23	31:69	65:34	30	91:9
Myrisetiini-3- <i>O</i> -ramnosidi	7:93	4:95	5:95	60	20:80
Myrisetiini-penta-metyylieetteri	18:82	36:64	22:78	40	92:8
Myrisetiini-tri-metyylieetteri	18:82	36:64	22:78	40	92:8
Myrisetiini-3- <i>O</i> -glukosidi	6:94	4:96	5:95	60	19:81
Myrisetiini-3- <i>O</i> -galaktosidi	5:95	4:96	4:96	60	19:81

Taulukko 4. Kasviuutteista valituille yhdisteille lasketut ionisuhteet MRM-menetelmillä pienille ja suuremmille yhdisteille sekä näiden yhteistulos, täysskannausmenetelmällä optimoitu kartiojännite sekä tätä kartiojännitettä käyttämällä laskettu ionisuhde.

Kasviuutteet yhdiste nro.	Ionisuhde S	Ionisuhde N	YHT	Optimoitu kartiojännite	Ionisuhde optimoidulla kartiojännitteellä
1	21:79	20:80	20:80	100	64:36
2	95:5	11:89	14:86	40	99:1
3	17:83	30:70	22:78	80	90:10
4	8:92	5:95	6:94	60	70:30
5	38:62	42:58	40:60	60	51:49
6	2:98	2:98	2:98	60	24:76
7	15:85	31:69	20:80	60	79:21
8	76:24	5:95	5:95	80	82:18
9				70	91:9
10	2:98	4:96	3:97	60	40:60
11	7:93	5:95	5:95	120	26:74
12	1:99	1:99	1:99	70	23:77
13	81:19	10:90	10:90	100	80:20
14	0:100	1:99	1:99	70	20:80
15	6:94	9:91	7:93	60	43:57
16	9:91	5:95	7:93	60	30:70
17	9:91	6:94	8:92	80	50:50
18	2:98	2:98	2:98	100	25:74
19	1:99	1:99	1:99	80	23:76
20	2:98	2:98	2:98	80	25:75
21				80	29:71
22	3:97	2:98	3:97	80	23:77
23				80	29:71
24	0:100	1:99	1:99	80	22:78
25	0:100	1:99	1:99	80	46:54
26				80	30:70
27	1:99	2:98	2:98	80	47:53
28	1:99	0:100	0:100	110	29:70
29	3:97	0:100	0:100	110	56:46
30	2:98	3:97	3:97	100	39:61
31				100	36:64
32	3:97	1:99	1:99	120	63:37
33	1:99	4:96	3:97	110	38:62
34	21:79	15:85	15:85	90	63:37
35	2:98	6:94	6:94	90	34:66
36	16:84	16:84	16:84	60	26:74
37	13:87	4:96	5:95	90	51:49
38	14:86	18:82	17:83	80	29:71
39	18:82	20:80	19:81	70	21:79
40	9:91	11:89	10:90	60	26:74

41	15:85	16:84	16:84	80	28:72
42	1:99	1:99	1:99	80	46:54
44	2:98	0:100	0:100	80	38:62
44	2:98	0:100	0:100	60	4:96
45	20:80	39:61	34:66	90	38:62
46	17:80	28:72	21:79	80	40:60
47	16:84	0:100	0:100	100	47:53
48	15:85	17:83	16:84	80	20:80
49	30:70	2:98	2:98	90	66:34
50	9:91	25:75	25:75	120	39:61
51	31:69	12:88	15:85	120	82:18
52				110	41:60
53	5:95	8:92	7:93	60	18:82
54	6:94	28:72	24:76	80	28:72
55				80	41:59
56	3:97	5:95	4:96	70	32:68
57				80	25:75
58	12:88	16:84	14:86	70	25:75
69	8:92	16:84	15:85	90	18:82
60	8:92	12:88	10:90	50	23:77
61	5:95	1:99	1:99	70	41:59
62				100	46:54
63				120	42:58
64	23:77	5:95	6:94	80	55:45
65				90	94:6
66	1:99	19:81	3:97	80	13:87
67	15:85	25:75	19:81	60	19:81
68	99:1	98:2	99:1	60	100:0
69	18:82	16:84	17:83	80	28:72
70	98:2	7:93	8:92	100	80:20
71				110	64:36
72	34:66	20:80	20:80	90	37:64
73	13:87	0:100	0:100	90	21:79
74	40:60	31:70	31:70	110	32:68
75	31:69	36:64	36:64	90	51:49
76	39:61	15:85	16:84	100	65:35
77	20:80	32:68	25:75	120	66:34
78	100:0	18:82	19:82	80	97:3
79	7:93	6:94	6:94	60	23:77
80	19:81	23:77	21:79	80	30:70
81	5:95	4:96	5:95	60	22:78
82	6:94	7:93	7:93	60	18:82
83	100:0	100:0	100:0	60	94:6
84	6:94	3:97	4:96	50	21:79
85	4:96	5:95	5:95	50	14:86
86	4:96	4:96	4:96	60	4:96

Kun MRM- ja täysskannausmenetelmiä verrataan toisiinsa, täytyy ottaa huomioon, että ne mittaavat eri asioita. Täysskannauksessa haluttujen ionien, tässä tapauksessa aglykoni- ja aglykoniradikaali-ionien, skannaus tapahtuu toisella kvadrupolilla ja spektristä nähdään halutut ionit. MRM-menetelmässä puolestaan toinen kvadrupoli lukitsee halutut ionit, tässä tapauksessa aglykoni- ja aglykoniradikaali-ionin, ja menetelmä seuraa näistä ioneista syntyvien valittujen fragmenttien muodostumista. Yhdessä hapettuneen aglykoni-ionin sekä liian pienen kartiojännitteen kanssa nämä selittävät eroja täysskannaus- ja MRM-menetelmillä saatuihin tuloksiin.

3.2 Aglykoni-ionien fragmentoituminen

Yhdisteiden aglykoniosien fragmentoitumista tarkasteltiin PRM-menetelmällä saadun MS²-datan avulla. Pystyttiin selvittämään aglykoni-, aglykoniradikaali-ionin ja hapettuneen aglykoni-ionin fragmentaatiota tarkastelemalla syntyneitä pääfragmentteja ja tutkimalla niiden yhteyttä yhdisteen rakenteeseen ja esimerkiksi sokerin liittymiskohtaan.

Yhdisteet tuottivat yhdisteryhmästä riippumatta pääasiassa fragmentteja, joiden m/z -arvot olivat samoja (taulukko 11), joten fragmentit numeroitiin taulukointia varten.

Taulukko 5. PRM-menetelmällä havaittujen pääfragmenttien numero, m/z -arvo, ehdotettu molekyylikaava, laskettu massa, mitattu massa ja kaksoissidosekvivalentti aglykoni-, aglykoniradikaali-ionille ja hapettuneelle aglykoni-ionille.

Fragmentti	m/z -arvo	molekyylikaava	Tarkka massa, laskettu	Tarkka massa, mitattu	DBE
1	317,02722	C ₁₅ H ₁₀ O ₈	318,0372	318,0367	11
2	316,02245	C ₁₅ H ₉ O ₈	317,0294	317,0289	11,5
3	315,01451	C ₁₅ H ₈ O ₈	316,0216	316,0211	12
4	315,05076	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	316,0579	316,0574	11
5	314,04344	C ₁₆ H ₁₁ O ₇	315,0501	315,0496	11,5
6	313,03505	C ₁₆ H ₁₀ O ₇	314,0423	314,0418	12
7	301,034	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	302,0423	302,0418	11
8	300,027	C ₁₅ H ₉ O ₇	301,0345	301,0340	11,5
9	299,02	C ₁₅ H ₈ O ₇	300,0267	300,0262	12
10	285,04019	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	286,0474	286,0469	11
11	284,03294	C ₁₅ H ₉ O ₆	285,0396	285,0391	11,5
12	283,02553	C ₁₅ H ₈ O ₆	284,0318	284,0313	12
13	288,02309	C ₁₄ H ₉ O ₇	289,0345	289,0340	10,5
14	287,02008	C ₁₄ H ₈ O ₇	288,0267	288,0262	11
15	273,03617	C ₁₄ H ₁₀ O ₆	274,0474	274,0469	10
16	272,02857	C ₁₄ H ₉ O ₆	273,0396	273,0391	10,5
17	271,02472	C ₁₄ H ₈ O ₆	272,0318	272,0313	11
18	270,01704	C ₁₄ H ₇ O ₆	271,024	271,0235	11,5
19	260,02834	C ₁₄ H ₆ O ₆	261,0396	261,0391	11
20	259,02455	C ₁₃ H ₈ O ₆	260,0318	260,0313	10
21	256,03363	C ₁₄ H ₉ O ₅	257,0447	257,0442	10,5
22	255,02997	C ₁₄ H ₈ O ₅	256,0369	256,0364	11
23	244,03378	C ₁₃ H ₉ O ₅	245,0447	245,0442	9,5
24	243,02973	C ₁₃ H ₈ O ₅	244,0369	244,0364	10
25	242,0222	C ₁₃ H ₇ O ₅	243,0291	243,0286	10,5
26	229,05086	C ₁₃ H ₁₀ O ₄	230,0576	230,0571	9
27	227,03552	C ₁₃ H ₈ O ₄	228,042	228,0415	10
28	203,03571	C ₁₁ H ₈ O ₄	204,042	204,0415	8
29	183,04608	C ₁₂ H ₈ O ₂	184,0522	184,0517	9
30	178,9948	C ₈ H ₄ O ₅	180,0057	180,0052	7
31	151,0043	C ₇ H ₄ O ₄	152,0108	152,0105	6
32	137,0254	C ₇ H ₆ O ₃	138,0315	138,0310	5

Puhdasaineiden (taulukko 12) kversetiini-3-*O*-glykosidien aglykoni-ionit tuottivat pääfragmentit *m/z*-arvoilla 301, 272, 256 ja 151. Aglykoniradikaali-ionin pääfragmentit puolestaan näkyivät *m/z*-arvoilla 300, 271, 255 ja 243. Kversetiini-7-*O*-glukosidin aglykoni-ionilla havaittiin vain kaksi pääfragmenttia *m/z*-arvoilla 301 ja 151. Yhdisteen aglykoniradikaali-ioni tuotti pääfragmentit *m/z*-arvoilla 300, 271 ja 151. Kversetiini-3,4'-di-*O*-glukosidin aglykoni-ioni ja aglykoniradikaali-ioni tuottivat samat pääfragmentit samoilla suhteellisilla intensiteeteillä kuin 3-*O*-glykosidit. Kversetiinijohdannaisten hapettunut aglykoni-ioni tuotti pääfragmentit *m/z*-arvoilla 299, 271 ja 243 riippumatta siitä, mihin asemaan sokerit olivat liittyneet.

Metylaatiot aglykonin eri kohdissa vaikuttivat yhdisteen ja sen aglykoni-ionin ja aglykoniradikaali-ionin fragmentoitumiseen. Hapettuneen aglykoni-ionin pääfragmentit olivat näilläkin yhdisteillä kuitenkin lähes samat.

Isoramnetiini-3-*O*-glykosidien puhdasaineissa sokerin tyyppi vaikutti aglykoni-ionien fragmentoitumiseen. 3-*O*-glukosidin ja -galaktosidin aglykoni-ionit tuottivat pääfragmentit *m/z*-arvoilla 300, 272 ja 244. 3-*O*-ramnosidilla ja -rutosidilla fragmentit havaittiin *m/z* arvoilla 300 ja 271 sekä kolmas intensiivinen fragmentti 3-*O*-ramnosidilla *m/z*-arvolla 244 ja 3-*O*-rutosidilla 243. Aglykoniradikaali-ionit tuottivat pääfragmentit *m/z*-arvoilla 299, 285, 271 ja 243. 3-*O*-rutosidilla ei näkynyt fragmenttia *m/z* arvolla 285. Isoramnetiini-7-*O*-glukosidin aglykoni-ionin pääfragmentit havaittiin *m/z*-arvoilla 300, 272 ja 151. Aglykoniradikaali-ioni tuotti pääfragmentit *m/z*-arvoilla 313, 299 ja 151. Isoramnetiini-3,7-di-*O*-glukosidin aglykoni-ionin pääfragmentit havaittiin *m/z*-arvoilla 300 ja 151. Aglykoniradikaali-ioni tuotti pääfragmentit *m/z*-arvoilla 271 ja 243. Hapettunut isoramnetiinin aglykoni-ioni tuotti pääfragmentit *m/z*-arvoilla 313, 285, 270 ja 242 riippumatta siitä, mihin kohtaan sokerit olivat liittyneet.

Kemferoli-3-*O*-rutosidi ja -ramnosidi puhdasaineiden aglykoni-ionin pääfragmentit havaittiin *m/z*-arvoilla 285, 256 ja 229. Aglykoniradikaali-ionin pääfragmentit olivat menettäneet yhden vetyatomit ja olivat muuten samat *m/z*-arvoilla 284, 255 ja 228. Kemferoli-7-*O*-glukosidin aglykoni-ioni tuotti pääfragmentit *m/z*-arvoilla 285 ja 151. 7-*O*-neohesperidosidin aglykoni-ioni tuotti yhden intensiivisen fragmentin *m/z*-arvolla 285. Aglykoniradikaali-ionin pääfragmentit havaittiin *m/z*-arvolla 284, 255 ja 151 kummallekin yhdisteille. Kemferoli-7-*O*-neohesperidosidi tuotti myös intensiivisen fragmentin *m/z*-arvolla 227. Robiniinin aglykoni-ionin pääfragmentit olivat *m/z*-arvoilla 285, 256 ja 229. Aglykoniradikaali-ioni puolestaan tuotti pääfragmentit *m/z*-arvoilla 284, 255 ja 228. Kemferolijohdannaisten hapettuneet aglykoni-ionit tuottivat pääfragmentit *m/z*-arvoilla 283, 255 ja 183. Myöskään kemferolijohdannaisilla hapettuneen aglykoni-ionin fragmentoitumisessa ei ollut vaikutusta sokerin tyypistä, tai liittymiskohdasta.

Myrisetiini-3-*O*-glykosidipuhdasaineiden aglykoni-ionien pääfragmentit havaittiin *m/z*-arvoilla 317, 288, 272 ja 151. Aglykoniradikaali-ionin pääfragmentit olivat *m/z*-arvoilla 316, 287 ja 271. Hapettuneiden aglykoni-ionien pääfragmentit havaittiin *m/z*-arvoilla 315, 287 ja 259.

Kaikilla flavonoliryhmillä metyloituminen vaikutti aglykoni-ionien fragmentoitumiseen, ja aglykoni-ionit, aglykoniradikaali-ionit ja hapettuneet aglykoni-ionit tuottivat yhdisteryhmän sisälläkin erilaisia pääfragmentteja riippuen metyyliryhmien lukumäärästä. Joillakin yhdisteillä, kuten kversetiini-3,7-di-metyylieetterillä metyyliryhmät vaikuttivat yhdisteen fragmentoitumiseen, eikä aglykoni-ioneja havaittu lainkaan. Vastaavasti kävi kversetagetiinilla, joka vastaa kversetiiniä, jossa on OH-ryhmä 6-asemassa.

Taulukko 6. Puhdasaineiden tuottamat PRM-fraamentit ja suhteelliset intesiteetit aglykoni-, aglykoniradikaali-, ja hapettuneelle aglykoni-ionille. Numeroa vastaavat fragmentit ja niiden *m/z*-arvot löytyvät taulukosta 11.

Yhdiste	Aglykoni-ionin fragmentit	Aglykoniradikaali-ionin fragmentit	Hapettuneen aglykoni-ionin fragmentit
1	7 (30), 16 (100), 21 (40), 31 (100)	8 (20), 17 (100), 22 (45), 24 (20)	9 (20), 17 (100), 24 (25)
2	7 (20), 16 (20), 30 (30), 31 (100)	8 (15), 17 (100), 22 (40), 24 (40)	9 (20), 17 (100), 24 (15)
3	7 (45), 16 (100), 21 (44), 31 (100)	8 (15), 17 (100), 22 (40), 24 (30)	9 (30), 17 (100), 24(20)
4	7 (45), 31 (40)	8 (100), 17 (30), 31 (100)	9 (20), 17 (100), 24 (15)
5	7 (30), 17 (100), 21 (40), 31 (65)	8 (20), 17 (100), 22 (45), 24 (30)	9 (20), 17 (100), 24 (20)
6	7 (90), 30 (30), 31 (100)	8 (30), 17 (100)	9 (20), 17 (100), 24 (10)
8	7 (70), 31 (100)	8 (50), 17 (100), 22 (45), 24 (30)	9 (20), 17 (100), 24 (20)
9	7 (100), 16 (30), 31 (70)	8 (90), 17 (30), 31 (100)	9 (20), 17 (100)
11	7 (20), 16 (100), 21 (40), 23 (30)	8 (20), 17 (100), 22 (50), 24 (20)	9 (100), 17 (30)
12	7 (30), 16 (100), 21 (40), 31 (50)	8 (20), 17 (100), 22 (40)	9 (25), 17 (100), 24 (20)
14	7 (100), 15 (100)	8 (20), 16 (100)	9 (20), 17 (100)
15	4 (20), 7(100), 31 (20)	5 (10), 8 (70), 17 (100), 24 (50)	6 (60), 10 (20), 18 (100), 25 (70)
16	4 (15), 8 (100), 16 (65), 23 (65), 31 (20)	5 (2), 9 (20), 10 (25), 17 (90), 24 (100)	6 (60), 10 (60), 18 (100), 25 (70)
17	4 (15), 8 (100), 16 (65), 23 (65), 31 (15)	5 (5), 9 (25), 10 (30), 17 (90), 24 (100)	6 (100), 10 (30), 18 (100), 25 (70)
18	4 (15), 8 (100), 17 (90), 24 (40), 31 (20)	5 (2), 9 (40), 10 (30), 17 (90), 24 (100)	6 (70), 10 (30), 18 (100), 25 (60)
19	4 (10), 8 (100), 17 (90), 22 (50), 24 (25)	5 (5), 9 (25), 17 (90), 24 (100)	6 (60), 10 (30), 18 (100), 25 (70), 31 (60)
20	4 (20), 8 (70), 16 (20), 31 (100)	6 (60), 9 (60), 17 (100)	6 (100), 10 (30), 18 (80), 25 (60)
21	4 (20), 8 (100), 31 (20)	5 (20), 9 (20), 10 (20), 17 (100), 24 (80)	6 (30), 10 (20), 18 (100), 25 (75)
22	10 (100)	11 (45), 22 (100), 27 (70), 31 (35)	12 (25), 22 (100), 29 (10)
23	10 (60), 21 (10), 31 (100)	11 (70), 22(20), 31 (100)	12 (30), 22 (100), 29 (20)
24	10 (100), 31 (10)	11 (90), 22 (40), 27 (45), 31 (100)	12 (25), 22 (100), 29 (15)
25	10 (60), 21 (90), 26 (80)	11 (20), 22 (100), 27 (70)	12 (30), 22 (100), 29 (20)
26	10 (100), 21 (90), 26 (100)	11 (20), 22 (100), 27 (70)	12 (70), 22 (100), 29 (20)
27	10 (100), 257 (20), 31 (15)	11 (100), 21 (75), 27 (25), 31 (90)	12 (70), 22 (100), 29 (30)
29	10 (100), 21 (40), 26 (50)	11 (20), 22 (100), 27 (60)	12 (25), 22 (100), 29 (15)
31	1 (20), 30 (55), 31 (100), 32 (60)	2 (30), 13 (100), 19 (20)	3 (20), 14 (100), 20 (20)
32	1 (30), 13 (70), 16 (100), 31 (80)	2 (30), 14 (70), 17 (100)	3 (40), 14 (100), 20 (80)
33	1 (20), 302 (80), 274 (100), 20 (60)	2 (20), 7 (75), 15 (100), 258 (65)	3 (15), 8 (70), 16 (100), 257

34	1 (70), 302 (100)	2 (70), 7 (100), 15 (40)	3 (65), 8 (100), 16 (30)
35	1 (30), 13 (70), 16 (100), 31 (50)	2 (20), 14 (70), 16 (100)	3 (40), 14 (100), 20 (60)
36	1 (35), 13 (70), 16 (100), 31 (60)	2 (25), 14 (65), 16 (100)	3 (40), 14 (100), 20 (60)

Kasviuutenäytteistä tarkasteltiin aglykoni-ionien, aglykoniradikaali-ionien ja hapettuneiden aglykoni-ionien fragmentaatiota vastaavalla tavalla. Pääfragmentit olivat hyvin samankaltaisia kuin puhtasaineilla (taulukko 13).

Kversetiiniglykosidien aglykoni-ionit tuottivat pääsääntöisesti fragmentit m/z -arvoilla 301, 272, 256 ja 151. Näistä vahvin signaali oli useimmilla m/z -arvolla 272. Aglykoniradikaali-ionit fragmentoitui tuottaen fragmentit m/z -arvoilla 301, 271 ja 255, joista voimakkain signaali oli lähes kaikilla m/z -arvolla 271. Hapettunut aglykoni-ioni fragmentoitui puhtasaineiden kanssa vastaavalla tavalla tuottaen fragmentit m/z -arvoilla 299, 271 ja 243. Fragmentti 243 näkyi vain osalla yhdisteistä. Joillain yhdisteistä aglykoni-ionin vahvin signaali m/z -arvolla 272 puuttui, mutta aglykoniradikaali-ioni fragmentoitui kuitenkin samalla tavalla. Tämä voidaan selittää sokerien liittymisellä useampaan kohtaan, jonka huomattiin puhtasaineissa pienentävän fragmentin 272 signaalia, mutta aiheuttavan kuitenkin aglykoniradikaali-ionin fragmentoitumisen 3-*O*-glykosideja vastaavalla tavalla.

Kemferoliglykosidien aglykoni-ionit tuottivat pääasiassa fragmentoituttuaan ioneja m/z -arvoilla 285, 256 ja 226. Osalla yhdisteistä fragmentti 229 näytti puuttuvan ja signaalien vahvuudet vaihtelivat merkittävästi yhdisteen mukaan. Aglykoniradikaali-ionit tuottivat fragmentteja m/z -arvoilla 284, 255 ja 228 lähes kaikille yhdisteille, joista vahvin signaali oli m/z -arvolla 255. Hapettunut aglykoni-ioni fragmentoitui tuottaen fragmentit m/z -arvoilla 283, 255 ja 183. Aglykoni-ionin fragmentin 229 puuttuminen voidaan selittää sokerin liittymisellä useampaan kohtaan.

Isoramnetiiniglykosidien aglykoni-ionit fragmentoitui tuottaen ionit m/z -arvoilla 300, 272, 271, 244 ja 243. Aglykoniradikaali-ionit tuottivat pääfragmentit m/z -arvoilla 299, 271 ja 243. Hapettuneen isoramnetiinin aglykoni-ioni tuotti pääfragmentit m/z -arvoilla 313, 270 ja 242. Isoramnetiiniglykosidien kohdalla puhtasaineita vastaavalla tavalla sokerin tyypillä oli vaikutusta ionien tuottamiin fragmentteihin. Fragmenttien intensiteetit poikkesivat puhtasaineiden vastaavista intensiteeteistä, ja esimerkiksi fragmentti 299 aglykoniradikaali-ionilla oli osalla yhdisteillä signaaliltaan vahvin.

Myrisetiiniglykosidien aglykoni-ionien pääfragmentit havaittiin m/z -arvoilla 317, 288, 272 ja 151. Aglykoniradikaali-ionin pääfragmentit olivat m/z -arvoilla 316, 287 ja 271. Hapettuneiden aglykoni-ionien pääfragmentit havaittiin m/z -arvoilla 315, 287 ja 259. Puhtasaineista poiketen aglykoniradikaali-ionin voimakkain signaali näkyi m/z -arvolla 271 eikä 272.

Taulukko 7 Kasviuutteiden tuottamat PRM-fragmentit ja suhteelliset intesiteetit aglykoni-, aglykoniradikaali-, ja hapettuneelle aglykoni-ionille. Numeroa vastaavat fragmentit ja niiden *m/z*-arvot löytyvät taulukosta 11.

Nro	Aglykoni-ionin MS/MS fragmentit	Aglykoniradikaali-ionin MS/MS fragmentit	Hapettuneen aglykoni-ionin MS/MS fragmentit
1	7 (100), 22 (10), 31 (30)	8 (60), 16 (100), 31 (40)	9 (25), 17 (100)
2	10 (100)	11 (30), 22 (95), 27 (100), 31 (20)	12 (30), 22 (10), 29 (20)
3	7 (100), 257 (30), 26 (40)	11 (15), 22 (100), 27 (95)	12 (40), 22 (100), 29 (20)
4	1 (30), 16 (30), 30 (50), 31 (100), 32 (60)	2 (30), 14 (70), 17 (100)	3 (20), 14 (100), 20 (70)
5	7 (40), 22 (20), 30 (40), 31 (100)	8 (25), 17 (100), 22 (50), 24 (30)	9 (25), 17 (100), 24 (30)
6	7 (40), 16 (100), 21 (55), 31 (70)	8 (20), 17 (100), 22 (50), 24 (30)	9 (40), 17 (100), 24 (50), 31 (30)
7	10 (100), 257 (30), 26 (60)	11 (10), 22 (100), 27 (100)	12 (30), 22 (100), 29 (20)
8	10 (100)	11 (35), 21 (100), 27 (85)	12 (30), 22 (100), 29 (20)
9	10 (100)	11 (35), 21 (100), 27 (85)	12 (30), 22 (100), 29 (20)
10	10 (100), 21 (95), 228 (90)	11 (10), 22 (100), 27 (95)	12 (40), 22 (100), 29 (20)
11	7 (20), 30 (30), 31 (100)	8 (25), 17 (100), 22 (55), 24 (30)	9 (20), 17 (100), 24 (45), 31 (25)
12	7 (30), 16 (100), 21 (50), 31 (75)	8 (20), 17 (100), 22 (50), 24 (30)	9 (20), 17 (100)
13	10 (100), 257 (50), 26 (100), 31 (30)	11 (20), 22 (100), 27 (60)	12 (20), 22 (100), 29 (20)
14	7 (30), 16 (100), 21 (45), 31 (60)	8 (25), 17 (100), 22 (45), 24 (30)	9 (20), 17 (100)
15	7 (40), 16 (35), 31 (100)	8 (20), 17 (100), 22 (45), 24 (30)	9 (30), 17 (100)
16	4 (20), 8 (100), 16 (70), 23 (70)	5 (2), 9 (25), 10 (40), 17 (90), 24 (100)	6 (45), 18 (100), 25 (80)
17	10 (70), 21 (100), 26 (25)	11 (20), 22 (100), 27 (65)	12 (40), 22 (100), 29 (20)
18	7 (35), 16 (100), 21 (50), 30 (35), 31 (100)	8 (25), 17 (100), 22 (45), 24 (25)	9 (20), 17 (100)
19	7 (30), 16 (100), 21 (40), 31 (50)	8 (25), 17 (100), 22 (50), 24 (30)	9 (20), 17 (100)
20	7 (30), 16 (100), 21 (45), 31 (80)	8 (30), 17 (100), 22 (45), 24 (25)	9 (20), 17 (100)
21	4 (10), 8 (100), 17 (55), 22 (30)	5 (1), 9 (100), 17 (70), 24 (60)	6 (20), 18 (100), 25 (95)
22	7 (30), 16 (100), 21 (50), 21 (60)	8 (20), 17 (100), 22 (45), 24 (25)	9 (30), 17 (100)
23	4 (10), 8 (100), 21 (70), 22 (40)	5 (5), 9 (100), 17 (80), 24 (70)	6 (35), 18 (100), 25 (70)
24	7 (30), 16 (100), 21 (45), 31 (75)	8 (20), 17 (100), 22 (50), 24 (20)	9 (20), 17 (100)
25	10 (60), 21 (100), 26 (50)	11 (20), 22 (100), 27 (60)	12 (25), 22 (100), 29 (20)
26	4 (10), 8 (100), 17 (50), 22 (30)	5 (2), 9 (100), 17 (80), 24 (65)	6 (20), 18 (100), 25 (80)
27	10 (80), 21 (100), 26 (80)	11 (20), 22 (100), 27 (60)	12 (30), 22 (100)

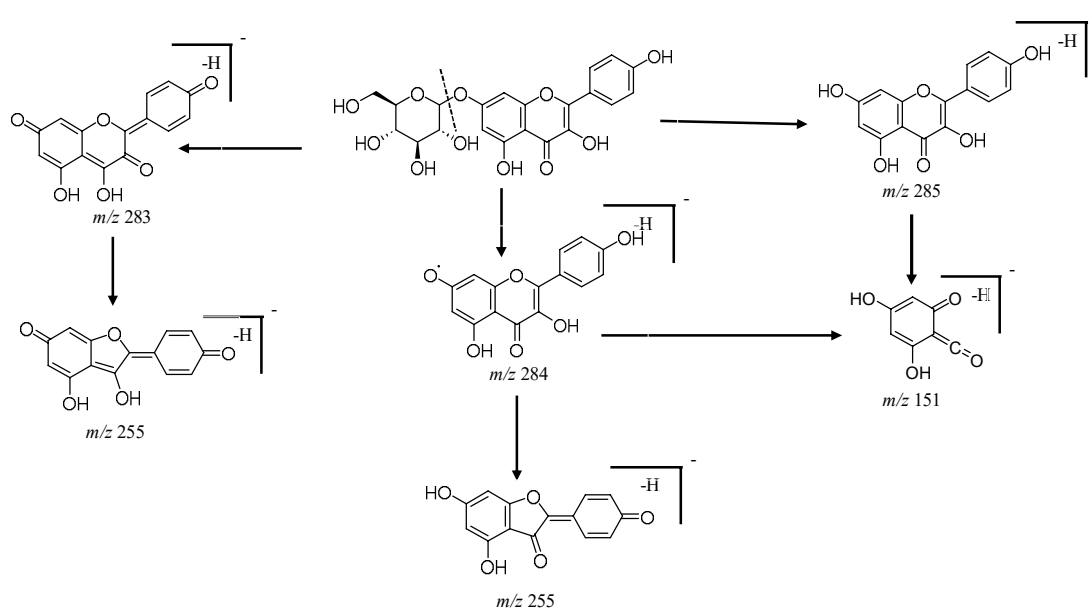
28	7 (85), 31 (100)	8 (10), 17 (100), 22 (35)	9 (5), 17 (100)
29	7 (100), 31 (20)	8 (20), 17 (100)	9 (25), 17 (100)
30	7 (80), 30 (40), 31 (100)	8 (20), 17 (100), 22 (50), 24 (30)	9 (20), 17 (100)
31	4 (20), 8 (100)	5 (20), 17 (100), 24 (80)	6 (20), 18 (100), 25 (80)
32	10 (100), 21 (35), 26 (50), 31 (40)	11 (20), 22 (100), 27 (70)	12 (40), 22 (100)
33	7 (100), 22 (40), 31 (30)	8 (25), 16 (16), 24 (20)	9 (20), 17 (100)
34	10 (100)	11 (40), 21 (100), 27 (70)	12 (30), 22 (100)
35	7 (100), 31 (30)	8 (30), 16 (100), 31 (20)	9 (20), 17 (100)
36	7 (30), 16 (100), 21 (50), 31 (65)	8 (25), 17 (100), 22 (50)	9 (30), 17 (100)
37	10 (70), 21 (60), 26 (100)	11 (20), 22 (100), 27 (70)	12 (40), 22 (100), 29 (30)
38	7 (40), 16 (100), 21 (50), 31 (100)	8 (20), 17 (100), 22 (50), 24 (30)	9 (20), 17 (100)
39	7 (30), 16 (100), 21 (50), 31 (70)	8 (20), 17 (100), 22 (50)	9 (40), 17 (100)
40	7 (30), 16 (100), 21 (50), 31 (50)	8 (20), 17 (100), 22 (50)	9 (40), 17 (100)
41	7 (40), 16 (100), 21 (50), 31 (90)	8 (30), 17 (100), 22 (10)	9 (30), 17 (100), 24 (60)
42	10 (100), 21 (40)	11 (20), 22 (100), 27 (75)	12 (30), 22 (100)
43	10 (100), 21 (40)	11 (20), 22 (100), 27 (80)	12 (30), 22 (100)
44	10 (100), 21 (45)	11 (25), 22 (100), 27 (70)	12 (25), 22 (100)
45	4 (100), 171(60)	5 (100), 170 (70)	6 (80), 169 (100)
46	4 (10), 8 (100), 16 (50), 23 (60)	5 (2), 9 (20), 10 (35), 17 (90), 24 (100)	6 (55), 18 (100)
47	10 (100), 21 (60), 26 (50)	11 (20), 22 (100), 27 (70)	12 (15), 22 (100)
48	7 (30), 16 (100), 21 (50), 31 (70)	8 (20), 17 (100), 22 (50), 24 (30)	9 (20), 17 (100)
49	10 (100), 26 (20)	11 (25), 22 (100), 27 (80)	12 (30), 22 (100)
50	7 (100), 30 (30), 31 (95)	8 (20), 17 (100), 22 (50)	9 (20), 17 (100)
51	10 (100)	11 (60), 22 (100)	12 (30), 22 (100)
52	4 (20), 8 (100)	5 (10), 9 (30), 17 (100), 24 (80)	6 (20), 18 (100), 25 (70)
53	7 (30), 16 (100), 21 (50), 31 (45)	8 (20), 17 (100), 21 (50), 24 (30)	9 (20), 17 (100)
54	7 (90), 16 (85), 21 (40), 31 (100)	8 (20), 17 (100), 21 (45), 24 (25)	9 (20), 17 (100)
55	4 (10), 8 (100), 17 (80), 22 (50)	5 (1), 9 (100), 17 (70), 24 (70)	6 (40), 18 (100), 25 (80)
56	10 (100), 21 (90), 228 (80)	11 (10), 22 (100), 27 (95)	12 (30), 22 (100)
57	4 (20), 8 (100), 16 (70), 23 (70)	5 (2), 9 (20), 10 (40), 17 (95), 24 (100)	6 (30), 18 (100), 25 (80)
58	7 (30), 16 (100), 21 (45), 31 (60)	8 (20), 17 (100), 22 (40), 24 (30)	9 (30), 22 (100), 24 (50)

