

专 题 讲 座

化学衍生化与GC/MS联用的进展(一)

傅 道 超

(中国科学院大连化学物理所)

八十年代有机质谱学的主攻方向是倾向于发展和研究生物—有机分子的新方法和新技术。

				区分		直接分析	适于光谱
		灵敏度	质量数	实构体	混合物	联用	
生物—有机分子	—直接用新电离技术(个别情报化学→预处理)	—FD	10^{-9} 克	$>1,000$	✓	✓	HPLC
		—SMS	$10^{-9} \sim 10^{-12}$ 克	$>2,000$	✓	✓	PC, TLC, HPLC
		—FIAB	10^{-9} 克	$>4,000$	✓	✓	TLC
		—LD	$10^{-9} \sim 10^{-13}$ 克	1,500	✓	—	GC, TLC, LC
		— ^{252}Cf -PD	10^{-9} 克	$>12,000$	✓	—	HPLC, TLC
	—化学衍生化→	—LC/MS (此技术尚不普遍)					
		—GC/MS	—GC/CIMS (正、负)				
			—GC/MS—SIM				
			—GC/MS/MS				

随着GC/MS在许多学科领域的广泛应用,常面临一些难挥发的,极性强的痕量组分的结构鉴定问题。对此,必须采用新电离技术,也可以通过化学衍生化途径。关于新电离技术方面,另有论述。在此主要讨论化学衍生化与GC/MS联用的最近发展。

GC和MS都要求所研究的化合物易于汽化,以“完整的、没有热降解或分子重排”的形式,通过GC系统和进入MS离子源。但是,一些难挥发的生物—有机分子,往往因为含有羧基、羟基、氨基、硫醇等极性基团,对热很不稳定,特别是几种官能团共存于同一化合物中时,由于极性或倾向于形成分子间氢键,使这些化合物挥发度降低和易热分解。若经化学衍生化则有下列优点:

(1) 化合物的挥发度得到改善。例如氨基酸的钠盐不能用于GC系统分析,但是,其甲酯则很容易。

(2) 提供热稳定性。例如四氢皮质酮经过GC系统易分解为相应甾酮—17和消除一个

1984年5月28日收

羟基乙醛。但是, 转化为MO-TMS衍生物后, 即使分子量有所增加, 在相同的GC条件下, 也不发生热降解。此外, 对易热分解样品, 由于损失而不能定量。如果衍生化后则可进行定量分析。

(3) 极性基团对固定相有强的吸附, 使流出的色谱峰形不对称, 衍生化后峰形得到改善。

(4) 对分不开的色谱峰, 选择适当的衍生物, 可以改善分离。例如异构体3-甲氧基-4-羟基-苯丙氨和4-甲氧基-3-羟基-苯丙氨的三氟乙酸衍生物用GC不能分开, 而选用异硫氰酸衍生物后, 则GC易分离。

表 (一) COc1ccc(O)cc1CCN 和 COc1ccc(O)cc1CCN 的衍生物保留值

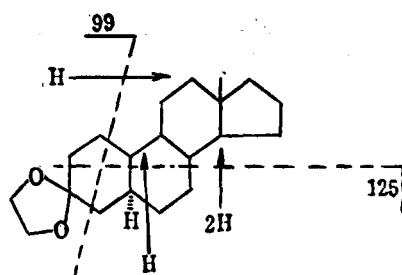
	1%OV-101	2.5%OV-225
<chem>COc1ccc(O)cc1CCN</chem> <chem>COc1ccc(O)cc1CCN</chem>	17.73	24.19
<chem>COc1ccc(O)cc1CCN</chem> <chem>COc1ccc(O)cc1CCN</chem>	17.73	24.19
<chem>COc1ccc(O)cc1CCN</chem> <chem>COc1ccc(O)cc1CCN</chem>	18.27	26.87
<chem>COc1ccc(O)cc1CCN</chem> <chem>COc1ccc(O)cc1CCN</chem>	18.44	27.11

