

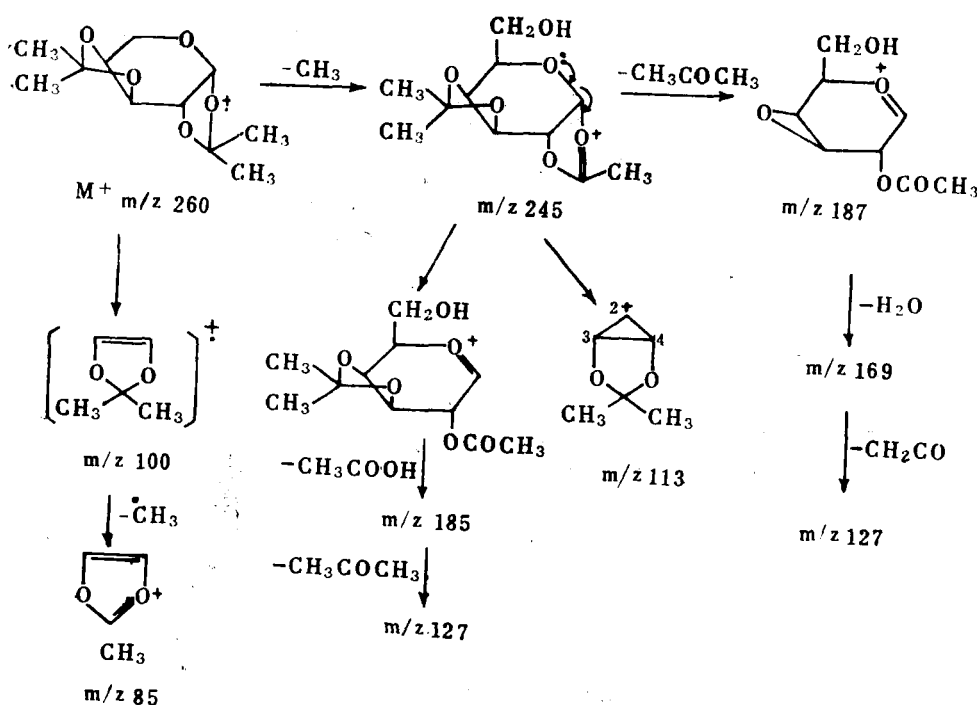
## 化学衍生物与GC/MS联用的进展(四)

傅道超

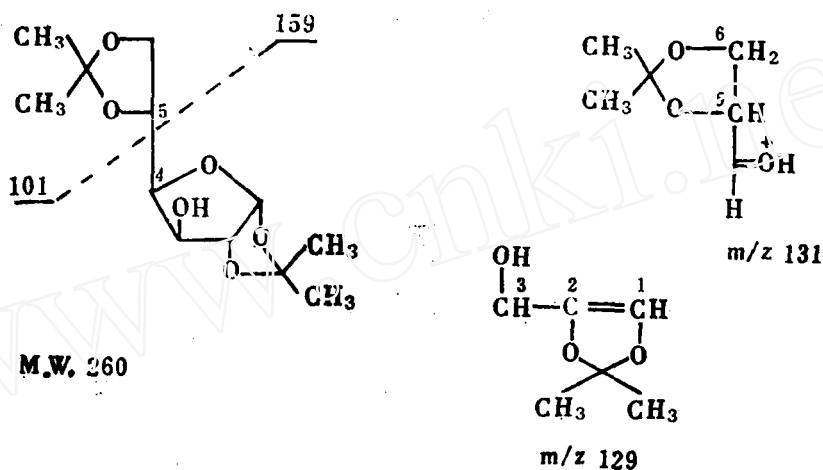
(中国科学院大连化物所)

### 3. 0-异丙叉衍生物

上面介绍的甲基化, 乙酰化和三甲基硅基衍生物不能区分糖类异构体, 而用 0-异丙叉衍生物则可区分。因为这种衍生物的形成, 依赖于羟基的空间排布, 显著加大异构糖类的结构差别, 得到不同的碎裂质谱。例如 1,2:3,4-双-O-异丙叉- $\alpha$ -D-半乳糖吡喃糖 (galactopyranose) 的主要断裂方式为:

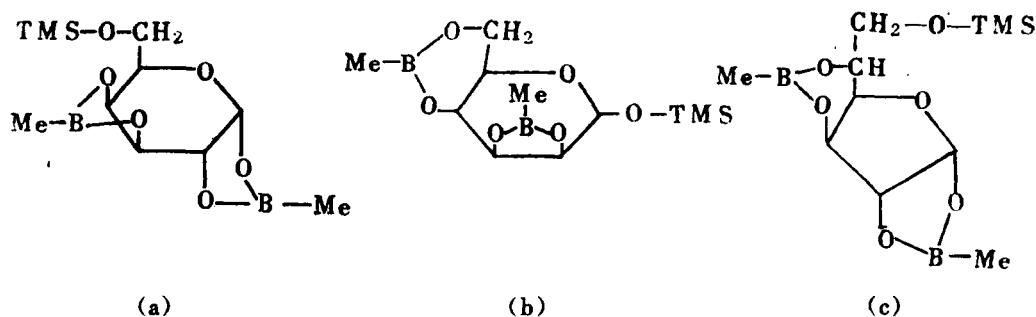


而1,2:5,6-双-O-异丙叉- $\alpha$ -D-葡萄糖呋喃糖的主要断裂表示在C-4与C-5间的键开裂, 还有 $m/z$ 131和 $m/z$ 129离子



#### 4. 环状的硼酸酯衍生物

环状的硼酸酯衍生物也提供立体结构特征。随着合适的空间配置它们分别形成五员环或六员环, 剩下的自由羟基能三甲基硅烷化以进一步去极性。在碳水化合物 GC-MS 研究中, 这种混合的硼酸酯-三甲基硅基衍生物, 可以鉴定五碳糖、六碳糖、6-脱氧己碳糖等异构体化合物。例如 D-半乳糖、D-甘露己糖和 D-葡萄糖经硼酸-硅烷化的相应衍生物如下: 含