59	7 (40), 16 (80), 21 (40), 31 (100)	8 (20), 17 (200), 22 (50), 24 (25)	9 (15), 17 (100)
60	7 (30), 16 (100), 21 (40), 31 (40)	8 (20), 17 (100), 22 (40), 24 (20)	9 (55), 17 (100)
61	10 (65), 21 (100), 26 (50), 31 (30)	11 (20), 22 (100), 27 (65)	12 (25), 22 (100), 29 (20)
62	4 (10), 8 (100), 17 (990), 22 (50), 24 (25)	5 (2), 9 (100), 17 (80), 24 (65)	6 (40), 18 (100), 25 (80)
63	4 (20), 8 (100), 17 (40)	5 (2), 9 (100), 17 (90), 24 (85)	6 (10), 10 (30), 18 (100), 25 (80)
64	10 (70), 21 (70), 26 (100)	11 (20), 22 (100), 27 (60)	12 (30), 22 (100)
65	4 (15), 8 (100), 17 (80), 22 (40), 24 (20)	5 (2), 9 (90), 17 (100), 24 (80)	6 (20), 18 (100), 25 (50)
66	7 (80), 16 (100), 21 (50), 31 (40)	11 (20), 17 (100), 22 (50), 24 (25)	9 (60), 17 (100)
67	7 (50), 16 (100), 21 (20), 31 (100)	8 (20), 17 (100), 22 (50), 24 (25)	9 (50), 17 (100)
68	7 (20), 30 (30), 31 (100)	8 (20), 17 (100), 22 (50), 24 (30)	9 (20), 17 (100), 24 (60)
69	7 (30), 16 (80), 21 (40), 31 (100)	8 (20), 17 (100), 22 (50), 24 (30)	9 (20), 17 (100)
70	10 (100), 257 (50), 26 (100)	11 (20), 22 (100), 27 (65)	12 (50), 22 (100)
71	4 (20), 8 (100), 22 (40), 24 (20)	5 (2), 9 (100), 17 (75), 24 (60)	6 (40), 18 (100), 25 (70)
72	7 (25), 31 (100)	8 (20), 17 (100), 22 (45), 24 (30)	9 (20), 17 (100), 24 (50)
73	10 (55), 21 (100), 228 (50)	11 (20), 22 (100), 27 (60)	12 (30), 22 (100)
74	7 (20), 30 (30), 31 (100)	8 (20), 17 (100), 22 (50), 24 (25)	9 (20), 17 (100), 24 (50), 31 (30)
75	7 (100), 22 (40), 31 (30)	8 (20), 16 (100), 24 (30)	9 (20), 17 (100)
76	10 (100)	11 (35), 21 (100), 27 (60)	12 (25), 22 (100)
77	10 (100)	11 (25), 22 (100), 27 (65)	12 (30), 22 (100)
78	10 (100)	11 (10), 22 (85), 27 (100)	12 (30), 22 (100)
79	1 (35), 13 (70), 16 (100), 31 (75), 32 (50)	2 (30), 14 (70), 17 (100)	3 (95), 14 (100), 20 (75)
80	7 (30), 16 (90), 21 (40), 31 (100)	8 (20), 17 (100), 22 (40), 24 (30)	9 (80), 17 (100)
81	1 (30), 13 (70), 16 (100) 31 (50), 32 (40)	2 (20), 14 (70), 17 (100)	3 (30), 14 (100), 20 (50)
82	1 (30), 13 (80), 16 (100), 31 (80), 32 (55)	2 (30), 14 (80), 17 (100)	3 (40), 14 (100), 20 (75)
83	1 (20), 30 (50), 31 (100), 32 (65)	2 (20), 14 (75), 17 (100)	3 (20), 14 (100), 20 (80), 27 (60)
84	1 (30), 13 (70), 16 (100), 31 (30)	2 (20), 14 (75), 17 (100)	3 (35), 14 (100), 20 (80), 28 (50)
85	1 (30), 13(75), 16 (100)	2 (20), 14 (70), 17 (100)	3 (20), 14 (100), 20 (40)
86	1 (35), 13 (70), 16 (100), 31 (60)	2 (30), 14 (70), 17 (100)	3 (50), 14 (100), 20 (70), 28 (40)

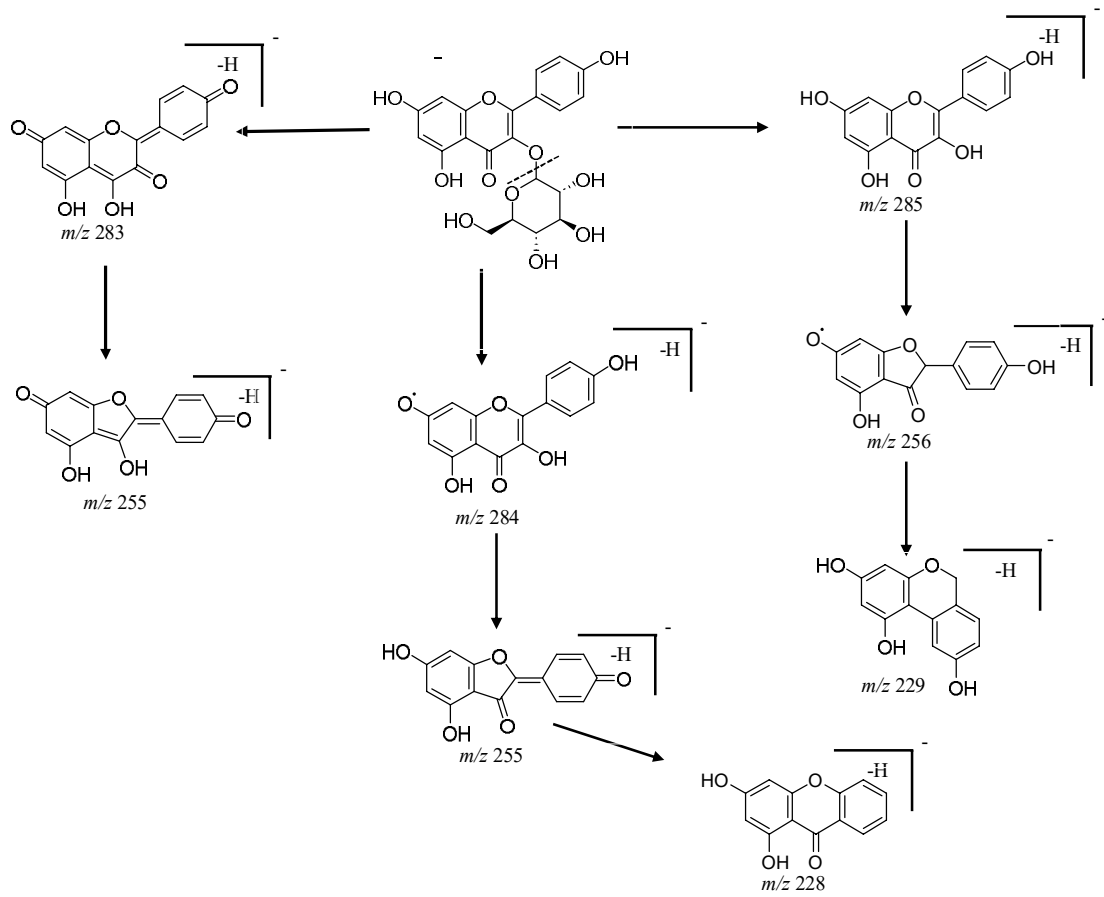
Aglykoni-ionien fragmentoitumisen perusteella voidaan saada selvää sokereiden liittymiskohdasta tai sokerin tyypistä (Kuva 7 ja 8). Kversetiini johdannaisilla sokerin tyypillä ei ollut niin isoa vaikutusta syntyneisiin fragmentteihin tai niiden intensiteetteihin kuin kemferoli- ja isoramnetiini johdannaisten kohdalla. Puhdasaineiden ja kasviuutteiden aglykoni-ionien fragmentoituminen noudatti pääasiassa samaa kaavaa, mutta pieniä eroja oli havaittavissa. Hapettunut aglykoni-ioni fragmentoitui kaikilla yhdisteryhmillä substituutioista huolimatta samalla kaavalla.

Puhdasaineista huomattiin, että 7-*O*-glykosidien aglykoniradikaali-ioni noudatti RDA-fragmentaatiota ja spektristä havaittiin fragmentaatiolle tunnusomainen flavonolifragmentti m/z -arvolla 151. Kyseisellä m/z -arvolla ei havaittu intensiivistä signaalia 3-*O*-glykosideilla tai edes robiniinilla, jossa on sokeri liittynyt myös 7-asemaan.

Kasviuutteiden aglykoni-ionien fragmentoitumista tarkastellessa nähtiin, että suurimman osan yhdisteiden ionien fragmentoituminen noudatti vastaavien yhdisteryhmien 3-*O*-glykosidien fragmentoitumista pääasiassa. Näihin havaintoihin perustuen 7-*O*-glykosideja vastaavaa fragmentaatiota ei havaittu kasviuutteissa.



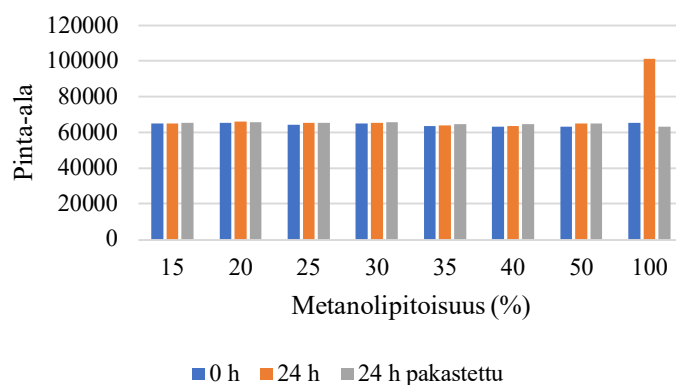
Kuva 7. Kemferoli-7-*O*-glukosidin aglykoni-, aglykoniradikaali-ionin, ja hapettuneen aglykoni-ionin tuottamat pääfragmentit.



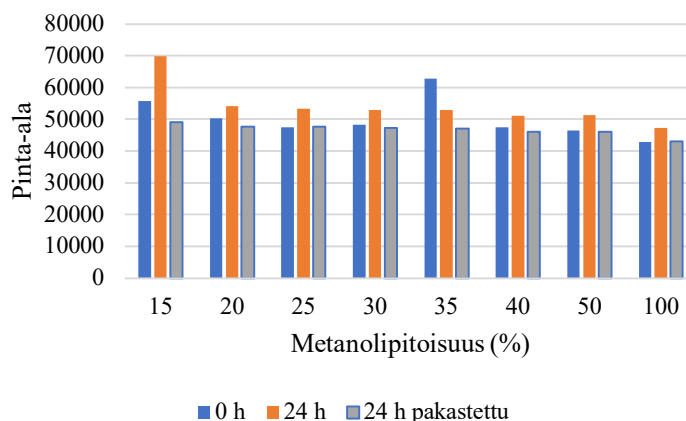
Kuva 8. Kemferoli-3-*O*-glukosidin aglykoni-, aglykoniradikaali-ionin, ja hapettuneen aglykoni-ionin tuottamat pääfragmentit.

3.3 Liukoisuus

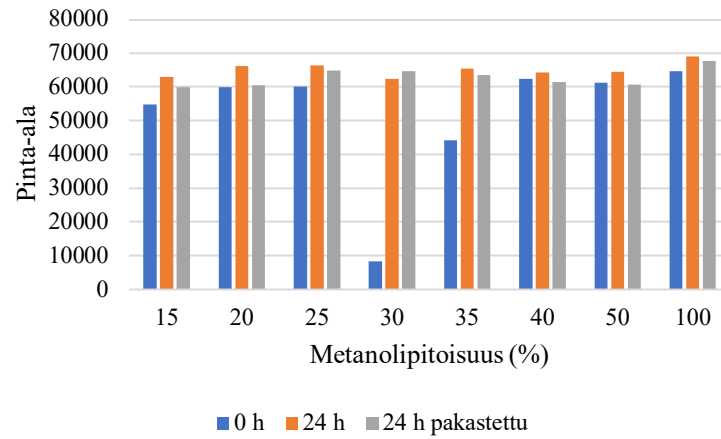
Liukoisuutta tarkasteltiin kversetiini-3-*O*-glukuronidista, rutiinista, kversetiini-3,4'-di-*O*-glukosidista, kemferoli-7-*O*-neohesperidosidesta, kemferoli-3-*O*-ramnosidista, kemferoli-7-*O*-glukosidista sekä myrisetiini-3-*O*-galaktosidista (kuva 8–14).



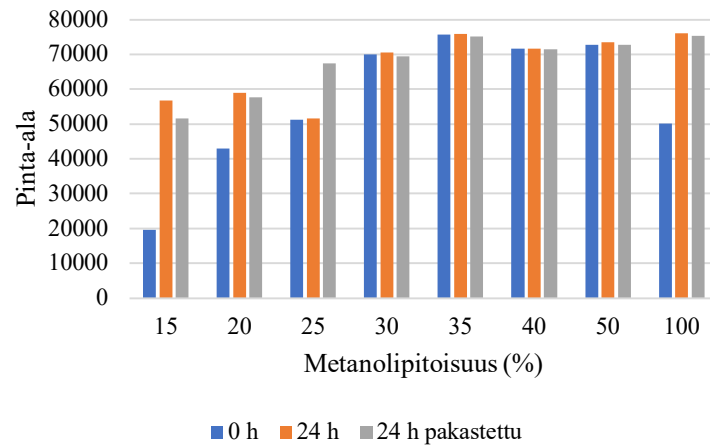
Kuva 9. Rutiinin liukoisuus eri metanolipitoisuuksissa analysoituina heti, vuorokauden kuluttua samasta vialista sekä vuorokauden kuluttua, kun näyte on pakastettu.



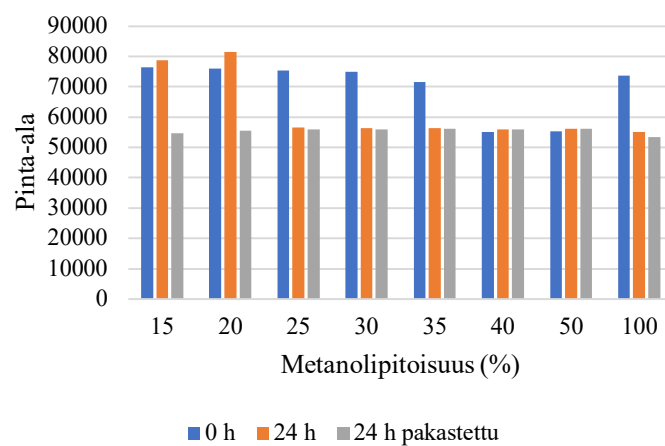
Kuva 10. Kversetiini-3-*O*-glukuronidin liukoisuus eri metanolipitoisuuksissa analysoituina heti, vuorokauden kuluttua samasta vialista sekä vuorokauden kuluttua, kun näyte on pakastettu.



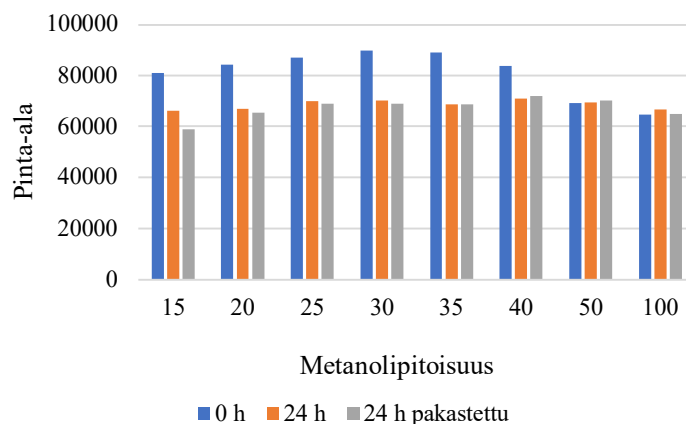
Kuva 11. Kversetiini-3,4'-di-*O*-glukosidin liukoisuus eri metanolipitoisuuksissa analysoituna heti, vuorokauden kuluttua samasta vialista sekä vuorokauden kuluttua, kun näyte on pakastettu.



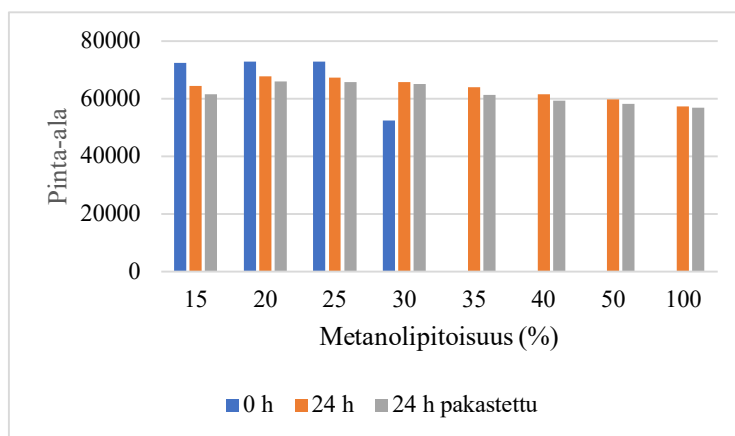
Kuva 12. Kemferoli-7-*O*-neohesperidosidin liukoisuus eri metanolipitoisuuksissa analysoituna heti, vuorokauden kuluttua samasta vialista sekä vuorokauden kuluttua, kun näyte on pakastettu.



Kuva 13. Kemferoli-3-*O*-ramnosidin liukoisuus eri metanolipitoisuuksissa analysoituna heti, vuorokauden kuluttua samasta vialista sekä vuorokauden kuluttua, kun näyte on pakastettu.



Kuva 14. Kemferoli-7-*O*-glukosidin liukoisuus eri metanolipitoisuuksissa analysoituna heti, vuorokauden kuluttua samasta vialista sekä vuorokauden kuluttua, kun näyte on pakastettu.

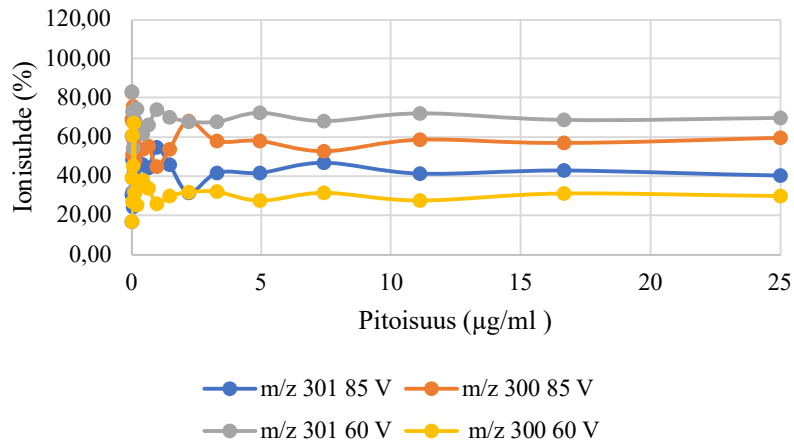


Kuva 15. Myrisetiini-3-*O*-galaktosidin liukoisuus eri metanolipitoisuuksissa analysoituna heti, vuorokauden kuluttua samasta vialista sekä vuorokauden kuluttua, kun näyte on pakastettu.

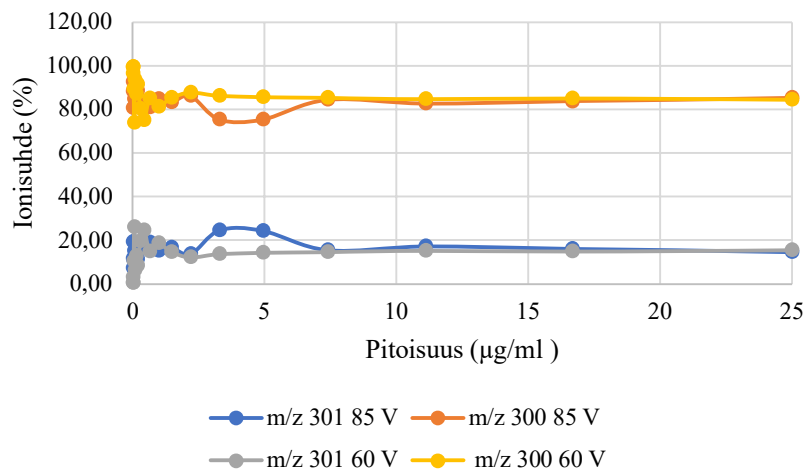
Saatiin selville, että kversetiini johdannaisilla liukoisuus pysyi melko tasaisena mittausajankohdasta ja metanolipitoisuudesta riippumatta. Kemferolijohdannaisilla havaittiin enemmän eroja mittausajankohdan ja liuottimen vahvuuden vaikutuksesta. Kaikkien yhdisteiden kohdalla todettiin, että 40 % ja 50 % liuoksilla liukoisuus pysyi tasaisena mittausajankohdasta riippumatta. Näillä pitoisuuksilla myös kromatografia pysyi hyvänä ja piikit havaittiin terävinä.

3.4 Pitoisuuden vaikutus ionisuhteisiin

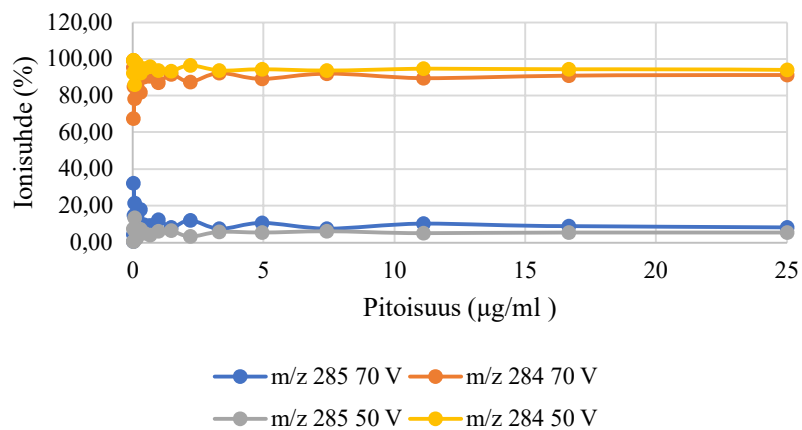
Pitoisuuden vaikutusta syntyviin ionisuhteisiin tarkasteltiin laimennossarjoista lasketuista ionisuhteista ja ionisuhdekuvaajista. Vaikutusta arvioitiin MRM- menetelmillä (kuvat 16–23) sekä täysskannausmenetelmällä (kuvat 24–31) saadusta datasta.



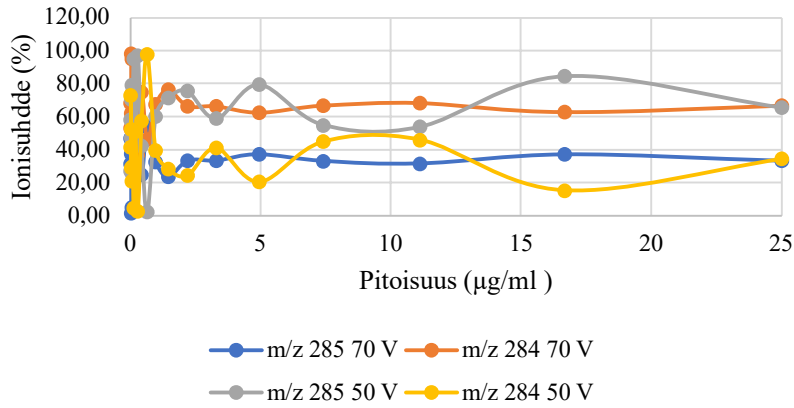
Kuva 16. Kversetiini-3,4'-di-*O*-glukosidin aglykoni- ja glykoniradikaali-ionien suhteet eri pitoisuuksissa, kun käytettiin MRM-menetelmiä pienemmille ja suuremmille yhdisteille.



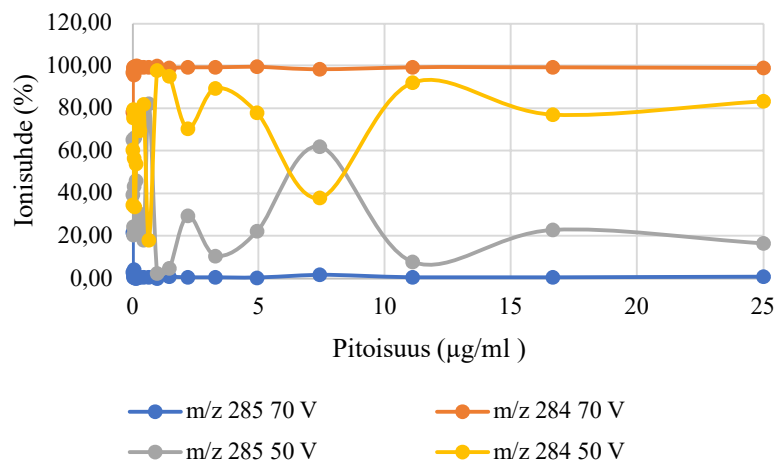
Kuva 17. Rutiinin aglykoni- ja glykoniradikaali-ionien suhteet eri pitoisuuksissa, kun käytettiin MRM-menetelmiä pienemmille ja suuremmille yhdisteille.



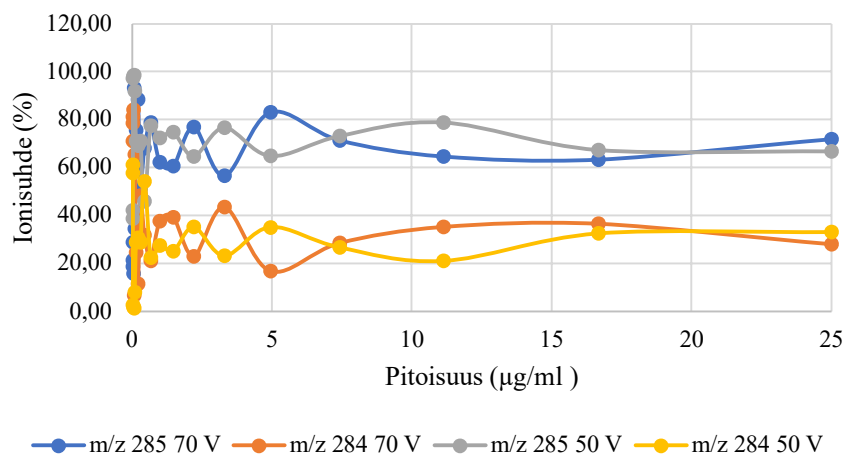
Kuva 18. Kemferoli-3-*O*-ramnosidin aglykoni- ja glykoniradikaali-ionien suhteet eri pitoisuuksissa, kun käytettiin MRM-menetelmiä pienemmille ja suuremmille yhdisteille.



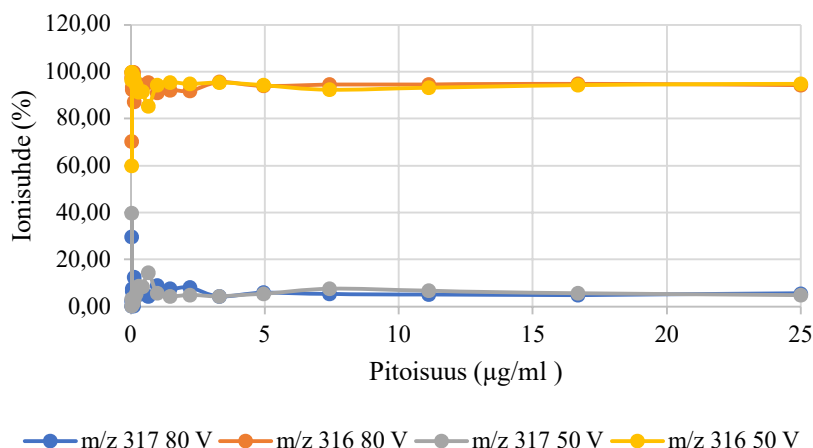
Kuva 19. Kemferoli-7-*O*-neohesperidosidin aglykoni- ja glykoniradikaali-ionien suhteet eri pitoisuuksissa, kun käytettiin MRM-menetelmiä pienemmille ja suuremmille yhdisteille.



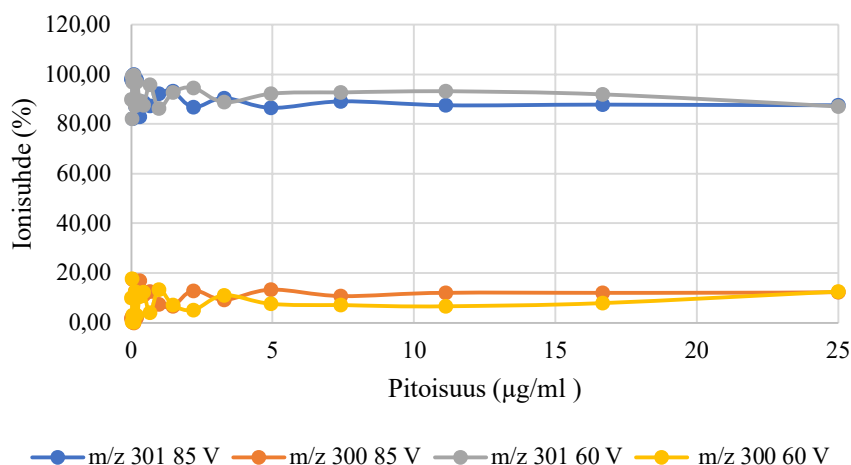
Kuva 20. Robiniinin aglykoni- ja glykoniradikaali-ionien suhteet eri pitoisuuksissa, kun käytettiin MRM-menetelmiä pienemmille ja suuremmille yhdisteille.



Kuva 21. Kemferoli-7-*O*-glukosidin aglykoni- ja glykoniradikaali-ionien suhteet eri pitoisuuksissa, kun käytettiin MRM-menetelmiä pienemmille ja suuremmille yhdisteille.



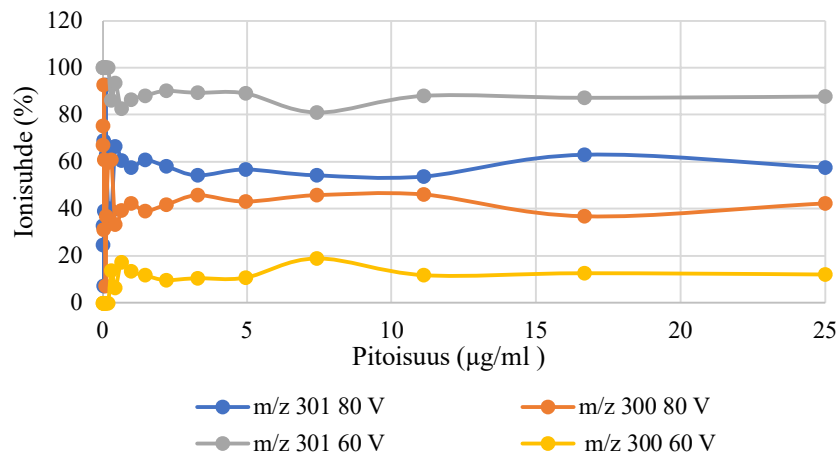
Kuva 22. Myrisetiini-3-*O*-ramnosidin aglykoni- ja glykoniradikaali-ionien suhteet eri pitoisuuksissa, kun käytettiin MRM-menetelmiä pienemmille ja suuremmille yhdisteille.



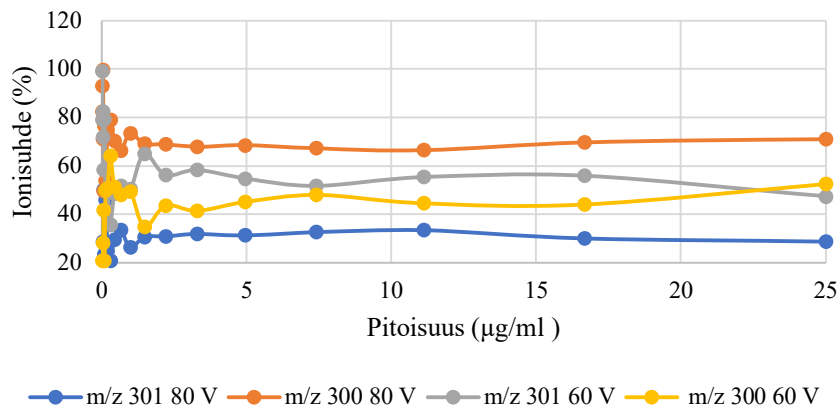
Kuva 23. Kversetiini-7-*O*-glukosidin aglykoni- ja glykoniradikaali-ionien suhteet eri pitoisuuksissa, kun käytettiin MRM-menetelmiä pienemmille ja suuremmille yhdisteille.