(5) 衍生化后能分离类似化合物和差向异构体。例如表睾丸甾酮和睾丸甾酮两个差向异构体, 未衍生化分不开, 而衍生化为TMS醚之后, 则能完全分离为两个色谱峰。

GC/MS中的化学衍生化, 必须同时考虑化合物衍生化后对GC和MS两者性质的影响。通常能用在GC系统的衍生物^[1]也都适用于MS分析。但是, 特定的功能基转化, 能够选择地指向一个有利的有机分子的碎裂。因而同一化合物的不同衍生物的质谱差异很大。不仅反映出使分子离子峰和碎片离子峰有相应的位移, 还能使原来分子的骨架断裂模型和断裂程度也改变。因此, 对特定官能团的衍生物的选择, 必须基于所希望得到的结构信息。从MS角度, 除了要求衍生物能增加挥发度, 改善热稳定性外, 还有下列特点:

(1) 引入低电离能的基团, 能增加M⁺的丰度, 提供确定的分子量。

(2) 新的官能团将具备能导致化合物碎裂, 使产生具有取代位置特征的强碎片离子。例如, 52-雄甾酮-3的质谱中, 有很多碎片离子丰度均相当强。但是, 次乙撑缩酮衍生物只有四个主要峰, 引起对解析这几个离子峰起源的注意, 从而易于鉴定出原来的酮基取代位置。



(3) 引入甲基、乙基、甲氧基、卤素、TMS (或其它基团) 于分子后, 导致选定的碎片离子在质谱中发生相应的位移, 有助于确定该分子的一些结构单元。

(4) 可用特定的衍生物或双衍生物使之区分异构体。

(5) 化学衍生化是测定双键位置的最好方法。

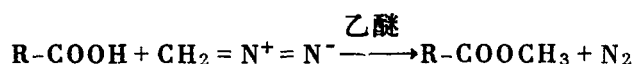
(6) 同位素标记形式的衍生物, 可提供GC-MS内标, 用以鉴定交换C、H、O、N的数目和类型, 对未知物提供结构信息, 帮助解析碎裂机理和对定量分析都是最有效的。

一、化学衍生化

近年来, 发展了很多GC-MS的衍生化技术^[2]。一般多是在GC衍生化基础上, 考虑MS所能提供的结构信息而加以修改。通用的衍生化试剂和反应基团列于表(二)。

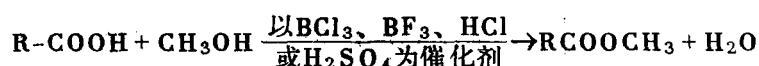
1. 酯化反应

(1) 偶氮甲烷法 (也可用苯基偶氮甲烷)



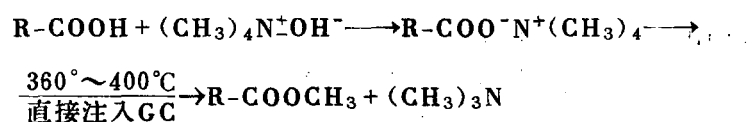
无副反应, 但偶氮甲烷具有毒性和易爆性。

(2) 甲醇法

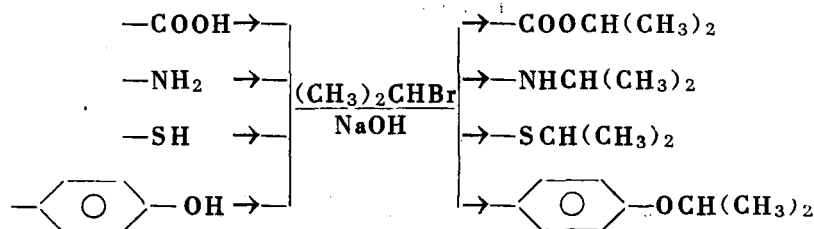


除了羧酸外, 对双键、环丙烷或其它活性中心均有作用。因之有副反应产物。

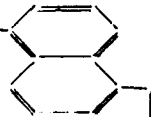
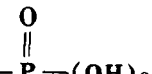
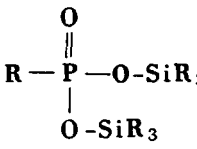
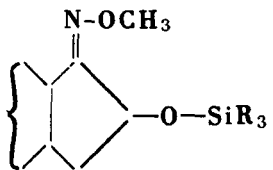
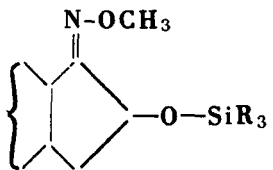
(3) 四甲基铵盐的分解