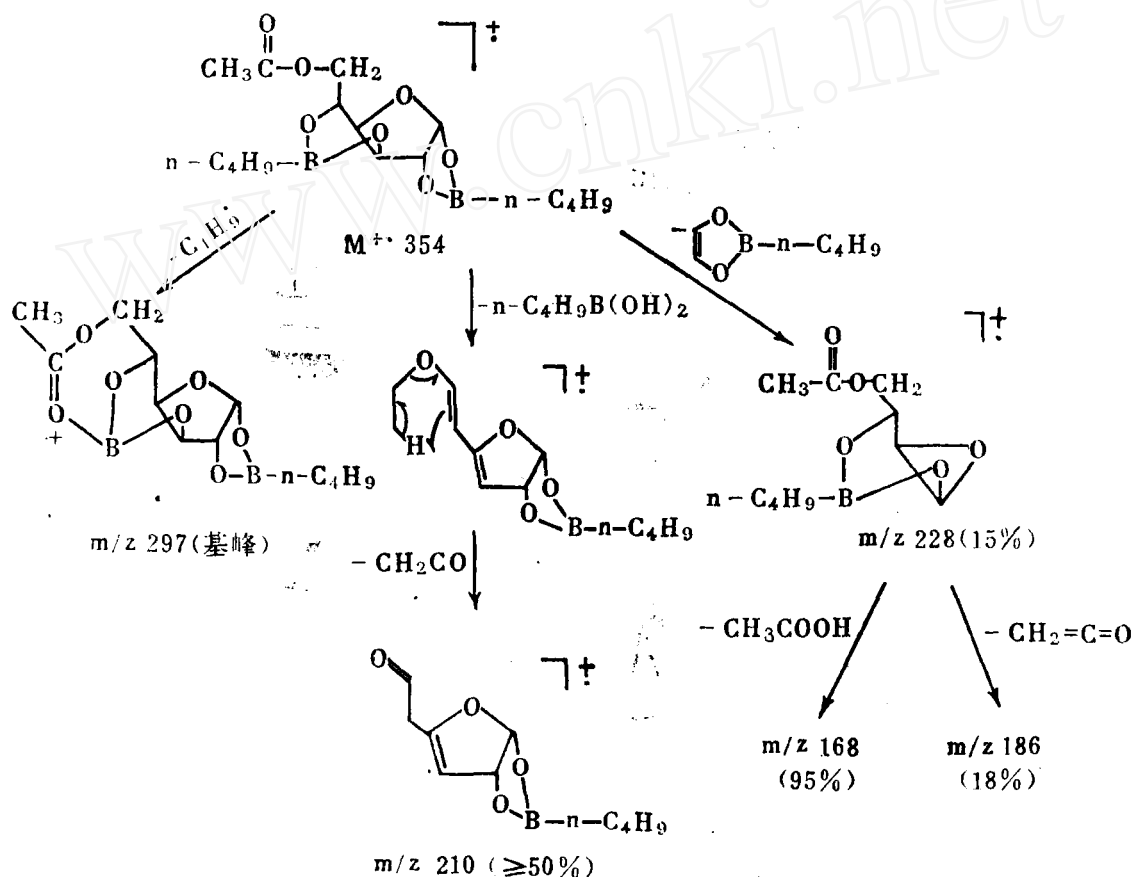


TMS-离子可用以指示三甲基硅氧基的连接方式。在(a)中由生成的 $(\text{CH}_3)_2\text{Si}^+-\text{O}-\text{CH}_2\text{CHO}^+$  ( $m/z$ 117) 离子指示TMSO连接在C-6。在(b)中由生成的

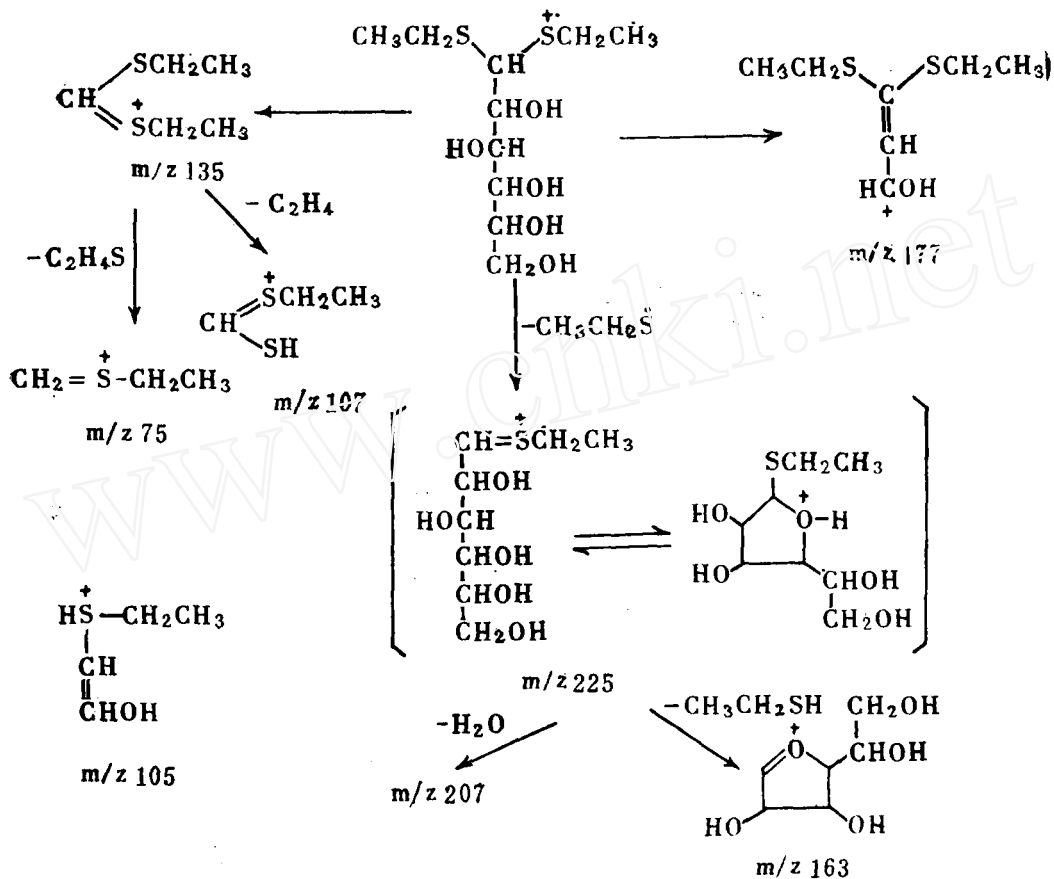
$\text{CH}_3-\text{B} \begin{array}{c} \diagup \text{O} \diagdown \\ \diagdown \text{O} \diagup \end{array} -\text{O}^+-\text{O}-\text{TMS}$  ( $m/z$ 215) 离子指示在C-1有TMS, 还有连接二个环状

硼酸酯 (2,3:4,6) 的结构。在(C)中由生成的  $\text{CH}_2 = \text{O} - \text{TMS}$  ( $m/z 103$ ) 离子指示衍生物存在呋喃环和两个硼酸酯 (1,2:3,5)。

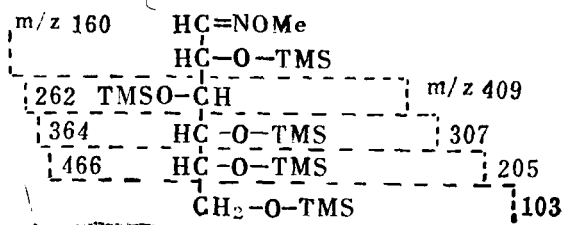
Wiecko等<sup>[40]</sup>研究了碳水化合物的另一新衍生物,即硼酸酯化/乙酰化衍生物。用氘标记,高分辨质谱研究了特征离子的来源。



除上述的环状碳水化合物衍生物外,在非环状碳水化合物的衍生物中,最突出的是硫缩醛衍生物。其质谱有确定的分子离子,这是与上述环糖的各种衍生物不相同之处。



多数情况下, 非环状糖类的MO-TMS衍生物<sup>(2)</sup>的质谱只有很弱的分子离子峰。由于非环状糖的MO-TMS衍生物质谱中的碎裂过程主要是简单断裂, 无重排离子, 所以很适于测定各个碳原子上的取代基。



