

快原子轰击质谱方法在糖甙化合物研究中的应用*

陈能煜** 陈 涛 史 俊

(兰州大学应用有机化学国家重点实验室 兰州大学分析测试中心 730000)

〔摘要〕本文综述了快原子轰击质谱方法在糖甙类的分子量、甙的裂解规律、立体异构现象研究中的应用及底物的影响。

关键词:快原子轰击质谱法 糖甙 应用

糖甙是一类具有强生理活性的化合物,往往是重要中草药的有效成分,它的重要性日益被人们重视,这类物质主要是由甙元和糖基结合而成,由于甙元结构多样,糖的种类、立体构型差异,以及单糖之间多种的连接方式,使糖甙鉴定变得愈为复杂。

糖甙一般是大极性的、热不稳定、难挥发的化合物,早期质谱主要是对糖甙进行衍生化,而后利用 EI 或 CI 方法测定其结构^[1]。随着质谱技术的发展,软电离(soft ionization)越来越多地应用于研究甙类结构,其中脱颖而出的是快原子轰击(Fast Atom Bombardment, FAB)电离^[2]。早在 80 年代初,Barber 就论述了它的工作原理^[3-5]。Lehmann 进一步研究了有关 FABMS 的基本问题,如底物效应、样品的影响及灵敏度等^[2]。随后, Dell 和 Housell 等人就开始利用 FAB 研究糖甙的结构^[6,7]。FAB 适用于热敏感、强极性和难挥发性化合物,出现准分子离子及各种碎片离子,具有离子流稳定、谱图重复性好、不产生表面电荷、灵敏度高、操作简单快速、可与薄层色谱和液相色谱联用等优点^[8]。

本文将对 FABMS 方法在糖甙结构研究中的应用进行论述,以助于甙类结构的研究。

1 甙的分子量的确定

一般糖甙的正离子 FABMS (Positive FABMS) 都显示明显的 $[M+H]^+$ 峰,负离子 FABMS (Negative FABMS) 显示 $[M-H]^-$ 峰。陈能煜等^[9]的研究表明, NFABMS 的 $[M+H]^+$ 准分子离子峰比 PFABMS 中的 $[M+H]^+$ 峰要强,而且没有其他附加离子峰(如 PFAB 的 $[M+Na]^+$ 、 $[M+K]^+$ 峰),易于辨认。这对确定甙的分子量有利。如图 1 化合物 A 的 FAB 谱[化合物 A 为 3-O- α -葡萄糖基偏诺甙(Pennogenin-3- α -glucopyranoside),

1996-01-22 收

* 国家自然科学基金资助课题

** 通讯联系人

MW=592]。

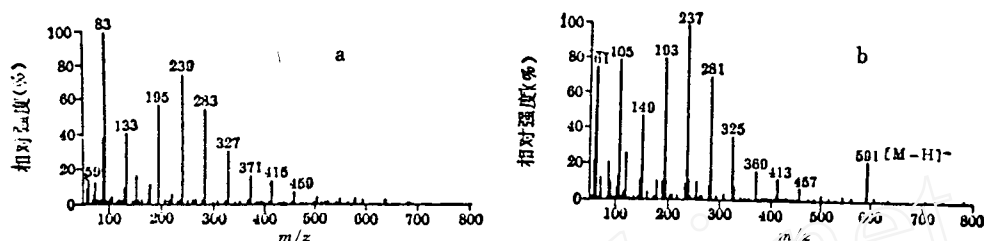


图1 化合物A的FAB谱(PEG-200为底物)

a. FFAB b. NFAB

然而,仅凭FAB谱定出分子量还有一定困难,这主要有以下几个问题^[10]:(1)谱中准分子区无峰;(2)准分子区有数个峰,丰度低;(3)谱图中准分子区仅有一个峰,但无法判断是 $[M+H]^+$, $[M+Na]^+$ 还是 $[M+g]^+$ 峰(g为甘油)。为提高准分子峰的丰度,把NaCl液加入样品得到的谱图,有时不仅表现 $[M+Na]^+$ 峰,还有 $[M+2Na]^+$ 峰。

为解决式的分子量问题,陈能煜等^[10]在FAB靶上加样品的同时,再加适量(一般为2mL~3mL)的NaCl和LiCl水溶液。这样得到的FAB谱中,就具有加合离子 $[M+Na]^+$ 和 $[M+Li]^+$ 峰,二峰之质量差为16。即凡出现质量数相差16的两个强峰,就可判定其中低质量峰为 $[M+Li]^+$ 峰,高的为 $[M+Na]^+$ 峰,从而得到该样品的分子量,而且FAB谱中看不到碎片加 Na^+ 、 Li^+ 的加合离子。另外的研究表明^[11],也可通过加 Na^+ 与 K^+ 离子判断分子量。其它金属离子,如 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Fe^{3+} 等可获得加合离子,但信号强度不尽理想;非金属盐类 NH_4Cl 也有 $[M+NH_4]^+$ 的加合现象,Musselman^[12]通过加合正一价银离子(Ag^+),能得到很强的 $[M+107]^+$ 和 $[M+109]^+$ 一对峰。

