

质谱法对长链不饱和脂肪酸 和其它双官能团不饱和化合物的 双键定位

张继跃 虞启涛 黄知恒

(中国科学院上海药物研究所)

〔摘要〕 本文对用质谱法进行长链不饱和脂肪酸和其它双官能团不饱和化合物的双键定位作了详细综述, 并讨论了各种方法的优点以及所存在的问题。

一、引 言

长链不饱和脂肪酸(UFA)和其它双官能团不饱和化合物是一类在生化中非常重要的物质, 各种动植物油脂成份、细胞膜成份、前列腺素、白三烯和多种昆虫激素便是其中的代表。

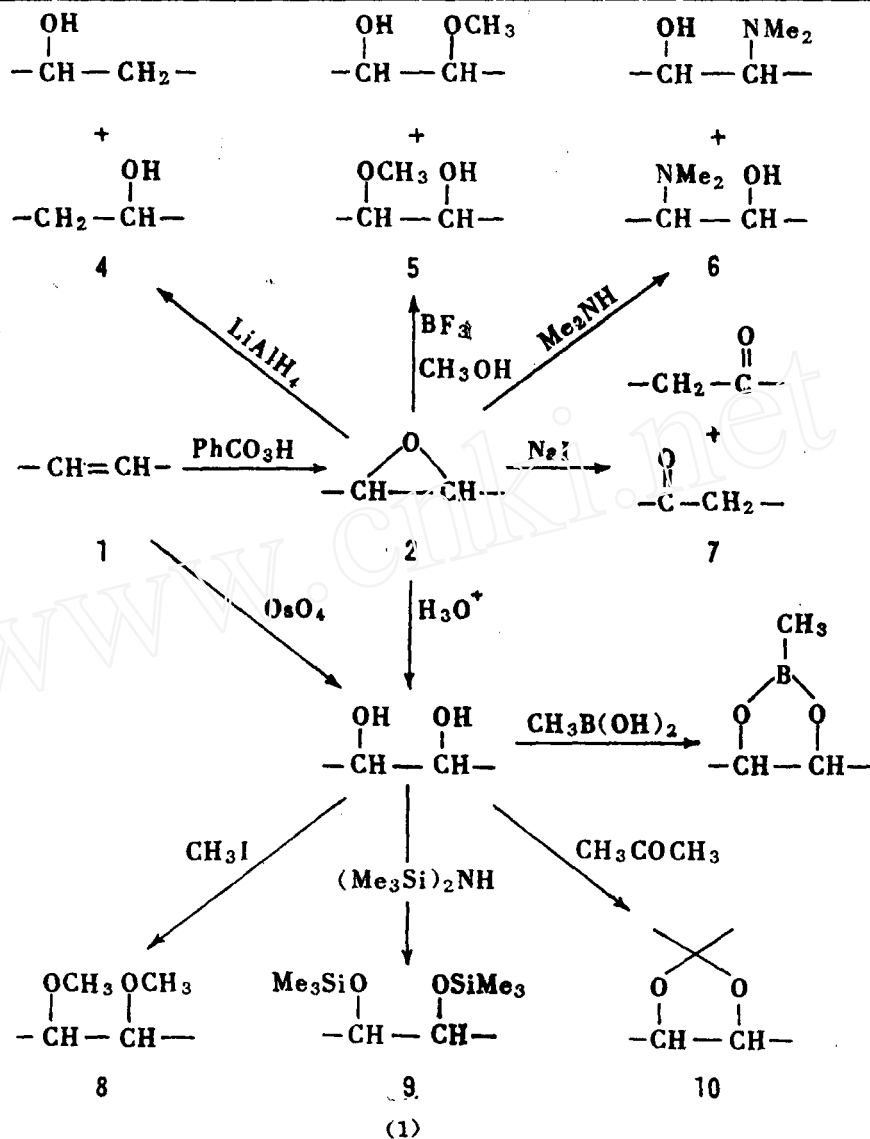
在这一领域中, 分析化学的任务是: (1) 识别不饱和键的类型(双键、三键等); (2) 测定不饱和键的数目; (3) 确定不饱和键的位置。给定的样品可为纯质, 但更多遇到的则是混合物, 因此要求能同时定性、定量分析。UV、IR、NMR光谱可以解决前两个问题(采用 ^{13}C NMR或在特殊的化学位移试剂存在下用 ^1H NMR也可能确定双键位置, 但仅限于纯

品)。问题的难点在于不饱和键(包括 $-\text{CH}=\text{CH}-$ 、 $-\text{C}\equiv\text{C}-$ 、 $-\overset{\text{CH}_2}{\text{C}}-\text{CH}-$)的定位(unsaturated bond location)。在这方面, MS已成为极有力的工具。最早可以追溯到50年代后期, 当时Stenhagen与Ryhage用一台自制的质谱计解决细菌脂质成份的结构, 引起人们对这一物理工具的重视。