D-葡萄糖的MO-TMS衍生物

### 核糖核武和核武酸类

MS技术特别适于核酸领域的研究, 也包括适于核武酸衍生物; 适于存在RNA或DNA分子中的痕量的核武酸或改性的核武酸研究。特别重要的是研究“由致癌物或致变性试剂的影响, 使核酸结构改性”问题所提供的有关“癌特征是如何诱发”的信息。

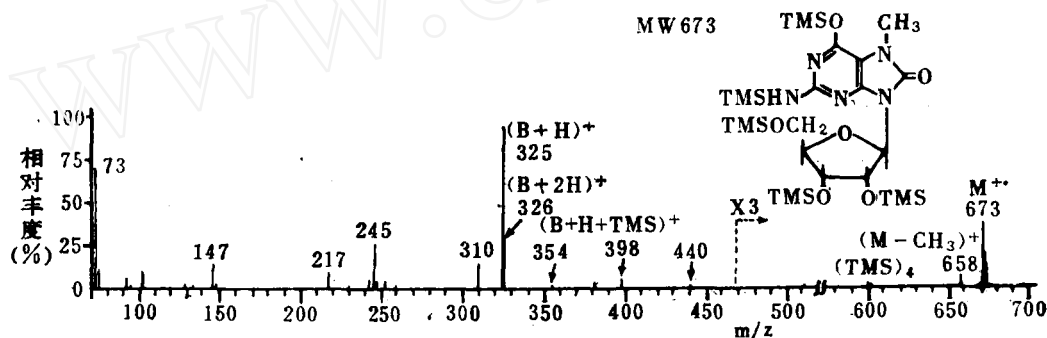
一般情况下, 未衍生化的核武类应用质谱法有较大困难。有的易热分解, 结果得不重复而混淆的质谱。有的虽不发生分解, 但缺 $M^+$ 和有结构意义的离子。如用CI、FI、FD和

$^{252}\text{Ci}$ 解吸技术, 可提供较强丰度的分子离子, 或与之有关的 $(M+A)^+$ 离子( $A$ 为 $\text{H}^+$ 、 $\text{Li}^+$ 、 $\text{Na}^+$ 等)。但谱图太简单, 不能给出更多的结构信息。化学衍生化有效的解决了上述问题。可以增加挥发度和热稳定性, 可以GC进样而扩大质谱法用于分析复杂混合物。此外, GC还提供补充结构信息(保留值)。尤其是某些衍生物能改善EI质谱的碎裂行为(即提供强丰度的 $M^+$ 和结构上有意义的碎片离子)。

### 1. 核糖核甙类<sup>[41-51]</sup>

各种衍生技术已应用于核甙类, 致力于改进色谱和质谱行为。有烷基化<sup>[41]</sup>、三甲基硅烷化<sup>[44]</sup>、乙酰化<sup>[42]</sup>、三氟乙酰化<sup>[43]</sup>、也可以通过衍生反应形成核甙的异丙叉衍生物, 或2', 3'-O-苯基硼酸酯衍生物<sup>[9]</sup>。

甲基化对核甙不实用, 因为甲基化不易完全, 使产物纯化困难。硅烷化是用得最广的。以鸟甙TMS衍生物的质谱为例(见图6)表示出特征离子峰。此外, 形成核甙的2', 3'-O-



图(6) 7-Me guanosine的TMS衍生物的质谱

异丙叉衍生物也较为满意, 它还可以进一步再乙酰化, 三氟乙酰化或TMS硅烷化, 生成挥发性更好的衍生物(见图7)。

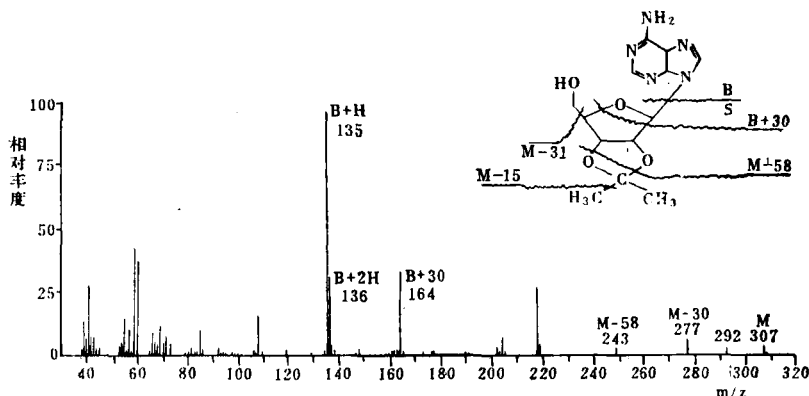


图7 2', 3'-O-isopropylidene Adenosine的质谱

核甙的质谱, 除了碱基和糖部分所产生的离子外, 一般具有 $M^+$ 、 $M-\text{OH}$ 、 $M-\text{H}_2\text{O}$ 和重要离子有 $M-30$ 、 $B+30$ 、 $B+44$ 。其中 $B+44$ 离子常为基峰。在C-2'有羟基的核甙, 有衍生的2'-O-甲基, 根据此离子的质量位移确定甲基的存在, 即 $(B+44)^+$ 位移到 $(B+58)^+$ 。以2'-O-甲基腺甙与3'-O-甲基腺甙相比较(见图8), 均有 $(B+30)^+$ 离子。(a)图中的 $(B+44)^+$ 位移至 $(B+58)^+$ 离子。胞嘧啶核甙质谱, 具有弱的 $M^+$ 和较强的 $(B+2H)^+$ 离子, 它