糖甙的NFABMS,如分别添加NaCl、NaBr、KCl或KBr,都没有明显的 $[M+Cl]^-$ 或 $[M+Br]^-$ 信号峰。如Rutin添加NaBr,除非溴的同位素含量比值 $[M+^{79}Br]^-/[M+^{81}Br]^-$ 有近似1/1的模式,恐也难以辨别^[11],如图3。因此,负离子FABMS的质荷比区分试剂是值得研究的课题之一。

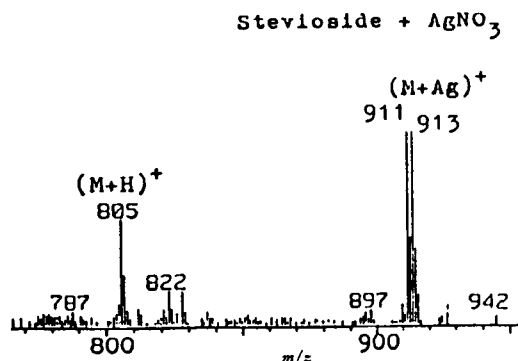


图2 Stevioside(WM=804)添加0.1N $AgNO_3$,
(M+Ag)⁺类分子峰

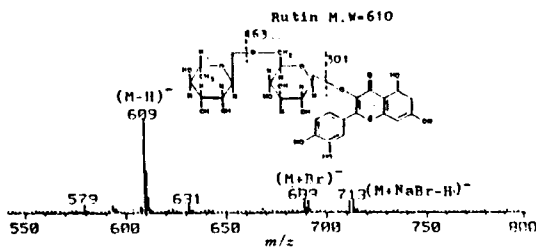


图3 Rutin添加NaBr的负离子
FABMS类分子峰

2 甙的裂解规律

在正离子 FAB 谱中,氧甙类都有很强的甙元离子峰,且多是基峰。甙的裂解是从甙键的氧原子两侧开裂,形成甙元端和糖基两大部分。电荷保留在甙元端是占优势的,糖基离子丰度极低。甙元端的碎片离子有带氧原子 $[A-O]^+$ 和不带氧原子 $[A]^+$ 及氧原子又接受两个氢原子 $[A-OH+H]^+$ 等三个典型离子^[13],而且没有因分子重排的断裂结构。许多学者的研究也证实了这点^[9,14-16]。Mitsuo Takayama^[17]进一步研究表明,加入金属离子(如 Na^+ 、 K^+)后, $[M+H]^+$ 峰减弱,同时碎片离子峰也相应减弱。

正负离子 FAB 的裂解也不尽相同,PFABMS 断裂峰是由分子间或介质的氢原子转移生成质子化离子,而 NFABMS 断裂峰则无以上情形^[13]。

更为详尽的关于甙类裂解的研究,常常要借助于 FABMS 与碰撞活化质谱法(CA)和质量分离离子动能谱法(MIKES),测 FAB-CA-MIKES 时,先扫描磁场,找到预置的母离子,固定磁场,只允许这个预置离子通过,然后在第二无场区的碰撞活化室通入 He 气作为碰撞气体,让预置的母离子有 50% 被碰撞活化分解,最后扫描电场,记录所得碎片离子的动能谱^[13]。

FAB 谱中,碎片离子峰很弱,再加上杂质、底物的干扰,不足以提供糖甙序列的信息,CA 谱把磁场锁定在 $[M+H]^+$ 准分子离子峰,就可以排除杂质和底物的干扰。现以齐墩果酸甙为例说明(图 4)^[18]。