MRM-menetelmillä kversetiini-3,4'-*di-O*-glukosidilla 85 V kartiojännitteellä ionisuhteet tasaantuivat 2,19 µg/ml pitoisuudessa 30:70 tasolle. 60 V kartiojännitteellä ionisuhteet tasaantuivat puolestaan 0,9 µg/ml pitoisuudessa liian matalan kartiojännitteen takia 70:30 tasolle. Rutiinin kohdalla 85 V kartiojännitteellä 0,05 µg/ml luokkaa oleva pitoisuus riitti ionisuhteiden vakiintumiseen 30:70 tasolle ja 60 V:lla 0,08 µg/ml pitoisuus tuotti vastaavan ionisuhteen. Kemferoli-3-*O*-ramnosidilla 0,08 µg/ml riitti tasaamaan ionisuhteen 10:90 tasolle 70 V ja 50 V kartiojännitteillä. Kemferoli-7-*O*-neohesperidosi vaati noin 1 µg/ml pitoisuuden ionisuhteen tasaamiseksi 70 V kartiojännitteellä ja suhde tasaantui noin 30:70 tasolle. 50 V kartiojännite vaati noin 11 µg/ml pitoisuuden ja ionisuhde tasaantui 70:30 tasolle. Robiniinilla 70 V kartiojännitteellä sopiva pitoisuus ionishteiden tasaantumiseen oli noin 0,02 µg/ml ionisuhteen ollessa 0:100. 50 V kartiojännite puolestaan vaati ionisuhteen vakiinnuttamiseksi noin 11 µg/ml pitoisuuden ja ionisuhde oli tällöin 10:90. Kemferoli-

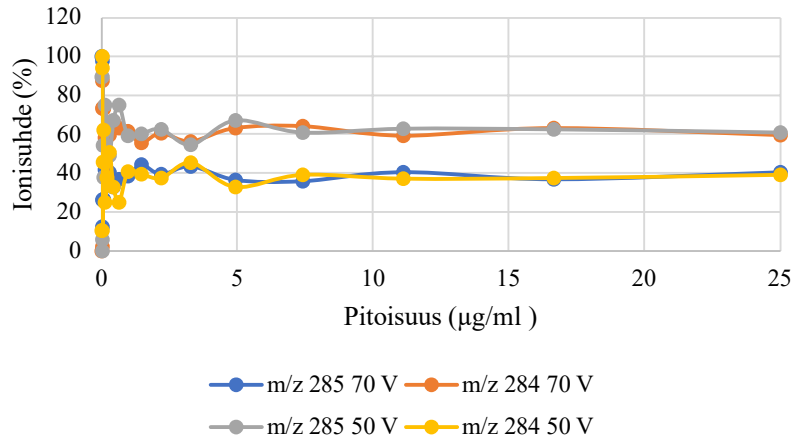
7-*O*-glukosidilla molemmat 70 V ja 50 V kartiojännite vaati noin 5 µg/ml pitoisuuden ionisuhteen tasaamiseksi tasolle 70:30. Myrsetiini-3-*O*-ramnosidilla kartiojännitteellä 80 V pitoisuuden tuli olla 0,2 µg/ml tasolla, jotta ionisuhde tasaantui. 50 V. kartiojännitteellä pienempi pitoisuus 0,025 µg/ml riitti. Molemmissa ionisuhde tasaantui 0:100 tasolle. Kversetiini-7-*O*-glukosidilla kartiojännitteellä 85 V ja 60 V molemmilla 0,2 µg/ml riitti ionisuhteen tasaantumiseen 90:10 tasolle.



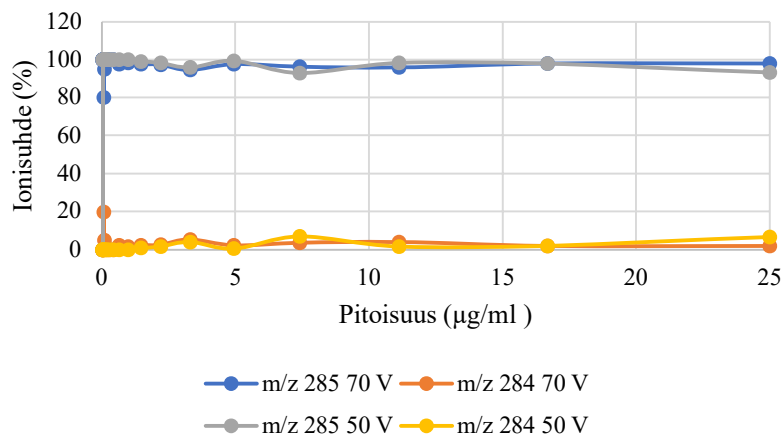
Kuva 24. Kversetiini-3,4'-di-*O*-glykosidin aglyconi- ja glykoniradikaali-ionien suhteet eri pitoisuuksissa, kun käytettiin täysskannausmenetelmää ja kartiojännitteitä, jotka vastaavat MRM-menetelmien kartiojännitteitä pienemmille ja suuremmille yhdisteille.



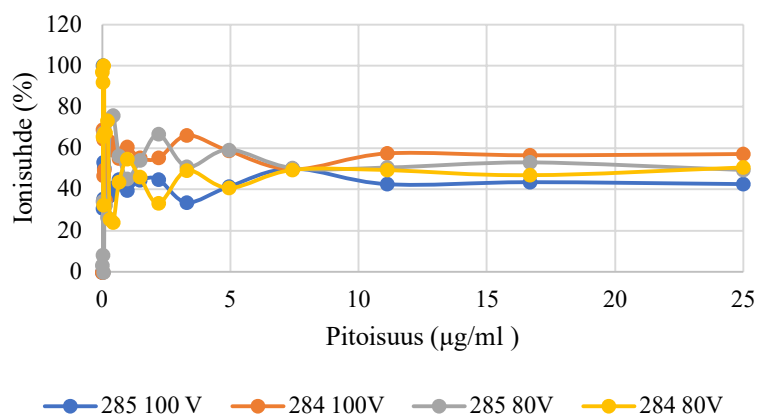
Kuva 25. Rutiinin aglyconi- ja glykoniradikaali-ionien suhteet eri pitoisuuksissa, kun käytettiin täysskannausmenetelmää ja kartiojännitteitä, jotka vastaavat MRM-menetelmien kartiojännitteitä pienemmille ja suuremmille yhdisteille.



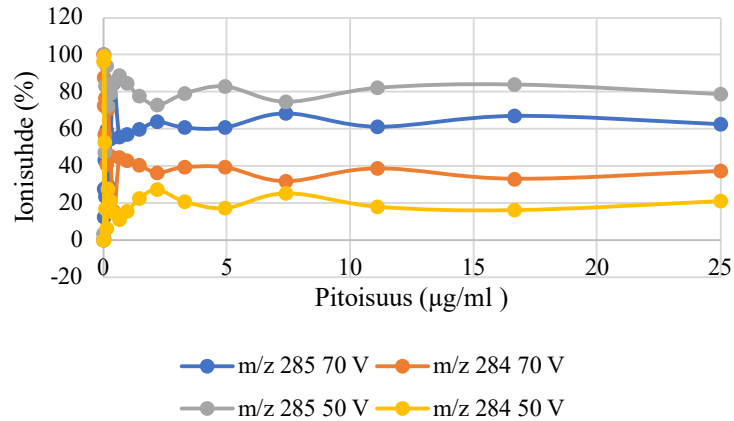
Kuva 26. Kemferoli-3-*O*-ramnosidin aglykoni- ja glykoniradikaali-ionien suhteet eri pitoisuuksissa, kun käytettiin täysskannausmenetelmää ja kartiojännitteitä, jotka vastaavat MRM-menetelmien kartiojännitteitä pienemmille ja suuremmille yhdisteille.



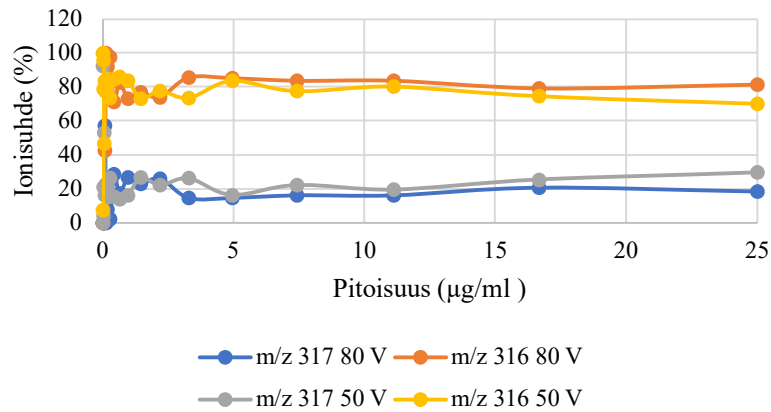
Kuva 27. Kemferoli-7-*O*-neohesperidosidin aglykoni- ja glykoniradikaali-ionien suhteet eri pitoisuuksissa, kun käytettiin täysskannausmenetelmää ja kartiojännitteitä, jotka vastaavat MRM-menetelmien kartiojännitteitä pienemmille ja suuremmille yhdisteille.



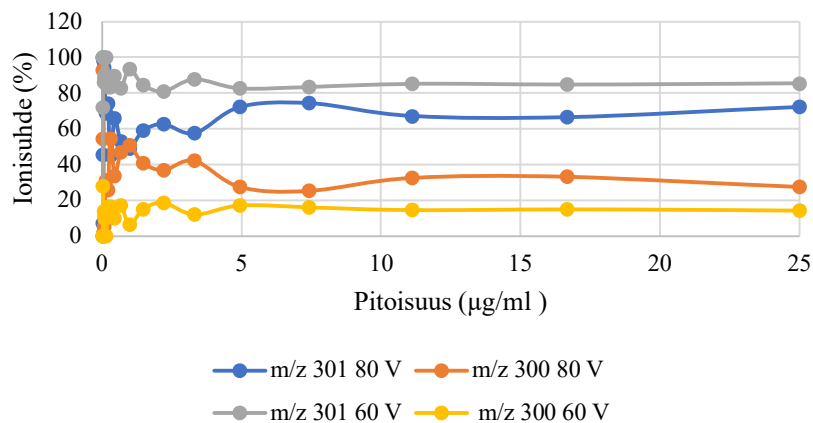
Kuva 28. Robiniinin aglykoni- ja glykoniradikaali-ionien suhteet eri pitoisuuksissa, kun käytettiin täysskannausmenetelmää ja kartiojännitteitä, jotka vastaavat MRM-menetelmien kartiojännitteitä pienemmille ja suuremmille yhdisteille.



Kuva 29. Kemferoli-7-*O*-glukosidin aglykoni- ja glykoniradikaali-ionien suhteet eri pitoisuuksissa, kun käytettiin täysskannausmenetelmää ja kartiojännitteitä, jotka vastaavat MRM-menetelmien kartiojännitteitä pienemmille ja suuremmille yhdisteille.



Kuva 30. Myrisetiini-3-*O*-ramnosidin aglykoni- ja glykoniradikaali-ionien suhteet eri pitoisuuksissa, kun käytettiin täysskannausmenetelmää ja kartiojännitteitä, jotka vastaavat MRM-menetelmien kartiojännitteitä pienemmille ja suuremmille yhdisteille



Kuva 31. Kversetiini-7-*O*-glukosidin aglykoni- ja glykoniradikaali-ionien suhteet eri pitoisuuksissa, kun käytettiin täysskannausmenetelmää ja kartiojännitteitä, jotka vastaavat MRM-menetelmien kartiojännitteitä pienemmille ja suuremmille yhdisteille.

Täysskannausmenetelmällä kversetiini-3,4'-di-*O*-glukosidi tarvitsi 80 V kartiojännitteellä ionisuhteen vakiinnuttamiseksi 60:40 tasolle 0,43 µg/ml pitoisuuden. 60 V kartiojännitteellä pitoisuuden tuli olla 0,28 µg/ml ja ionisuhde vakiintui tasolle 10:90. Rutiinin kohdalla 80 V kartiojännitteellä 0,43 µg/ml pitoisuus tasasi ionisuhteen 30:70 tasolle. 60 V kartiojännite vaati 1,46 µg/ml pitoisuuden ja ionisuhde tasaantui 65:35 tasolle. Kemferoli-3-*O*-ramnosidilla 70 V kartiojännitteellä luotettavan ionisuhteen saamiseksi tarvittiin 0,29 µg/ml pitoisuus, jolloin ionisuhde oli 40:60 tasolla. 50 V kartiojännite tarvitsi 0,97 µg/ml pitoisuuden ja ionisuhde tasaantui 60:40. Kemferoli-7-*O*-neohesperidosidilla 70 V kartiojännitteellä ionisuhde tasaantui 100:0 tasolle, kun pitoisuus ylitti 0,085 µg/ml. Vastaavalle tasolle ionisuhde tasaantui 50 V kartiojännitteellä, kun pitoisuus oli 0,03 µg/ml. Robiniinin kohdalla täysskannauksesta ei saatu integroitua piikkien pinta-aloja 70 V ja 50 V kartiojännitteillä, koska signaalit olivat niin heikkoja. Käytettiin 100 V kartiojännitettä, joka vaati noin 4,9 µg/ml pitoisuuden ionisuhteen vakiinnuttamiseksi tasolle 40:60. 80 V kartiojännitteellä vaadittiin sama pitoisuus luotettavan ionisuhteen saamiseksi, mikä oli 50:50. Kemferoli-7-*O*-glukosidilla 70 V kartiojännite tarvitsi noin 0,65 µg/ml pitoisuuden, että ionisuhde tasaantui 60:40 tasolle. 50 V kartiojännitteellä pienempi pitoisuus 0,19 µg/ml riitti vakaan 70:30 ionisuhteen luomiseksi. Myrisetiini-3-*O*-glukosidilla 80 V kartiojännite tarvitsi pitoisuudeksi vähintään 0,43 µg/ml vakaan 20:80 ionisuhteen saamiseksi. Vastaava tasainen ionisuhde saatiin 50 V kartiojännitteellä samassa pitoisuudessa. Kversetiini-7-*O*-glukosidilla 1,46 µg/ml pitoisuus riitti ionisuhteen tasaamiseen 60:40 tasolle. 60 V kartiojännitteelle 0,97 µg/ml riitti ja ionisuhde tasaantui 80:20 tasolle.

Taulukko 14. MRM-menetelmiltä havaittu pitoisuus, jossa aglykoni- ja galykoniradikaalionien suhde alkoi tasaantumaan, sekä tässä pisteessä saavutettu ionisuhde, kun käytettiin S ja N kokoisten yhdisteiden kartiojännitteitä.

Yhdiste	Kartiojännite (V)	Pitoisuus (µg/ml)	ionisuhde
Kversetiini-3,4'-di- <i>O</i> -glukosidi	85	2,19	30:70
	60	0,9	70:30
Rutiini	85	0,05	20:80
	60	0,08	20:80
Kversetiini-7- <i>O</i> -glukosidi	85	0,2	90:10
	60	0,2	90:10
Kemferoli-3- <i>O</i> -ramnosidi	70	0,08	10:90
	50	0,08	10:90
Kemferoli-7- <i>O</i> -neohesperidosidi	70	1	30:70
	50	1	70:30
Kemferoli-7- <i>O</i> -glukosidi	70	5	70:30
	50	5	7:30
Robiniini	70	0,02	0:100
	50	11	10:90
Myrisetiini-3- <i>O</i> -ramnosidi	80	0,2	0:100
	50	0,03	0:100

Taulukko 8. Täysskannausmenetelmällä havaittu pitoisuus, jossa aglykoni- ja galykoniradikaalionien suhde alkoi tasaantumaan, sekä tässä pisteessä saavutettu ionisuhde, kun käytettiin MRM-menetelmien S ja N kokoisille yhdisteille vastaavia kartiojännitteitä.

Yhdiste	Kartiojännite (V)	Pitoisuus (µg/ml)	ionisuhde
Kversetiini-3,4'-di- <i>O</i> -glukosidi	80	0,43	60:40
	60	0,28	10:90
Rutiini	80	0,43	30:70
	60	1,46	65:35
Kversetiini-7- <i>O</i> -glukosidi	80	1,46	60:40
	60	0,97	80:20
Kemferoli-3- <i>O</i> -ramnosidi	70	0,29	40:60
	50	0,97	60:40
Kemferoli-7- <i>O</i> -neohesperidosidi	70	0,09	100:0
	50	0,03	100:0
Kemferoli-7- <i>O</i> -glukosidi	70	0,65	60:40
	50	0,19	70:30
Robiniini	100	4,9	40:60
	80	4,9	50:50
Myrisetiini-3- <i>O</i> -ramnosidi	80	0,43	20:80
	50	0,43	20:80

Pitoisuudella oli vaikutusta siihen, kuinka luotettava ionisuhde on. Osalla yhdisteillä, esimerkiksi MRM-menetelmällä kemferoli-7-*O*-glykosidilla ja robiniinilla, missä on myös 7 asemassa sokeri, tarvittiin selvästi korkeampi pitoisuus siihen, että ionisuhde tasaantui (taulukko 14 ja 15). Lähtökohtaisesti MRM-menetelmällä riitti pienemmät pitoisuudet, pois lukien kemferoli-7-*O*-neohesperidosidi, joka käyttäytyi epäjohdonmukaisesti testissä. Pitoisuuden kasvaessa ionisuhteet pysyivät pääsääntöisesti tasaisina 25 µg/ml saakka. MRM-menetelmällä suhde pysyi pitoisuuden kasvaessa vakaampana kaikilla yhdisteillä. Täysskannausmenetelmällä rutiinin kohdalla 60 V kartiojännitteellä ionisuhde lähtee vielä muuttumaan pitoisuuden lähestyessä 25 µg/ml, mutta muutos tapahtuu ionisuhteiden osalta ”odotettuun” suuntaan. Tuloksista voidaan todeta, että liian pieni kartiojännite yhdessä matalan pitoisuuden kanssa antaa vääristyneen kuvan ionisuhteista.

3.5 Syntyvien ionisuhteiden laskennallinen mallinnus

Laskennallisella mallilla voidaan painottaa sitä, kuinka yhdisteiden antamat vasteet vaikuttavat lopulliseen ionisuhteeseen. Yhdiste, jolla on korkea vaste voi vaikuttaa seoksesta havaittavaan ionisuhteeseen, vaikka sen pitoisuus on muita yhdisteitä pienempi.

Puhdasaineista MRM-menetelmillä saatujen piikkien pinta-alat integroitiin ja vasteet normalisoitiin niin, että aglykoni-ionien ja aglykoniradikaali-ionien vasteet saivat arvot välille 0–100 % (taulukko 16).

Taulukko 16. Normalisoidut vasteet aglykoni- ja aglykoniradikaali-ionille kversetiinipuhdasaineille.

Yhdiste	Normalisoitu aglykoni-ioni (%)	Normalisoitu radikaali-ioni (%)
Rutiini	15,18	75,12
kversetiini-7- <i>O</i> -glukosidi	12,45	1,17
kversetiini-3,4'-di- <i>O</i> -glukosidi	35,64	42,12
kversetiini-3- <i>O</i> -glukopyranosidi	12,46	59,40
Kversetiini-3- <i>O</i> -asetyyli-glukosidi	15,41	100,00
Hyperosidi	11,31	59,34
Kversetiini	7,34	0,15

Kun saman yhdisteryhmän yhdisteille annettiin hypoteettisia pitoisuuksia, saatiin laskettua teoreettinen ionisuhde kertomalla pitoisuus normalisoidulla prosenttiosuudella jaettuna sadalla. Pystyttiin tarkastelemaan millaisilla yhdisteseoksilla voi saada samanlaisen ionisuhteen aikaiseksi (taulukko 17).

Kversetiinijhdannaisista nähtiin, että aglykoni-onia enemmän tuottavien yhdisteiden normalisoidut osuudet pysyivät suhteessa pienempinä, kun verrattiin aglykoniradikaali-onia

tuottaviin 3-*O*-glykosideihin. Taulukosta 17 huomataan, kun yhdisteille annettiin hypoteettisia pitoisuuksia ja painotettiin enemmän aglykoni-onia tuottavia yhdisteitä, oli ionisuhde silti aglykoniradikaali-ioni voittainen.

Taulukko 17. Yhdisteille annetut hypoteettiset pitoisuudet, joiden avulla laskettiin aglykoni- ja aglykonidarikaali-ionin suhteelliset osuudet.

Yhdiste	Pitoisuus (mg/g)	Aglykoni-ionin suhteellinen osuus	Aglykoniradikaali-ionin suhteellinen osuus
Rutiini	5	0,76	3,76
kversetiini-7- <i>O</i> -glukosidi	50	6,23	0,58
kversetiini-3,4'-di- <i>O</i> -glukosidi	40	14,26	16,85
kversetiini-3- <i>O</i> -glukopyranosidi	15	1,87	8,91
Kversetiini-3- <i>O</i> -6''-asetyyli-glukosidi	10	1,54	10,00
Hyperosidi	20	2,26	11,87
Kversetiini	30	2,20	0,045

Ionisuhde: 36:64

Myös kemferolin kohdalla, josta tutkimuksessa oli mukana kaupallisia malliyhdisteitä, joissa sokerit olivat liittyneet eri kohtiin, oli tilanne samankaltainen. Ionisuhde pysyi aglykoniradikaali-ionin puolella ja 7-*O*- ja di-*O*-glykosidien vaikutus oli hyvin pieni, vaikka näille yhdisteille olisi antanut suuremmat pitoisuudet.

Luonnossa esiintyvistä flavonolimonoglykosideista suurin osa esiintyy 3-*O*-glykosideina.⁴⁸ Tämä tarkoittaa sitä, että kasviuutteissa esiintyvissä yhdisteissä 7-*O*-glykosidien vaikutus jää huomattavasti pienemmäksi ja ionisuhteet kääntyvät helposti aglykoniradikaali-ionin puolelle.

4 Yhteenveto ja johtopäätökset

Kartiojännitteen todettiin vaikuttavan merkittävästi syntyviin ionisuhteisiin. Kartiojännitteen kasvaessa varsinkin flavonoliaglykonien ja 3-*O*-glykosidien ionisuhde muuttui aluksi selvästi dominoivasta aglykoni-ionista aglykoniradikaali-ionivoittoiseksi. Esimerkiksi kemferoli-3-*O*-rutinosidilla aglykoni-ionin osuus laski 90 %:sta 40 %:iin kartiojännitteen muuttuessa 40 V:sta 100 V:iin. 7-*O*-glykosideissa ionisuhde pysyi aglykoni-ionivoittoisena kartiojännitteestä riippumatta. 3,4'-diglykosideissa ionisuhteet vaihtelivat kartiojännitteen funktiona tavalla, joka muistutti 3-*O*- ja

7-*O*-glykosidien yhdistelmää. B-renkaan OH- ja OCH₃-ryhmien lukumäärän huomattiin myös vaikuttavan aglykoneista syntyneisiin ionisuhteisiin. Esimerkiksi kemferolijohdannaisilla, joilla B-renkaassa on vain yksi OH-ryhmä, ionisuhde oli tasaisempi verrattuna kversetiinin ja myrisetiinin di- ja trihydorksisubstituutioihin. Lisäksi osassa malliyhdisteistä nähtiin, että niiden rakenteiden aglykoniosat paitsi deprotonoituivat, niin myös hapettuivat, mikä havaittiin kaksi massayksikköä kevyemmästä aglykoni-ionista. Hapettumista havaittiin varsinkin 7-*O*-glykosideilla sekä monoglykosideilla, joissa on sokeri useammassa kohdassa. Hapettumisen nähtiin vääristävän aglykoni- ja aglykoniradikaali-ionin suhdetta. MRM-menetelmällä yhdisteet, jotka tuottivat runsaasti hapettunutta aglykoni-onia, saattoivat aglykoni-ionin ja aglykoniradikaali-ionin suhde erota täysskannausmenetelmällä saatuun suhteeseen.

Huomattiin, että yhdisteiden aglykoni- ja aglykoniradikaali-ioni fragmentoituivat eri tavalla riippuen siitä, oliko kyseessä 3-*O*- vai 7-*O*-glykosidi. Di-*O*-glykosidien pääfragmentit muistuttivat enemmän 3-*O*-glykosidin tuottamia fragmentteja. Hapettuneet aglykoni-ionit tuottivat yhdisteryhmän sisällä samoja pääfragmentteja, riippumatta sokerin laadusta tai sen liittymiskohdasta. PRM-menetelmällä saaduista aglykoni-ionien fragmentoitumistuloksista huomattiin, että fragmentit ja niiden suhteelliset intensiteetit saattoivat vaihdella yhdisteryhmän sisällä riippuen sokerin tyypistä sekä liittymiskohdasta. Tämä voi selittää osakseen tutkimuksessa havaittuja eroja MRM- ja täysskannausmenetelmällä saatuihin ionisuhteisiin kartiojännitteen lisäksi. Esimerkiksi kemferoli-3-*O*-rutinosidi ja isoramnetiini-3-*O*-rutinosidin ionisuhteet olivat muita 3-*O*-glykosideja tasaisemmat. Kun tarkasteltiin näiden yhdisteiden PRM-menetelmällä saatuja fragmentteja, poikkesivat ne hieman muiden saman yhdisteryhmän 3-*O*-glykosidien fragmentoitumisesta.

Yhdisteen pitoisuudella oli vaikutusta syntyviin ionisuhteisiin. Liian pieni pitoisuus vääristi aglykoni-ionin ja aglykoniradikaali-ionin välistä suhdetta. Yhdessä liian pienen pitoisuuden ja kartiojännitteen kanssa ionisuhteista ei saada luotettavaa kuvaa.

Puhdasaineiden antamaa tietoa voidaan hyödyntää kasviuutteissa mahdollisesti esiintyvien yhdisteiden ionisuhteiden tulkinnessa ja rakenteiden tunnistuksessa. Laskennallinen malli, jossa painotetaan pitoisuuksia ja normalisoituja vasteita auttaa ymmärtämään miten erilaiset yhdisteseokset vaikuttavat ionisuhteisiin. Luonnossa esiintyvien flavonoliglykosidien fragmentoitumisen voidaan olettaa olevan malliyhdisteitä vastaavia, joten malliaineiden avulla saatua tietoa voidaan hyödyntää kasviuutteisiin. Kasviuutteet ovat kuitenkin monimutkaisia ja yhdisteet voivat antaa päällekkäisiä signaaleja sekä kasviuutteissa esiintyvät muut yhdisteet voi aiheuttaa kilpailua ionisaatiosta ja epätäydellistä fragmentaatiota. Nämä kaikki vaikuttavat myös syntyviin ionisuhteisiin. Lisäksi luonnossa voi esiintyä uusia tai harvinaisia flavonolijohdannaisia, joiden käyttäytymistä massaspektrometrilla malliyhdisteet eivät välttämättä kata.

Jos aglykoni- ja aglykoniradikaali-ionien välistä suhdetta halutaan käyttää yhdisteen rakenteen tutkimisessa apuna, on otettava huomioon edellä mainitut asiat. Kun pitoisuus on sopiva ja kartiojännite oikean suuruinen voidaan esimerkiksi MRM-menetelmillä saatuja ionisuhteita hyödyntää rakenteen ymmärtämisen tukena.

5 Viiteluettelo

1. Stavenga, D. G; Leertouwer, H. L; Dudek, B; van der Kooi C. J. Coloration of Flowers by Flavonoids and Consequences of pH Dependent Absorption. *Front. Plant Sci.* **2021**, 11:600124.
2. Emiliani, J; Grotewold, E; Ferreyra, M. L. F; Casati, P. Flavonols Protects Plants against UV-B Deleterious Effects. *Molecular Plant.* **2013**, 6, 1376–1379.
3. Kothari, D; Lee, W-D; Kim, S-K. Allium Flavonols: Health Benefits; Molecular Targets, and Bioavailability. *Antioxidants.* **2020**, 9, 888.
4. Kim, J-D; Liu, L; Guo, W, Meydani, M. Chemical structure of flavonols in relation to modulation of angiogenesis and immune-endothelial cell adhesion. *J. Nutr. Biochem.* **2006**, 17, 165–176.
5. Marais, J. P. J; Deavours, B; Dixon, R. A; Ferreira, D. The Stereochemistry of Flavonoids. Kirjassa The Science of Flavonoids. Grotewold, E. Springer; New York, Yhdysvallat, 2006, s. 1–3.
6. Thais, M. S; Almezgagi, M; Zhang, Y; Bashir, A; Abdullah, H. M; Gamah, M; Xiaozhou, W; Qinfang, Z; Xiangqun, S; Qianqian, M; Ali, M; Solangi, Z. A; Malik, W. S; Zhang, W. Mechanistic new insights of flavonols on neurodegenerative diseases. *Biomed. Pharmacother.* **2021**, 137, 111253.
7. Hollman, P. C. H; Arts, I, C. W. Flavonols, flavones and flavanols – nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food. Agr.* **2000**, 80, 1081–1093.
8. Daryanavard, H; Postiglione, A. E; Muhlemann, J. K; Muday, G. K. Flavonols modulate plant development, signaling and stress responses. *Curr. Opin. Plant Biol.* **2023**, 72, 102350.
9. Murkovic, M. Phenolic Compounds: Occurrence, Classes, and Analysis. Kirjassa Encyclopedia of Food and Health; Caballero, B; Finglas, P. M; Toldrá, F. Academic Press, **2016**, Pages 346–351,
10. Häkkinen, S; Auriola, S. High-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometry and diode array ultraviolet detection in the identification of flavonol aglycones and glycosides in berries. *J. Chromatogr. A.* **1998**, 829, 91–100.
11. Rodriguez De Luna, S. L; Ramirez-Graza, R. E; Saldivar, S. O. S. Environmentally Friendly Methods for Flavonoid Extraction from Plant Material: Impact of Their Operating Conditions on Yield and Antioxidant Properties. *Sci. World J.* **2020**, 38.
12. Liu; Fernie, A. R; Tohge, T. Diversification of chemical Structures of Methoxylated Flavonoids and Genes Encoding Flavonoid-O-Methyltransferases. *Plants.* **2022**, 11, 564
13. Wen, L; Jiang, Y, Yang, J; Zhao, Y; Tian, M, Yang, B. Structure bioactivity and synthesis of methylated flavonoids. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2017**, 1398, 120–129.
14. Magar, R. T; Sohng, J. K. A Review on Structure, Modifications and Structure-Activity Relation of Quercetin and Its Derivatives. *J. Microbiol. Biotechnol.* **2020**, 30, 11-20.
15. de Rijke, E; Out, P; Niessen, W. M. A; Arise, F; Gooijer, C; Brinkman, U. A. T. Analytical separation and detection methods for flavonoids. *J. Chromatogr. A.* **2006**, 1112, 31–63.

16. Pinheiro, P. F; Justino, G. C. Structural Analysis of Flavonoids and Related Compounds – A Review of Spectroscopic Applications. Kirjassa *Phytochemicals: A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health*. Rao, A., Toim. Toronto, Kanada, **2012**. s 33–56.
17. Downey, M. O; Rochfort, S. Simultaneous separation by reversed-phase high-performance liquid chromatography and mass spectral identification of anthocyanins and flavonols in Shiraz grape skin. *J. Chromatogr. A*. **2008**, 1201, 43–47.
18. Stefova, M; Stafilov, T. HPLC Analysis of Flavonoids. Kirjassa *Encyclopedia of Chromatography*. Cazes, J; Toim. Boca Raton, Florida, Yhdysvallat, **2004**, s. 183–195.
19. Vailaya, A; Horvath, C. Retention in reversed-phase chromatography: partition or adsorption. *J. Chromatogr. A*. **1998**, 829, 1–27.
20. de Rijke, E., *Trace-level determination of flavonoids and their conjugates: Application to plants of the Leguminosae family*. Väitöskirja, Vrije Universiteit Amsterdam, **2005**.
21. Sundqvist, G; Stenvall, M; Berglund, H; Ottosson, J; Brumer, H. A general, robust method for the quality control of intact proteins using LC-ESI-MS. *J. Chromatogr. B*. **2007**, 852, 188–194.
22. Li, Z-H; Guo, H; Xu, W-B; Ge, J; Li, X; Alimu, M; He, D-J. Rapid Identification of Flavonoid Constituents Directly from PTP1B Inhibitive Extract of Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Leaves by HPLC-ESI-QTOF-MS-MS. *J. Chromatogr. Sci.* **2016**, 54, 805–810
23. Pikulski, M; Brodbelt, J. S. Differentiation of flavonoid glycoside isomers by using metal complexation and electrospray ionization mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2003**, 14, 1337–1453.
24. Liigand, P; Kaupmees, K; Haav, K; Liigand, J; Leito, I; Girod, M; Antoine, R; Kruve, A. Think Negative: Finding the Best Electrospray Ionization/MS Mode for Your Analyte. *Anal. Chem.* **2017**, 89, 5665–5668.
25. March, R. E; Lewars, E. G; Stadey, C. J; Miao, X-S; Zhao, X; Metcalfe, C. D. A comparison of flavonoid glycosides by electrospray tandem mass spectrometry. *Int. J. Mass spectrom.* **2006**, 248, 61–85.
26. McLafferty, F. W. Tandem Mass Spectrometry. *Science*. **1981**, 214, 280–287.
27. Antoniewicz, M. R. Tandem mass spectrometry for measuring stable-isotope labeling. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2013**, 24, 48–53.
28. Cech, N. B. ja Enke, C. G., Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals, *Mass Spectrom. Rev.*, **2001**, 20, 362–387.
29. Ho, C.; Lam, C.; Chan, M.; Cheung, R.; Law, L.; Lit, L.; Ng, K.; Suen, M. ja Tai, H., Electrospray ionisation mass spectrometry: Principles and clinical applications, *Clin. Biochem. Rev.*, **2003**, 24, 3–12.
30. de Hoffmann, E. ja Stroobant, V., *Mass Spectrometry Principles and Applications*, Wiley, 3rd edition., **2007**. s. 43–46.

31. Gross, J. H., *Mass Spectrometry*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, **2017**. s. 723–769.
32. Banerjee, S; Mazumdar, S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int. J. Anal Chem.* **2012**, 2012, 282574.
33. Pereira, C. A. M; Yariwake, J. H; McCullagh, M. Distinction of the C-glycosylflavone isomer pairs orientin/isoorientin and vitexin/isovitexin using HPLC-MS exact mass measurement and in-source CID. *Phytochem. Anal.* **2005**, 16, 295–301.
34. He, Z; Zhao, L; Liu, X; Xu, Y. The application of in-source fragmentation in ultra-high performance liquid chromatography-electrospray ionization -tandem mass spectrometry for pesticide residue analysis. *J. Chromatogr A.* **2020**, 1633, 461637.
35. Szabo, D; Gömöry, A; Ludanyi, K; Vekey, K; Drahos, L. Very Low-Pressure CID Experiments: High Energy Transfer and Fragmentation Pattern at the Single Collision Regime. *Molecules.* **2023**, 29, 211.
36. Abranko, L; Garcia-Reyes, J; Molina-Diaz, A. In-source fragmentation and accurate mass analysis of multiclass flavonoid conjugates by electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2011**, 46, 478–488.
37. Yang, W-Z; Ye, M; Qiao, X; Wang, Q; Bo, T; Guo, D-A. Collision-induced dissociation of 40 flavonoid aglycones and differentiation of the common flavonoid subtypes using electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry and quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *Eur. J. Mass Spectrom.* **2012**, 18, 493–503.
38. McNab, H; Ferreira, E. S. B; Hulme, A. N; Quye, A. Negative ion ESI–MS analysis of natural yellow dye flavonoids—An isotopic labelling study. *Int. J. Mass Spectrom.* **2009**, 284, 57–65.
39. Ablajan, K; Tuoheti, A. Fragmentation characteristics and isomeric differentiation of flavonol O-rhamnosides using negative ion electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2012**, 27, 451–460.
40. Ji, L; Shi, W; Li, Y; Je, J; Xu, G; Qin, M; Guo, Y; Ma, Q. Systematic Identification, Fragmentation Pattern, And Metabolic Pathways of Hyperoside in Rat Plasma, Urine, And Feces by UPLC-Q-Exactive Orbitrap MS. *J. Anal. Methods Chem.* **2022**, 2022, 2623018.
41. Feketeova, L; Barlow, C. K; Benton, T. M; Rochfort, S. J; O’Hair, R. A. J. The formation and fragmentation of flavonoid radical anions. *Int. j. Mass Spectrom.* **2011**, 301, 174–183.
42. Hvattun, E; Ekeberg, D. Study of the collision-induced radical cleavage of flavonoid glycosides using negative electrospray ionization tandem quadrupole mass spectrometry. *J. Mass Spectrom.* **2002**, 38, 43–49.
43. Engström, M. T; Päljärvi, M; Salminen, J-P. Rapid Fingerprint Analysis of Plant Extracts for Ellagitannins, Gallic Acid, and Quinic Acid Derivatives and Quercetin-, Kaempferol- and Myricetin-Based Flavonol Glycosides by UPLC-QqQ-MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2015**, 63, 4068–4079.