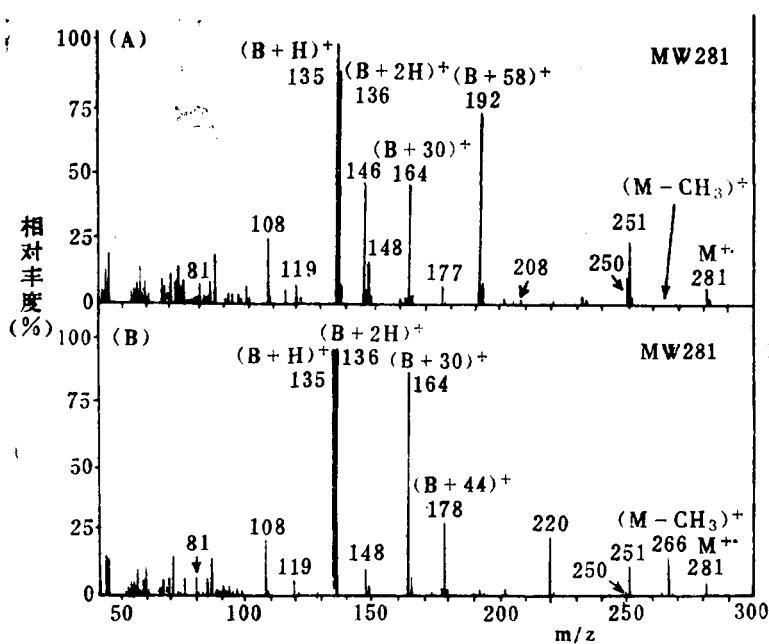
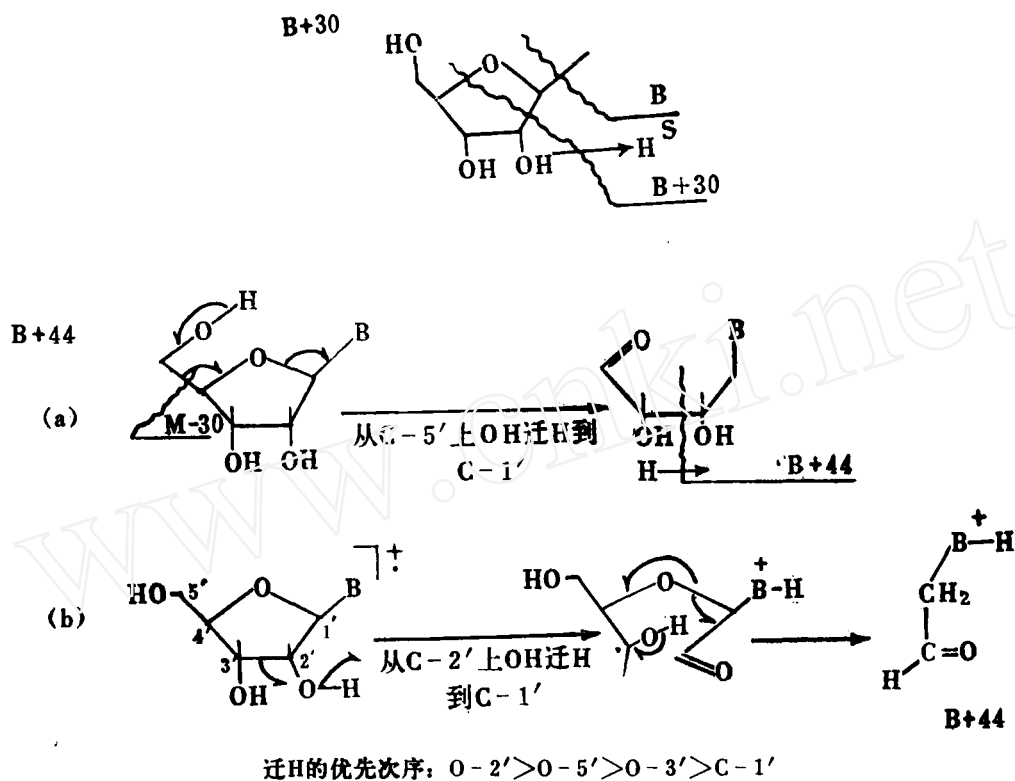
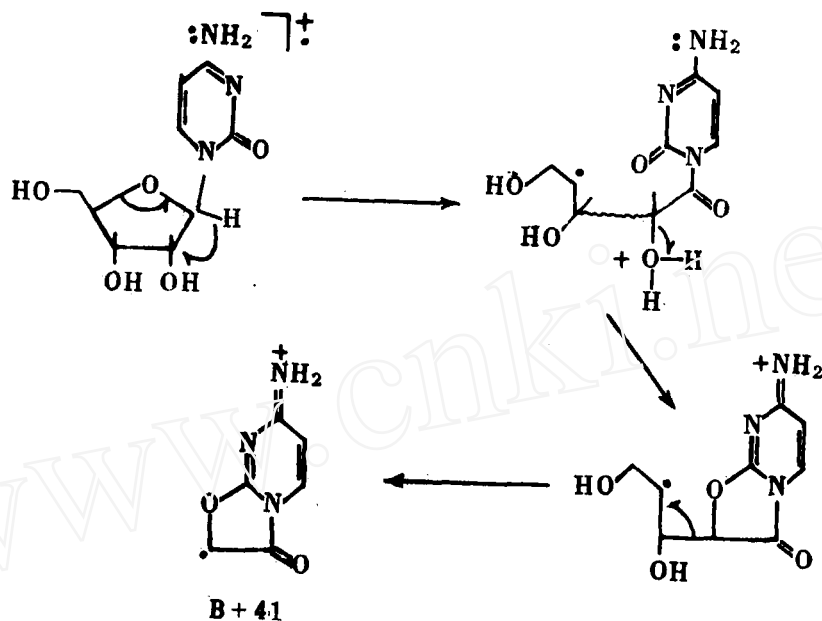
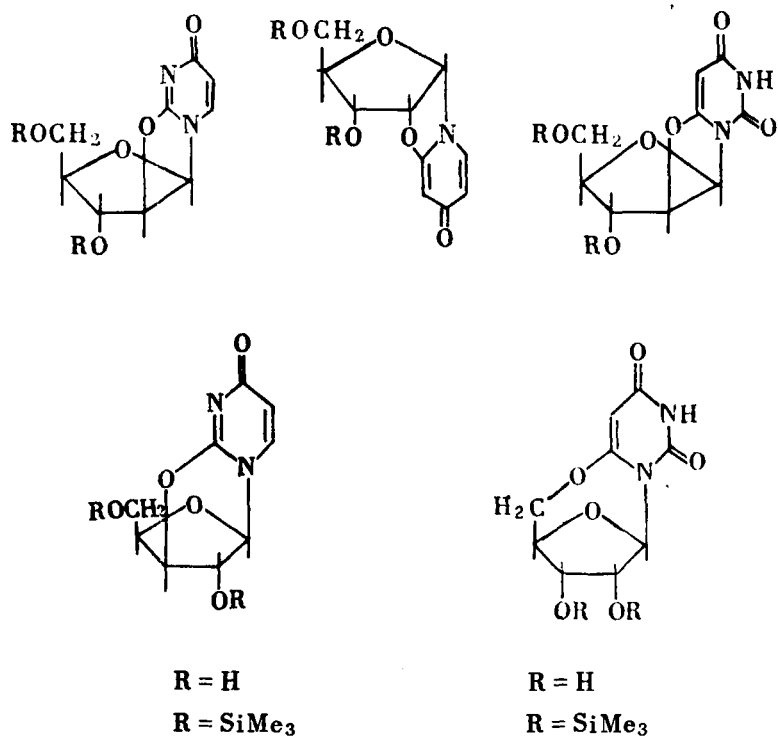


图8 (A) 2'-O-Me adenosine 的质谱  
(B) 3'-O-Me adenosine 的质谱

大于  $(B+H)^+$  和强丰度的  $(B+41)^+$  离子。形成  $(B+41)^+$  离子的机制如下:



核甙质谱碎裂研究已扩大至如下类型的环式核甙类。McCloskey<sup>[47,48]</sup>所作环式核甙的



TMS衍生物有足够的挥发度, 可以GC-MS直接分析反应混合物。其衍生物的质谱, 从结构上很多主要离子与未衍生化的类似。但与未衍生化的相比能更真实的代表原来的环式核甙结构。