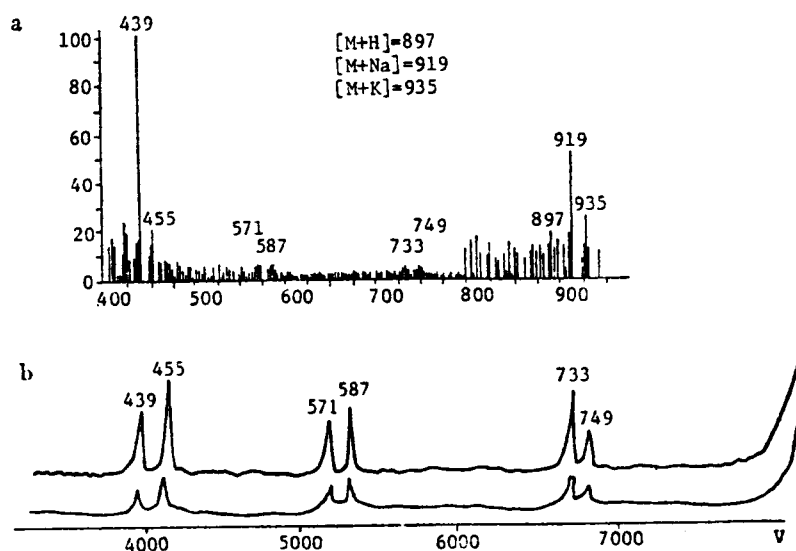


图 4 齐墩果酸甙的 FAB 谱和 CA 谱

a. FAB b. CA

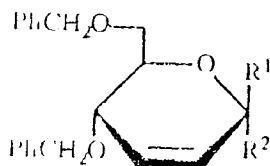
由图 4 很易判断甙中糖的连续情况,陈能煜^[9]利用 NFAB-CA 测定皂甙中糖的序列,与上例有相同之处。

FAB-CA-MIKE 谱所提供的信息更加丰富一些,它不仅给出了甙的裂解碎片峰,而且也提供了糖基裂解时产生的系列离子峰^[13],例如图 5。

3 立体构型问题

甙类立体异构体主要基于对甙类衍生化或化学处理后通过质谱而区分。

由于硼酸衍生物在质谱仪的离子源中能与顺式环邻二醇生成环状硼酸酯离子,而反式环邻三醇难以发生这一反应。糖基的差向异构体分子中所含顺式邻二醇(呋喃型或吡喃型)数目各不相同,因而,华苏明等利用这一反应^[13],选用硼酸三甲酯^[25]、苯基硼酸^[21]、萘基硼酸和 2,4-二甲基苯基硼酸^[22],以 NFABMS 法鉴定糖甙中糖基与甙元的 α, β 连接方式。方一苇等^[23]以正丁基硼酸鉴定了 12 个葡萄糖甙和半乳糖甙的立体异构。1987 年 Augel 等^[24]通过过碘酸对糖的专一性剪切、重氢硼化物还原甲基化和 FABMS,分析测定了糖的连接点的异构问题。



- 1 α $R^1=H, R^2=CH(NO_2)CO_2C_6H_5$
 1 β $R^1=CH(NO_2)CO_2C_6H_5, R^2=H$
 2 α $R^1=H, R^2=C(NO_2)(CO_2CO_2H)_2$
 2 β $R^1=C(NO_2)(CO_2C_6H_5)_2, R^2=H$

图 6 C-甙的两对异构体

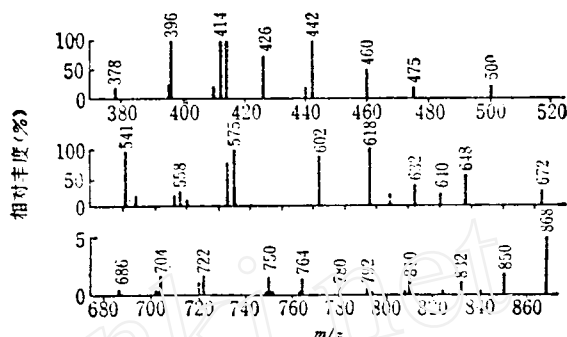


图 5 Sclarnargine 的 FAB-CA-MIKES

对 C-甙的研究,主要是法国的 Brakta 小组^[25-27],他们主要是对图 6 的两对异构体进行研究。

他们利用 PEABMS 及 FAB-MIKES 和 FAB-CA-MIKES,分别对两对异构体研究,发现准分子离峰 $[M+H]^+$ 并不是基峰,而且两个异构体的 $[M-H]^+$ 及失去甙元的峰 $[M+H-phCH_2OH]^+$ 峰的强度是不同的。 α -异构体的 $[M+H-H_2O]^+$ 峰很强,而 β -异构体的则很弱,从而揭示 C-甙的 α, β 异构体用质谱法是可以鉴定的。

4 底物的影响

所谓底物,是指能溶解或悬浮样品的粘稠液体,以便在较长时间内获得稳定的二次离子流,提高谱图稳定性,增强准分子离子峰^[8]。FAB 质谱方法必须有一定的底物来支持样品,因此底物的选择对糖甙的测定有很大的影响。

Kelsey^[28]综合整理了已见报道的各种可作为底物的化合物的物理性质以供选择时参考。Edwin^[29]和 Gower^[30]分别论述了各种底物的化学性质及在 FABMS 中底物的影响。Gower 认为,作为底物必须具备以下性质:(1)底物应能溶解待测样品;(2)在质谱仪的真空条件下,底物应有较小的挥发性;(3)底物不能与待测样品发生化学反应。可作为底物的物质很多,例如甘油(glycerol)、聚乙烯醇(polyethylene glycols)、三乙醇胺(triethanolamine)等。