(4) 形成异丙酯的高级酯类衍生化反应

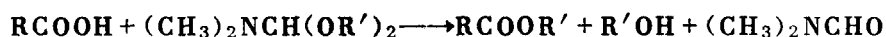


表(二) 典型功能团和衍生物

反 应 基 团	试 剂	反 应 产 物
R-COOH	CH ₂ N ₂ CH ₃ OH/BF ₃ CH ₃ OH/HCl CH ₃ OH/SOCl ₂ (CH ₃) ₄ N ⁺ OH ⁻ 硅烷化 (R'O) ₂ -CH-N(CH ₃) ₂	R-COOCH ₃ R-COOCH ₃ R-COOCH ₃ R-COOCH ₃ R-COOCH ₃ R-COOSiR ₃ R-COOR'
RR'-C=O	NH ₂ -OCH ₃ ·HCl NH ₂ -OCH ₂ φ·HCl NH ₂ -NR'R ²	RR'-C=N-OCH ₃ RR'-C=N-OCH ₂ φ RR'-C=N-NR'R ²
R-OH	硅烷化试剂 CH ₃ CO-O-COCH ₃ F(CF ₂) _n CO-O-CO(CF ₂) _n F CH ₃ I/AgO	R-O-SiR ₃ R-O-COCH ₃ R-O-CO(CF ₂) _n F R-O-CH ₃
R-NH ₂	硅烷化试剂 F(CF ₂) _n CO-O-CO(CF ₂) _n F CS ₂ 丹酰氯	R-N-(SiR ₃) ₂ R-NH-CO(CF ₂) _n F R-N=C=S R-NH-SO ₂ -  N(CH ₃) ₂
RR'NH	硅烷化试剂 F(CF ₂) _n CO-O-CO(CF ₂) _n F 硅烷化试剂	RR'N-SiR ₃ RR'N-CO(CF ₂) _n F
 R-P(=O)(OH) ₂ (磷酸酯或含糖磷酸酯)	硅烷化试剂	 R-P(=O)(OSiR ₃) ₂
H ₂ N-(R)-COOH (氨基酸)	R'OH/H ⁺ F(CF ₂) _n CO-O-CO(CF ₂) _n F 硅烷化试剂 (R'O) ₂ -CH-N(CH ₃) ₂	F(CF ₂) _n -CO-NH-(R)-COOR' (R ₃ 'Si) ₂ -N-(R)-COOSiR' ₃ 或 R ₃ 'Si-NH-(R)-COOSiR' ₃ (CH ₃) ₂ N-CH=N-(R)-COOR' N-OCH ₃ 
羟基酮类	NH ₂ -OCH ₃ ·HCl/Silylation	

反 应 团 基	试 剂	反 应 产 物
HX-(R)-OH (X = NH, O)	R'-B(OH) ₂	$ \begin{array}{c} R' \\ \\ B \\ / \quad \backslash \\ X \quad O \\ \backslash \quad / \\ (R) \end{array} $
R-CH=CH-R'	OsO ₄ ; 三甲基衍烷化	$ \begin{array}{c} R-CH-CH-R' \\ \quad \quad \\ O-TMS \quad O-TMS \end{array} $
	Epoxidation with a peracid	$ \begin{array}{c} R-CH-CH-R' \\ \backslash \quad / \\ O \end{array} $
	OsO ₄ ; NaOH, DMSO, CH ₃ I	$ \begin{array}{c} R-CH-CH-R' \\ \quad \quad \\ OCH_3 \quad OCH_3 \end{array} $
	OsO ₄ ; CH ₃ COCH ₃	$ \begin{array}{c} R-CH-CH-R' \\ \quad \quad \\ O \quad O \\ \backslash \quad / \\ CH_3 \quad CH_3 \end{array} $