除了上述衍生反应外, 还有进行研究核甙类的“立体密集型的三烷基硅基”(“Steri-

cally Crowded Trialkyl Silyl" ) 衍生物代替其TMS衍生物, 改进了抗水解的能力。特别是最近两年, Quilliam等<sup>[49,50,51]</sup>首次用TBDMSi、TMiPSi、TMTBSi 试剂, 对核糖核甙、脱氧核糖核甙进行了部分硅烷基化, 混合的乙酰基—硅烷基衍生化, 和全硅烷基衍生化。鉴于这些衍生物在核酸的合成和分析上有意义, 作者较系统地作了这些衍生物的GC保留值和EI质谱, 并进行了深入的结构研究。这些衍生物的碎裂途径, 是用精密质量测定, 亚稳离子分解, 氘标记测量确定的。 $(M-R)^+$  (R为叔丁基或异丙基) 是谱图中很多强丰度离子的前体离子。它们是由分子中的Si<sup>+</sup>和氧原子互相作用导致“硅离子重排”, 形成了环状硅鎓离子, 然后再分解。因为Si和氧原子作用, 必须在立体化学上是可取的。由环状硅鎓离子重排导致特定的碎裂, 其碎片离子类型和丰度与结构相关。对于核甙有三种可能离子:  $(M-R_y)^+$ 、 $(M-R_z)$ 和 $(M-R_w)$ 。对于脱氧核甙则只有两种可能。对于混合衍生物, R消去的优先次序为叔丁基>异丁基>甲基。在此类衍生物的质谱中, 从 $(M-R)$ 给出不同组的显著子离子。它们在未衍生物化的核甙、或在核甙的TMS衍生物中不出现, 即使出现也是丰度极低的离子。从而获得了糖部分、核碱基部分、及与其异构体有关的很多有价值的信息 (见图9~11)。