一般而言,大极性化合物宜用甘油和硫代甘油底物,间硝基苄醇和间硝基苯辛醚(O-

nitrodphenyl octylether)适用于极性小的化合物。Rose^[31]等人认为,聚乙烯醇 200(PEG-200)很适合于甙类化合物,特别是皂甙二糖、三糖甙。Komori^[32]用三乙醇胺作底物测定甙体甙类的 FAB 谱也得到很好效果。

对负离子 FAB,甘油和硫代甘油也是常用底物^[33]。Ariat 等人^[34]认为,三乙醇胺更适于 NFAB。近期 Mitsuo Takayama^[35]以 1,5-戊二醇作底物,实验结果表明,该化合物在 NFAB 条件下,优于其它常用底物。

综上所述,在测定甙类的 FAB 谱时,必须要选择合适底物,以获得最佳谱图效果。

参 考 文 献

- 1 M S Munson, F H Fiele. *J Am Chem Soc*, 1966, 88, 2621
- 2 Lehmann W U, Kessker M. *Biomed Mass Spectrom*, 1984, 11, 217
- 3 M Barber *et al.* *J Chem Soc Chem Commun*, 1981, 532
- 4 M Barber *et al.* *Nature*, 1981, 293, 270
- 5 M Barber *et al.* *Anal Chem*, 1982, 54, 645A
- 6 Dell A, Bollou C E. *Biomed Mass Spectrom*, 1983, 10, 15
- 7 Hounsell E F *et al.* *Biomed MS*, 1984, 219, 947
- 8 罗运, 朱育芬. *分析测试通报*, 1992, 11, 34
- 9 陈能煜等. *化学学报*, 1987, 45, 682
- 10 陈能煜, 赵凡智. 第六次全国在机质谱学学术会议论文集, 兰州, 1991. 44~48
- 11 罗吉孟, 刘邦基, 陈秋明. *化学学报*, 1991, 49, 1
- 12 B D Musselman. *Anal Chem*, 1985, 57, 2425
- 13 梁伟升, 芦荟等. *化学学报*, 1989, 47, 133
- 14 Chen Y Z *et al.* *Biomed Mass Spectrom*, 1987, 14, 9
- 15 徐文豪, 薛智. *药学报*, 1986, 21, 177
- 16 M Stobiecki *et al.* *Biomed Mass Spectrom*, 1987, 15, 589
- 17 Mitsuo Takayama *et al.* *Org Mass Spectrom*, 1991, 26, 655
- 18 吴风镔, 朱子清. *有机化学*, 1986, 6, 409
- 19 华苏明, 陈耀祖等. *高等学校化学学报*, 1991, 9, 1126
- 20 华苏明等. *Org Mass Spectrom*, 1995, 20, 719
- 21 李宏等. *Org Mass Spectrom*, 1992, 25, 9
- 22 李源俊等. *J Carbohydrate Chem*, 1993, 12, 39
- 23 方一苇, 严琳. *药学报*, 1988, 23, 895
- 24 Augel Anne-Sophie *et al.* *Carbohydrate Res*, 1987, 168, 15
- 25 M Braket *et al.* *Org Mass Spectrom*, 1990, 25, 249
- 26 M Braket *et al.* *Org Mass Spectrom*, 1992, 27, 331
- 27 M Braket *et al.* *Org Mass Spectrom*, 1992, 27, 621
- 28 Kelsey D Cook. *Biomed Mass Spectrom*, 1989, 18, 492
- 29 Edwin De Panv. *Mass Spectrom Rev*, 1986, 5, 191
- 30 John Leveson Gower. *Biomed Mass Spectrom*, 1985, 12, 19
- 31 M E Rose *et al.* *Biomed Soc Trans*, 1983, 11, 602

- 32 T Komori *et al.* Liobigs Ann Chem,1983;2079
33 A Sakushima *et al.* Mass Spectrom,1988;36;71
34 M Arita *et al.* J Biochem,1984;95;971
35 Mitsuo Takayama. Org Mass Spectrom,1991;26;1123

The Application of Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry in Studying Glycosides

Chen Nenyu *,Chen Tao,Shi Jun

(National Laboratory of Applied Organic Chemistry,Lanzhou University;
Center of Analysis & Measurement,Lanzhou University,Lanzhou 730000,Chian)

Received 1996-01-22

Abstract

The fast atom bombardment mass spectrometry technique for studying the structures of glycoside is reviewed in four sections; the molecular wight of glycosides, the mechanism of ion fragmentation, stereoisomerism and effects of matrices.

Key Words: FABMS, glycosides, application

* To whom the response should be addressed.