还可利用N,N-二甲基甲酰胺二烷基缩醛与羧基反应, 烷基R'可随所制不同系列化合物而改变, 特点是简单快速, 但此法尚未普遍应用。



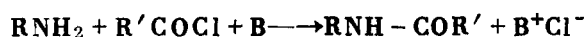
2. 甲基化反应

多羟基化合物的羟基, 在氧化银存在下, 与CH₃I作用转变为醚类。

3. 酰化反应

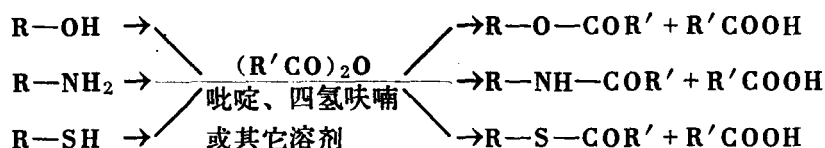
一般言, 对胺类(伯胺、仲胺、叔胺)、酰胺、醇类(伯醇、仲醇、叔醇)、硫醇、酚类、烯醇、甘油醇、不饱和化合物、芳环化合物上的H, 均可进行酰化反应。酰化试剂主要有三类。

(1) 酸性卤化物



有高度反应活性, 对难酰化的, 或具不利的空间因素的化合物重要。缺点: 有过剩的卤酸或卤盐, 易引起麻烦。

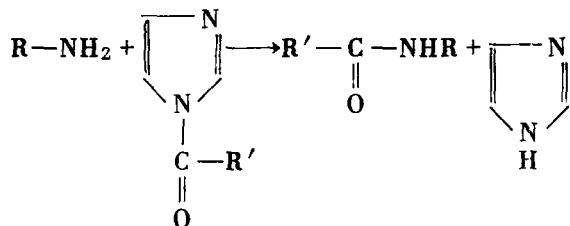
(2) 酸酐类



生成清晰的产物, 但酸酐比卤酸难挥发, 反应介质呈酸性, 使此类酰化试剂不适于对酸敏感的化合物。

(3) 具反应活性的酰基衍生物

酰化的咪唑、酰胺、酚类的酰化试剂，都适于对酸敏感的化合物。



缺点：必须采用抽取步骤除去过剩试剂。

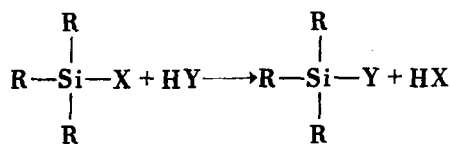
除了采用适当的酸酐酰化外，对于酯类和氨基酸类的衍生化，常用相应的全氟酰基酸酐试剂，制备三氟乙酰、五氟丙酰和七氟丁酰衍生物。也可用相应的N-全氟酰基咪唑进行酰化衍生反应。通用的有乙酰基咪唑、三氟乙酰基咪唑、五氟丙酰基咪唑、七氟丁酰基咪唑和五氟苯酰基咪唑试剂。

4. 硅烷化反应

硅烷化衍生反应对GC-MS分析是最常用的，因为它们具有：

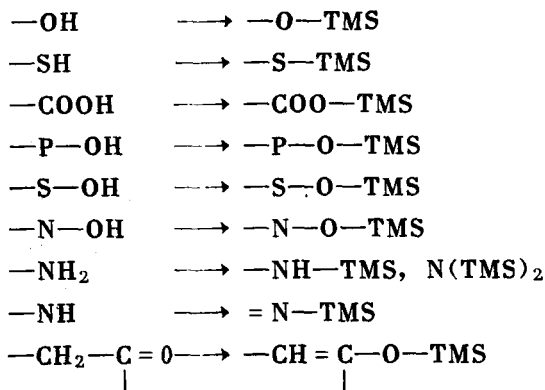
(1) 容易制备。(2) 能保护很多不同类型的功能基。(3) 具弱极性，对GC提供好的色谱峰形。(4) 对立体异构敏感，在GC中可以分辨。(5) 不易吸附，高挥发性，可快速从MS离子源脱除。(6) 其质谱具有 M^+ ，或间接从TMS中失去甲基推定分子量。(7) TMS能主导化合物的碎裂，从TMS衍生物的质谱，可获得比未衍生化的质谱有更多的结构诊断性离子。(8) 可利用氘标记—TMS试剂与其它的硅烷基同系物平行试验，大大有助于TMS衍生物质谱解析。(9) 大多情况下，TMS衍生物能转变回原来化合物，再进行不同的衍生反应或其它反应等优点。但也有不足：一方面容易水解，对原化合物提供较高的质量（对每个反应基团增72amu）。当化合物含一个以上TMS时，质谱中出现大量重排离子，使质谱解析复杂化（但此重排离子有时可以为结构分析和立体化学提供有用的信息）。