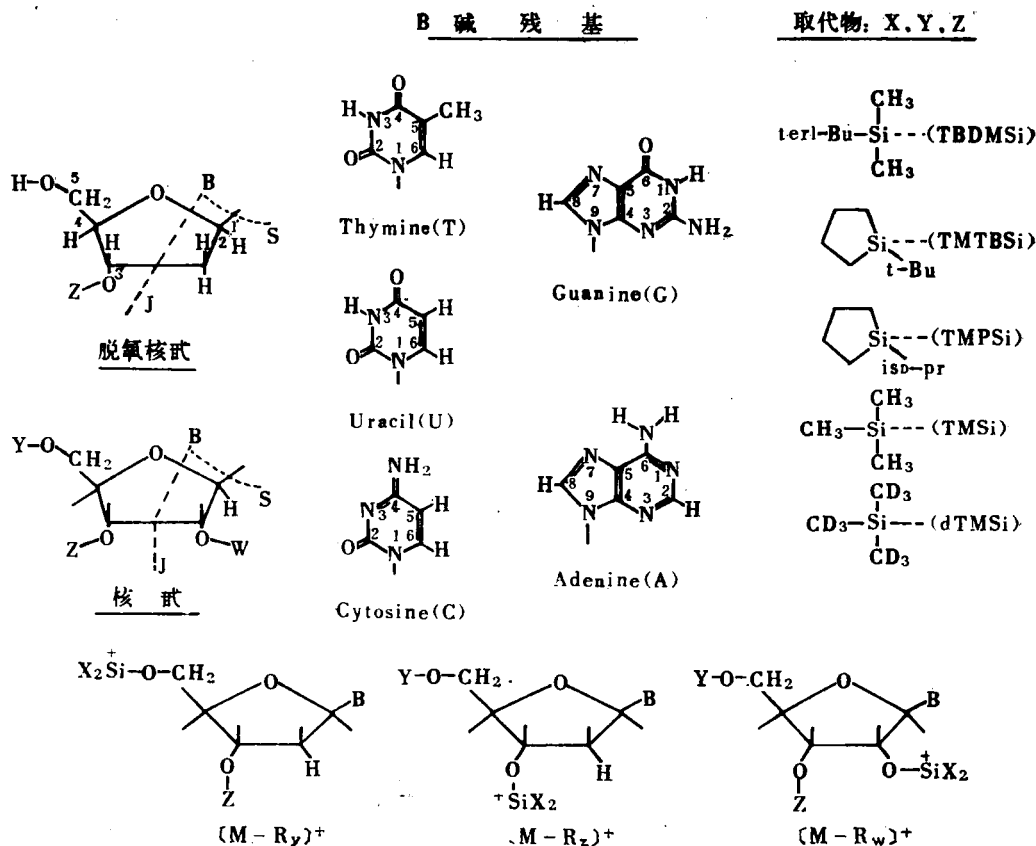


图 9



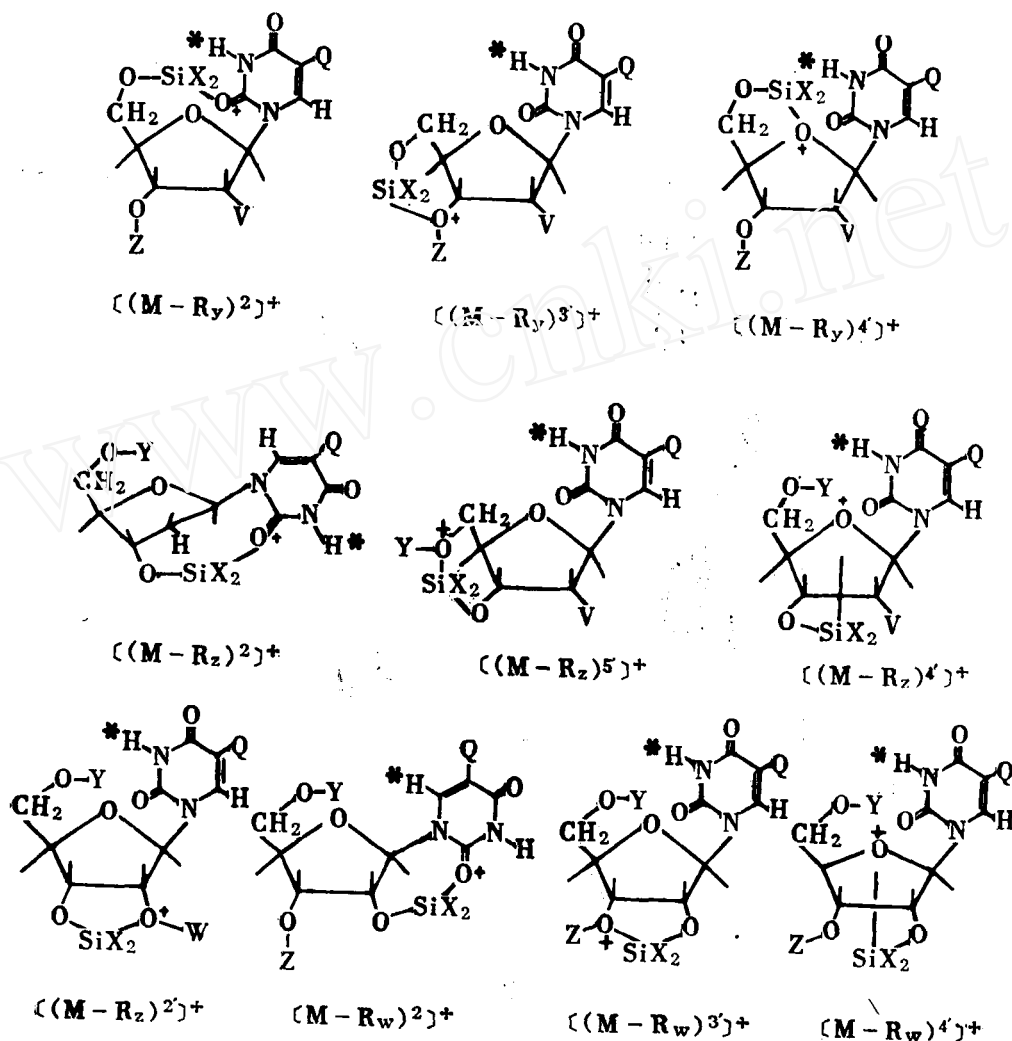


图10 上面6个结构应用于脱氧核甙, 10个结构应用于核甙

Q = H 或 CH<sub>3</sub>

V = OSiX<sub>2</sub>R——对核甙

V = H——对2'-脱氧核甙

## 2. 核甙酸类<sup>[51-55]</sup>

核甙酸因含有磷酸, 不宜用通常的EI和CI技术。必须衍生化或用其它新电离技术才能取得质谱。甲基化和三甲基硅烷化所生成的衍生物已足够挥发, 也研究过开链的核甙酸和环状核甙酸的这类衍生物的质谱。其全甲基化衍生物质谱具有  $M^{++}$ 、 $(M - CH_3)^+$ 、 $(M - OCH_3)^+$ 、 $(M - CH_3OH)^+$ 。断裂配糖体键, 游离出糖离子, 再进一步碎裂。核甙酸的TMS

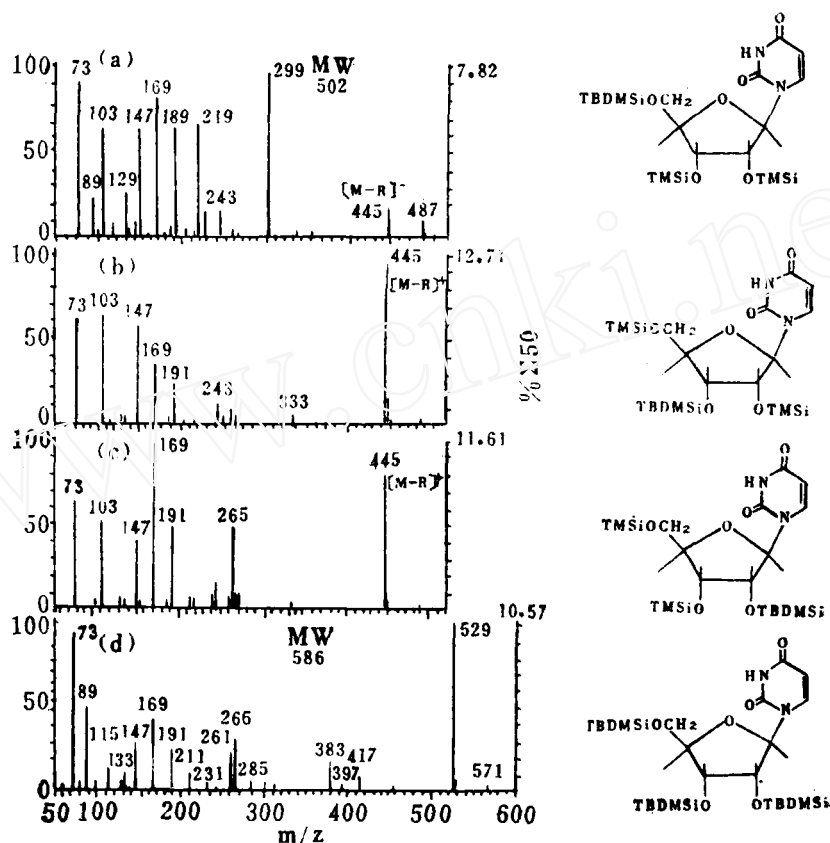
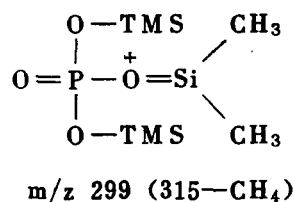
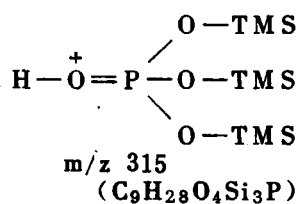


图11 (a) 2',3-bis-O-TMSi-5'-O-TBDMSi-尿核甙 MW502  
 (b) 2',5'-bis-O-TMSi-3'-O-TBDMSi-尿核甙 MW502  
 (c) 3',5'-bis-O-TMSi-2'-O-TBDMSi-尿核甙 MW502  
 (d) 2,3,5'-Tris-O-TBDMSi-尿核甙 MW586

衍生物质谱，具有强的 $M^+$ 和 $(M-CH_3)^+$ ，还有意外的  $m/z$  315 和  $m/z$  299 离子。它们是



从分子内部迁移整个TMS族形成的。例如在五-TMS腺甙-5'-单磷酸酯〔penta (TMS) adenosine-5'-monophosphate〕的质谱中也有此两特征离子 (见图12)。

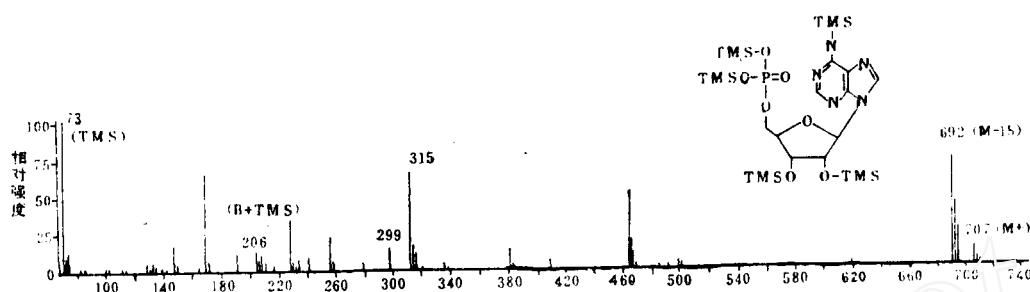
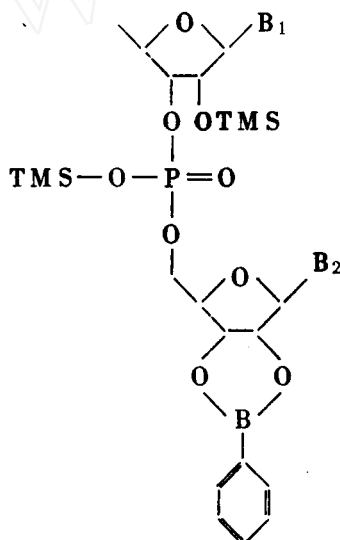