但是, 不饱和位置在质谱上常得不到直接的反映, 虽曾报道(Leonhardt等^[1]) 在 $\text{C}_{12}\sim\text{C}_{18}-\Delta^n$ -单烯醇乙酸酯的质谱上, 借助丰度比 $(m/z55)/(m/z54)$ 与不饱和位置(n)之间的线性关系曲线可判断双键的位置(Horriike等也有类似的报道^[2]), 但峰高往往受实验条件的影响而变化, 这种经验推测难以用于未知物的分析。

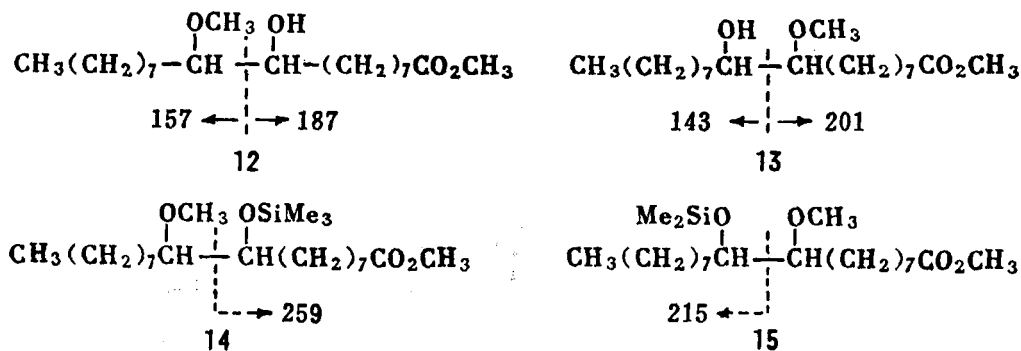
60年代以来, 不饱和键定位的研究多如雨后春笋。各种方法面临的共同问题是如何克服不饱和键在质谱条件下的自由位移。这种倾向常如此之明显, 以致碳数相同, 双键位置不同的异构烯烃都给出几乎完全相同的图谱。同样的情况也见于烯醇、烯酸或其简单的衍生

1986年8月11日收



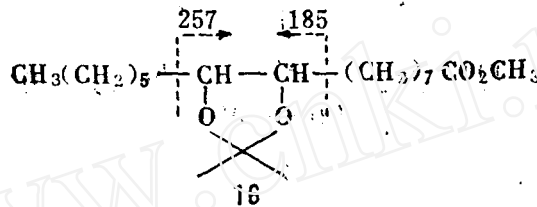
式(1)列出了各种氧化羟基化反应。从不饱和化合物1出发可以得到衍生物2—11。如 $2 + \text{NaI} \rightarrow 7^{(11)}$ 和 $2 + \text{Me}_2\text{NH} \rightarrow 6^{(12)}$ 都可确定出原有双键的位置,但由于得到二种异构的产物,增加了识别图谱的困难。

Kleiman等⁽⁹⁾报道了 $2 + \text{BF}_3/\text{CH}_3\text{OH} \rightarrow 5$,其质谱能较满意地确定双键的位置。若把羟基转化为相应的三甲基硅醚,特征离子则更明显⁽¹⁰⁾。如油酸甲酯的衍生物12—15:



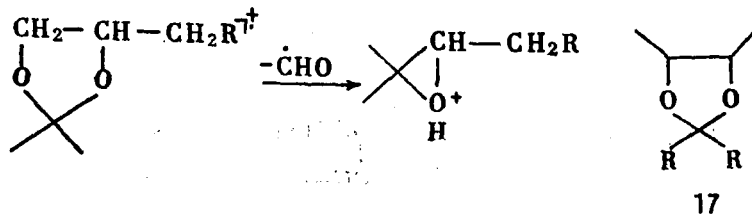
UFA酯经 OsO_4 或 KMnO_4 氧化成邻二醇3,被双重活化的C—C键的断裂也较为特征^[13]。但由于邻二醇的挥发性较差,不适用于GC—MS分析。3 + Me_2SO_4 或 $\text{MeI} \rightarrow$ O-甲基醚(8)可改善挥发性^[14]。个别情况下,含数个双键的PUFA也能用此法分析,然而产生的特征碎片太多(据Dommes^[15]推测有 $4n^2 + 10n + 2$ 个特征离子,若双键 $n = 5$,则可能生成152个特征峰),它们的丰度大都都很低,很难推广到未知的PUFA的分析。

UFA酯经氧化、TMS化(1 \rightarrow 3 \rightarrow 9),所得O-三甲基硅醚9与O-甲基醚8相比,9的特征碎片有更高的丰度,也更易识别^[16,17],但一般不出现分子离子,得到的往往是M-90(Me_3SiOH)。利用GC-CIMS可以得到(M+1)⁺峰,但谱图则更复杂^[18]。含2—5个



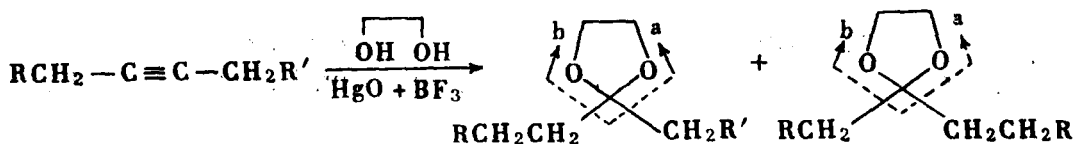
双键的PUFA酯的硅醚化衍生物的质谱也有报道^[19]。此外,O-三甲基硅醚衍生物也可用以确定共轭的UFA的结构^[20]。