硅烷化反应：



(硅烷化试剂) (反应物) (衍生物)

适于含有下列功能团的有机化合物类型：



通用的硅烷化试剂见表(三)。

表(三) 通用的硅烷化试剂

硅 烷 化 试 剂	结 构 式	缩 写
N ₁ O-Bis(trimethylsilyl)-acetamide	$\begin{array}{c} \text{OSi(CH}_3\text{)}_3 \\ \\ \text{CH}_3\text{—C} \\ \\ \text{N—Si(CH}_3\text{)}_3 \end{array}$	BSA
Hexamethyldisilazane	$(\text{CH}_3)_3\text{Si—NH—Si(CH}_3\text{)}_3$	HMDS
Trimethylchlorosilane	$(\text{CH}_3)_3\text{SiCl}$	TMCS
BiS(trimethylsilyl) trifluoroacetamide	$\begin{array}{c} \text{O—Si(CH}_3\text{)}_3 \\ \\ \text{CF}_3\text{—C} \\ \\ \text{N—Si(CH}_3\text{)}_3 \end{array}$	BSTFA
Trimethylsilylimidazole	$\begin{array}{c} \text{N} \\ \\ \text{N—Si(CH}_3\text{)}_3 \end{array}$	TMSIM
N-Trimethylsilyldiethylamine	$(\text{CH}_3)_3\text{SiN(C}_2\text{H}_5\text{)}_2$	TMSDEA
N-Trimethylsilyldimethylamine	$(\text{CH}_3)_3\text{SiN(CH}_3\text{)}_2$	TMSDMA
N-Methyl-N-trimethylsilyl-trifluoroacetamide	$\text{CF}_3\text{CON(CH}_3\text{)(Si(CH}_3\text{)}_3)$	MSTFA
Dimethylchlorosilane	$\text{H(CH}_3\text{)}_2\text{SiCl}$	DMCS
Tetramethyldisilazane	$\text{H(CH}_3\text{)}_2\text{Si(CH}_3\text{)}_2\text{H}$	TMDS
Chloromethyl dimethylchlorosilane	$(\text{CH}_2\text{Cl})(\text{CH}_3)_2\text{SiCl}$	CMDMCS
Hexamethyl disiloxane	$(\text{CH}_3)_3\text{Si—O—Si(CH}_3\text{)}_3$	HMDSO
N-methyl-N-TMS-Acetamide	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3\text{—CO—N—Si(CH}_3\text{)}_3 \end{array}$	MSA

硅烷化试剂按硅烷基给予能力的次序是: TMSIM>BSTFA>BSA>MSTFA>TMSDEA>MSTA>TMCS>HMDS对于选定的硅烷化试剂与化合物反应的次序是: 醇>酚>羧酸>胺>酰胺。醇类的反应次序: 伯醇>仲醇>叔醇。胺类的反应次序: 伯胺>仲胺。

各种三甲基硅烷化试剂的反应性有很大差别, 根据GC—MS的要求选定。此外, 不同试剂的挥发性差别也很显著。作为痕量物质分析, 溶剂和试剂色谱峰的拖尾很重要, 副产物的挥发性也需要考虑。例如BSA和BSTFA反应相当, 但BSTFA的氟化副产物比BSA易挥发, 因而较少干扰GC分析。TMSDMA比TMSDEA反应快的原因, 由于其副产物二甲胺HN(CH₃)₂为气体, 易逸出, 促使反应快。比较缓和的试剂是HMDS和TMCS, 多用于羟基衍生化, 而较强的试剂为BSA和BSTFA, 用于反应性较弱的基团。例如—NH₂、—NH—和有空间阻碍的基团。

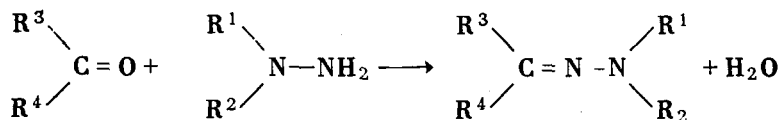
硅烷化反应既可用纯试剂进行, 又可以在有溶剂存在的条件下进行。吡啶、乙腈、二甲基甲酰胺、四氢呋喃和二甲基亚砷等都是最通用的溶剂。吡啶的挥发性是最适于GC的要求, 它在多数硅烷化反应中也是一个好的催化剂。若在进行硅烷化的同时, 再进行甲腈衍生反