-
44. Olech, M; Pietrzak, W; Nowak, R. Characterization of Free and Bound Phenolic Acids and Flavonoid Aglycones in *Rosa rugosa* Thunb. Leaves and Achenes Using LC–ESI–MS/MS–MRM Methods. *Molecules*. **2020**, 25, 1804.
 45. Bian, Y; Zhang, Y; Zhou, Y; Li, G-H; Feng, X-S. Progress in the pretreatment and analysis of flavonoids: An Update since 2013. *Sep. Purif. Rev.* **2022**, 51, 11–37.
 46. Vanhakylä, S; Salminen, J-P. Mass Spectrometric Fingerprint Mapping Reveals Species-Specific Differences in Plant Polyphenols and Related Bioactivities. *Molecules*. **2023**, 28, 6388.
 47. Vanhakylä, S; Salminen, J-P. Seasonal Variation in Plant Polyphenols and Related Bioactivities across Three Years in Ten Tree Species as Visualized by Mass Spectrometric Fingerprint Mapping. *Molecules*. **2023**, 28, 6093.
 48. Ruohe Yin, R; Messner, B; Faus-Kessler, T; Hoffmann, T; Schwab, W; Hajirezaei, M-R; von Saint Paul, V; Werner Heller, V; Schaffner, A-R. Feedback inhibition of the general phenylpropanoid and flavonol biosynthetic pathways upon a compromised flavonol-3-*O*-glycosylation. *J. Exp. Bot.* **2012**, 63, 2465–2478.
 49. Llorent-Martínez, E. J; Ortega-Barrales, P; Zengin, G; Uysal, S; Ceylan, R. Lathyrus aureus and Lathyrus pratensis: characterization of phytochemical profiles by liquid chromatography-mass spectrometry, and evaluation of their enzyme inhibitory and antioxidant activities. *RSC Adv.* **2016**, 6, 88996–89006.
 50. Taamalli, A; Iswaldi, I; Arraez-Roman, D; Segura-Carretero, A; Fernandez-Gutierrez, A; Zarrouk, M. UPLC-QTOF/MS for a rapid Characterisation of Phenolic Compounds from Leaves of *Myrtus communis* L. *Phytochem. Anal.* **2013**, 81, 89–96.
 51. Piccolella, S; Crescente, G; Volpe, M. G; Paolucci, M; Pacifico, S. UHPLC-HR-MS/MS-Guided Recovery of Bioactive Flavonol Compounds from Greco di Tufo Vine Leaves. *Molecules*. **2019**, 24, 3630.
 52. Llorent-Martínez, E. J; Gordo-Moreno, A. I; Fernández-de Córdoba, M. L; Salazar-Mendías, C.; Tercero-Araque, A. Characterization of the Phenolic Profile and Antioxidant Activity of *Cathissa reverchonii* (Lange) Speta. *Molecules*. **2022**, 27, 1979.
 53. Chen, Y; Xie, S; Cjen, S; Zeng, S. Glucuronidation of flavonoids by recombinant UGT1A3 and UGT1A9. *Biochem. Pharmacol.* **2008**, 76, 416–425.
 54. Llorach, R; Gil-Izquierdo, A; Ferrares, F; Tomas-Barberan, F. A. HPLC-DAD-MS/MS ESI Characterization of Unusual Highly Glycosylated Acylated Flavonoids from Cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis*) Agroindustrial Byproducts. *J. Agric. Food. Chem.* **2003**, 51, 3895–3899.
 55. Simirgiotis, M. J; Schmeda-Hirschmann, G. Direct identification of phenolic constituents in Boldo Folium (*Peumus boldus* Mol.) infusions by high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. A.* **2010**, 1217, 443–449.

-
56. Kumar, S; Singh, A; Kumar, B. Identification and characterization of phenolics and terpenoids from ethanolic extracts of *Phyllanthus* species by HPLC-ESI-QTOF-MS/MS. *J. Pharma. Anal.* **2017**, *7*, 214–222.
57. Bonaccorsi, P; Caristi, C; Gagiulli, C; Leuzzi, U. Flavonol glucosides in *Allium* Species: A comparative study by means of HPLC-DAD-ESI-MS-MS. *Food Chem.* **2008**, *107*, 1668–1673.
58. Ou-yang, Z; Cao, X; Wei, Y; Zhang, W-W-Q; Zhao, M; Duan, J-a. Pharmacokinetic study of rutin and quercetin in rats after oral administration of total flavones of mulberry leaf extract. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2013**, 776–782.
59. Arimboor, A; Arumugan, C. HPLC-DAD-MS/MS profiling of antioxidant flavonoid glycosides in sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) seeds. *Int. J. Food. Sci. Nutr.* **2012**, *63*, 730–738.
60. Xu, Y; Rashwan, A. K; Ge, Z; Li, Y; Ge, H; Li, J; Xie, J; Liu, S; Fang, J; Cheng, K; Chen, W. Identification of a novel α -glucosidase inhibitor from *Melastoma dodecandrum* Lour. Fruits and its effect on regulating postprandial blood glucose. *Food Chem.* **2023**, *399*, 133999.
61. Francescato, L. N; Debenedetti, S. L; Schwanz, T. G; Bassani, V. L; Henriques, A. T. Identification of phenolic compounds in *Equisetum giganteum* by LC-ESI-MS/MS and a new approach to total flavonoid quantification. *Talanta.* **2013**, *105*, 192–203.
62. Li, C; Seeram, N. P. Ultra-fast liquid chromatography coupled with electrospray ionization time-of-flight mass spectrometry for the rapid phenolic profiling of red maple (*Acer rubrum*) leaves. *J. Sep. Sci.* **2018**, *41*, 2331–2346.
63. Carvalho, A. A; Rodrigues dos Santos, L; Santana de Freitas, J; Pinto de Sousa, R; Soares de Farias, R; Junior, G. M. V; Rai, M; Chaves, M. H. First report of flavonoids from leaves of *Machaerium acutifolium* by DI-ESI-MS/MS. *Arab. J. Chem.* **2022**, *15*, 103765
64. Li, Z-H; Guo, H; Xu, W-B; Ge, J; Li, X; Alimu, M; He, D-J. Rapid Identification of Flavonoid Constituents Directly from PTP1B Inhibitive Extract of Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Leaves by HPLC-ESI-QTOF-MS-MS. *J. Chromatogr. Sci.* **2016**, *54*, 805–810.
65. Mohamed Yunus, S. N; Abas, F; Jaafar, A.H; Azizan, A; Zolkeflee, N.K.Z; Abd Ghafar, S. Z. Antioxidant and α -glucosidase inhibitory activities of eight neglected fruit extracts and UHPLC-MS/MS profile of the active extracts. *Food. Sci. Biotechnol.* **2021**, *30*, 195–208.
66. Choi, S-S; Park, H-R; Lee, K-A. A comparative Study of Rutin and Rutin Glycoside: Antioxidant Activity, Anti-Inflammatory Effect, Effect on Platelet Aggregation and Blood Coagulation. *Antioxidants.* **2021**, *10*, 1696.
67. Qin, Y; Gao, B; Shi, H; Cao, J; Yin, C; Lu, W; Yu, L; Cheng, Z. Characterization of flavonol mono-, di-, tri- and tetra-*O*-glycosides by ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-quadrupole time-of-flight mass spectrometry and its application for identification of flavonol glycosides in *Viola tianschanica*. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2017**, *142*, 113–124.

-
68. Grati, W; Samet, S; Bouzayani, B; Ayachi, A; Treilhou, M; Tene, N; Mezghani-Jarraya, R. HESI-MS/MS Analysis of Phenolic Compounds from *Calendula aegyptiaca* Fruits Extracts and Evaluation of their Antioxidant Activities. *Molecules*. **2022**, *27*, 2314.
69. Lu, L; Qian, D; Yang, J; Jiang, S; Guo, J; Shang, E-x; Duan, J-a. Identification of isoquercitrin metabolites produced by human intestinal bacteria using UPLC-Q-TOF/MS. *Biomed. Chromatogr.* **2012**, *27*, 509–514.
70. Moraes, D. P; Lozano-Sánchez, J; Machado, M. L; Vizzotto, M; Lazzaretti, M; Leyva-Jimenez, F. J. J; da Silveira, T. L; Ries, E. F; Barcia, M. T. Characterization of new blackberry cultivar BRS Xingu: Chemical composition, phenolic compounds and antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Food Chem.* **2020**, *322*, 126783.
71. Oszmianski, J; Kolniak-Ostek, J; Wojdylo, A. Characterization and Content of Flavonol Derivatives of *Allium ursinum* L. *Plant. J. Agric. Food Chem.* **2013**, *61*, 176–184
72. Wang, H; Chen, L; Yang, B; Du, J; Chen, L; Li, Y; Guo, F. Structures, Sources, Identification/Quantification Methods, Health Benefits, Bioaccessibility, and Products of Isorhamnetin Glycosides as Phytonutrients. *Nutrients*. **2023**, *15*, 1947.
73. Crupi, p; Genhi, R; Antonacci, D. In-time and In-space tandem mass spectrometry to determine the metabolic profiling of flavonoids in a typical sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivar from Southern Italy. *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49*, 1025–1034.
74. Mosić, M; Trifković, J; Vovk, I; Gašić, U, Tešić, Ž; Šikoparjia, B; Milojković-Opsenica, D. Phenolic Composition Influences the Health-Promoting Potential of Bee-Pollen. *Biomolecules*. **2019**, *9*, 783.
75. Dos Santos, C; Galaverna, R. S; Angolini, C. F. F; Nune, V. V. A; Almeida, L. F. R; Ruiz, A. L. T; De Carvalho, J. E; Duarte, R. M. T; Duarte, M. C. T; Eberlin, M. N. Antioxidative, Antiproliferative and Antimicrobial Activities of Phenolic Compounds from Three *Myrcia* Species. *Molecules*. **2018**, *23*, 986.
76. Piccolella, S; Crescente, G; Volpe, M. G; Paolucci, M; Pacifico, S. UHPLC-HR-MS/MS-Guided Recovery of Bioactive Flavonol Compounds from Greco di Tufo Vine Leaves. *Molecules*. **2019**, *24*, 3630.
77. Lin, L-Z; Harnly, J. M. A screening Method for the Identification of Glycosylated Flavonoids and Other Phenolic Compounds Using a Standard Analytical Approach for All Plant Materials. *J. Agric. Food Chem.* **2007**, *55*, 1084–1096.
78. Figueroa-Merma, A; Chirinos, R; García-Rios, D; Pedreschi, R; Aguilar-Galvez, A; Campos, D. Bioactive compounds characterization of Peruvian *Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin & Clemants leaves by GC/MS and UPLS-ESI-Q/TOF-MSn. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2022**, *58*, 1219–1229.

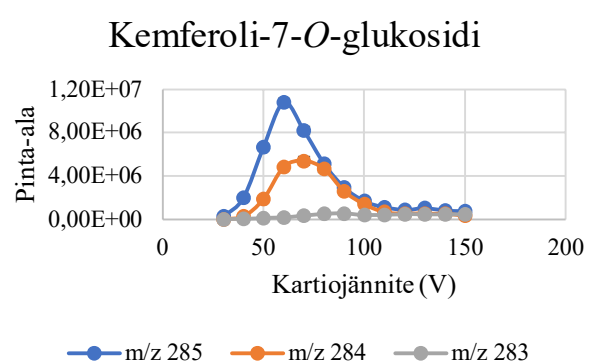
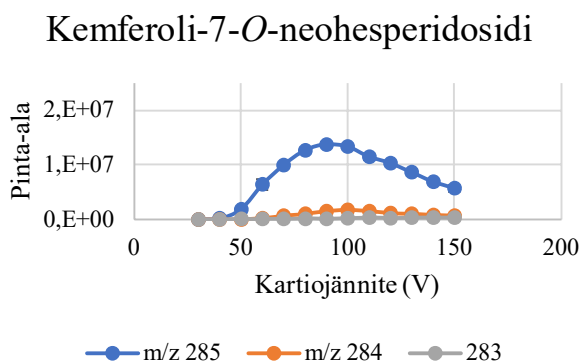
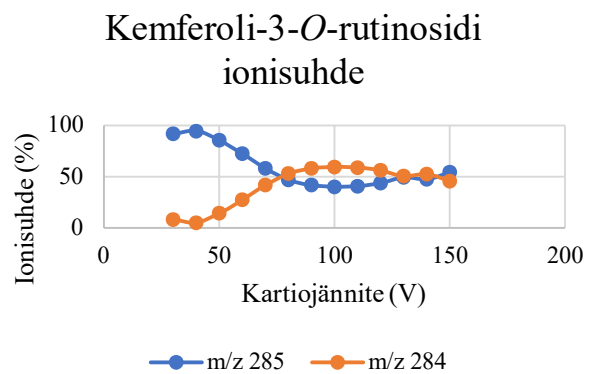
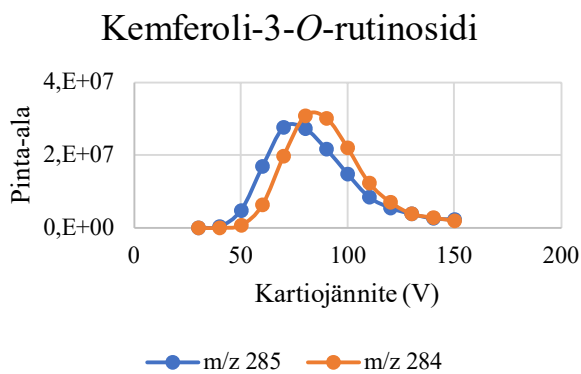
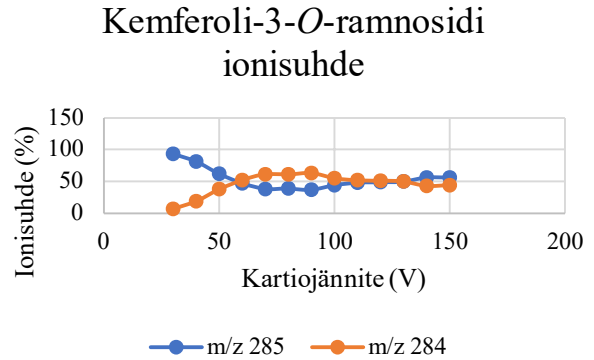
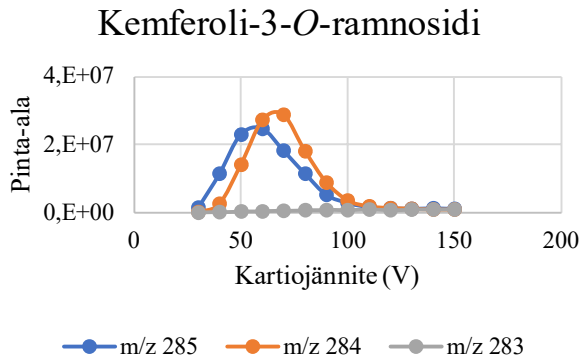
79. Park, S. K; Im, S. Y. Isolation and Evaluation of Bioactive Compounds from *Rheum emodi* and their Anti-Inflammatory and Anticancer Properties. *Int. Agric. Biol.* **2021**, 25, 1161–1172.
80. Faria, A. F; Marquez, M. C; Mercadante, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. *Food Chem.* **2011**, 126, 1571–157

Liitteet

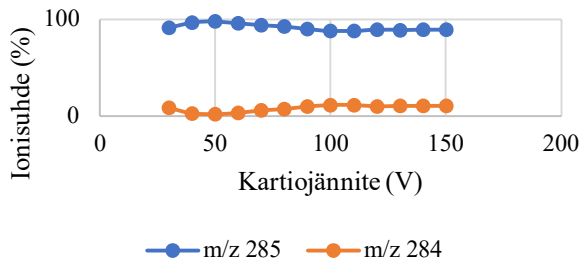
1. Puhdasaineiden kuvaajat täysskannausmenetelmällä
2. Kasviuutteiden ionisuhdekuvaajat täysskannausmenetelmällä
3. Kasviuutteista tunnistetut flavonoliglykosidiyhdisteet
4. Kasviuutteissa käytetyt kasvilajit ja kasvien osat

1. Puhdasaineiden kuvaajat täysskannausmenetelmällä

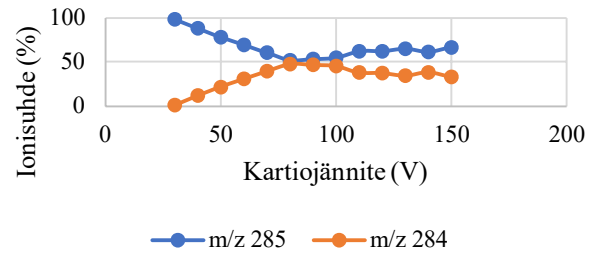
Kuvaajissa, joissa ionien pinta-alat ovat esitetty kartiojännitteen funktiona, on pisteet kolmen rinnakkaisen mittauksen keskiarvoja. Lisäksi näille pisteille on laskettu ja merkattu virhe keskiarvon keskivirheenä. Ionisuhdekuvaajat on tehty edeltävien kuvaajien kolmen rinnakkaisen mittauksen keskiarvojen mukaan.



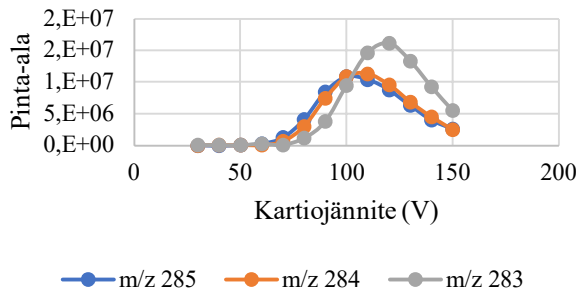
Kemferoli-7-*O*-neohesperidosidi ionisuhde



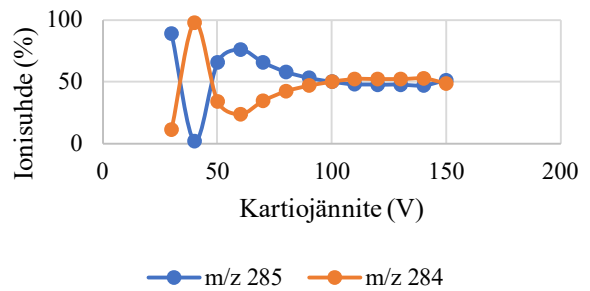
Kemferoli-7-*O*-glukosidi ionisuhde



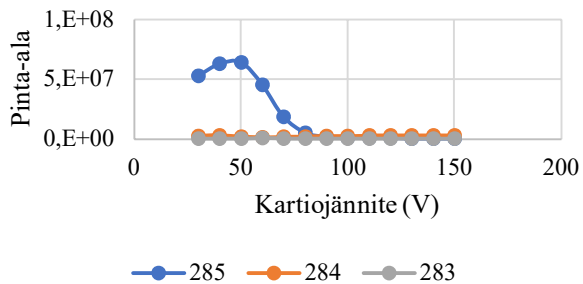
Robiniini



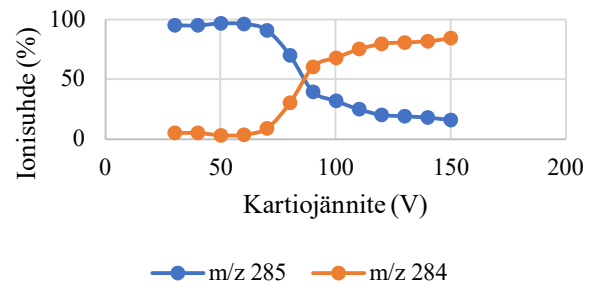
Robiniini ionisuhde



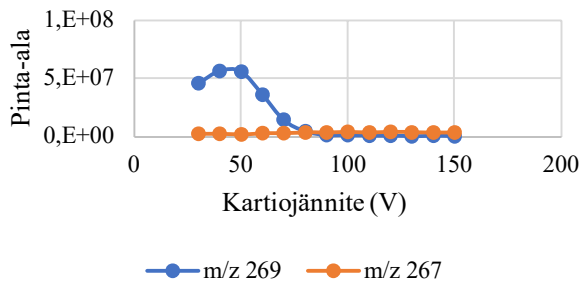
Kemferoli



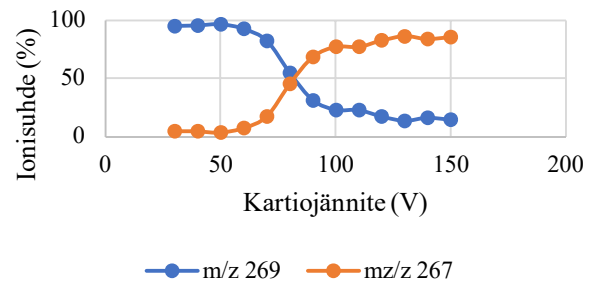
Kemferoli ionisuhde

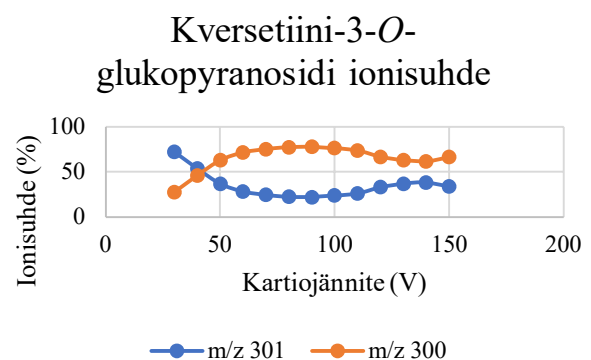
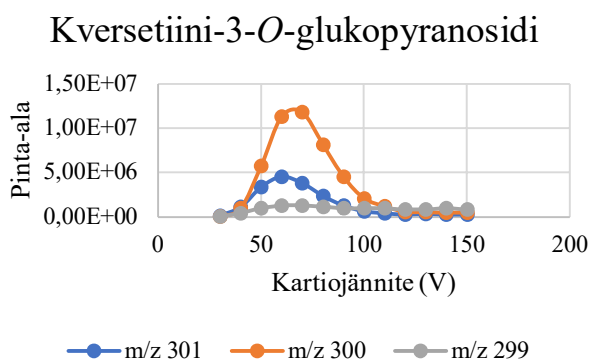
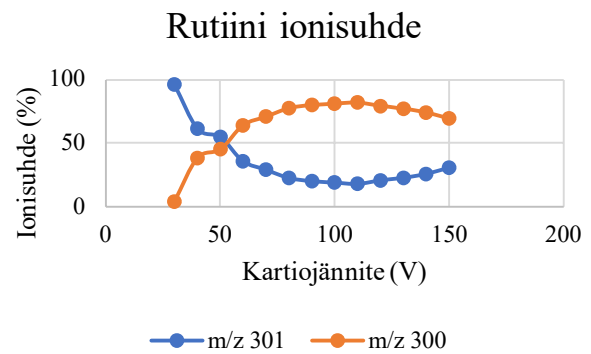
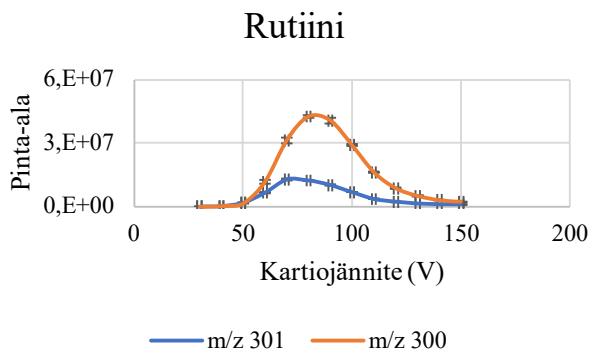
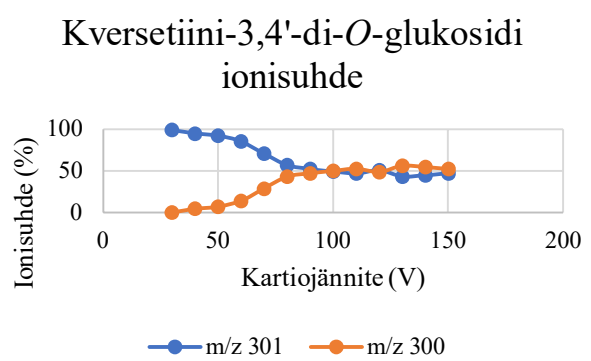
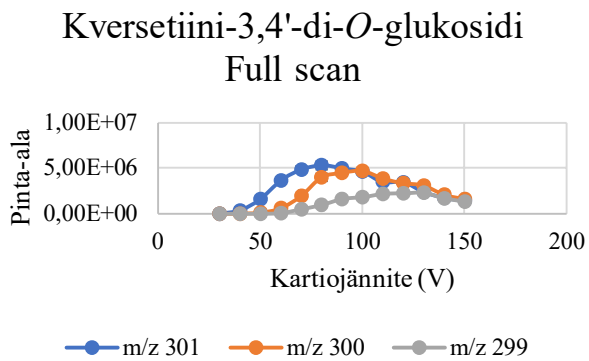
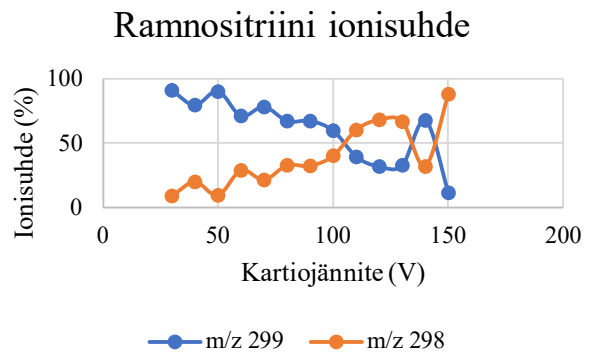
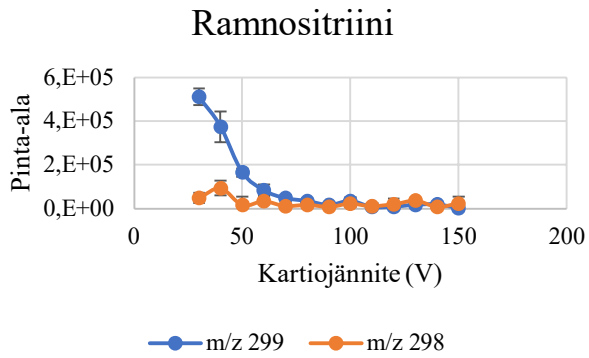


Resokemferoli

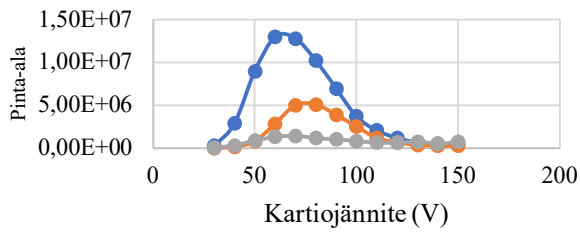


Resokemferoli ionisuhde

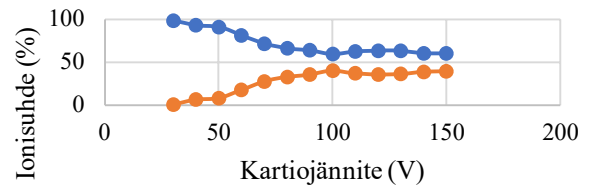




Kversetiini-7-O-glukosidi

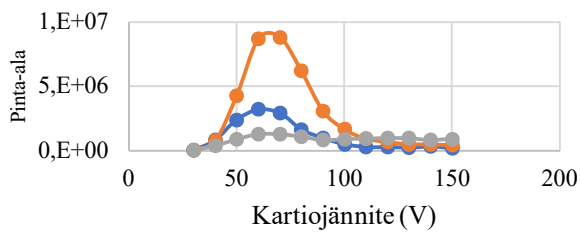


—●— m/z 301 —●— m/z 300 —●— m/z 299

Kversetiini-7-O-glukosidi
ionisuhde

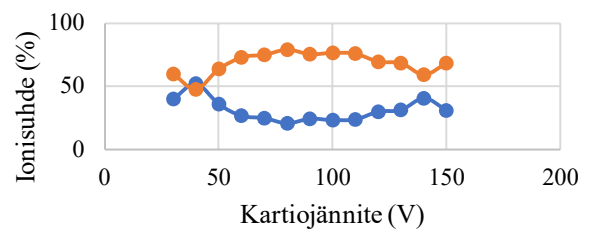
—●— m/z 301 —●— m/z 300

Hyperosidi

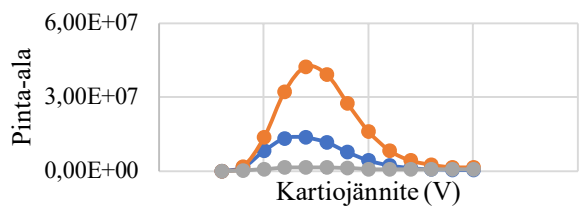


—●— m/z 301 —●— m/z 300 —●— m/z 299

Hyperosidi ionisuhde

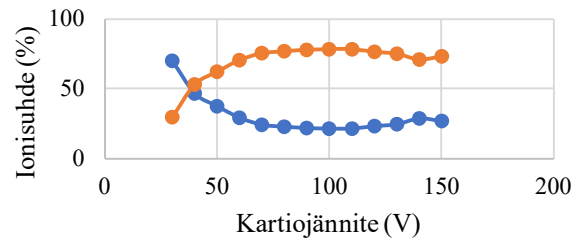


—●— m/z 301 —●— m/z 300

Kversetiini-3-O-6"-asetyyli-
glukosidi

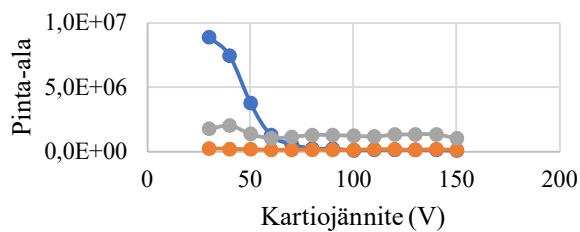
—●— m/z 301 —●— m/z 300 —●— m/z 299

ionisuhde full scan



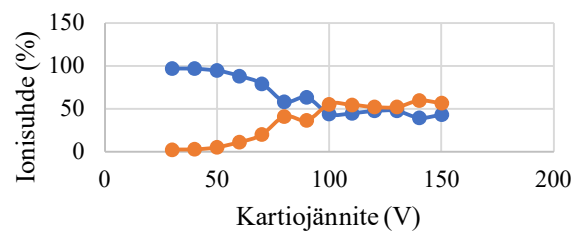
—●— m/z 301 —●— m/z 300

Kversetiini

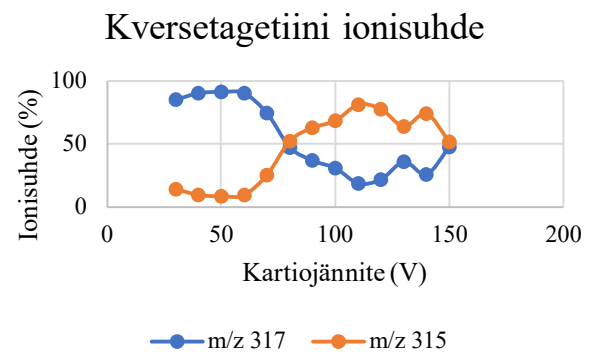
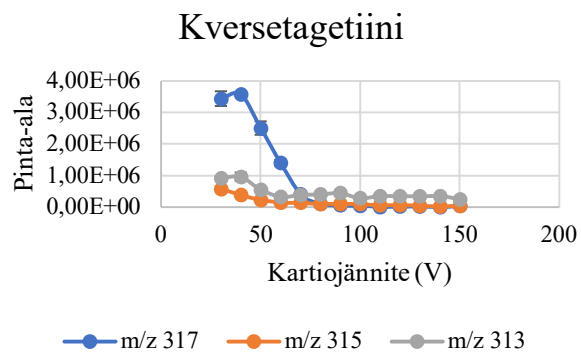
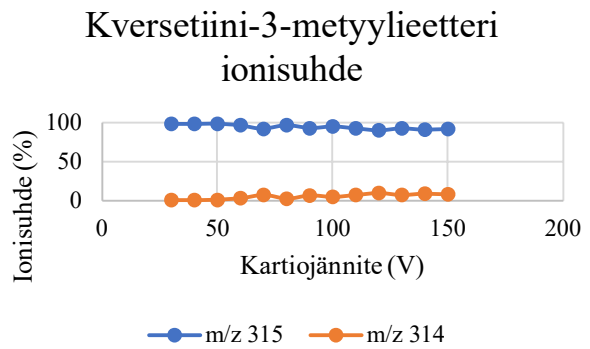
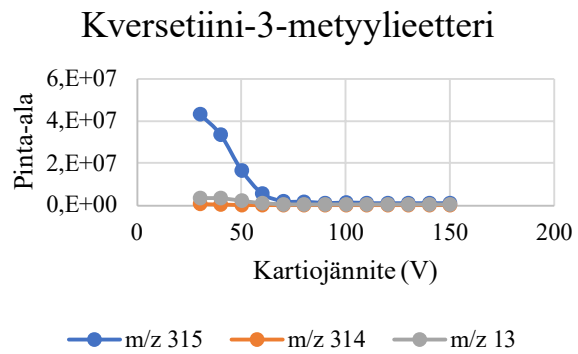
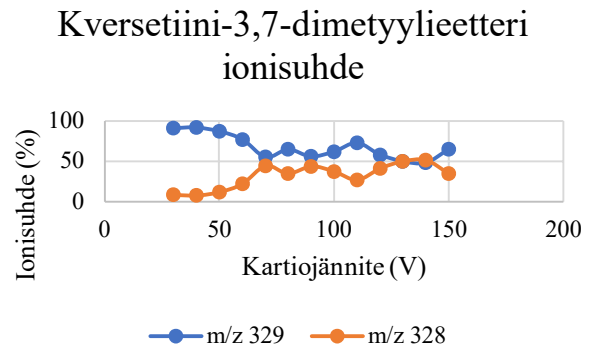
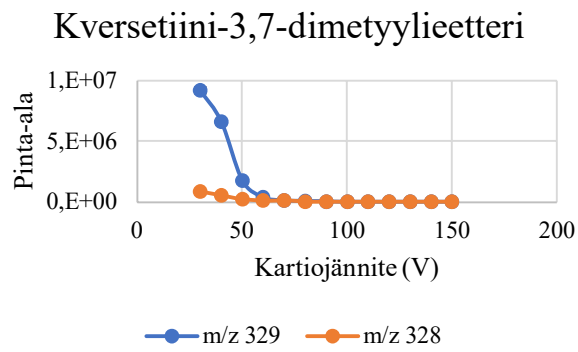
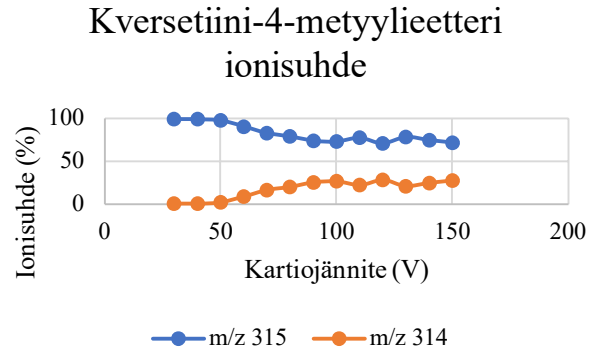
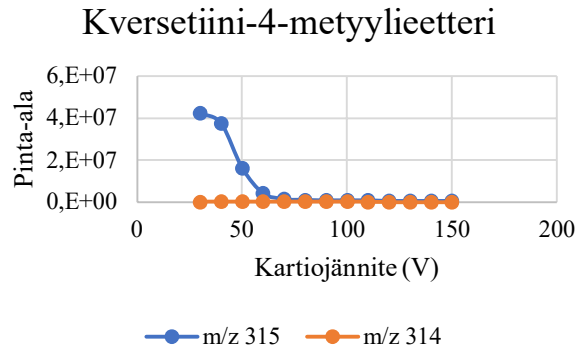