McCloskey等^[21,22]研究了长链烯烃及UFA转变为缩酮衍生物3 \rightarrow 10的质谱。以棕榈酸衍生物16为例,主要碎片如下所示:特征离子m/z185、257有中等强度,但当双键靠近链的末端时,M⁺ \rightarrow M-CHO的断裂使谱图变得复杂。Blum和Richter^[23]用GC-MS/GC-CI



的方法,研究了一系列缩酮衍生物17的质谱,证明也可用于确定双键的位置。3 + $\text{CH}_3\text{B}(\text{OH})_2 \rightarrow 11$ 也可用于UFA的分析,其质谱特征和缩酮接近^[15]。

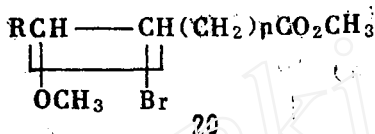
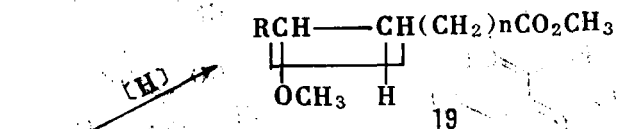
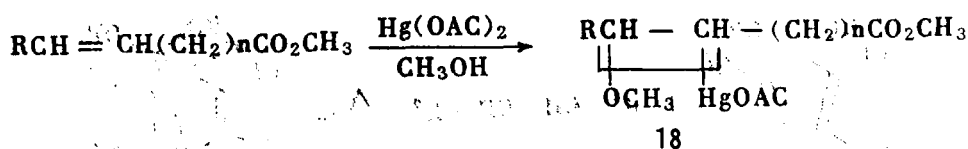
长链炔烃和乙二醇在Henninon催化剂($\text{HgO} + \text{BF}_3$)存在下缩合成二种缩酮,根据同样的原理推出炔键的位置^[24]。



3. 双键加成反应

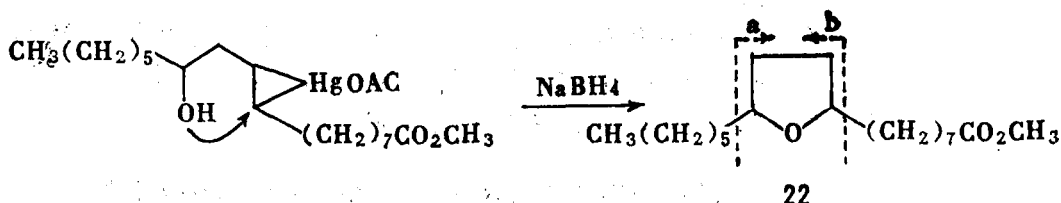
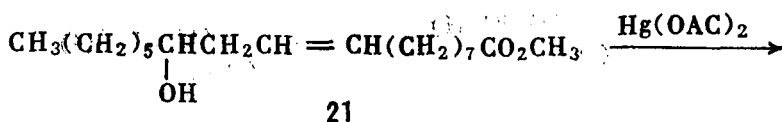
(1) 甲氧基汞化反应 (Methoxymercuration)

UFA酯与醋酸汞在甲醇中反应得到甲氧基醋酸汞化合物18,后者经还原或与卤素反应



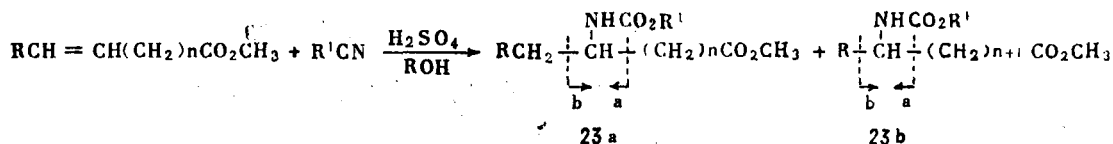
可分别得到19和20。这两类化合物的质谱也可用以确定双键的位置^[25, 26]。

对双键附近有羟基的UFA酯21(或相应的醇), 与Hg(OAc)₂、NaBH₄反应生成环状化合物22, 根据环二侧的断裂(22→a+b)可确定双键和羟基的可能间距和各自的位置^[27]。