应, 对此两个反应而言, 吡啶是最可取的溶剂。

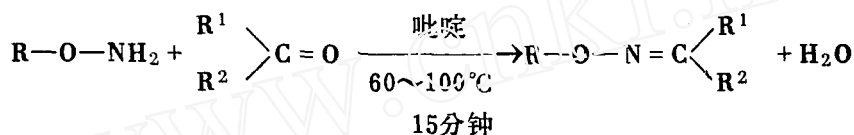
5. 羰基的衍生反应

就羰基化合物的挥发度而言, 作GC-MS分析问题不大。但往往因其极性而在化学上敏感, 或对热不稳定, 或在色谱过程中与固定液相互相作用, 使色谱峰不对称。此时, 羰基必须转化为惰性衍生物。

羰基化合物与N,N-二烷基联氨反应, 形成腙衍生物。有好的GC性质, 但易分解, 特别是痕量级研究, 实用受到限制。



羰基化合物与甲基肟 (Me-Oximes) 形成简单的、适于GC-MS研究的衍生物。既有良好的GC性质, 质量增加只有29amu, 而碎裂谱又不复杂, 所以广泛使用。

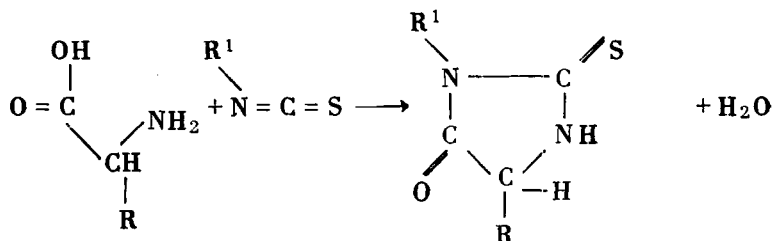


此外, 使用苄基肟也有效, 而丁基肟和戊基肟的GC和MS性质介于甲基肟和苄基肟衍生物之间, 已用于甾酮类分析。

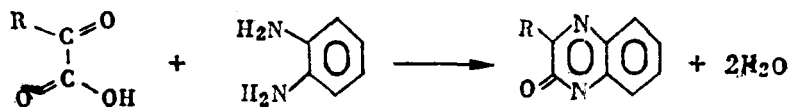
6. 环状衍生物

多数环状衍生物试剂只是针对特定的功能团。例如:

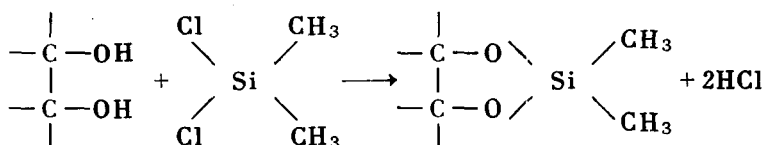
(1) 异硫氰酸酯与含羧基和 α -氨基的有机分子形成硫代海因 (Thiohydantoin)。