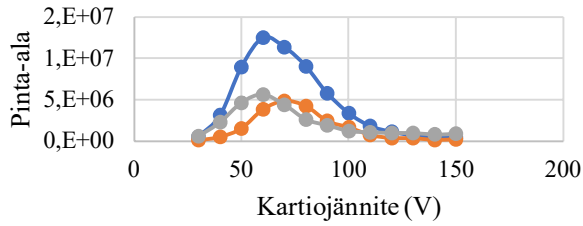
—●— m/z 301 —●— m/z 300 —●— m/z 299

Kversetiini ionisuhde

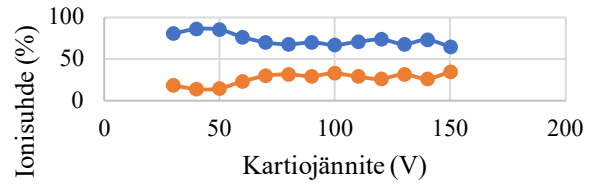


—●— m/z 301 —●— m/z 300

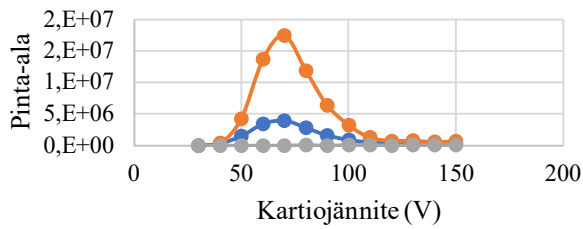


Kversetagetiini-7-*O*-glukosidi

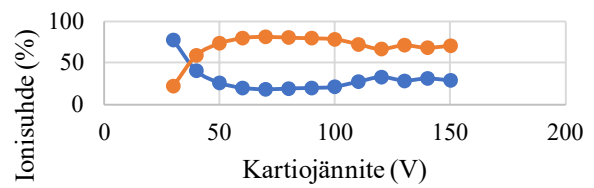
—●— m/z 317 —●— m/z 316 —●— 315

Kversetagetiini-7-*O*-glukosidi
ionisuhde

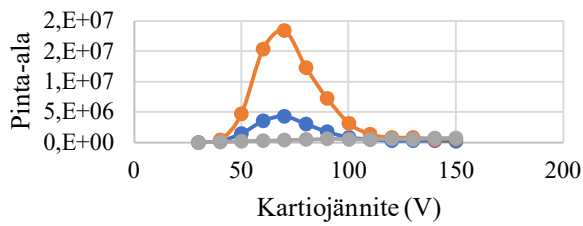
—●— m/z 317 —●— m/z 316

Isoramnetiini-3-*O*-glukosidi

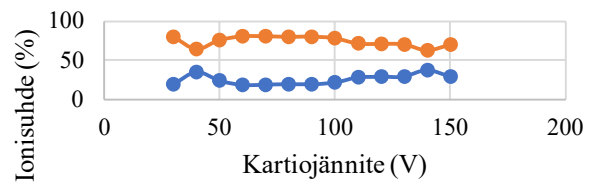
—●— m/z 315 —●— m/z 314 —●— 313

Isoramnetiini-3-*O*-glukosidi
ionisuhde

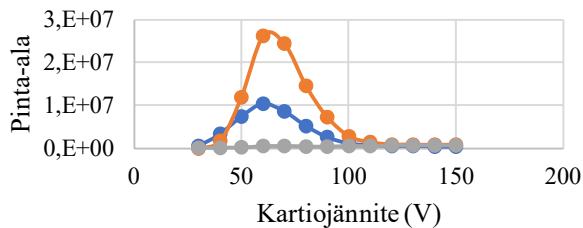
—●— m/z 315 —●— m/z 314

Isoramnetiini-3-*O*-galaktosidi

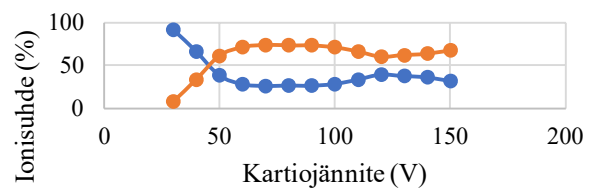
—●— m/z 315 —●— m/z 314 —●— m/z 313

Isoramnetiini-3-*O*-galaktosidi
ionisuhde

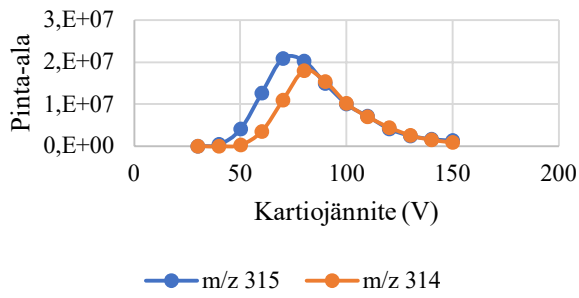
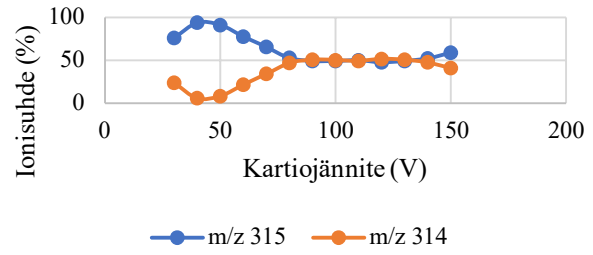
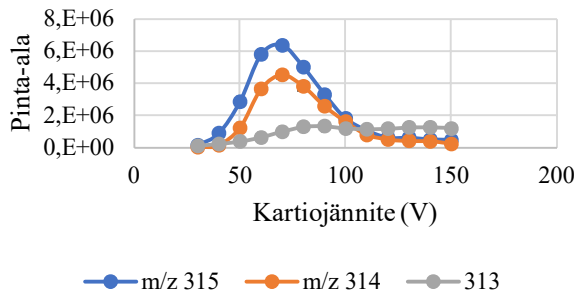
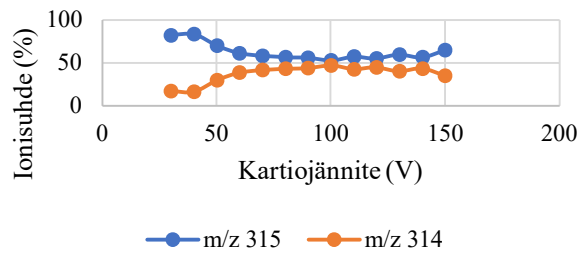
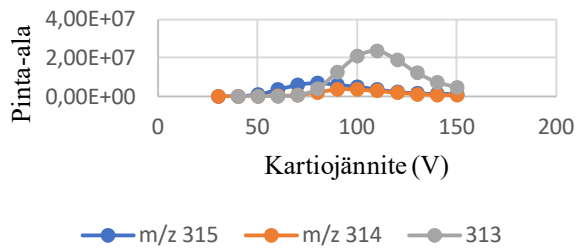
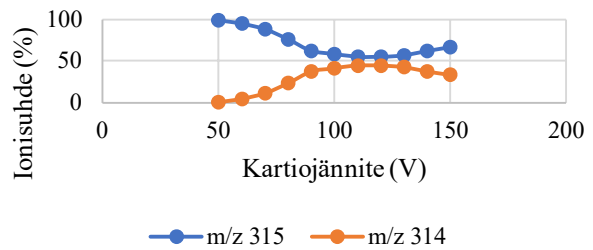
—●— m/z 315 —●— m/z 314

Isoramnetiini-3-*O*-ramnosidi

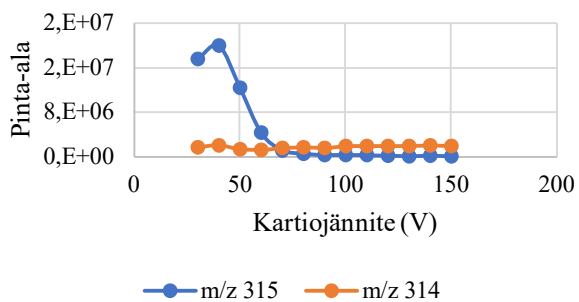
—●— m/z 315 —●— m/z 314 —●— 313

Isoramnetiini-3-*O*-ramnosidi
ionisuhde

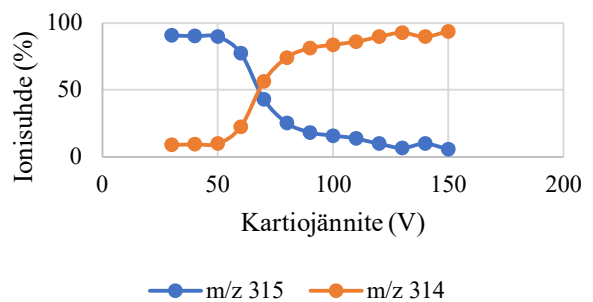
—●— m/z 315 —●— m/z 314

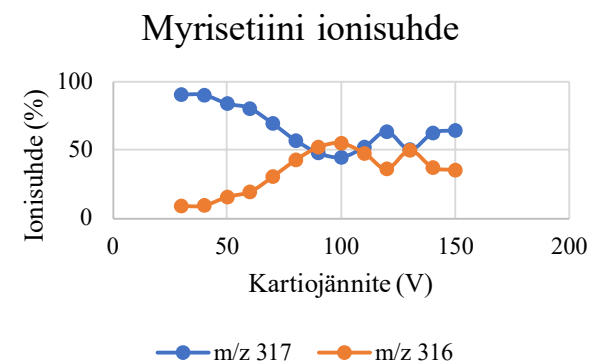
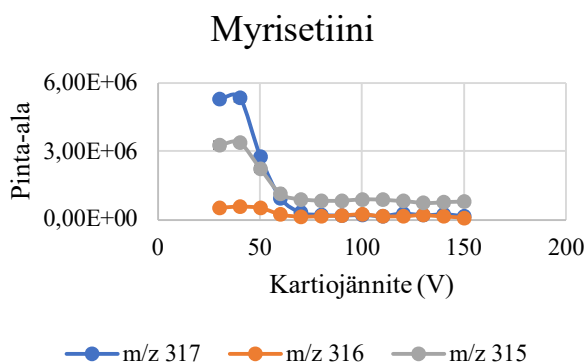
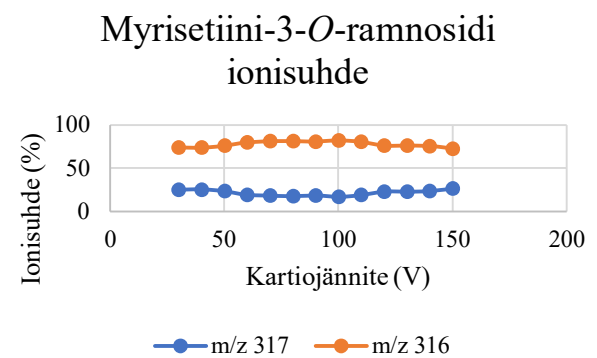
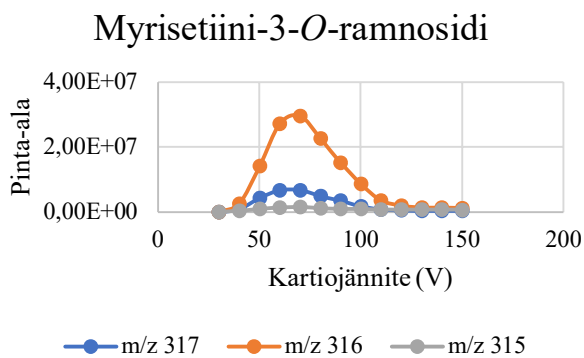
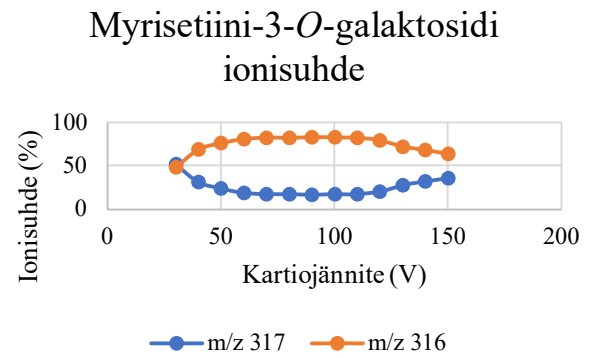
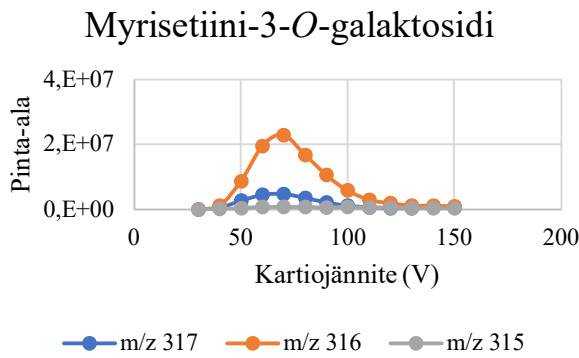
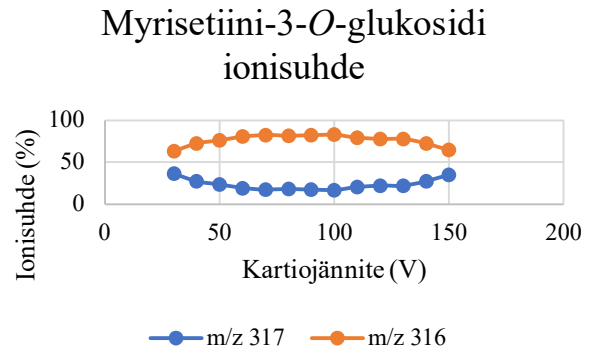
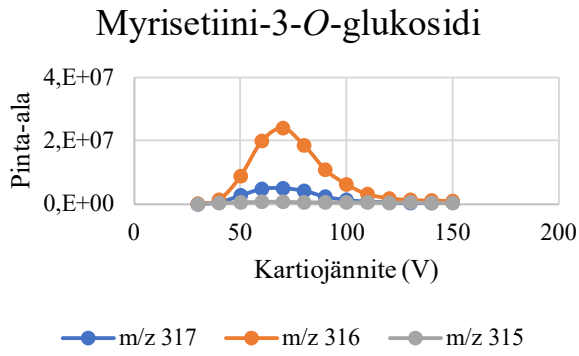
Isoramnetiini-3-*O*-rutinosidiIsoramnetiini-3-*O*-rutinosidi
ionisuhdeIsoramnetiini-7-*O*-glukosidiIsoramnetiini-7-*O*-glukosidi
ionisuhdeIsoramnetiini-3,7-di-*O*-
glukosidiIsoramnetiini-3,7-di-*O*-glukosidi
ionisuhde

Isoramnetiini



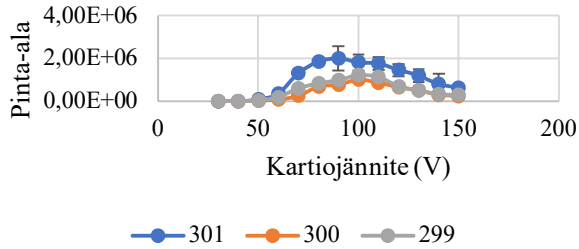
Isoramnetiini ionisuhde



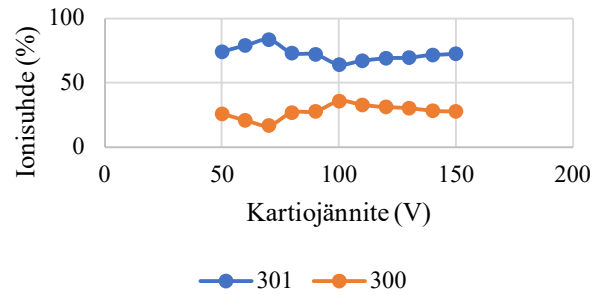


2. Kasviuutteiden kuvaajat täysskannausmenetelmällä

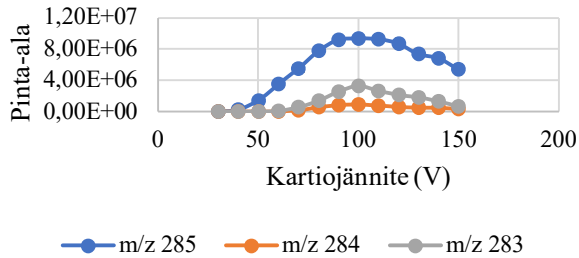
1. Kversetiini-glukuronidi-glukosidi/galaktosidi



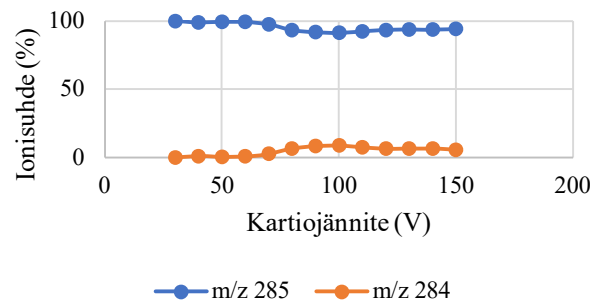
Ionisuhde



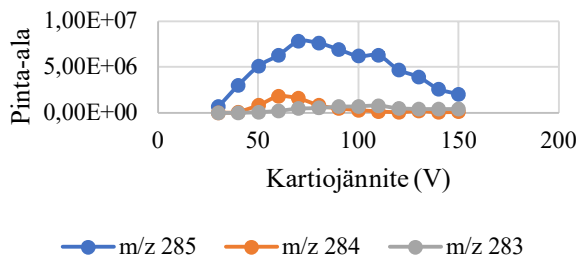
2. Kemferoli-glukuronidi-glukosidi/galaktosidi



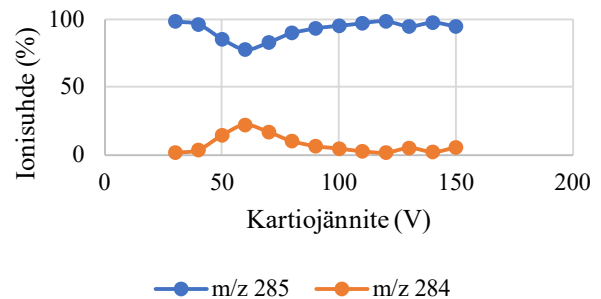
Ionisuhde



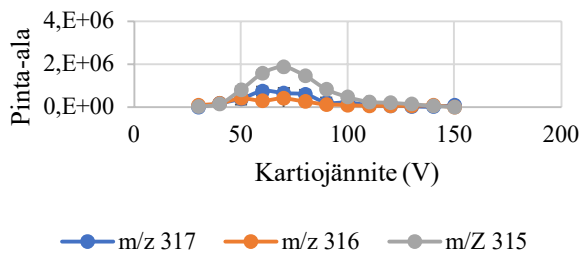
3. Kemferoli-glukuronidi-di-glukosidi/galaktosidi



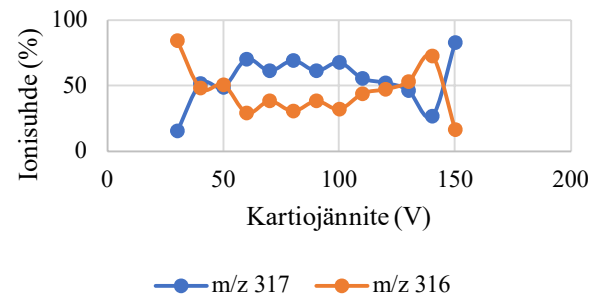
Ionisuhde



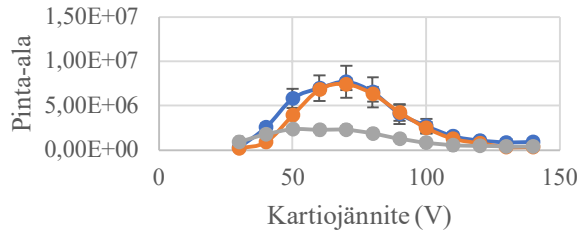
4. Myrisetiini-glukosidi/galaktosidi



Ionisuhde

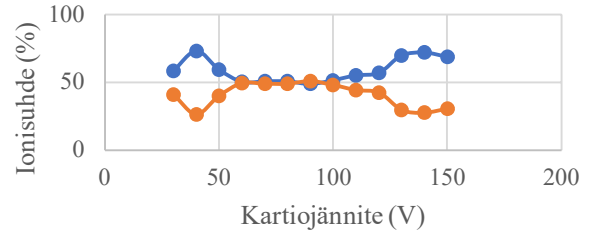


5. Kversetiini-glukuronidi



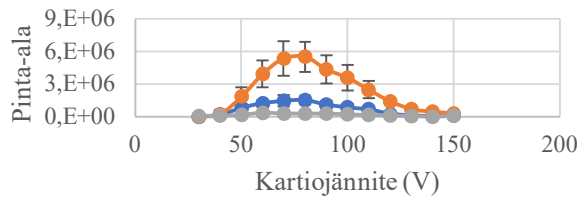
● m/z 301 ● m/z 300 ● m/z 299

Ionisuhte



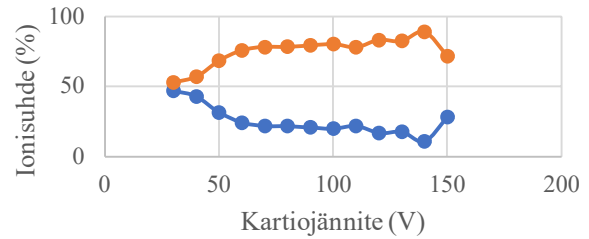
● m/z 301 ● m/z 300

6. Kversetiini-asetyyli-glukosidi/galaktosidi



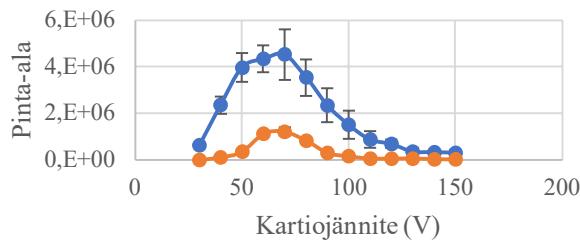
● m/z 301 ● m/z 300 ● m/z 299

Ionisuhte



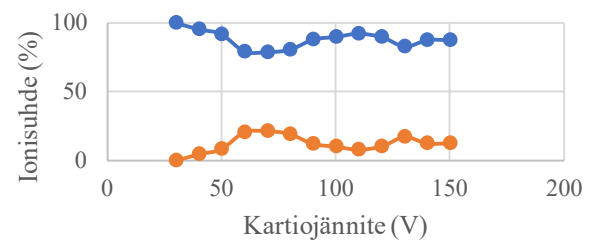
● m/z 301 ● m/z 300

7. Kemferoli-glukuronidi



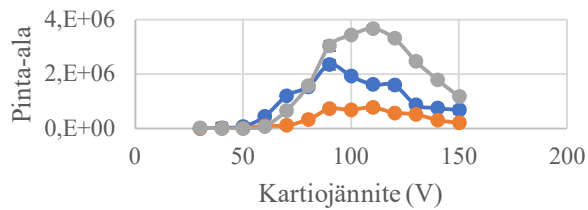
● m/z 285 ● m/z 284 ●

Ionisuhte



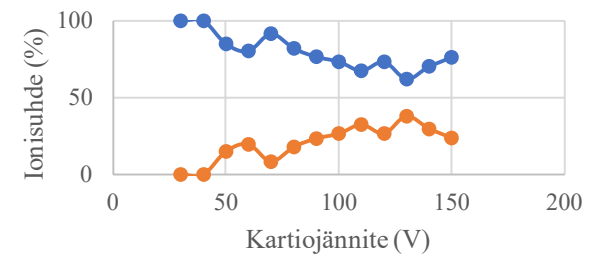
● m/z 285 ● m/z 284

8. Kemferoli-di-glukosidi/galaktosidi



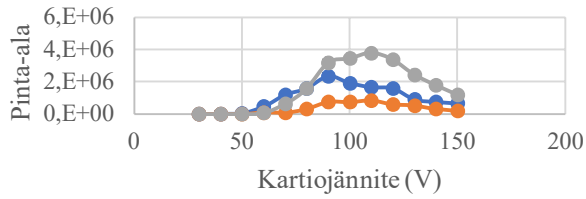
● m/z 285 ● m/z 284 ● m/z 283

Ionisuhte



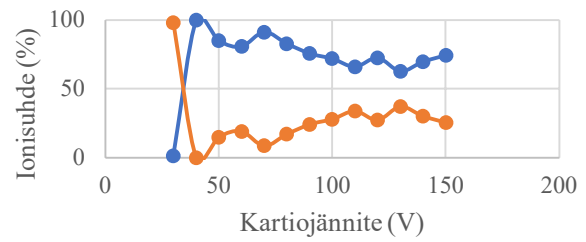
● m/z 285 ● m/z 284

9. Kemferoli-ramnosyyli-di-glukosidi/galaktosidi



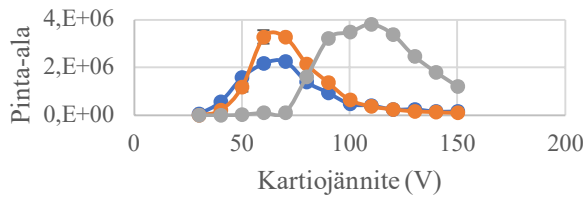
● m/z 285 ● m/z 284 ● m/z 283

Ionisuhde



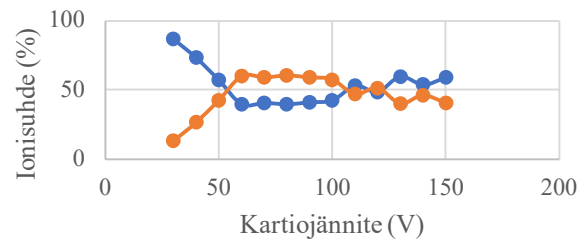
● m/z 285 ● m/z 284

10. Kemferoli-glukosidi/galaktosidi



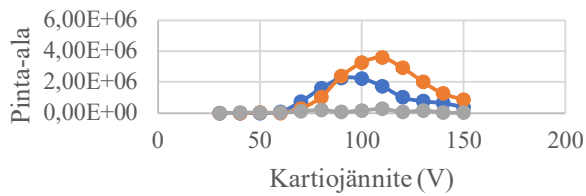
● m/z 285 ● m/z 284 ● m/z 283

Ionisuhde



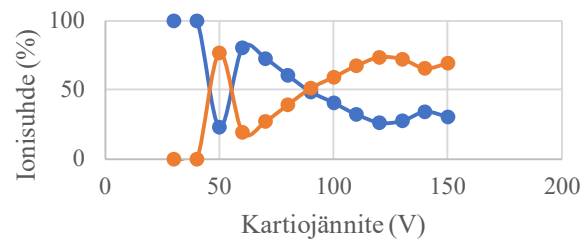
● m/z 285 ● m/z 284

11. Kversetiini-tri-glukosidi/galaktosidi



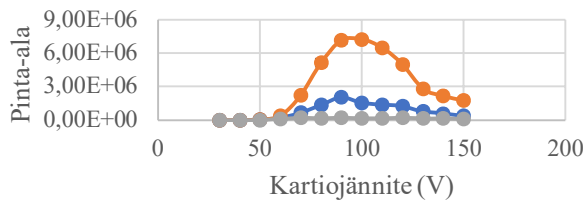
● m/z 301 ● m/z 300 ● m/z 299

Ionisuhde



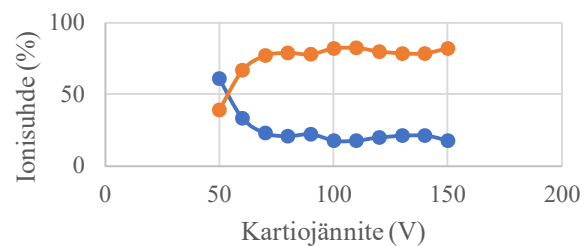
● m/z 301 ● m/z 300

12. Kversetiini-di-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



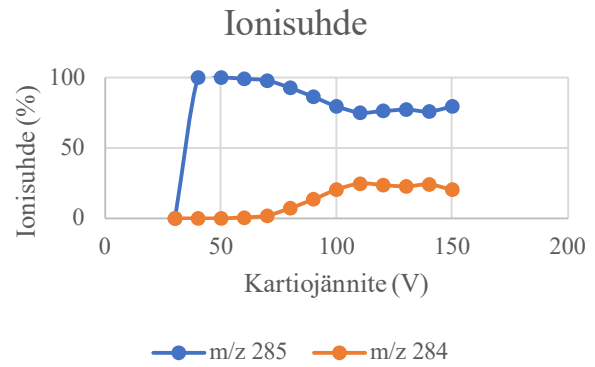
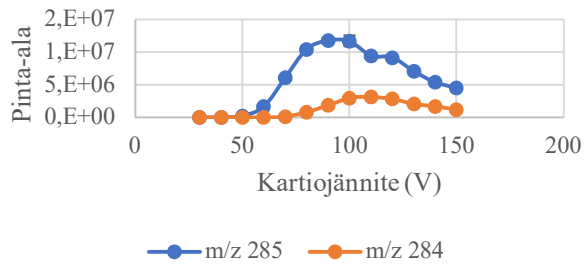
● m/z 301 ● m/z 300 ● m/z 299

Ionisuhde

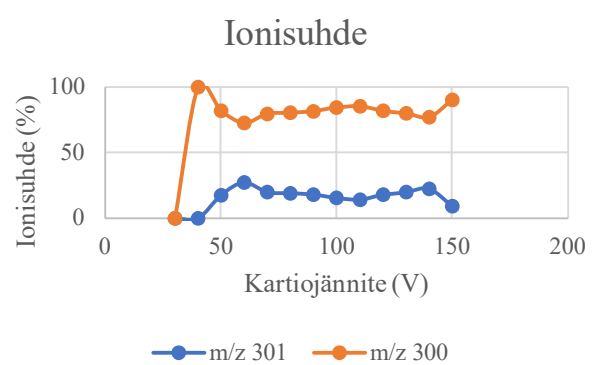
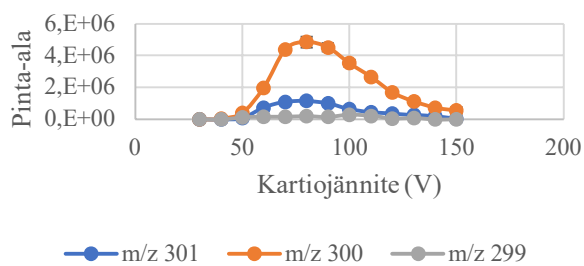