图12 五-(TMS)腺甙-5'-单磷酸酯的质谱  
(Penta(Trimethylsilyl)adenosine-5'-monophosphate)

Hunt等<sup>[54]</sup>首次用质谱法测定了二核武酸的序列。Dolhun<sup>[55]</sup>等用双衍生试剂,对称地衍生化为苯基硼酸酯,然后三甲基硅烷化,使其挥发度增加。在衍生的二核武酸的质谱中有明显区分碱残基顺序的一些离子。



除二核武酸外,在多核武酸方面,<sup>252</sup>Cf解吸质谱已作到十核武酸的结果。对分子大,极性强的多核武酸而言,衍生化技术将继续发展,新技术也将向如何分析“难挥发”大分子的方向继续发展。二者配合起来,直接分析整体核酸在不久的将来是可能的。

### 三、今后发展动向

#### 1. 化学衍生化—GC/MS联动扫描技术

直接分析混合物中的“MS/MS”技术(低分辨质谱)尚有不足之处。对某些异构体的混合组分,不能用预选质量达到分离。若用对结构灵敏的GC方式采样,则异构体混合物可以很好地预分离。Gaskell等人<sup>[57]</sup>曾研究雄甾烷-3,17-二醇的八个立体异构体。将该化合物的双-叔丁基二甲基硅基醚衍生物(bis-t-Butyl dimethyl-Silyl ether)作联动扫描质谱,得出了主要碎裂途径和竞争过程。最近 Longstaff 和 Rose 等<sup>[58]</sup>首次将化学衍生化与“GC/MS 联扫技术”相联用,研究取代的硼酸苯酯异构体衍生物的混合物之特征碎裂途径,效果很好。并将用于甾类异构体混合物的分析。目前,该项研究工作很活跃,有发展前途(见图13, 14)。

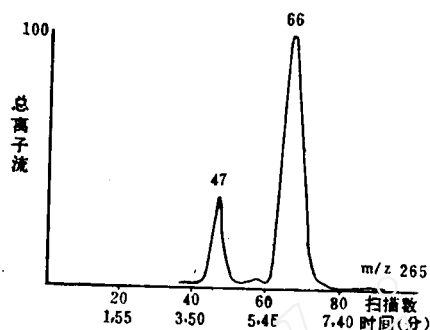


图13 硝基苯硼酸-羧酸酐与丙二醇衍生反应的混合物在B/E=常数时对  $m/z$  265 重复扫描的总离子色谱图

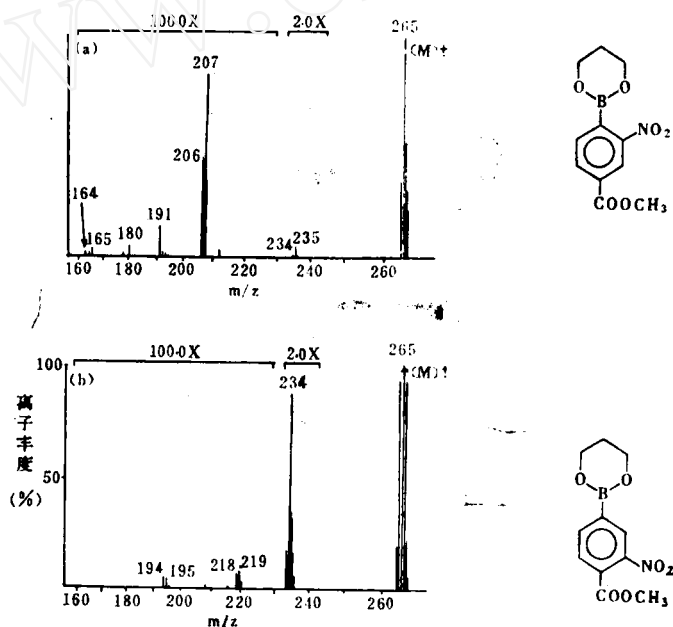


图14 (a) 和 (b) 图分别为47号峰和66号峰的联扫质谱图

## 2. 化学衍生化——GC/CIMS

化学衍生化一旦与GC/CIMS联用之后,可更多的解决生物化学课题。例如在检测痕量组分方面,很多昆虫激素含有单烯和双烯键的脂肪醇类的异构体,因其量少,分离和鉴定均困难。特别是醇类在激素中是微量,这样,更是痕量的醇。采用化学衍生后,流出时间发生位移,使原来分不开的醇类和非醇类组分得以分开。衍生物的质谱也明显。Hogge 等人<sup>(59)</sup>用GC/(正、负)—CIMS技术,比较其TFA、PFP、HFB三种不同衍生物的检测极限,均在ng数量级。又如在异构体鉴别方面,Brooks等人<sup>(4)</sup>研究了1,2和1,3—二醇类、 $\alpha$ 和 $\beta$ —羟基酸类、2—氨基—1,3,4—三醇类双功能基化合物的烷烃硼酸酯衍生物的GC/EI和GC/CIMS质谱的特征,并对反式和顺式的9,10—二羟基硬脂酸甲酯(或乙酯)的两个光学异构体,用CIMS鉴别(EI质谱相同不易区分),得到有意义的结果。

## 3. 柱上衍生反应

柱上衍生化除了较早的脂肪酸的酯化反应外,有用三甲基苯铵氢氧化物的甲醇溶液,对

多种类别物质进行柱上甲基化反应。甚至在巴比士酸盐的GC/MS分析中,这种柱上衍生反应被选作为常规方法。在进行代谢物的甲基化时,改用三甲基-d<sub>9</sub>-苯铵氢氧化物,可以区分它们内生的或柱上甲基化产物。还有报道对甾醇(乙酸乙酯的溶液)用甲烷磺酰氯(用吡啶作催化剂)在柱上衍生反应,转化它为甲烷磺酸酯。对羟肟酸用乙酸酐溶液(以吡啶为催化剂)反应后,加热转化为异氰酸酯。此外,选择性的柱上衍生化也有报道,有关于嘌呤和嘧啶(如胸腺嘧啶)之类物质选择地进行N-甲基化,而对巯基氧无关<sup>[2]</sup>。后者在核甙领域的GC-MS分析中重要。Kossa等人<sup>[60]</sup>最近报道柱上的热解甲基化衍生反应,适用于含有酸性的O-H和N-H功能团的化合物,包括羧酸类、酚类、磺酰胺类、巴比士盐、嘌呤、嘧啶、黄嘌呤之类。用此衍生反应测定了若干生物来源样品。如血浆、血清、全血、唾液、脑脊髓液、尿、粪便、动植物的组织、细菌培养液等。对生物化学和药理学方面应用有意义。

值得注意的是在GC-MS系统中,使用同位素标记。同位素交换在柱上进行,除了需样量较少外,氘化和分离简化为一个步骤。不仅对羟基和氨基中的H能进行交换,而且对

$\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{>P=O} \end{array}$  中的H也交换为  $\begin{array}{c} \text{D} \\ | \\ \text{>P=O} \end{array}$ 。对含磷化合物,若用“湿”法,易导致磷酸水解。在此,柱上“气相”交换法特别有义。因之,逐渐应用于核甙酸的衍生物、甘油磷酸酯的衍生物、甾体磷酸酯的衍生物、以及雌性激素和前列腺素的TMS衍生物的结构解析。最近,已有大量商品化的全氘三甲基硅烷化试剂问世,更促进柱上同位素交换的运用。