(2) Ritter反应

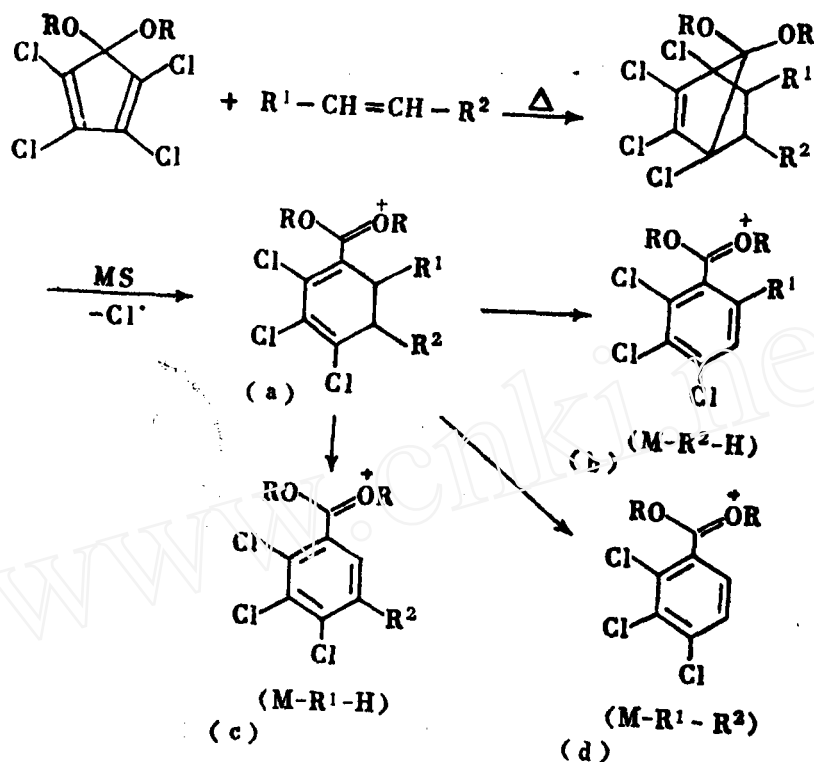
UFA酯和腈基化合物在硫酸和醇中反应得到Ritter反应加成产物(23a, 23b), 氮原子诱发的α-断裂离子峰可以帮助确定链上双键的位置^[28]。



R' = CH₃、C₂H₅、CH=CH₂等

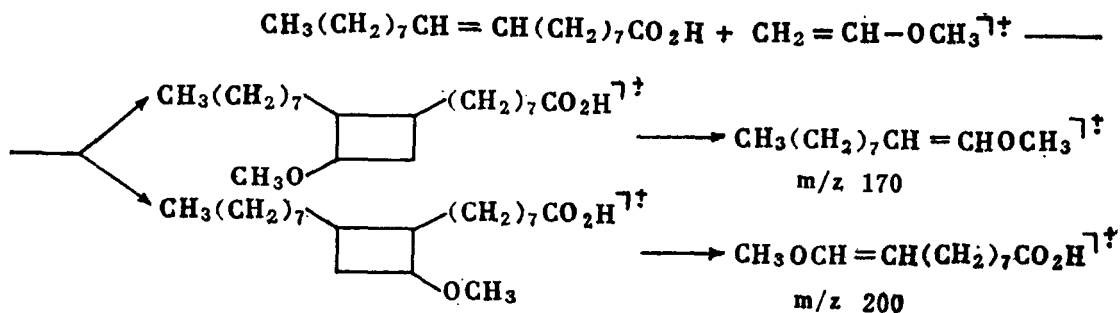
(3) Diels-Alder反应

烯键和四氟环戊二烯缩酮进行Diels-Alder反应。根据反应产物质谱中取代基的丢失(a→b、c、d), 可以确定双键的位置。各离子的相对丰度和烯烃的构型有关, 根据各离子相对丰度比(b或c比a), 可确定其几何构型(E或Z)^[29]。



(4) 甲基乙烯基醚加成

Ferrer-Correia等^[30]研究了在化学电离条件下, 烯烃和反应气甲基乙烯基醚(MVE)离子间的分子-离子反应。在离子源压力为1托时, 加入CO₂(或N₂, CS₂等)作为电荷位移试剂, 以一定的比例导入样品(如油酸)和MVE, 反应如下:



根据所得的CI谱中特征离子 m/z 170、200就可推出油酸中双键的位置。此方法仅适用于推测含单烯的化合物结构。

(5) 氘化(Deuteration)还原

烯烃中的双键位置也可以用氘化还原的方法来确定。双键氘化还原后, 分子离子向高质量区位移($4u$ /双键)。和氢还原的图谱比较, 碳链开裂峰质量的变化(CHD代替CH₂)指示原有分子中的双键位置^[31]。UFA的N-四氢吡咯衍生物氘化还原后, 其质谱可更清晰地指示双键的位置^[32]。质量位移技术中选择的氘化还原试剂必须具备: (1) 双键氘化完全, (2) 氘化时不引起双键的异构化(位移)。Pd-CaCO₃-Pb(OAc)₂和(ϕ P)₃RhCl是

适合的两种氢(氘)化催化剂。此外,用 $N_2D_4 \cdot D_2O$ 加氧化剂来还原氧化也可达到同样的目的。

三、远端官能团修饰

从上可见,利用对不饱和中心的修饰来确定分子中的双键位置,其方法往往仅适用于简单的不饱和化合物,而不适用于复杂和混合的不饱和化合物的分析。为了解决这些问题,人们另辟蹊径,对UFA(或长链不饱和醇)中的羧基(或羟基)进行化学修饰,使质谱能直接指示出双键的位置。这一途径称“远端官能团修饰”(Remote functional group modification),它是基于修饰后官能团的电离能改变来实现的。例如,在UFA及其甲酯中,由于双键的电离能($\sim 9.5eV$)比羧基及甲酯基($\sim 10.2eV$)低,故电离时正荷定域优先发生在双键上,离子化后双键上的不配对电子可以在整个碳链上自由位移,导致一系列复杂的碎片离子的产生。然而,如果在羧基端引入一个含杂原子的官能团,由于杂原子的强正荷定域作用,其电离能往往低于双键的电离能(如 $-CONMe_2$ 为 $\sim 8.8eV$),故电离时电荷优先定域在杂原子上,双键的自由位移随之减弱,结果产生一系列由杂原子诱发的较规则的断裂,导致全然不同的谱形。