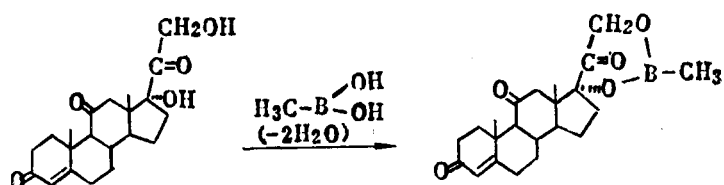
(2) 用适当的二胺与 α -羰基和羧基缩合形成杂环衍生物。



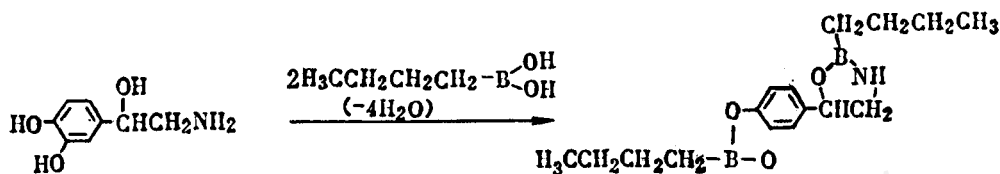
(3) 与两个羟基族形成硅化物



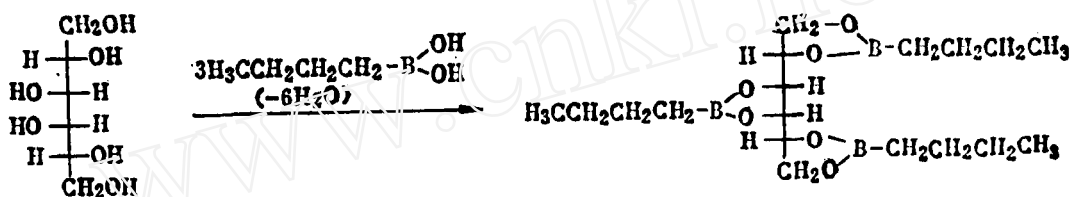
很多生物来源的有机化合物, 例如氨基酸、碳水化合物、皮质甾酮、前列腺素等具有两个或两个以上的极性官能团。其挥发度和热稳定性均差, 常需要同时与多个功能基进行衍生



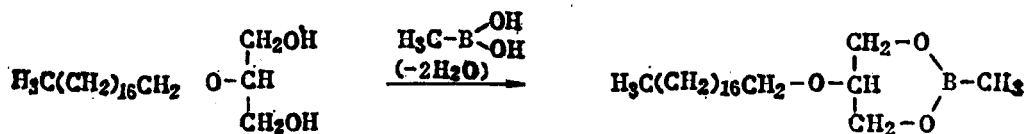
cortisone



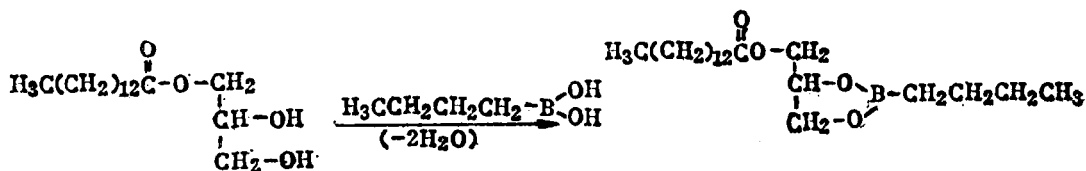
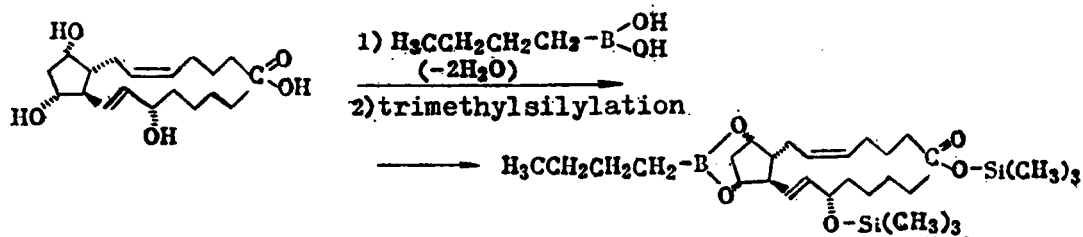
norepinephrine
(a catecholamine)



D-galactitol
(D-dulcitol)