在生物-有机化学的GC/MS分析中,化学衍生化占很重要地位。如与“软电离”法和新的检测技术相结合,不言而喻,将大大地促进痕量组分的定性定量分析、极性有机物的结构测定、立体异构的鉴别、双键位置的测定和质谱碎裂机制等研究的发展。

### 参 考 文 献

1. Drozd, J., J. Chromatog., 113, 303(1975)
2. Merritt, C, Charles, J. et al., Practical Spectroscopy Series Vol. 3, Mass Spectrometry part B, (1980)
3. Poole, C. F. and Zlatkis, J. Chromatog. Science, 115(1979)
4. Brooks, C. J. W., Edmonds, C. G. et al., Adv. Mass Spectrom., 7B 1587 (1976)
5. Rosello, J. et al., 7B 1628(1976)
6. Donike, M., Chromatographia, 7, 651(1974)
7. Donike, M., J. Chromatog., 78,273(1973)
8. Evans, J. V. and Vouros, P., Anal. Biochem., 90, 389(1978)
9. Crain, P. F. Desiderio, D. M. et al., "Mass Spectrometry of prostaglandins" in methods in Enzymology, (1975)
10. Watson, J. T. and Sweetman, B. J., Org. Mass Spectrom., 9,39(1974)
11. Rosello, J. et al., J. Chromatog., 130,65(1977)
12. Nicosia, S. et al., Anal. Biochem., 61,192(1974)
13. Middleditch, B. S. et al., J. Org. chem., 38,2204 (1973)
14. Kelly, R. W., Anal. Chem., 45,2079(1973)
15. Kelly, R. W., Adv. Mass Spectrom., 6, 193(1974)
16. Miyazaki, H. et al., J. Chromatog., 153,83(1978)
17. Oswald, E. O. et al., J. Chromatog., 93, 47(1974)

18. Smith, A. G. et al., *Biomed. Mass Spectrom.*, 4,258(1977)
19. Rosello, J. Swnol, C. *Adv. of Mass Spectrom.*, 7,1628(1976)
20. Petersson, B. A. and Vouros, P., *Anal. Chem.*, 49,1304(1977)
21. Lawson, A. M. Ramsolam, D. B. Raw, P. J. et al., *Biomed. Mass Spectrom.*, 1,374(1974).
22. VandenHeuvel, W. J. A. Smith, J. L. AlberSchonberg, G. et al., "Derivatization and Gas Chromatography in the Mass Spectrometry of Steroids," in *modern methods of steroid analysis*, (1973)
23. Sloan, S., Harvey, D. J. and Vouros, P., *Org. Mass Spectrom.*, 5,789(1971)
24. Havlicek, S. C., Brennan, M. R. and Scheuer, P. J., *Org. Mass Spectrom.*, 5, 1273(1971)
25. Gray, R. T., Diekman, J., Larson, G. L., Munger, W. K., and Djerassi, C. , *Org. Mass Spectrom.*, 3,973(1970)
26. Brooks, C. J. et al., *J. Org. Chem.*, 37,3235(1972)
27. Bjorkhem, J., Gustafsson, J. A. and Sjovall, J., *Org. Mass Spectrom.* , 7,277 (1973)
28. Chambaz, E. M., Defaye, G. and Madani, C., *Anal. Chem.* 45,1090(1973)
29. Brooks, C. J. W. and Harvey, D. J., *J. Chromatog.*, 54,193(1971)
30. Middleditch, B. S. et al., *Org., Mass Spectrom.*, 6, 179(1972)
31. McCloskey, J. A., "Mass Spectrometry of fatty acid derivatives" in *Topics in Lipid Chemistry*, Vol. 1, (1972)
32. Petersson, G., *Mass Spectrom.*, 6,565(1972)
33. Petersson, G., *Org. Mass Spectrom.*, 6,577(1972)
34. Johnson, B. N. and Taylor, J. W., *Org. Mass Spectrom.* 7, 259(1973)
35. Blum, S., Gertler, S. , Sarel, S. and Sinnreich, D. , *J. Org. Chem.* 37, 3114 (1972)
36. Dommes, V. et al., *J. Chromatog. Sci.* 14,360(1976)
37. Radford, T. and DeJongh, D. C., "Carbohydrates" in *Biochemical Applications of Mass Spectrometry*, (1972)
38. Hanessian, S., "Mass Spectrometry of Natural Products Containing Sugars", in *methods of biochemical analysis*, (1971)
39. Das, K. G. and Thayumanavan, B., *Org. Mass Spectrom.*, 6, 1063(1972)
40. Wiecko, J. and Sherman, W. R., *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 7631(1973)
41. Von Minden, D. L. and McCloskey, J. A., *F. Am. Chem Soc.* 95, 7480(1973)
42. Egger, S.H., Biedron, S.I. and Hawtrey, A.O.*Tetrahedron Lett.* , 3271(1966)
43. Koenig, W. A. Smith, L. C. Crain, P. F. and McCloskey, J. A., *Biochemistry* 10, 3968(1971); 11, 1122(1972)
44. Lawson, A. M. and McCloskey, J. A., *J. Am. Chem. Soc.* 93, 1114(1971)
45. Dolhum, J. J. and Wieber, J. C., *Mass Spectrom.*, 3, 669(1970)
46. Shaw, S. J. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 92, 2510(1970)
47. Puzo, G. and McCloskey, J. A., *J. Org. Chem.*, 43 №4, 767(1978)
48. Tsuboyama, S. and McCloskey, J. A., *J. Org. Chem.* 37, №2, 166(1972)
49. Quilliam, M. A., *J. of Chromatogr.* 196, 367(1980)
50. Quilliam, M. A. and Ogilvia, K. K., *Org. Mass Spectrom.* 15, №4, 207(1980)
51. Quilliam, M. A., *Org. Mass Spectrom.* 16 №3, 129(1981)
52. Lawson, A. M. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 93, 1014(1971)
53. Pettit, G. R., Einck, J. J. and Brown, P., *Biomed. Mass Spectrom.* 5, 153 (1978)
54. Hunt, D. F. et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33, 378(1968)
55. Dolhun, J. J. and Wiebers, J. L., *J. Am. Chem. Soc.*, 91, 7755(1969)
56. Waller, G. R., "Biochemical Application of Mass Spectrometry First Supplementary" (1980)

57. Gaskell, S. J., *Biochemical Mass Spectrometry* Vol.6, №2, 78(1979)
58. Longstaff, C. et al., *Org Mass Spectrom.* 17, №10, 508(1982)
59. Hogge, L. R. and Olson, D. J. H., *J. of Chromatog. Science*, Vol. 20, №3, 109 (1982)
60. Kossa, W. C., *J. Chromatog. Sci.* 17, 177(1979)

www.cnki.net