1. UFA的N-四氢吡咯衍生物

Vetter等^[33]首先报告利用四氢吡咯衍生物的质谱来测定油酸和亚油酸中的双键位置。Andersson等^[34]比较了N-四氢吡咯和其它一些酰胺衍生物的质谱,证明N,N-二取代酰胺的质谱信息要比N-单取代酰胺和酰胺明显。在许多酰胺中,N-四氢吡咯衍生物是定位效果最佳的一种。Andersson和Holman^[35]研究了一系列UFA的四氢吡咯衍生物的质谱,得出对于 $\Delta^5-\Delta^{15}$ 的十八碳单烯酸的四氢吡咯衍生物来说,其质谱符合下述规则:如果在衍生物的质谱中,包含n和n-1碳原子(指原来UFA中的碳原子)的峰族中最强的峰之间相差12u,而不是通常的相差14u,则双键的位置就在n和n+1碳之间,见油酸的四氢吡咯酰胺的质谱(图1)。

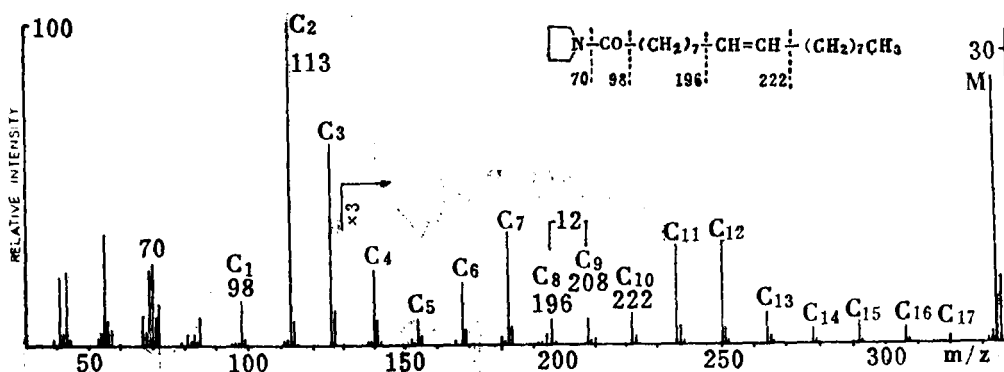


图1 N-油酸四氢吡咯衍生物质谱(70eV)

PUFA的四氢吡咯酰胺也符合上述规则^[36]。但双键数增多后,特征离子峰不够明显,特别是当双键多于4个时,则很难用此法确定其位置^[37]。此外,本法对含共轭双键的UFA无效^[38]。

含有叁键的UFA也可通过四氢吡咯酰胺来分析,但特征离子及分子离子的强度比相应的含双键的要弱^[39]。

2. 菸醇酯

Harvey^[40]比较了 α -、 β -和 γ -吡啶甲醇的UFA酯的质谱之后,发现 β -吡啶甲醇酯(菸醇酯)的质谱能提供最典型的结构信息。图2为油酸烟酯醇的质谱(20eV),双键(Δ^n)所在位置的前后(第 $n-1$ 和 $n+1$ 碳)间出现相差26u的间隔,指示双键的位置。同时含 $n+2$ 和 $n+3$ 碳的碎片峰具有比其它系列峰都高的丰度,这是由于断裂形成共轭双烯的结果。