2-octadecylglycerol



glyceryl-1-myristate

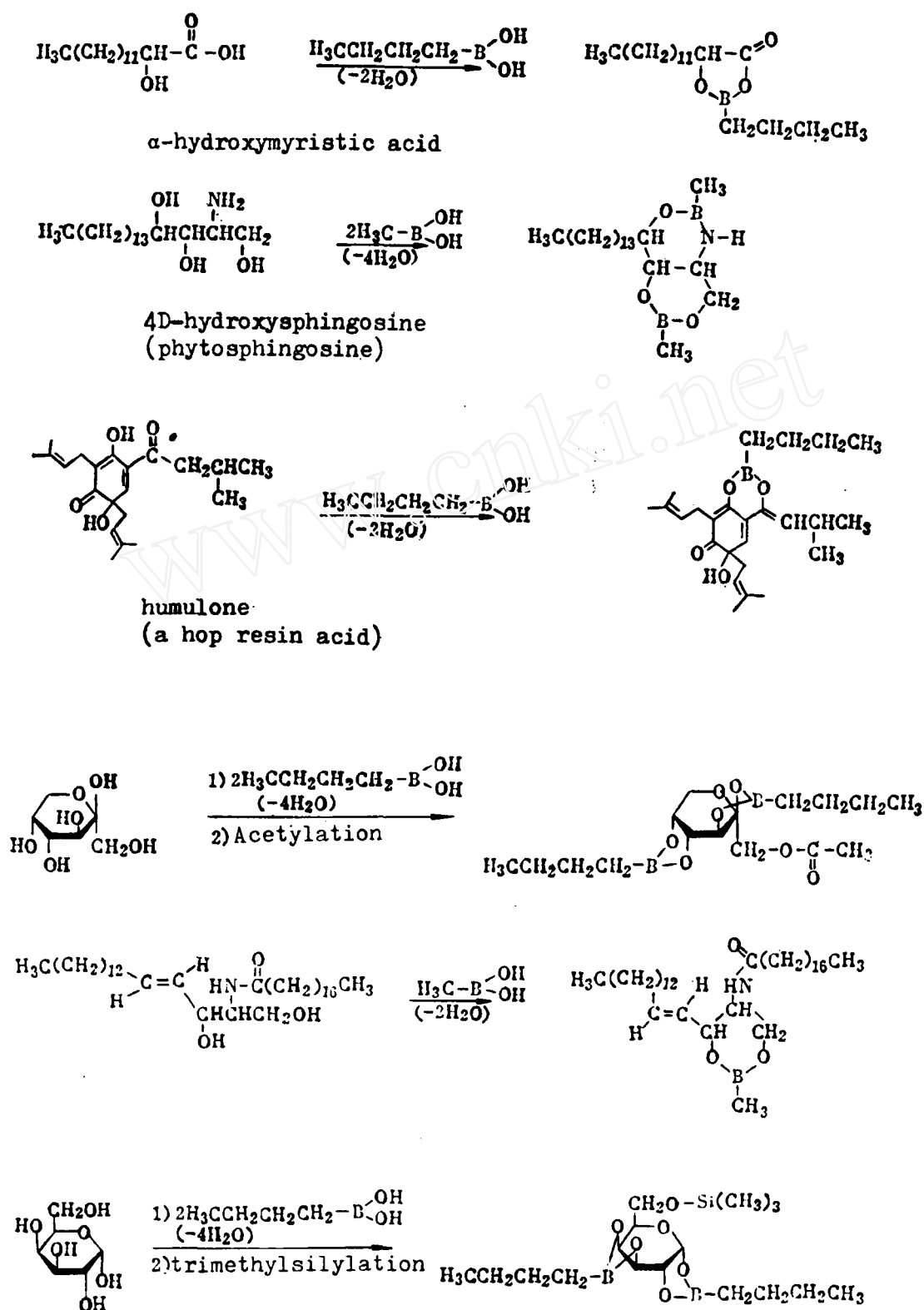


图 1 用于GC-MS的一些硼酸环甲酯和硼酸正丁酯

化。此时,则以形成环状硼酸酯衍生物为好。环状硼酸酯有足够的稳定性,还可以进一步对自由的羟基或酮基衍生化。例如由 3α , 17α , 21 -三羟基, 5β -妊娠酮- 20 形成的 17 , 21 -环状正丁基硼酸酯衍生物,可再衍生转化为其 20 - MO - 3α - $OTMS$ 衍生物。

关于环状硼酸酯的质谱,特征突出。过去文献报导较多是EI质谱,最近已引起对其CI质谱的注意。与其它衍生物不同,它具有强丰度的 M^{++} 和 $(M+1)^+$ 离子。硼的同位素比也有利于质谱解析。目前硼酸酯衍生物已广泛地应用于下列多种有机物见图(1)。

The Progress of Chemical Derivatization Combining with GC/MS(I)

Fu Daoyun

(Dalian Institute of Chem. Phys., Academia Sinica)

Received 28, May, 1984

Abstract

A general review is presented to introduce the recent development of chemical derivatization, which in combining with GC/MS, has been applied into many important aspects of bio-organic chemistry, including prostaglandins, thyroid hormones, steroids, fatty acids, carbohydrates, nucleosides and nucleotides. Moreover, some information and discussions about the trends of this technique are mentioned in the paper as well.