● m/z 301 ● m/z 300

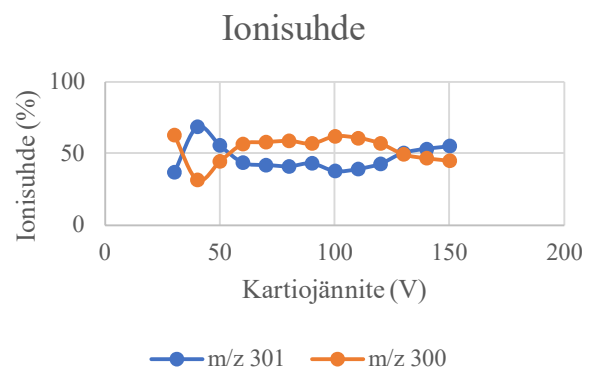
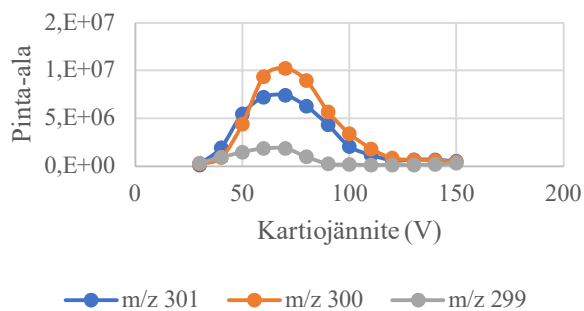
13. Kemferoli-tri-glukosidi/galaktosidi



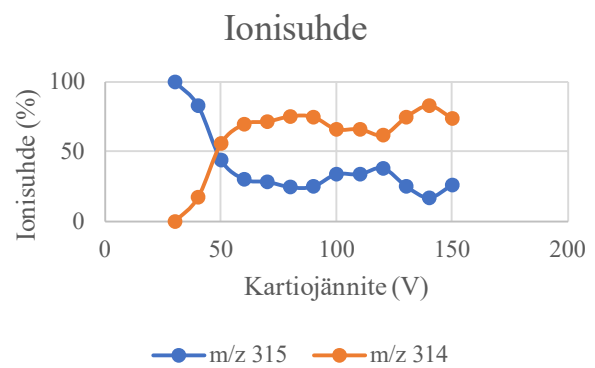
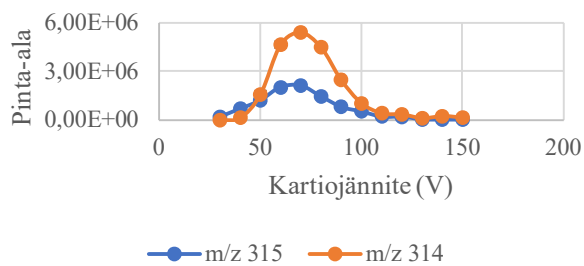
14. Kversetiini-di-glukosidi/galaktosidi



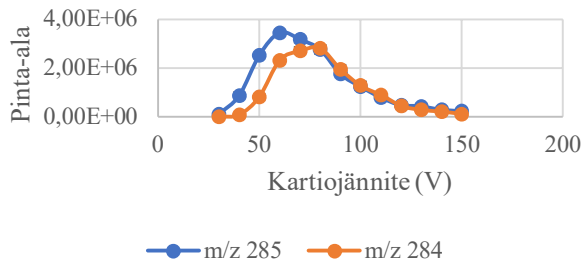
15. Kversetiini-glukuronidi



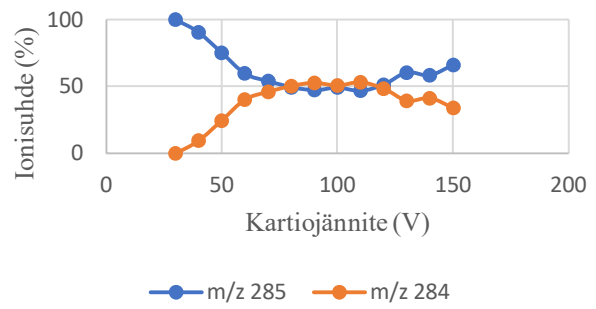
16. Isoramnetiini-glukosidi/galaktosidi



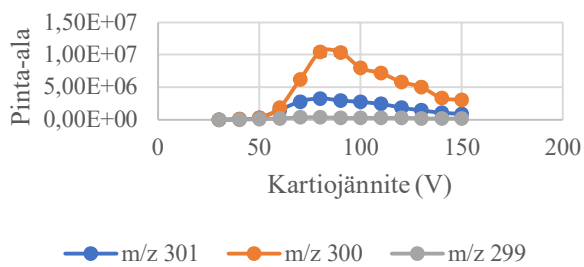
17. Kemferoli-asetyyli-glukosidi/galaktosidi



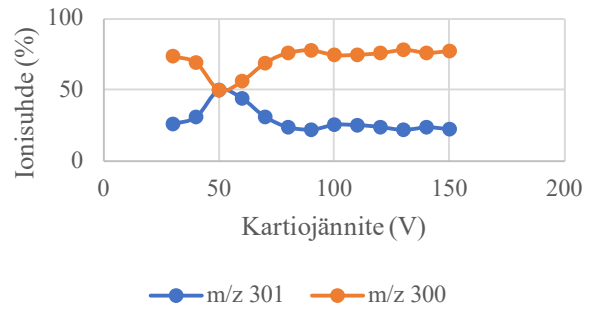
Ionisuhde



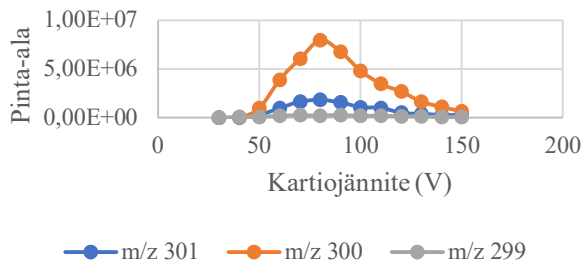
18. Kversetiini-di-glukosidi/galaktosidi



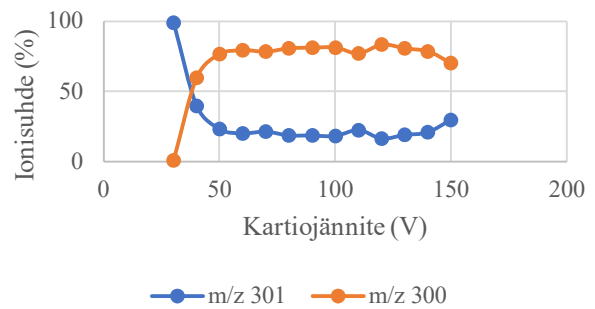
Ionisuhde



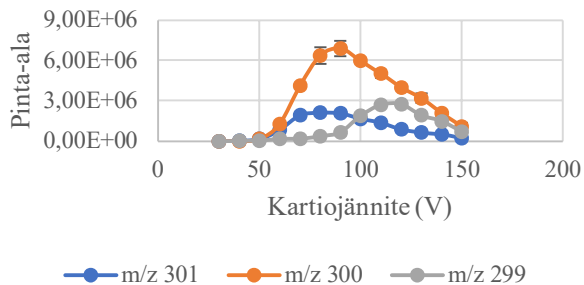
19. Kversetiini-arabinoosi-glukosidi/galaktosidi



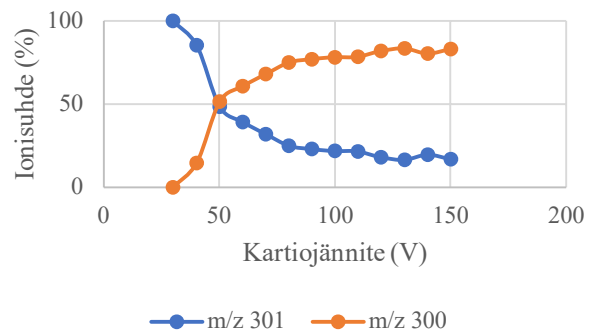
Ionisuhde



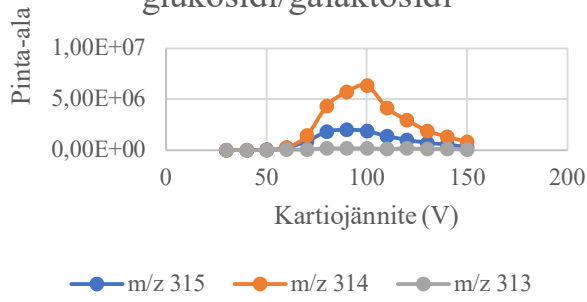
20. Kversetiini-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



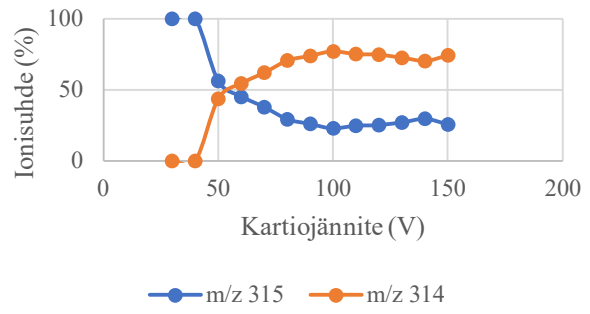
Ionisuhde



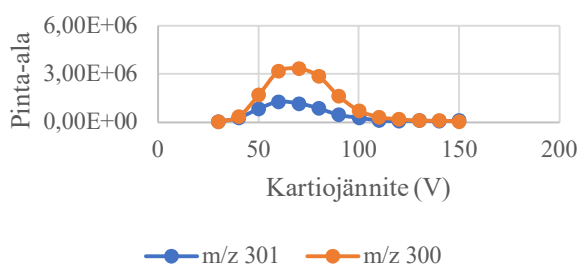
21. Isoramnetiini-di-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



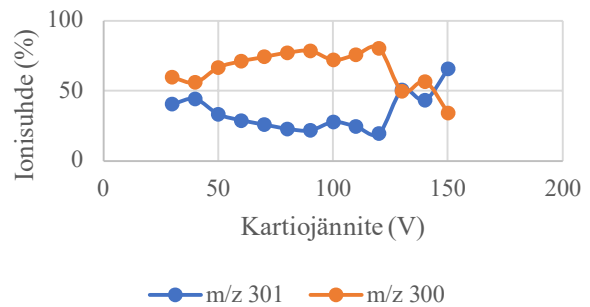
Ionisuhde



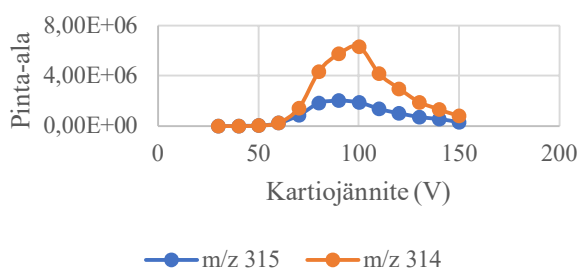
22. Kversetiini-glukosidi/galaktosidi



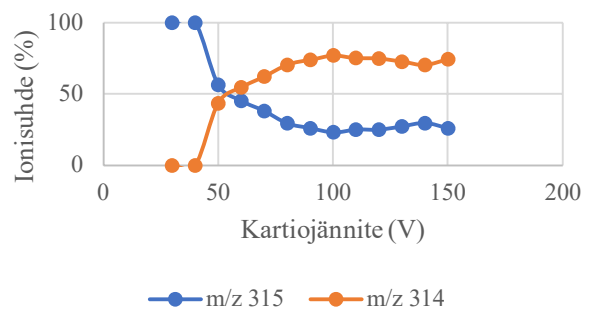
Ionisuhde



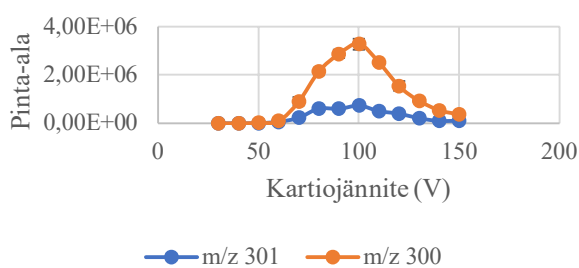
23. Isoramnetiini-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



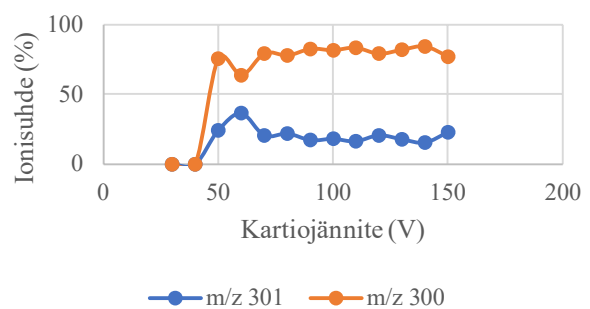
Ionisuhde



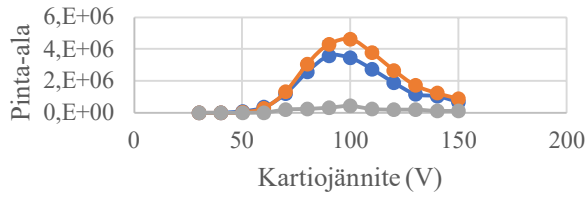
24. Kversetiini-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