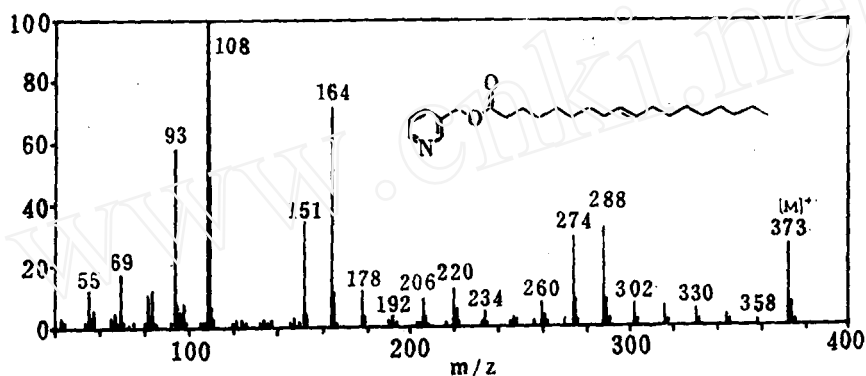
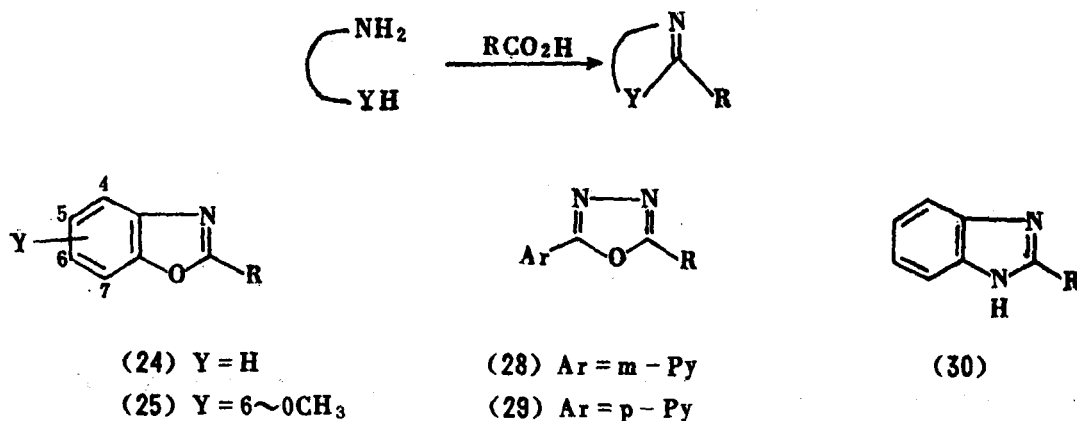


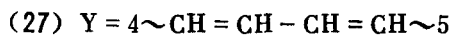
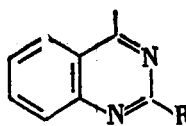
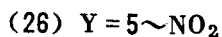
图2 油酸菸醇酯质谱(20eV)

Harvey^[41]继续研究了多种PUFA的菸醇酯的质谱,表明此法对多烯酸结构鉴定的可能性。此法的主要缺点是:只在低电子能量(20eV)下记录的质谱才显示不饱和和键的特征,对双键较多的UFA特征碎片不够明晰,这将给未知物的结构测定带来困难。

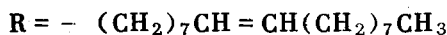
3. 苯并噁唑法

最近,本文作者采用一种新的羧基衍生化途径,即通过环化反应,把UFA缩合成各种2-烯基杂环化合物(24-31)。由于羧基“嵌入”芳香杂环体系,后者的强正荷定域作用,使烯键自由位移的倾向减弱,其质谱的鉴别能力因此大为提高。合成的八个杂环化合物如下:





31



这些衍生物的质谱都能直接判定出原有UFA中的双键位置，并都具有很强的分子离子峰和系列峰。考虑到衍生物的制备简便、稳定程度与提供信息的能力，作者选择2-烯基苯并咪唑衍生物(24, R = 烯基)作进一步的研究^(4,2)。作者证明，这些含氟杂环衍生物的电子轰击谱都能提供确切的结构信息，且分子离子与特征离子的丰度远高于其它方法(如四氢吡咯衍生物、菸醇酯)的结果。本法操作简便(一步反应)，对单烯酸及多烯酸的双键定位均能有效。图3为二十二碳六烯酸(22:6(4,7,10,13,16,19))的苯并咪唑衍生物的质谱。图中的6个相差12u的间隔，表示6个双键所在的位置。此外，这一方法还成功地用于长链环丙烷脂肪酸中环丙烷基的定位。

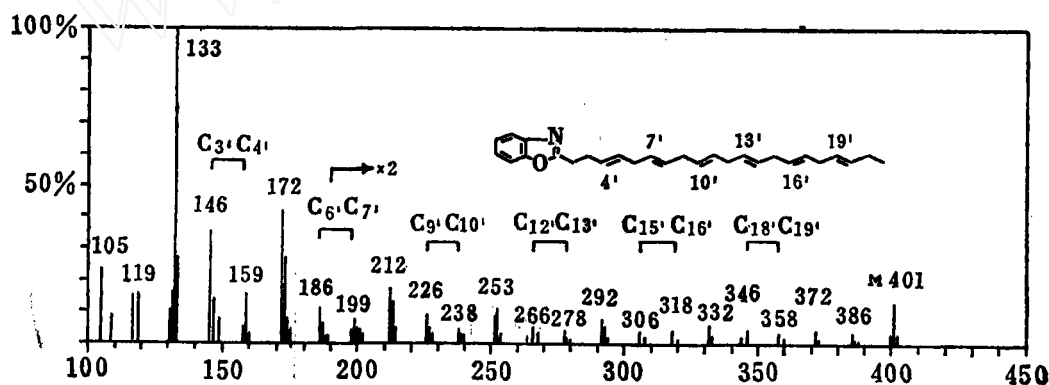


图3 二十二碳六烯酸(4,7,10,13,16,19)的苯并咪唑衍生物质谱(70ev)



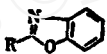


4. 远端官能团修饰法的其它应用

除了含烯键和炔键的UFA外，自然界中还存在着许多带有支链(甲基等)和环状结构(环丙基等)等其它官能团的长链脂肪酸和醇。远端官能团修饰技术对它们的结构鉴定也获得不同程度的成功(表1)。

表1

化合物	衍生化途径	参考文献
带甲基支链的脂肪酸	$\text{RCON} \begin{array}{ c } \hline \square \\ \hline \end{array}$	43
	$\text{RCOCH}_2\text{Py(m)}$	40
	$\begin{array}{c} \text{OCH}_3 \\ \\ \text{RC} = \text{C}(\text{CN})_2 \end{array}$	44

续表 1

化 合 物	衍 生 化 途 径	参 考 文 献
带甲基支链 的脂肪醇	RNHPy(0, m)	45
		46
	ROCOPy(m)	47
带环状结构 (环丙烷等) 的脂肪酸		48
	RCO ₂ CH ₂ Py(m)	49
		
不饱和脂肪 醇	RNHPy(0, m)	45
		46
	ROCOPy(m)	47
带羟基和羧 基的脂肪酸		50

四、负离子的碰撞活化质谱

饱和FA的 $(M-H)^-$ 负离子碰撞活化谱(NI-CAD)中, 有很规则的丢失 C_nH_{2n+2} 碎片

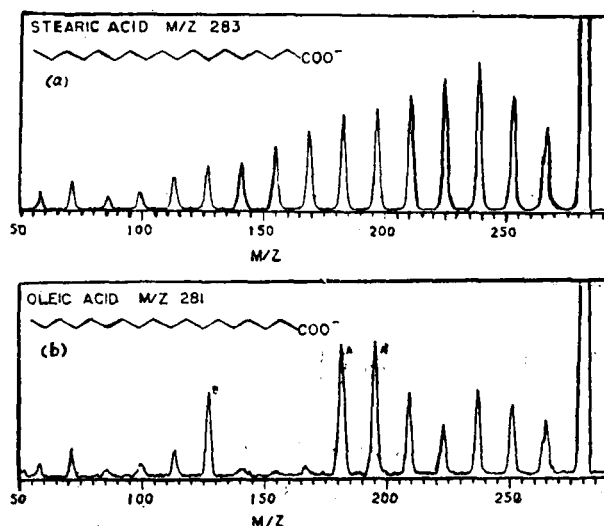


图 4 硬脂酸 (a) 和油酸 (b) 的 $(M-H)^-$ 碰撞活化离子谱

五、结 束 语

用质谱法对脂肪链上的不饱和键进行定位已经不是一个新问题,不同的对象,有各自适合的解决途径。其所以至今仍吸引化学家的关切,是由于迄今为止还没有一种满意的方法,可以对混合物中的复杂组分同时进行定量与定性分析。天然产物化学特别有此需要。对多烯酸的分析,成功的方法尚少;对不饱和脂肪酸以外的双(或多)官能团化合物(如不饱和脂肪醇羟基化合物)新的探索还不多;能否有一种灵敏度更高(样品量ng水平)可用于如昆虫激素等微量物质的分析,一个“理想”的双键定位方法仍是今后追求的目标,它至少应满足以下要求:

(1) 化学处理简便、有效,最好是一步反应,高产率,能在超微量($<10^{-6}$ g)规模下进行;

(2) 衍生物的质谱具有清楚、明确的特征,不受不饱和数的限制。特征峰容易辨认,不受柱流失造成的杂质峰的干扰;

(3) 有良好的GC和LC性质,值得注意的是在分析UFA的各种衍生化方法中,还没有一种方法的分离效果能与简单的甲酯相匹敌。不同时具备优良分离与鉴定性能的方法,不能认为是好的分析方法。

看来,远端基团修饰、氧化还原、NI-CAD质谱,或这几种技术的结合将会使“双键定位”问题在更高水平上得到新的解决。

参 考 文 献

1. B. A. Leonhardt, E. D. Devilbiss and J. A. Klum, *Org. Mass Spectrom.*, 18, 9 (1983)
2. M. Horriike and C. Hirano, *Biomed. Mass Spectrom.*, 8, 41(1981)
3. J. A. McCloskey, *Topics in Lipid Chemistry*, edited by F. D. Gunstone, Vol. 1 P369 *Logos. Press London*(1970)
4. M. Beroza and B. Bierl, *Anal. Chem.*, 39, 1131(1967)
5. E. H. Pryde and J. C. Cowan, *Top. Lipid Chem.*, 2, 1(1971)
6. R. Kleiman, G. F. Spencer, F. R. Earle and I. A. Wolff, *Lipids*, 4, 135(1969)
7. R. T. Aplin and L. Coles, *Chem. Commun.*, 858(1967)
8. M. J. Vacheron, G. Michel and R. Guilluy, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 51, 177 (1969)
9. R. Kleiman and G. F. Spencer, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 50, 31(1973)
10. F. D. Gunstone and H. R. Schuler, *Chem. Phys. Lipids*, 15, 198(1975)
11. G. W. Kenner and E. Stenhagen, *Acta. Chem. Scand.*, 18, 1551(1964)
12. H. Audier, S. Bory, M. Fetizon, P. Longevialle and R. Toubiana, *Bull. Soc. Chim. Fr.* 3034(1964)
13. R. Ryhage and E. Stenhagen, *Arkiv. Kemi.*, 15, 545(1960)
14. W. C. Niehaus Jr. and R. Ryhage, *Anal. Chem.*, 40, 1840(1968)
15. V. Dommès, F. Wirtz-Peitz and W. H. Kunau, *J. Chromatogr. Sci.*, 14, 360 (1976)
16. P. Capella and C. M. Zorzut, *Anal. Chem.* 40, 1458(1968)
17. E. G. Perkins and C. J. Argoudelis, *Lipids*, 4, 619(1969)
18. T. Ariga, E. Araki and T. Murata, *Anal Biochem.*, 83, 474(1977)
19. U. Murawski, H. Egge, P. Gyorgy and F. Zilliken, *Z. Naturforsch.*, 29c, 1