Ionisuhde

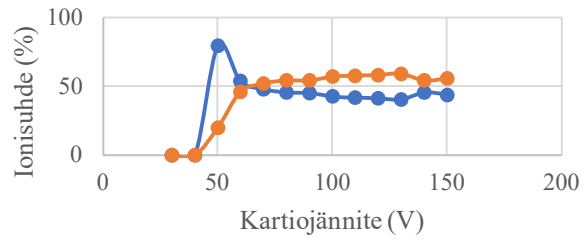


25. Kemferoli-di-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



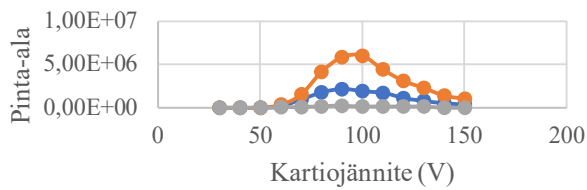
● m/z 285 ● m/z 284 ● m/z 283

Ionisuhde



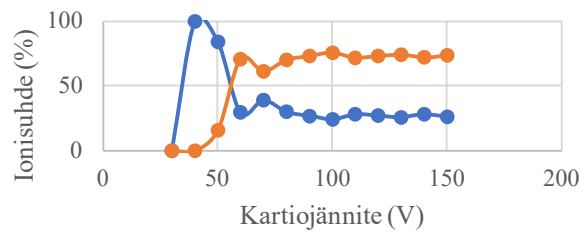
● m/z 285 ● m/z 284

26. Isoramnetiini-di-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



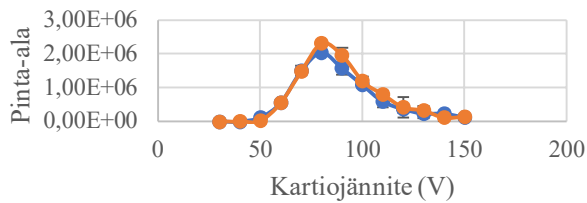
● m/z 315 ● m/z 314 ● m/z 313

Ionisuhde



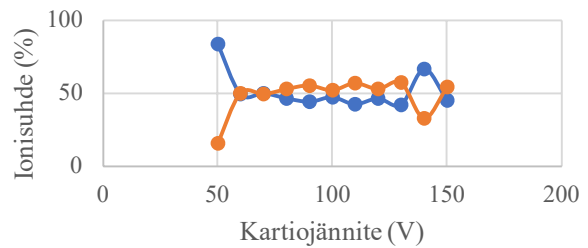
● m/z 315 ● m/z 314

27. Kemferoli-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



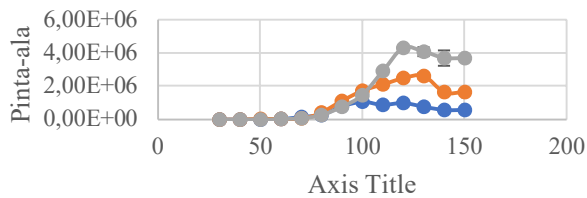
● m/z 285 ● m/z 284 ●

Ionisuhde



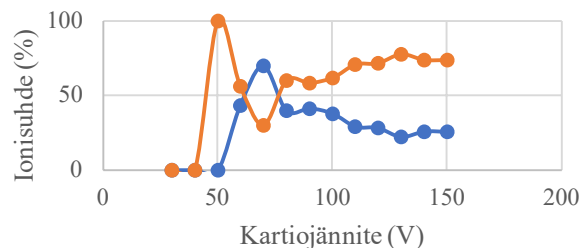
● m/z 285 ● m/z 284

28. Kversetiini-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



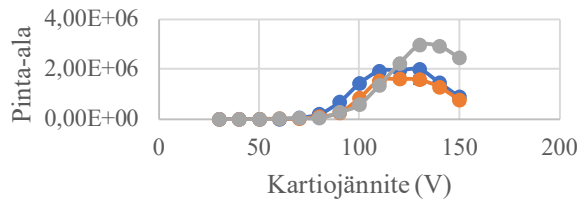
● m/z 301 ● m/z 300 ● m/z 299

Ionisuhde



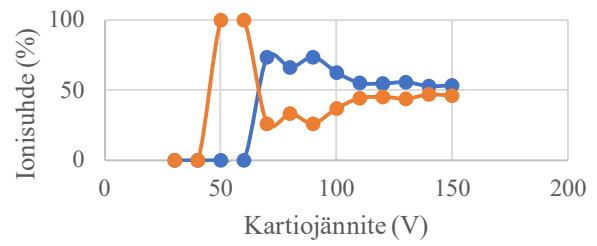
● m/z 301 ● m/z 300

29. Kemferoli-ramnosyyli-tri-glukosidi/galaktosidi



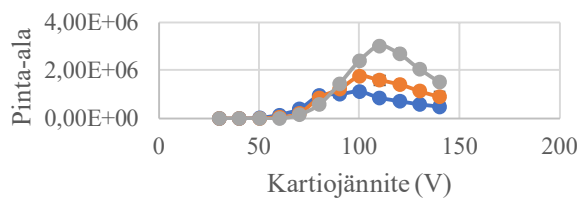
—●— m/z 285 —●— m/z 284 —●— m/z 283

Ionisuhde



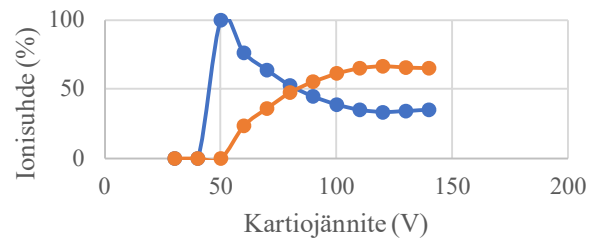
—●— m/z 285 —●— m/z 284

30. Kversetiini-ramnosyyli-di-glukosidi/galaktosidi



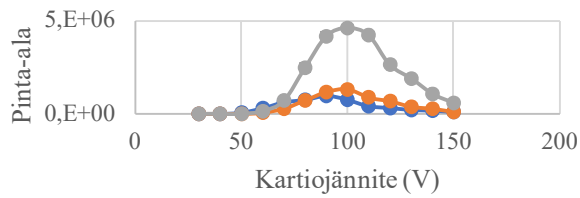
—●— m/z 301 —●— m/z 300 —●— m/z 299

Ionisuhde



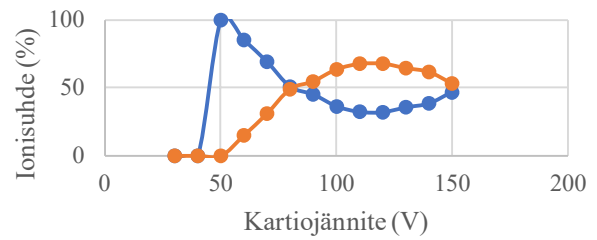
—●— m/z 301 —●— m/z 300

31. Isoramnetiini-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



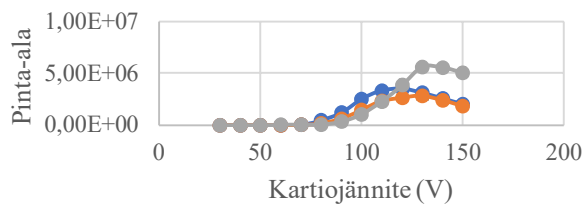
—●— m/z 315 —●— m/z 314 —●— m/z 313

Ionisuhde



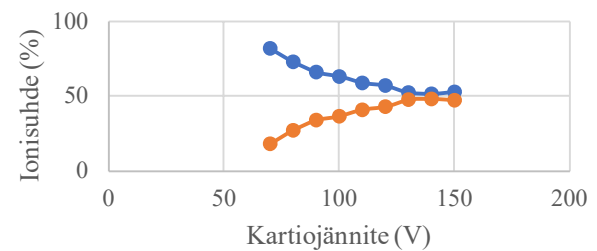
—●— m/z 315 —●— m/z 314

32. Kemferoli-ramnosyyli-tri-glukosidi/galaktosidi



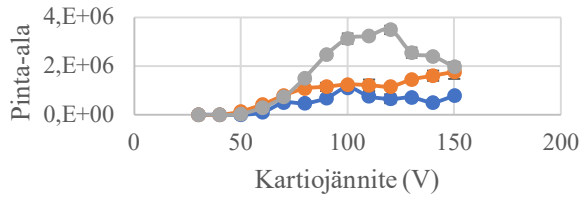
—●— m/z 285 —●— m/z 284 —●— m/z 283

Ionisuhde



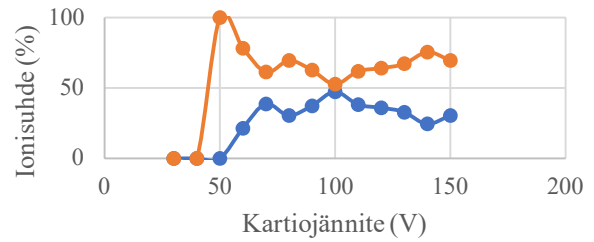
—●— m/z 285 —●— m/z 284

33. Kversetiini-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



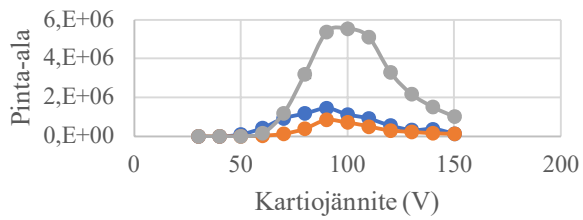
● m/z 301 ● m/z 300 ● m/z 299

Ionisuhde



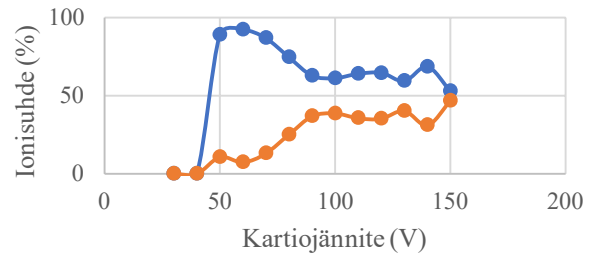
● m/z 301 ● m/z 300

34. Kemferoli-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



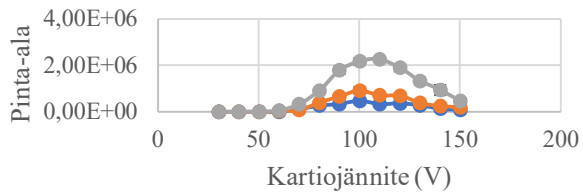
● m/z 285 ● m/z 284 ● m/z 283

Ionisuhde



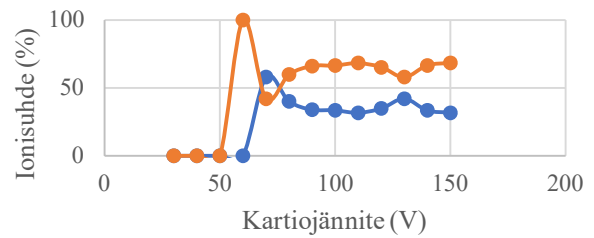
● m/z 285 ● m/z 284

35. Kversetiini-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



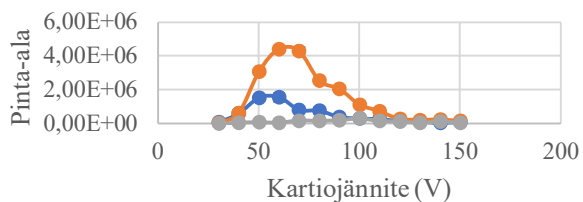
● m/z 301 ● m/z 300 ● m/z 299

Ionisuhde



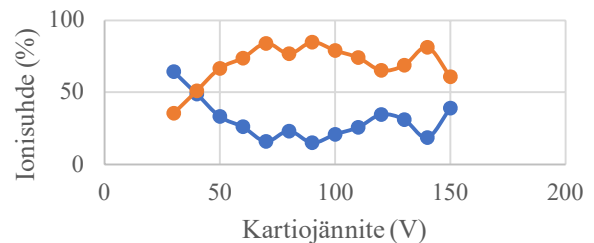
● m/z 301 ● m/z 300

36. Kversetiini-glukosidi/galaktosidi



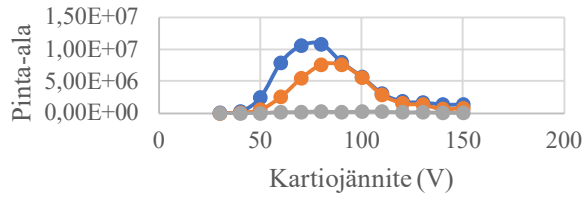
● m/z 301 ● m/z 300 ● m/z 299

Ionisuhde



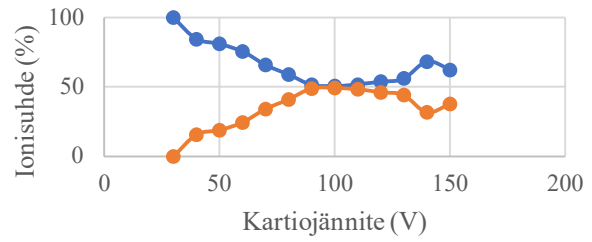
● m/z 301 ● m/z 300

37. Kemferoli-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



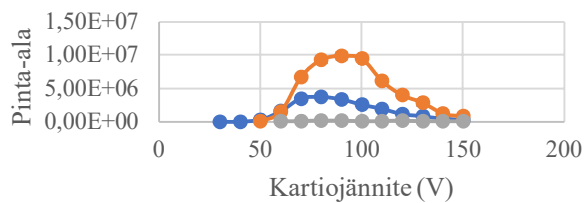
● m/z 301 ● m/z 300 ● m/z 299

Ionisuhde



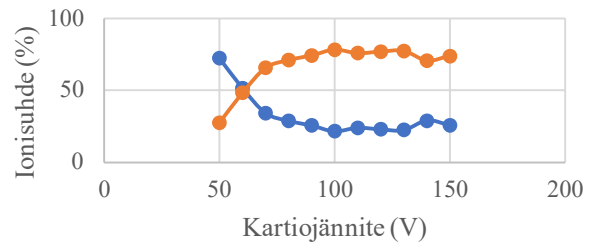
● m/z 301 ● m/z 300

38. Kversetiini-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



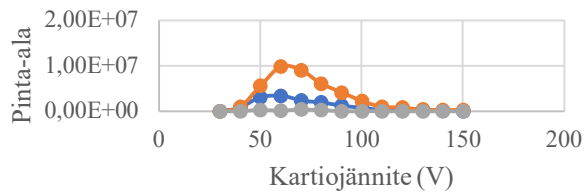
● m/z 301 ● m/z 300 ● m/z 299

Ionisuhde



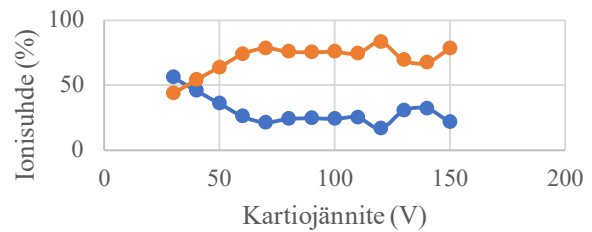
● m/z 301 ● m/z 300

39. Kversetiini-glukosidi/galaktosidi



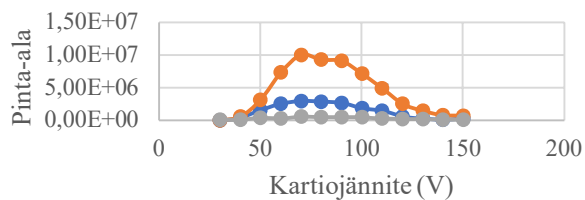
● m/z 301 ● m/z 300 ● m/z 299

Ionisuhde



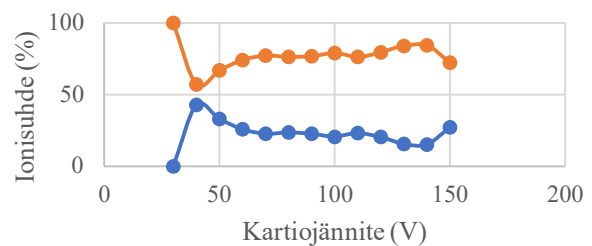
● m/z 301 ● m/z 300

40. Kversetiini-asetyyli-glukosidi/galaktosidi



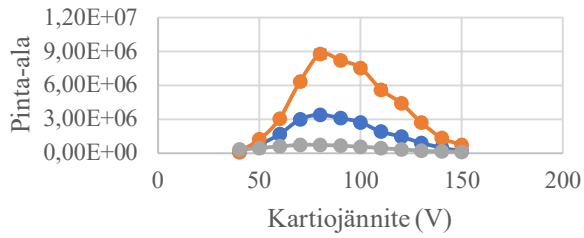
● m/z 301 ● m/z 300 ● m/z 299

Ionisuhde



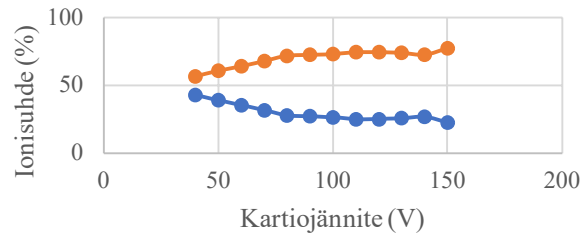
● m/z 301 ● m/z 300

41. Kversetiiniglykosidi



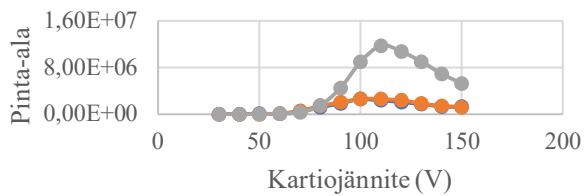
● m/z 301 ● m/z 300 ● m/z 299

Ionisuhte



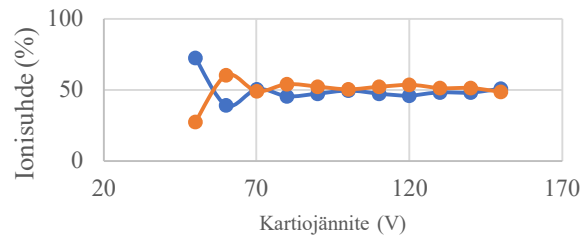
● m/z 301 ● m/z 300

42. Kemferoli-ramnosyyli-di-glukosidi/galaktosidi



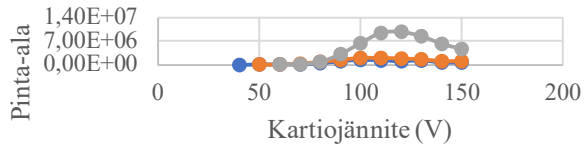
● m/z 285 ● m/z 284 ● m/z 283

Ionisuhte



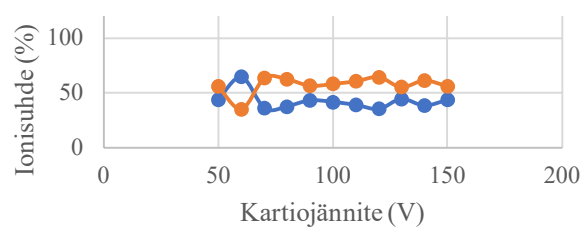
● m/z 285 ● m/z 284

43. Kemferoli-asetyyli-ramnosyyli-di-glukosidi/galaktosidi



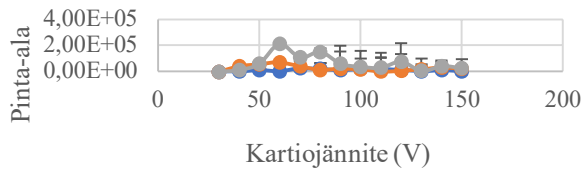
● m/z 285 ● m/z 284 ● m/z 283

Ionisuhte



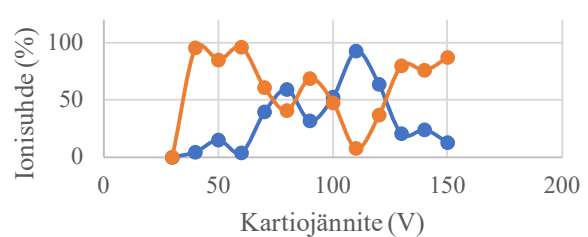
● m/z 285 ● m/z 284

44. Kemferoli-asetyyli-ramnosyyli-di-glukosidi/galaktosidi



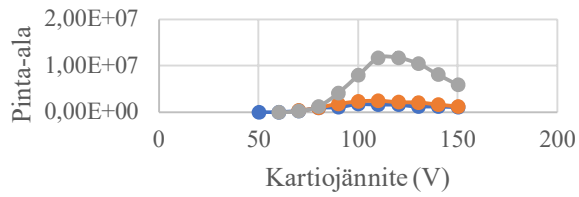
● m/z 285 ● m/z 284 ● m/z 283

Ionisuhte



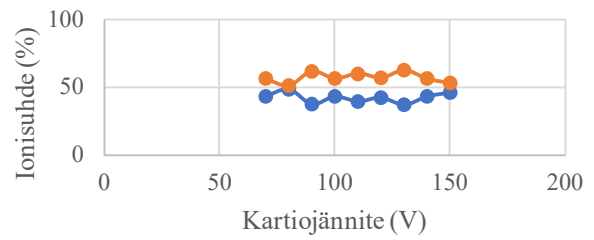
● m/z 285 ● m/z 284

45. Isoramnetiini-ramnosyyli-galloyli-arabinosidi



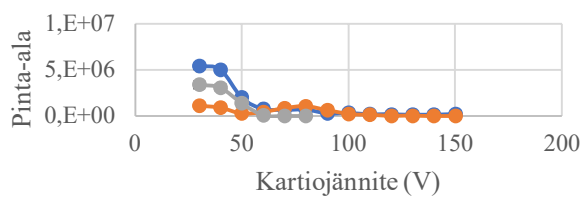
—●— m/z 315 —●— m/z 314 —●— m/z 313

Ionisuhde



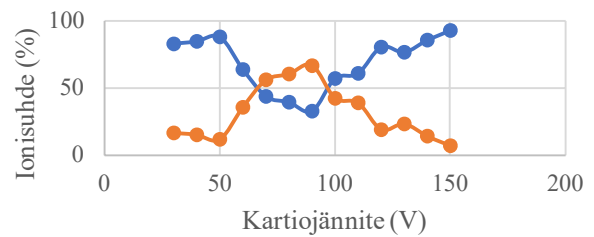
—●— m/z 315 —●— m/z 314

46. Isoramnetiini-glukosidi/galaktosidi



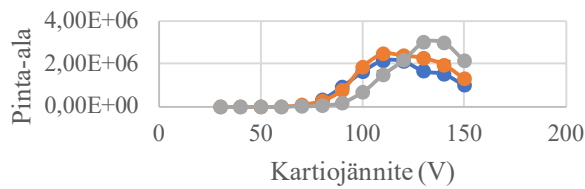
—●— m/z 315 —●— m/z 314 —●— m/z 313

Ionisuhde



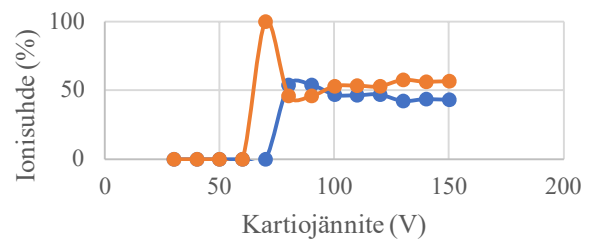
—●— m/z 315 —●— m/z 314

47. Kemferoli-tri-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



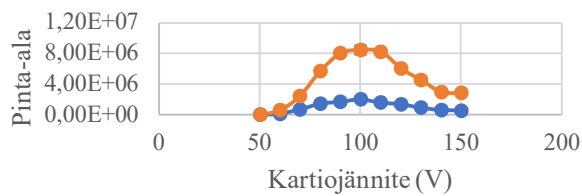
—●— m/z 285 —●— m/z 284 —●— m/z 283

Ionisuhde



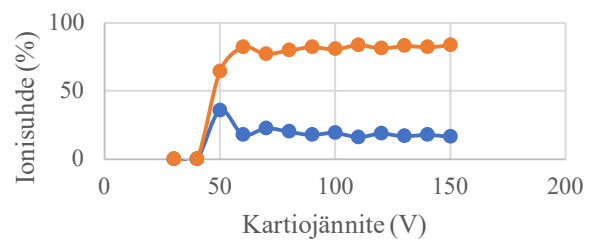
—●— m/z 285 —●— m/z 284

48. Kversetiini-di-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



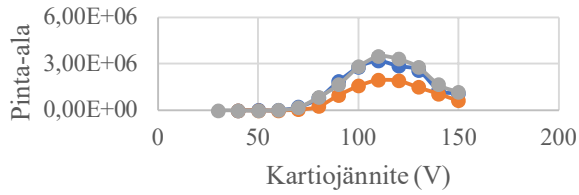
—●— m/z 301 —●— m/z 300 —●—

Ionisuhde



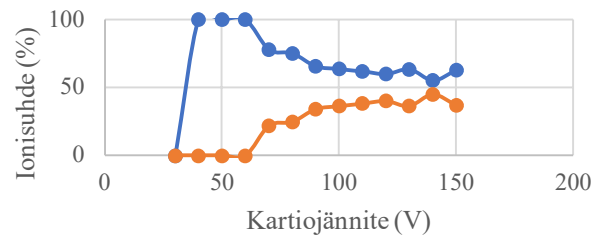
—●— m/z 301 —●— m/z 300

49. Kemferoli-ramnosyyli-di-glukosidi/galaktosidi



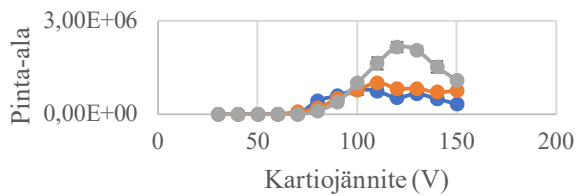
● m/z 285 ● m/z 284 ● m/z 283

Ionisuhde



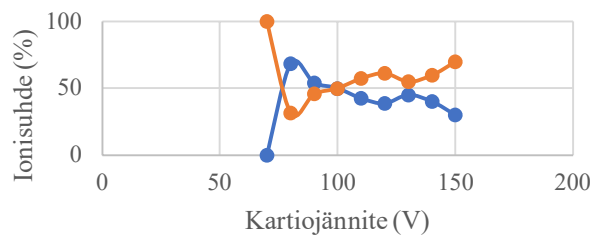
● m/z 285 ● m/z 284

50. Kversetiini-tri-glukosidi/galaktosidi



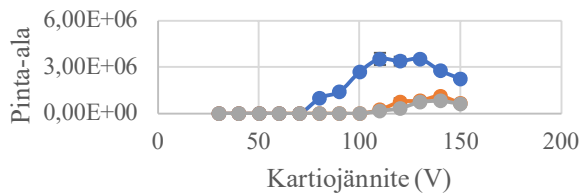
● m/z 301 ● m/z 300 ● m/z 299

Ionisuhde



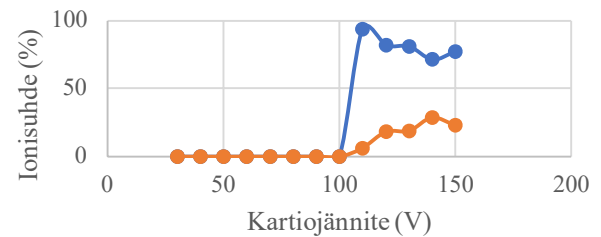
● m/z 301 ● m/z 300

51. Kemferoli-tetra-glukosidi/galaktodifi



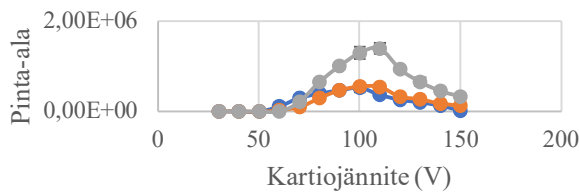
● m/z 285 ● m/z 284 ● m/z 283

Ionisuhde



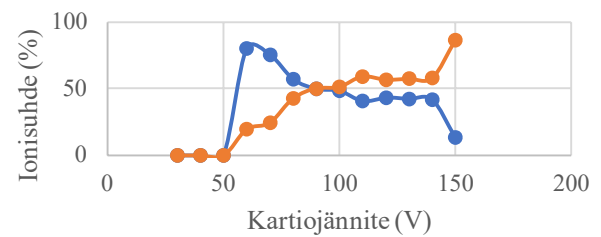
● m/z 285 ● m/z 284

52. Isoramnetiini-di-glukosidi/galaktosidi



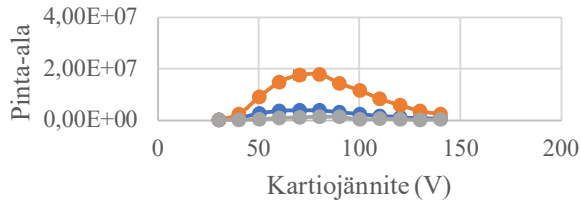
● m/z 315 ● m/z 314 ● m/z 313

Ionisuhde



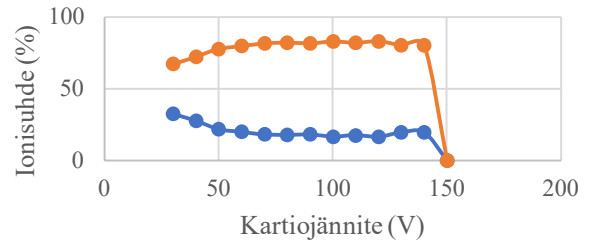
● m/z 315 ● m/z 314

53. Kversetiini-arabinoosi-glukosidi/galaktosidi



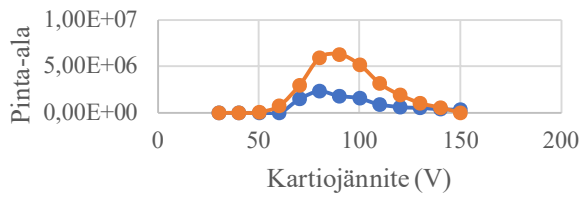
—●— m/z 301 —●— m/z 300 —●— m/z 299

Ionisuhde



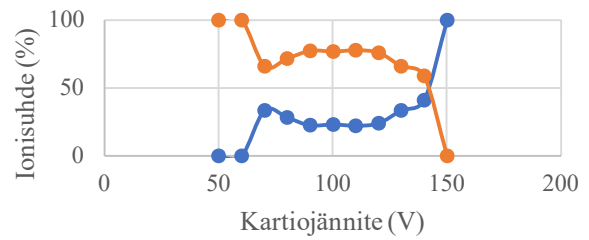
—●— m/z 301 —●— m/z 300

54. Kversetiini-galloyyli-glukosidi/galaktosidi



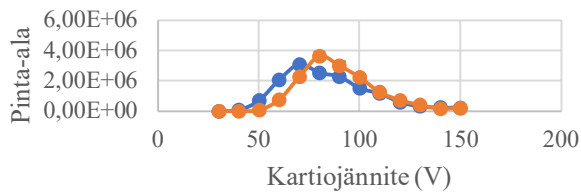
—●— m/z 301 —●— m/z 300 —●— m/z 299

Ionisuhde



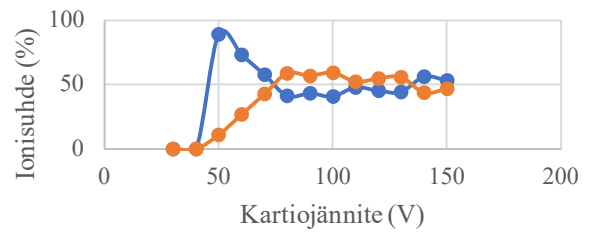
—●— m/z 301 —●— m/z 300

55. Isoramnетиini-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



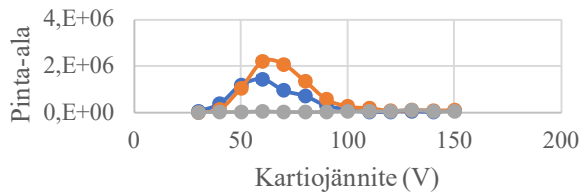
—●— m/z 315 —●— m/z 314

Ionisuhde



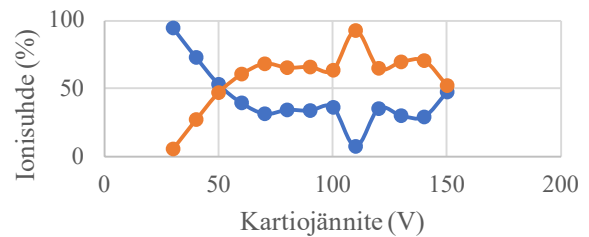
—●— m/z 315 —●— m/z 314

56. Kemferoli-glukosidi/galaktosidi



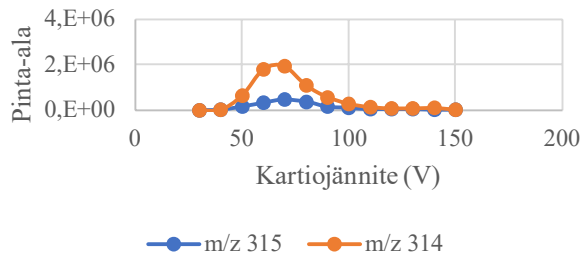
—●— m/z 285 —●— m/z 284 —●— m/z 283

Ionisuhde

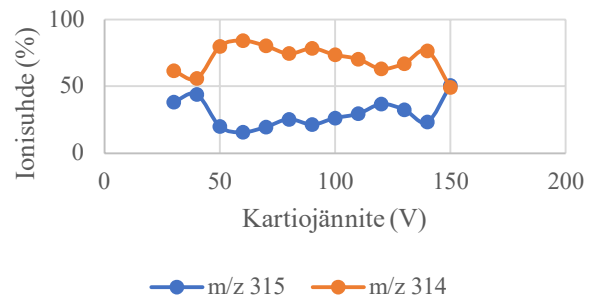


—●— m/z 285 —●— m/z 284

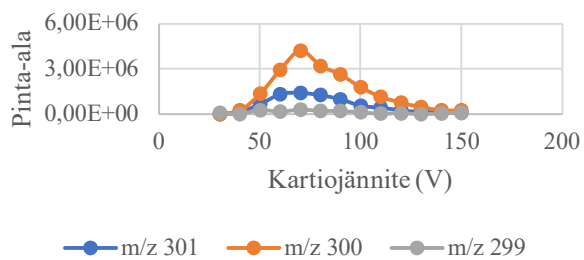
57. Isoramnetiini-glukosidi/galaktosidi



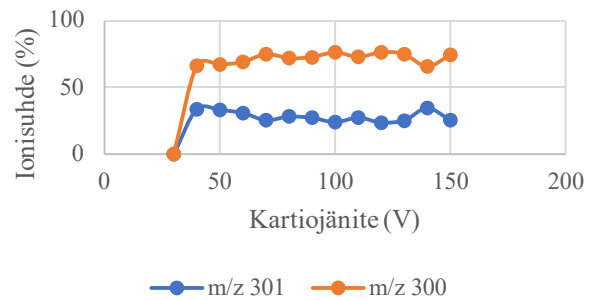
Ionisuhde



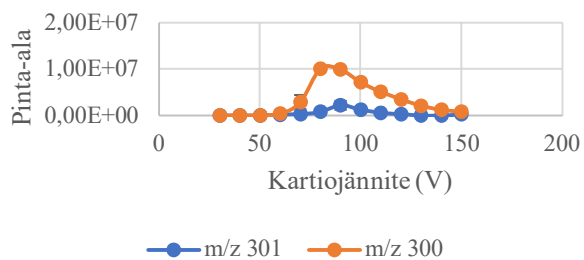
58. Kversetiini-asetyyli-glukosidi/galaktosidi



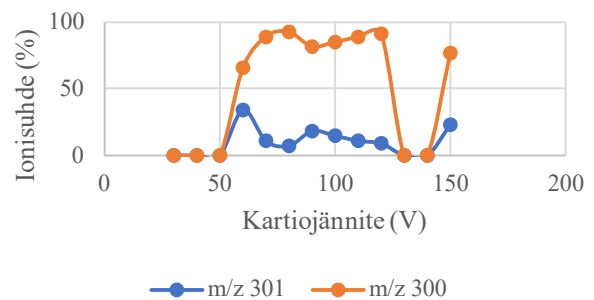
Ionisuhde



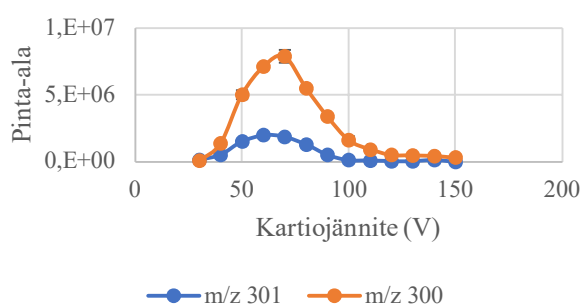
59. Kversetiini-galloyyli-glukosidi/galaktosidi



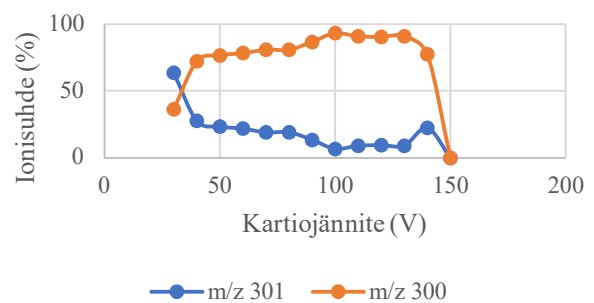
Ionisuhde



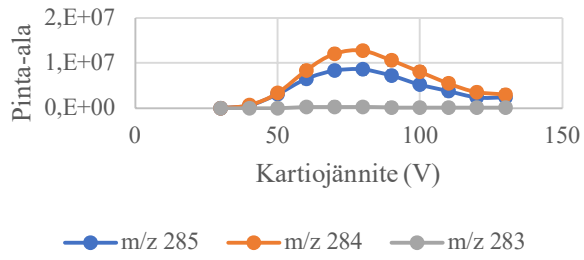
60. Kversetiini-arabinosidi



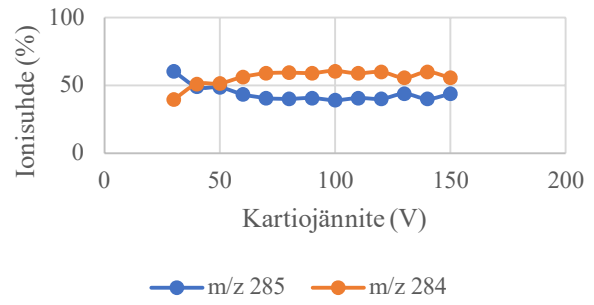
Ionisuhde



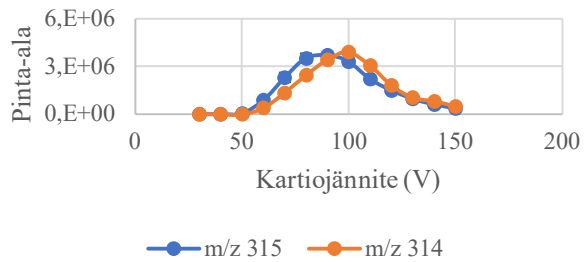
61. Kemferoli-tri-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



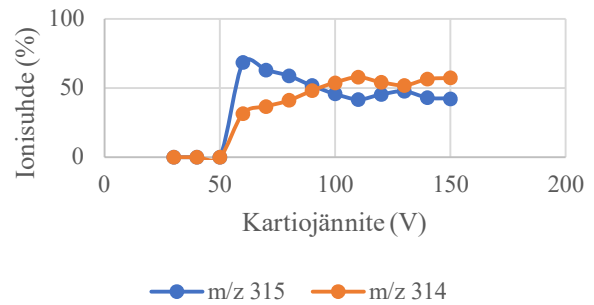
Ionisuhte



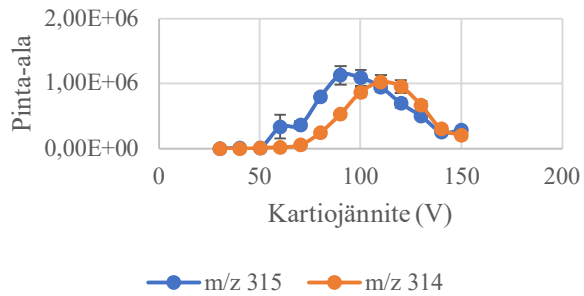
62. Isoramnetiini-di-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



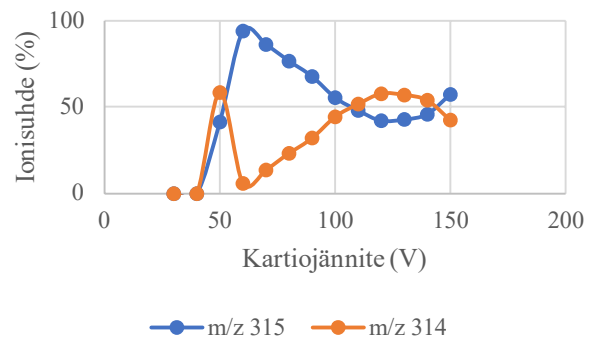
Ionisuhte



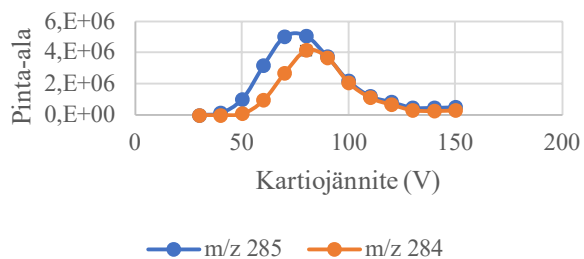
63. Isoramnetiini-ramnosyyli-di-glukosidi/galaktosidi



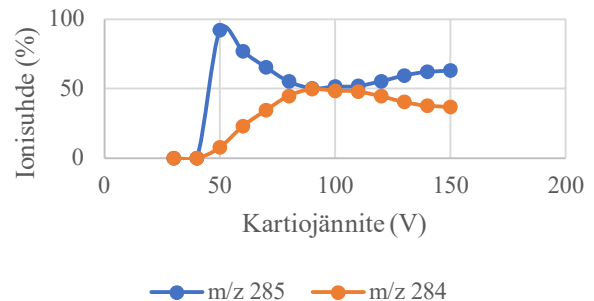
Ionisuhte



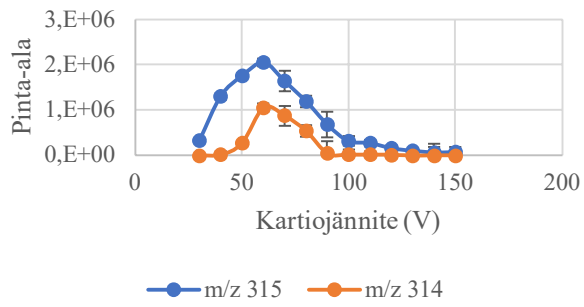
64. Kemferoli-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



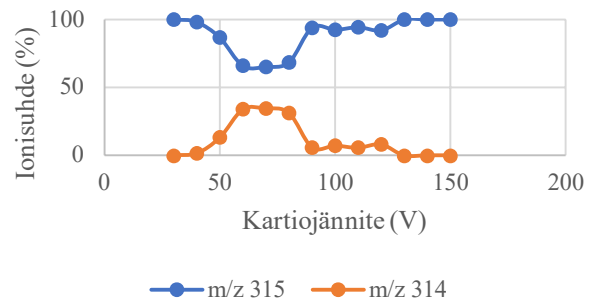
Ionisuhte



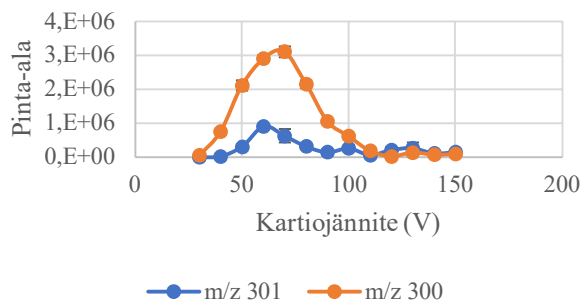
65. Isoramnetiini-glukuronidi



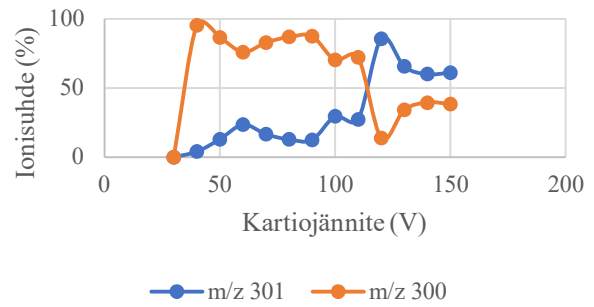
Ionisuhde



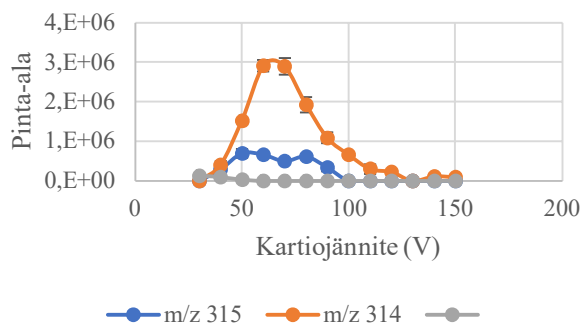
66. Kversetiini-arabinosidi



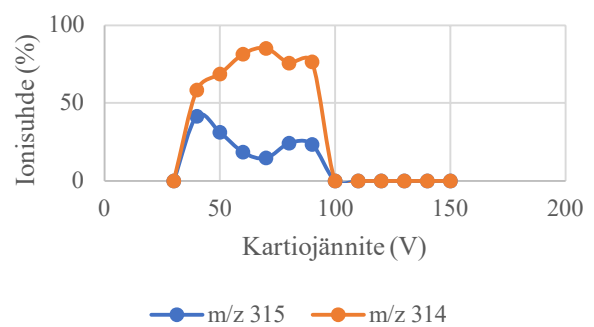
Ionisuhde



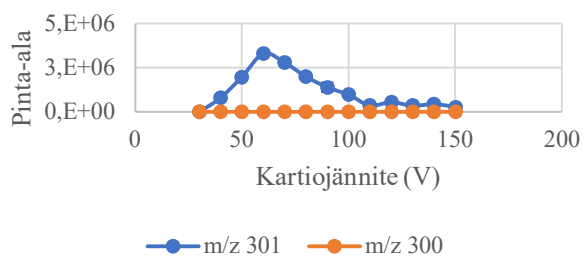
67. Kversetiini-ramnosidi



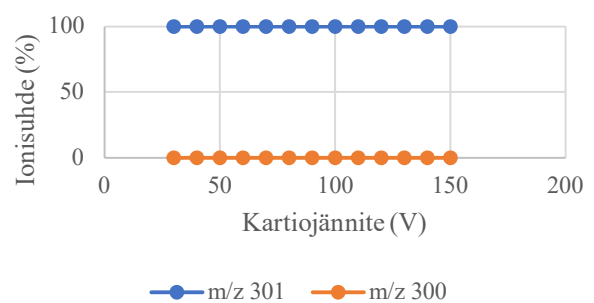
Ionisuhde



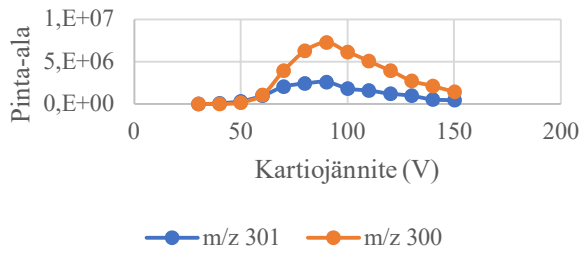
68. Kversetiini-galloyyli-arabinosidi



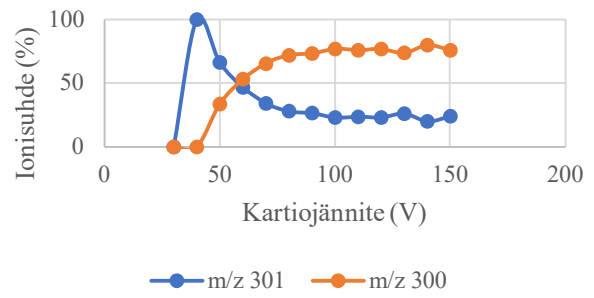
Ionisuhde



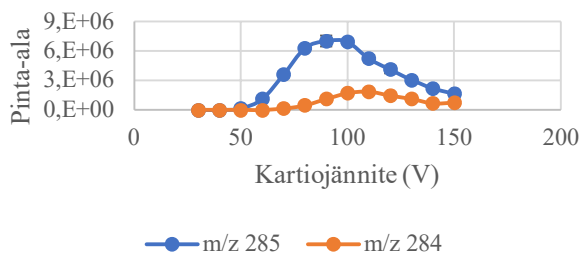
69. Kversetiini-di-glukosidi/galaktosidi



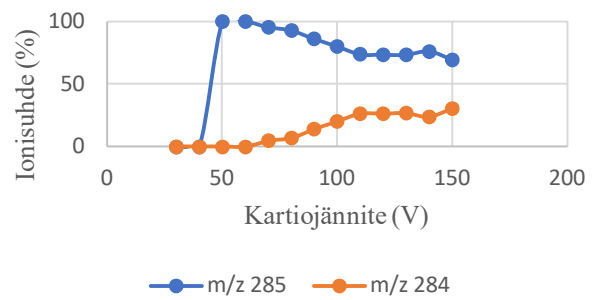
Ionisuhde



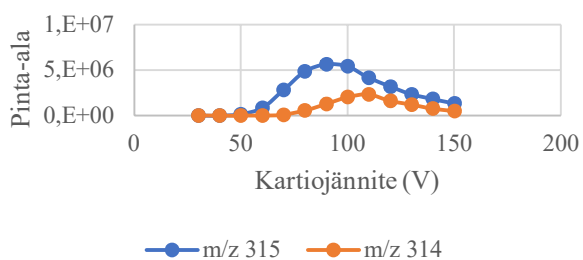
70. Kemferoli-tri-glukosidi/galaktosidi



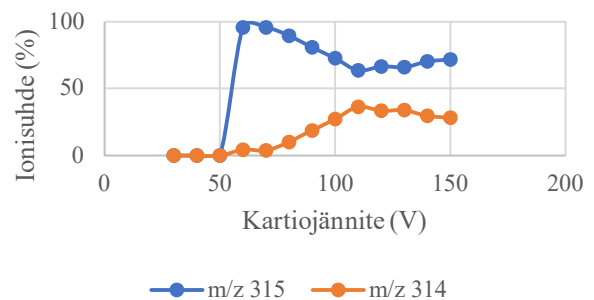
Ionisuhde



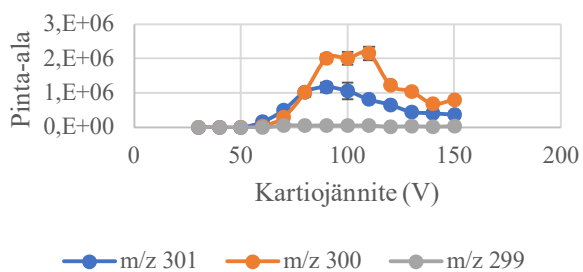
71. Isoramnetiini-tri-glukosidi/galaktosidi



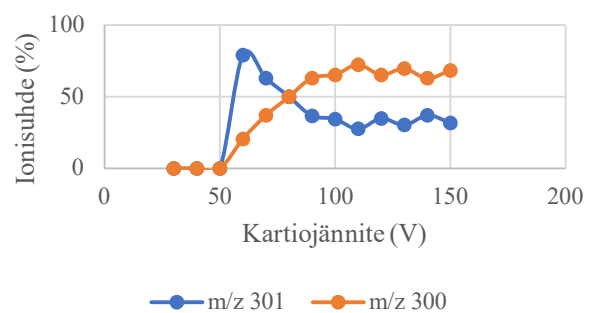
Ionisuhde



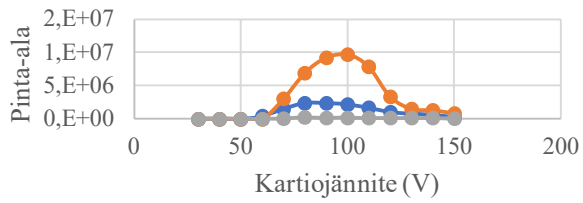
72. Kversetiini-arabinoosi-di-glukosidi/galaktosidi