(1974)

20. B. Schmitz and H. Egge, *Chem. Phys. Lipids*, 25, 287(1979)
21. J. A. McCloskey and M. J. McClelland, *J. Am. Chem. Soc.*, 87, 5090(1965)
22. R. E. Wolff, G. Wolff and J. A. McCloskey, *Tetrahedron*, 22, 3093(1966)
23. W. Blum and W. J. Richter, *Helv. Chem. Acta.*, 57, 1744(1974)
24. H. E. Audier, J. P. Begue, P. Cadiot and M. Fetizon, *Chem. Commun.*, 200 (1967)
25. D. E. Minnikin, *Lipids*, 10, 55(1975)
26. R. D. Platner, G. F. Spencer and R. Kleiman, *Lipids*, 11, 222(1976)
27. F. D. Gunstone and R. P. Inglis, *Chem. Phys. Lipids*, 10, 89,105(1975)
28. S. Blum and S. Sarel, *J. Org. Chem.*, 37, 3121(1972)
29. D. A. Kidwell and K. Blemann, *Anal. Chem.*, 54, 2462(1982)
30. A. J. V. Ferrer-Correia, K. R. Jennings and D. K. S. Sharma, *Chem. Commun.*, 973(1975)
31. NG. Dinh-Nguyen and R. Ryhage, *Arkiv. Kemi.*, 15, 433(1960)
32. A. Kawaguchi, Y. Kobayashi, Y. Ogawa and S. Okuda, *Chem. Pharm. Bull.*, 31 3228(1983)
33. W. Vetter, W. Walther and M. Vocchi, *Helv. Chim. Acta.*, 54, 1599(1971)
34. B. A. Andersson, W. Heimermann and R. T. Holman, *Lipids*, 9, 443(1974)
35. B. A. Andersson and R. T. Holman, *Lipids*, 9, 185(1974)
36. B. A. Andersson, W. W. Christie and R. T. Holman, *Lipids*, 10, 215(1975)
37. J. D. Joseph, *Lipids*, 10, 395(1975)
38. F. Bohlmann and C. Zdero, *Chem. Ber.*, 106, 1328(1973)
39. A. J. Valicenti, W. H. Heimermann and R. T. Holman, *J. Org. Chem.*, 44, 1068 (1979)
40. D. J. Harvey, *Biomed. Mass Spectrom.*, 9, 33(1982)
41. D. J. Harvey, *Biomed. Mass Spectrom.*, 11, 340(1984)
42. Q. T. Yu, J. Y. Zhang and Z. H. Huang, *Biomed. Environ. Mass Spectrom.*, 13, 211(1986)
43. R. L. Glass, T. P. Krick, D. M. Sand, C. H. Rand and H. Schlenk, *Lipids*, 10, 695(1975)
44. R. E. Wolff, J. T. Watson and B. J. Sweetman, *Tetra. Lett.*, 2719(1970)
45. W. Vetter, W. Meister and G. Oesterhelt, *Helv. Chim. Acta.*, 61, 1287(1978)
46. W. Vetter, W. Meister and G. Oesterhelt, *Helv. Chim. Acta.*, 60, 1203(1977)
47. W. Vetter and W. Meister, *Org. Mass Spectrom.*, 16, 118(1981)
48. W. J. Gensler and J. P. Marshall, *J. Org. Chem.*, 42, 126(1977)
49. D. J. Harvey, *Biomed. Mass Spectrom.*, 11, 187(1984)
50. B. A. Andersson, *Prog. Chem. Fats other Lipids*, 16, 299(1978)
51. K. B. Tomer, F. W. Crow and M. L. Gross, *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 5487 (1983)
52. M. Bambagiotti A., S. A. Coran, V. Giannellini and F. F. Vincieri, *Org. Mass Spectrom.*, 19, 577(1984)
53. N. J. Jensen, K. B. Tomer and M. L. Gross, *Anal. Chem.*, 57, 2018(1985)

Mass Spectrometric Location of Double Bonds in Unsaturated Fatty Acids and Other Unsaturated Compounds

Zhang Jiyue, Yu Qitao & Huang Zhiheng

(Shanghai Institute of Materia Medica, Academia Sinica)

Received 11, Aug. 1986

Abstract

Methods for locating the position of double bonds in unsaturated fatty acids and other unsaturated compounds using mass spectrometry are reviewed. "On-site", remote functional group modification and negative FAB-CAD methods are described. Their advantages and disadvantages are also discussed.