Ionisuhde

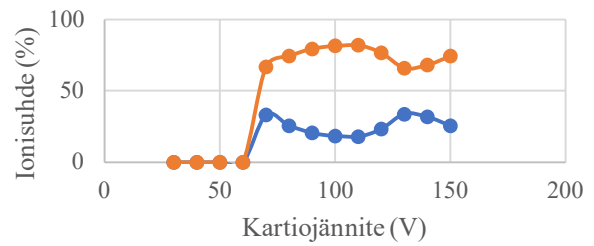


73. Kemferoli-di-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi



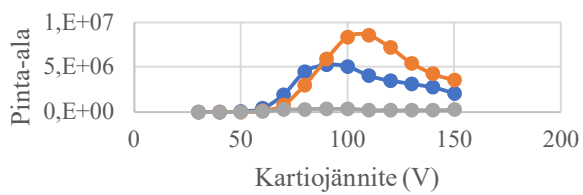
—●— m/z 285 —●— m/z 284 —●— m/z 283

Ionisuhte



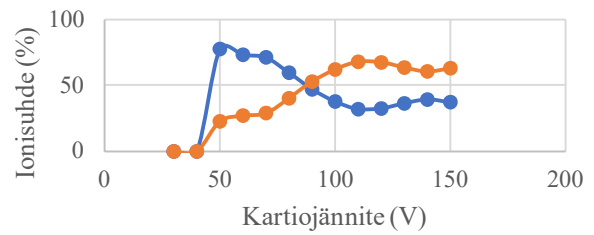
—●— m/z 285 —●— m/z 284

74. Kversetiini-tri-glukosidi/galaktosidi



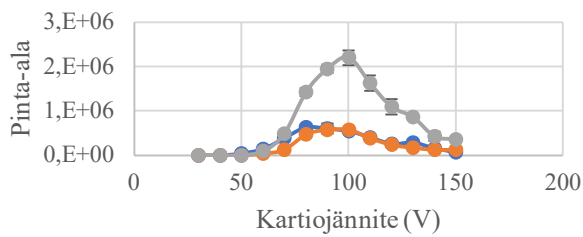
—●— m/z 301 —●— m/z 300 —●— m/z 299

Ionisuhte



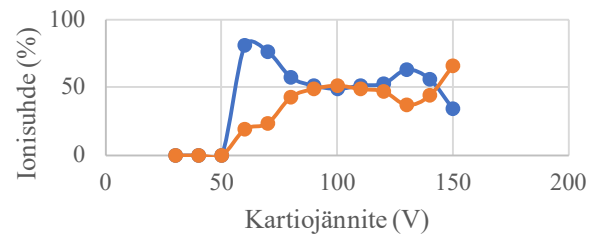
—●— m/z 301 —●— m/z 300

75. Kversetiini-di-ramnosidi



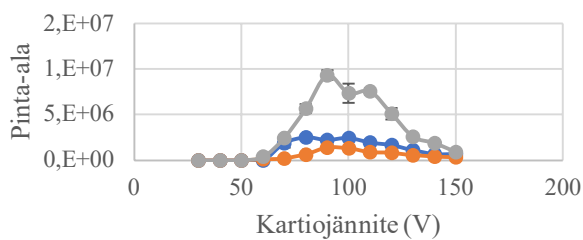
—●— m/z 301 —●— m/z 300 —●— m/z 299

Ionisuhte



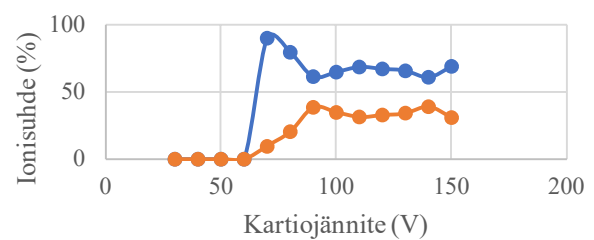
—●— m/z 301 —●— m/z 300

76. Kemferoli-di-ramnosidi



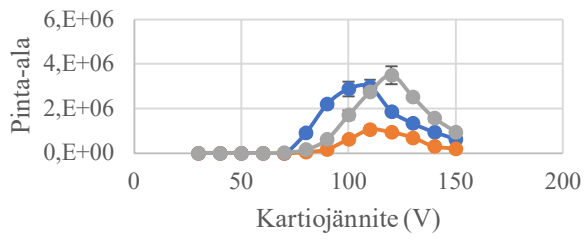
—●— m/z 285 —●— m/z 284 —●— m/z 283

Ionisuhte



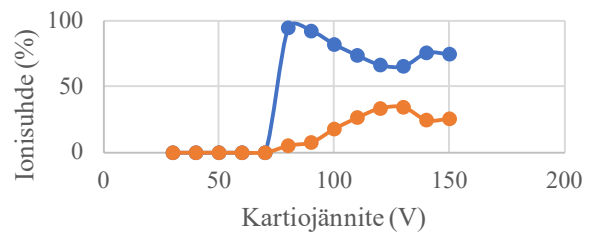
—●— m/z 285 —●— m/z 284

77. Kemferoli-ramnosidi



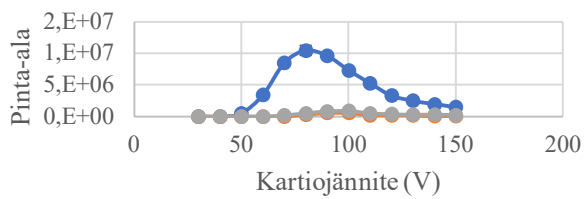
● m/z 285 ● m/z 284 ● m/z 283

Ionisuhde



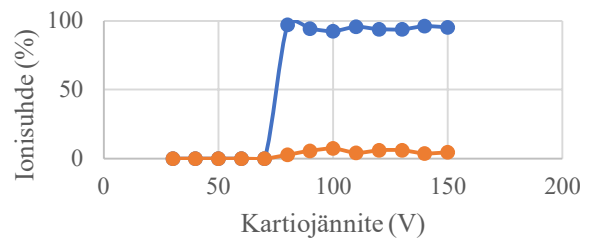
● m/z 285 ● m/z 284

78. Kemferoli-asetyyli-arabinoosyyli-ramnosidi



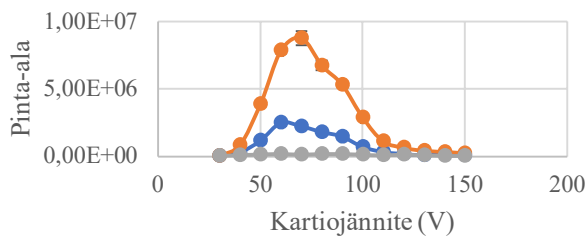
● m/z 285 ● m/z 284 ● m/z 283

Ionisuhde



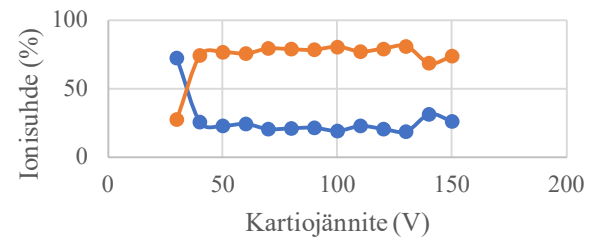
● m/z 285 ● m/z 284

79. Myrisetiini-ramnosidi



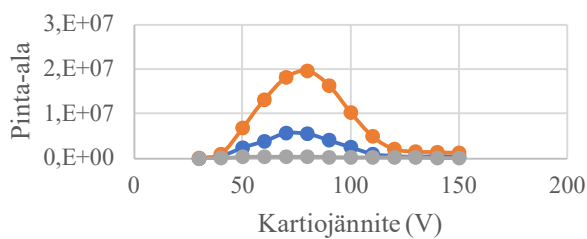
● m/z 317 ● m/z 316 ● m/z 315

Ionisuhde



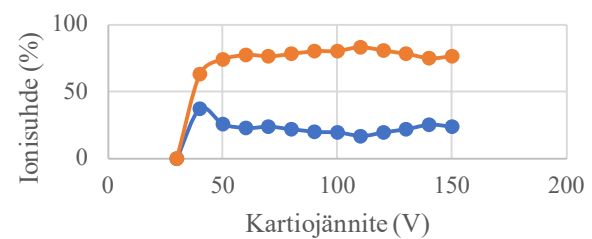
● m/z 317 ● m/z 316

80. Kversetiini-ramnosidi



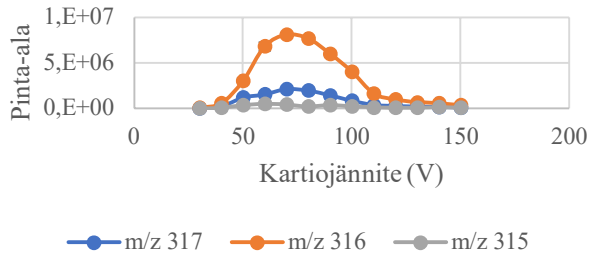
● m/z 301 ● m/z 300 ● m/z 299

Ionisuhde

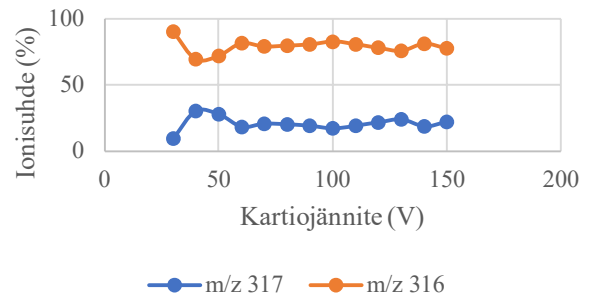


● m/z 301 ● m/z 300

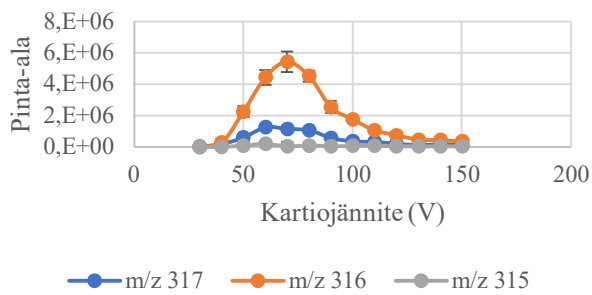
81. Myrisetiini-glukosidi/galaktosidi



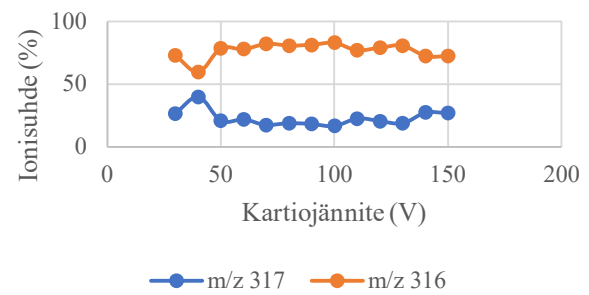
Ionisuhde



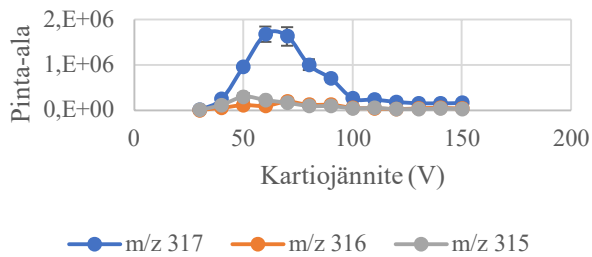
82. Myrisetiini-ramnosidi



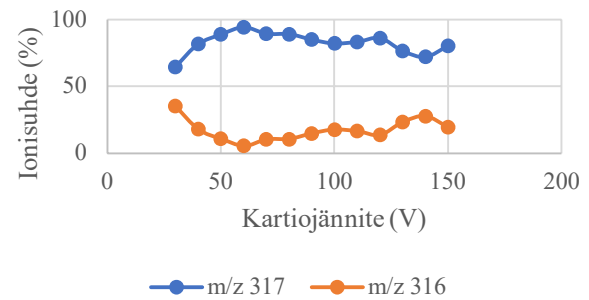
Ionisuhde



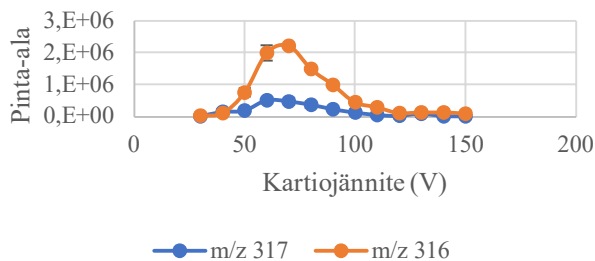
83. Myrisetiini-galloyyli-arabinosidi



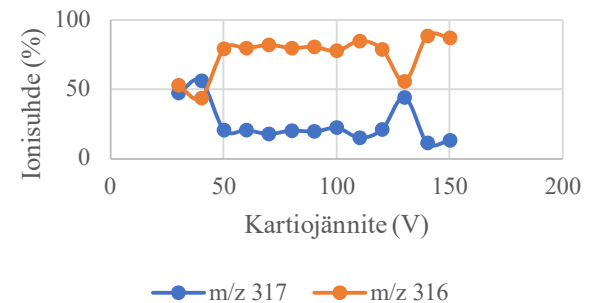
Ionisuhde



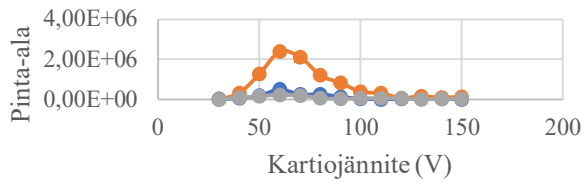
84. Myrisetiini-asetyyli-ramnosidi



Ionisuhde

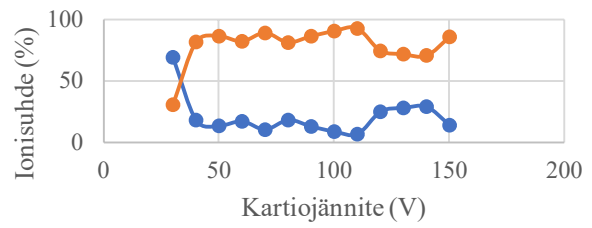


85. Myrisetiini-asetyyli- ramnosidi



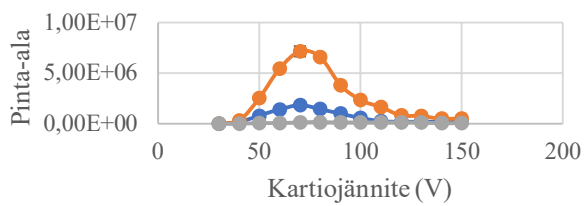
—●— m/z 317 —●— m/z 316 —●— m/z 315

Ionisuhde



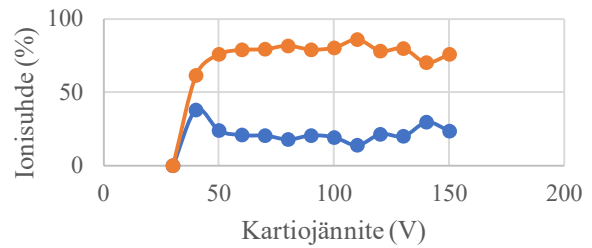
—●— m/z 317 —●— m/z 316

86. Myrisetiini- glukosidi/galaktosidi



—●— m/z 317 —●— m/z 316 —●— m/z 315

Ionisuhde



—●— m/z 317 —●— m/z 316

3. Kasviuutteista tunnistetut flavonoliglykosidiyhdisteet.

Liitetaulukko 1. Tutkimuksessa käytetyistä kasviuutteista karakterisoidut yhdisteet, retentioaika, UV-spektrissä havaitut maksimit, molekyyliaino, arvoitu molekyylikaava, deprotonoituneen molekyyli-ionin havaittu m/z -arvo, spektrissä havaittujen muiden tärkeimpien fragmenttien m/z -arvot, laskettu massa, mitattu massa, virhe ja kaksoissidosekvivalentti (DBE).

Yhdiste nro.	Yhdiste	RT (min)	UV-max	M	Molekyylikaava	m/z [M-H] ⁻	Muita m/z -arvoja	Tarkka massa, laskettu	Tarkka massa, mitattu	Virhe (ppm)	DBE	Viitteet
1	Kversetiini-glukuronidi-glukosidi/galaktosidi	2,93	254–352	640	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₈	639,12133	461 (100), 295, 191	640,1266	640,126052	1,632	14	[48]
2	Kemferoli-glukuronidi-glukosidi/galaktosidi	3,17	265–346	624	C ₂₇ H ₂₈ O ₁₇	623,12613	593 (40), 447 (55), 285, 175	624,1317	624,131152	1,694	14	[49]
3	Kemferoli-glukuronidi-di-glukosidi/galaktosidi	4,39	265–342	786	C ₃₆ H ₃₄ O ₂₀	785,15762	609, 461, 447 (80), 285 (100)	786,1632	786,162652	0,705	20	[49]
4	Myrisetiini-glukosidi/galaktosidi	3,67	354	480	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	479,08354	317 (80), 191 (10)	480,0897	480,089152	0,89	12	[50]
5	Kversetiini-glukuronidi	4,06	255–353	478	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	477,06762	301 (100), 271	478,0741	478,073552	0,328	13	[51]
6	Kversetiini-asetyyli-glukosidi/galaktosidi	4,29	255–354	506	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	505,09949	341, 300 (50)	506,1053	506,104752	1,438	13	[52]
7	Kemferoli-glukuronidi	4,39	265–347	462	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	461,07308	447, 285 (100)	462,0792	462,078652	1,151	13	[53]
8	Kemferoli-di-glukosidi/galaktosidi	3,19	265–344	610	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,14708	447, 285, 145	610,1524	610,151852	1,596	13	[54]
9	Kemferoli-ramnosyyli-di-glukosidi/galaktosidi	3,21	265–347	756	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	755,20502	447, 285, 175	756,21	756,209452	1,329	14	[55]
10	Kemferoli-glukosidi/galaktosidi	4,38	265–347	448	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,09357	284 (50)	448,0999	448,099352	0,638	12	[56]
11	Kversetiini-tri-glukosidi/galaktosidi	3,4	255–358	788	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₂	787,19437		788,1998	788,199252	0,666	14	[54]
12	Kversetiini-di-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi	3,6	255–354	756	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	755,2043	625	756,21	756,2095	0,375	14	[55]
13	Kemferoli-tri-glukosidi/galaktosidi	3,68	267–350	772	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	771,1993	285	772,2049	772,2044	0,413	14	[54]
14	Kversetiini-di-glukosidi/galaktosidi	3,597	255–353	626	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	625,1419	463, 300	626,1473	626,1468	1,404	13	[57]
15	Kversetiini-glukuronidi	4,07	255–354	478	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₃	477,0675	301 (100)	478,0741	478,0736	0,034	13	[58]

16	Isoramnetiini-glukosidi/galaktosidi	4,48	254–353	478	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	477,1042	314, 151	478,1104	478,1099	0,651	12	[59]
17	Kemferoli-asetyyli-glukosidi/galaktosidi	4,66	268–348	490	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₂	489,1041	285 (60)	490,1104	490,1099	0,472	13	[60]
18	Kversetiini-di-glukosidi/galaktosidi	3,58	255–354	626	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₇	625,142	300, 133	626,1473	626,1468	1,516	13	[61]
19	Kversetiini-arabinoosi-glukosidi/galaktosidi	3,742	255–354	596	C ₂₆ H ₂₈ O ₁₆	595,1314	300	596,1368	596,1363	1,516	13	[62]
20	Kversetiini-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi	3,898	255–354	610	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1469	300	610,1524	610,1519	1,448	13	[63]
21	Isoramnetiini-di-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi	3,93	254–354	770	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀	769,2206		770,2256	770,2251	1,148	14	[55]
22	Kversetiini-glukosidi/galaktosidi	4,026	255–353	464	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0888	300 (90)	464,0948	464,0943	1,189	12	[64]
23	Isoramnetiini-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi	4,29	254–354	624	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	623,1624	447, 315	624,168	624,1675	1,095	13	[55]
24	Kversetiini-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi	3,59	255–354	756	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₀	755,2048		756,21	756,2095	1,051	14	[55]
25	Kemferoli-di-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi	3,81	265–347	740	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	739,2099	689, 284	740,2151	740,2146	1,053	14	[55]
26	Isoramnetiini-di-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi	3,94	254–354	770	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₀	769,2202	609	770,2256	770,2251	0,667	14	[55]
27	Kemferoli-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi	4,13	265–348	594	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₅	593,1521	284	594,1575	594,157	1,495	13	[65]
28	Kversetiini-ramnosyyli-tri-glukosidi/galaktosidi	2,83	354–255	934	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₆	933,2527	785, 600, 438, 299, 137 (10)	934,2574	934,2569	1,056	15	[66]
29	Kemferoli-ramnosyyli-tri-glukosidi/galaktosidi	2,96	266–348	918	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₅	917,2583	771 (20), 625, 438, 217	918,2625	918,262	1,614	15	[67]
30	Kversetiini-ramnosyyli-di-glukosidi/galaktosidi	3,33	255–354	772	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	771,1999	623, 313, 226	772,2049	772,2044	1,269	14	[67]
31	Isoramnetiini-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi	3,884	254–353	624	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₆	623,1623	461, 284, 159	624,168	624,1675	0,918	13	[68]
32	Kemferoli-ramnosyyli-tri-glukosidi/galaktosidi	2,954	266–348	918	C ₃₉ H ₅₀ O ₂₅	917,2587	771 (15), 625, 159	918,2625	918,262	2,017	15	[67]
33	Kversetiini-ramnosyyli-glukosidi/galaktosidi	3,544	255–353	610	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	609,1471	446, 323 (40), 214, 177 (45), 159 (60)	610,1524	610,1519	1,597	13	[68]

34	Kemferoli-ramnosyyli- glukosidi/galaktosidi	3,791	265–347	594	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593,1523	431 (15), 353, 159	594,1575	594,157	1,883	13	[67]
35	Kversetiini-ramnosyyli- glukosidi/galaktosidi	3,176	254–351	610	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609,147	489 (10)	610,1524	610,1519	1,481	13	[68]
36	Kversetiini- glukosidi/galaktosidi	4,024	255–353	464	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463,0888	300 (80), 183	464,0948	464,0943	1,384	12	[64]
37	Kemferoli-ramnosyyli- glukosidi/galaktosidi	4,247	247–265	594	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593,1523	447, 285, 191	594,1575	594,157	1,832	13	[67]
38	Kversetiini-ramnosyyli- glukosidi/galaktosidi	3,935	255–354	610	$C_{27}H_{30}O_{16}$	609,1472	301	610,1524	610,1519	1,711	13	[68]
39	Kversetiini- glukosidi/galaktosidi	4,063	255–353	464	$C_{21}H_{20}O_{12}$	463,0889	300 (50)	464,0948	464,0943	1,513	12	[64]
40	Kversetiini-asetyyli- glukosidi/galaktosidi	4,324	255–354	506	$C_{23}H_{22}O_{13}$	505,0995	341, 300 (40), 191	506,1053	506,1048	1,418	13	[69]
41	Kversetiiniglykosidi	4,29	288–354	608	$C_{27}H_{27}O_{16}$	607,1312	505 (70), 463 (20), 300 (15)	608,1368	608,1363	1,239	14	[70]
42	Kemferoli-ramnosyyli-di- glukosidi/galaktosidi	2,863	266–347	756	$C_{33}H_{40}O_{20}$	755,2055	593 (30), 446	756,21	756,2095	1,925	14	[55]
43	Kemferoli-asetyyli- ramnosyyli-di- glukosidi/galaktosidi	3,301	265–347	798	$C_{35}H_{53}O_{21}$	797,2163	635, 446, 255, 175	798,2205	798,22	2,206	15	[71]
44	Kemferoli-asetyyli- ramnosyyli-di- glukosidi/galaktosidi	3,421	265–347	798	$C_{35}H_{53}O_{22}$	798,2163	635, 446, 255, 176	798,2205	798,22	2,206	15	[71]
45	Isoramnetiini-ramnosyyli- galloyyli-arabinosidi	3,932	267–350	746	$C_{34}H_{34}O_{19}$	745,1632	599, 431 (40), 313 (60)	746,1683	746,1678	1,42	18	[72]
46	Isoramnetiini- glukosidi/galaktosidi	4,431	254–353	478	$C_{22}H_{22}O_{12}$	477,1046	447, 314	478,1104	478,1099	1,532	12	[59]
47	Kemferoli-tri-ramnosyyli- glukosidi/galaktosidi	3,249	266–347	886	$C_{39}H_{50}O_{23}$	885,2686	739, 595	886,2727	886,2722	1,739	15	[63]
48	Kversetiini-di-ramnosyyli- glukosidi/galaktosidi	3,615	255–354	756	$C_{33}H_{40}O_{20}$	755,2045	625 (40), 563 609 (20), 579	756,21	756,2095	0,667	14	[55]
49	Kemferoli-ramnosyyli-di- glukosidi/galaktosidi	3,209	265–347	756	$C_{33}H_{40}O_{20}$	755,2049	(20), 446, 285	756,21	756,2095	1,223	14	[73]
50	Kversetiini-tri- glukosidi/galaktosidi	2,79	254–352	788	$C_{33}H_{40}O_{22}$	787,1952	593, 415, 285	788,1998	788,1993	1,708	14	[54]

51	Kemferoli-tetra- glukosidi/galaktodifi	2,814	265–343	934	$C_{39}H_{50}O_{26}$	933,2531	487 (20), 415 (60), 285	934,2574	934,2569	1,452	15	[54]
52	Isoramnetiini-di- glukosidi/galaktosidi	3,283	252–351	640	$C_{28}H_{32}O_{17}$	639,1578	595, 477 (20)	640,1629	640,1624	1,811	13	[74]
53	Kversetiini-arabinoosi- glukosidi/galaktosidi	3,742	255–353	596	$C_{26}H_{28}O_{16}$	595,1316	463, 300 (15)	596,1368	596,1363	1,953	13	[74]
54	Kversetiini-galloyyli- glukosidi/galaktosidi	3,855	265–352	616	$C_{28}H_{24}O_{16}$	615,1	463, 341	616,1056	616,1051	1,337	17	[62]
55	Isoramnetiini-ramnosyyli- glukosidi/galaktosidi	4,335	254–354	624	$C_{28}H_{32}O_{16}$	623,1626	315 (10)	624,168	624,1675	1,271	13	[55]
56	Kemferoli- glukosidi/galaktosidi	4,383	265–348	448	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447,0939	284 (40), 151	448,0999	448,0994	1,354	12	[56]
57	Isoramnetiini- glukosidi/galaktosidi	4,487	254–354	478	$C_{22}H_{22}O_{12}$	477,1044	314 (20)	478,1104	478,1099	1,154	12	[59]
58	Kversetiini-asetyyli- glukosidi/galaktosidi	4,293	254–353	506	$C_{23}H_{22}O_{13}$	505,0996	341, 300 (40)	490,1104	490,1099	1,576	13	[68]
59	Kversetiini-galloyyli- glukosidi/galaktosidi	3,853	261–353	616	$C_{28}H_{24}O_{16}$	615,1	463 (10), 300	616,1056	616,1051	1,402	17	[62]
60	Kversetiini-arabinosidi	4,314	255–354	434	$C_{20}H_{18}O_{11}$	433,0778	300 (80)	434,0843	434,0838	0,313	12	[75]
61	Kemferoli-tri-ramnosyyli- glukosidi/galaktosidi	3,771	265–348	886	$C_{39}H_{50}O_{23}$	885, 26869	-	886,2727	886,2722	1,897	15	[63]
62	Isoramnetiini-di-ramnosyyli- glukosidi/galaktosidi	4,249	254–353	770	$C_{34}H_{42}O_{20}$	769,2207	593 (10), 447 (10), 285	770,2256	770,2251	1,33	14	[55]
63	Isoramnetiini-ramnosyyli-di- glukosidi/galaktosidi	3,302	254–353	786	$C_{34}H_{42}O_{21}$	785,2161	623 (40), 401 (10), 161	786,2205	786,22	1,985	14	[67]
64	Kemferoli-ramnosyyli- glukosidi/galaktosidi	4,249	265–347	594	$C_{27}H_{30}O_{15}$	593,1521	285	594,1575	594,157	1,461	13	[67]
65	Isoramnetiini-glukuronidi	4,521	254–353	492	$C_{22}H_{20}O_{13}$	491,0837	315 (100)	492,0897	492,0892	1,255	13	[76]
66	Kversetiini-arabinosidi	4,326	255–353	434	$C_{20}H_{18}O_{11}$	433,0777	300 (100)	434,0843	434,0838	0,22	12	[75]
67	Kversetiini-ramnosidi	4,445	255–348	448	$C_{21}H_{20}O_{11}$	447,0937	300 (70)	448,0999	448,0994	0,996	12	[62]
68	Kversetiini-galloyyli- arabinosidi	4,524	266–355	586	$C_{27}H_{22}O_{15}$	585,0894	301 (100)	586,0951	586,0946	1,413	17	[62]
69	Kversetiini-di- glukosidi/galaktosidi	3,625	254–354	626	$C_{27}H_{30}O_{17}$	625,1418	463, 301	626,1473	626,1468	1,228	13	[57]

70	Kemferoli-tri- glukosidi/galaktosidi	3,689	267–350	772	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₁	771,1995	639, 479, 285	772,2049	772,2044	0,751	14	[54]
71	Isoramnetiini-tri- glukosidi/galaktosidi	3,768	253–357	802	C ₃₄ H ₄₂ O ₂₂	801,2107	741, 595, 493	802,2154	802,2149	1,553	14	[67]
72	Kversetiini-arabinosyyli-di- glukosidi/galaktosidi	3,501	265–354	758	C ₃₂ H ₃₈ O ₂₁	757,1839	301	758,1893	758,1888	0,804	14	[77]
73	Kemferoli-di-ramnosyyli- glukosidi/galaktosidi	3,85	265–348	740	C ₃₃ H ₄₀ O ₁₉	739,2101	609, 399, 285	740,2151	740,2146	1,323	14	[55]
74	Kversetiini-tri- glukosidi/galaktosidi	3,399	255–358	788	C ₃₃ H ₄₀ O ₂₂	787,1948	475	788,1998	788,1993	1,225	14	[54]
75	Kversetiini-di-ramnosidi	3,849	255–349	594	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	593,1523	447 (10)	594,1575	594,157	1,933	13	[67]
76	Kemferoli-di-ramnosidi	4,119	262–342	578	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₄	577,1573	431 (20), 285 619 (10), 431,	578,1626	578,1621	1,544	13	[67]
77	Kemferoli-ramnosidi	4,698	264–344	722	C ₃₃ H ₃₈ O ₁₈	721,1995	285	722,2046	722,2041	1,363	15	[78]
78	Kemferoli-asetyyli- arabinoosyyli-ramnosidi	4,889	264–344	606	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₅	605,1523	431 (100), 285 (10)	606,1575	606,157	1,779	14	[78]
79	Myrisetiini-ramnosidi	3,97	257–349	464	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	463,0882	316 (40)	464,0948	464,0943	0,045	12	[79]
80	Kversetiini-ramnosidi	4,42	257–357	448	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	447,0935	300 (50)	448,0999	448,0994	0,392	12	[62]
81	Myrisetiini- glukosidi/galaktosidi	3,667	257–356	480	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	479,0836	316 (45), 301 (20), 225 (20)	480,0897	480,0892	0,911	12	[76]
82	Myrisetiini-ramnosidi	4,038	259–349	464	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	464,089	316 (40), 300 (20)	464,0948	464,0943	1,665	12	[79]
83	Myrisetiini-galloyyli- arabinosidi	4,18	270–359	602	C ₂₇ H ₂₂ O ₁₆	601,0845	483 (10), 317 (100)	602,09	602,0895	1,701	17	[75]
84	Myrisetiini-asetyyli- ramnosidi	4,58	348	506	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	505,0995	417, 316 (60), 284	506,1053	506,1048	1,438	13	[80]
85	Myrisetiini-asetyyli- ramnosidi	4,85	344	506	C ₂₃ H ₂₂ O ₁₃	505,0995	461, 316 (80), 181	506,1053	506,1048	1,378	13	[80]
86	Myrisetiini- glukosidi/galaktosidi	3,68	354	480	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₃	479,0833	316 (45), 225	480,0897	480,0892	0,41	12	[76]

4. Kasviuutteissa käytetyt kasvilajit ja näytteeseen käytetty kasvin osa

Liitetaulukko 2. Kasviuutteiden näytenumero, näytteeseen käytetty kasvilaji sekä käytetty kasvin osa.

Näyte nro.	Kasvilaji	Kasvin osa
1	<i>Anemone nemorosa</i>	kukka
2	<i>Anemone nemorosa</i>	kukka
3	<i>Anemone nemorosa</i>	kukka
4	<i>Betula pubescens</i>	lehti
5	<i>Betula pubescens</i>	lehti
6	<i>Betula pubescens</i>	lehti
7	<i>Betula pubescens</i>	lehti
8	<i>Ficaria verna</i>	kukka
9	<i>Ficaria verna</i>	kukka
10	<i>Ficaria verna</i>	kukka
11	<i>Primula veris</i>	lehti
12	<i>Primula veris</i>	lehti
13	<i>Primula veris</i>	lehti
14	<i>Quercus robur</i>	kukka
15	<i>Quercus robur</i>	kukka
16	<i>Quercus robur</i>	kukka
17	<i>Quercus robur</i>	kukka
18	<i>Quercus robur</i>	kukka
19	<i>Lilium martagon</i>	lehti
20	<i>Lilium martagon</i>	lehti
21	<i>Convallaria majalis</i>	lehti
22	<i>Convallaria majalis</i>	lehti
23	<i>Convallaria majalis</i>	lehti
24	<i>Convallaria majalis</i>	lehti
25	<i>Convallaria majalis</i>	kukka + varsi
26	<i>Convallaria majalis</i>	kukka + varsi
27	<i>Convallaria majalis</i>	kukka + varsi
28	<i>Convallaria majalis</i>	kukka + varsi
29	<i>Barbarea vulgaris</i>	kukka
30	<i>Barbarea vulgaris</i>	kukka
31	<i>Barbarea vulgaris</i>	kukka
32	<i>Barbarea vulgaris</i>	kukka
33	<i>Barbarea vulgaris</i>	lehti
34	<i>Barbarea vulgaris</i>	lehti
35	<i>Barbarea vulgaris</i>	lehti
36	<i>Thlaspi caerulescens</i>	lehti + varsi
37	<i>Menyanthes trifoliata</i>	kukka

38	<i>Menyanthes trifoliata</i>	kukka
39	<i>Menyanthes trifoliata</i>	lehti
40	<i>Menyanthes trifoliata</i>	lehti
41	<i>Aegopodium podagraria</i>	lehti
42	<i>Glechoma hederacea</i>	kukka + lehti + varsi
43	<i>Allium ursinum</i>	kukka
44	<i>Allium ursinum</i>	kukka
45	<i>Allium ursinum</i>	lehti
46	<i>Acer platanoides</i>	lehti
47	<i>Lathyrus linifolius</i>	kukka + lehti
48	<i>Viola riviniana</i>	kukka
49	<i>Viola riviniana</i>	kukka
50	<i>Cardamine pratensis</i>	kukka
51	<i>Fritillaria meleagris</i>	kukka
52	<i>Fritillaria meleagris</i>	kukka
53	<i>Fritillaria meleagris</i>	kukka
54	<i>Prunus padus</i>	kukka
55	<i>Epilobium angustifolium</i>	lehti
56	<i>Chelidonium majus</i>	kukka
57	<i>Chelidonium majus</i>	kukka
58	<i>Chelidonium majus</i>	kukka
59	<i>Sorbus aucuparia</i> ssp. <i>Aucuparia</i>	lehti + varsi
60	<i>Geranium pratense</i>	lehti
61	<i>Geranium pratense</i>	lehti
62	<i>Lysimachia europaea</i>	lehti + kukka
63	<i>Lysimachia europaea</i>	lehti + kukka
64	<i>Maianthemum bifolium</i>	lehti + kukka + varsi
65	<i>Maianthemum bifolium</i>	lehti + kukka + varsi
66	<i>Alchemilla acutiloba</i>	lehti
67	<i>Rosa rugosa</i>	lehti
68	<i>Rosa rugosa</i>	lehti
69	<i>Rosa rugosa</i>	lehti
70	<i>Primula veris</i>	kukka
71	<i>Primula veris</i>	kukka
72	<i>Primula veris</i>	kukka
73	<i>Primula veris</i>	lehti
74	<i>Primula veris</i>	lehti
75	<i>Primula veris</i>	lehti
76	<i>Eryngium giganteum</i>	lehti
77	<i>Eryngium giganteum</i>	lehti
78	<i>Eryngium giganteum</i>	lehti
79	<i>Eryngium giganteum</i>	lehti
80	<i>Eucalyptus calcicola</i>	ei tiedossa

81	<i>Eucalyptus calcicola</i>	ei tiedossa
82	<i>Corymbia citriodora</i>	ei tiedossa
83	<i>Corymbia citriodora</i>	ei tiedossa
84	<i>Eucalyptus magnificata</i>	ei tiedossa
85	<i>Corymbia peltata</i>	ei tiedossa
86	<i>Corymbia peltata</i>	ei tiedossa