

新技术新仪器

一种适用于质谱化学修饰 的微反应技术—反应色谱法

虞 启 涛 黄 知 恒

(中国科学院上海药物研究所)

〔摘要〕 本文介绍了反应气相色谱、反应薄层色谱和反应液相色谱等反应色谱技术。该技术样品用量少,而且避免了样品的损失和污染,有可能作为质谱法中化学修饰的微量化学反应技术。

随着有机化学、生物化学和质谱技术的发展,质谱法愈来愈广泛地应用于结构复杂的化合物的分析,被分析的样品量往往只有微克或毫微克量。成功的分析不仅取决于有机化学家和质谱学家对谱图解析的经验,而且常取决于巧妙的化学修饰^{〔1〕}。实现化学修饰的微量化学反应已成为质谱样品前处理的重要辅助手段。近年来,在色谱条件下进行化学反应已积累了许多经验,逐步发展成为独特的反应色谱技术。反应色谱法不仅样品用量少,而且集反应与分离于一体,避免了样品受污染,使操作中的损失达到最低限度^{〔2〕}。经活化的吸附剂既作为反应载体又作为催化剂,使许多反应在温和的条件下进行,有可能发展成为质谱中化学修饰的理想微反应技术。本文对几种反应色谱法作一简略介绍。

反应气相色谱(RGC) 反应气相色谱严格地说应指色谱过程中发生在柱上的反应,但目前一般把发生在柱前应用器中的反应和在进样瓶中粉碎的玻璃毛细管技术也作为反应气相色谱、常见的反应气相色谱如表1所示^{〔3〕}。

柱前反应器中进行的RGC中应用最广泛的是催化氢化,在剧烈的反应条件下,有机分子中功能团均被除去而得到原来分子的骨架信息,即碳骨架色谱。因为许多导致复杂开裂的基团均被除去,得到的谱图就较容易解析,特别有助于确定原化合物的结构。通常的装置是在分析的GC柱前加一根长约一英寸的不锈钢柱,柱内填有25~50毫克1%铂或钯催化剂,先在200℃通氢气1小时活化催化剂,然后进样,卤代物、硫化物、不饱和物、醚、酯和胺等均可被氢解,得到相应的烃被检出^{〔4〕}。

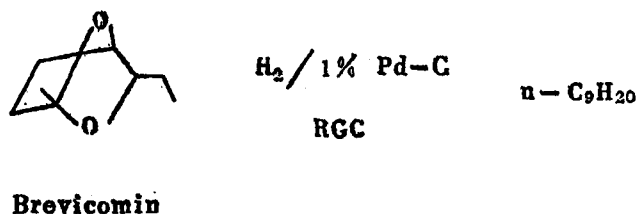
例如Brevicomins系雌性松树甲虫分泌的性吸引剂,50微克活性物质经碳骨架色谱法,由质谱鉴定主要成分为正壬烷。再根据IR, NMR和UV数据推出可能结构,并经合成物和

1985年6月14日收

表1. 若干常见的反应气相色谱

试 剂	反 应
H ₂ 和 催化剂	双键氢化 碳骨架色谱
H ₂ 和 锌粉	具官能团化合物的氢解
硼氢锂	羰基还原
碱(NaOH, KOH)或碱石灰	酯水解
	酰胺→胺
碱性化合物(NH ₃ 或有机胺)	芳香磺酸→酚
磷酸	含氮化合物盐→游离碱
	酰氨→腈

生物活性试验证实^[5]。



这种柱前氢化方法经改良可只还原双键而保留酮、酯、腈、环氧、醚等其它不饱和功能团, 更适合于具不饱和键多功能团化合物的鉴定^[6]。

羰基化合物常是含脂肪食物香味的主要成分, 但由于浓度低而分析困难, 常用的方法是先制成 2, 4-二硝基苯衍生物(DNPH), 再用适当试剂再生原来的羰基化合物进行测定。用RGC的方法, 将DNPH和 α -酮戊二酸以 1:3 比例置于柱前的聚四氟乙烯管内, 加热到 250°C, 5 秒钟后释放的羰基化合物扫入GC进行定量分析, 定量范围为 3 微克^[7]。

用季铵盐对脂肪酸进行GC柱上酯化反应在气相色谱中早已广泛采用。Pantarotto 等应用三甲苯胺氢氧化物对各种核苷及核苷碱类抗肿瘤药物进行柱上甲基化后, 可用化学电离选择离子检测的方式对小鼠血浆中药物浓度作定量测定^[8]。

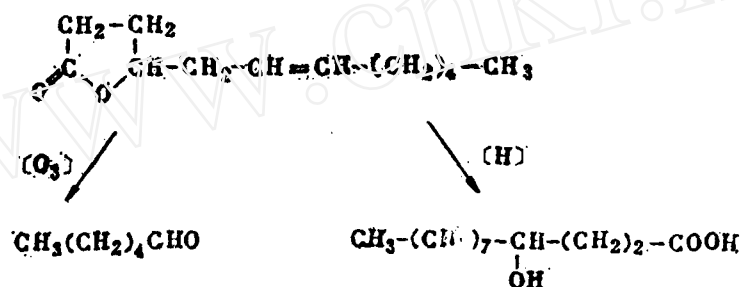
Teece 等用氘代三甲苯胺氢氧化物对核苷类化合物进行柱上氘甲基化以区别衍生化时引入的甲基和分子中原有的甲基, 比其它标记方法更为简便^[9]。

三甲硅醚衍生物被广泛用于GC和MS分析中, 以改善化合物的色谱或质谱性质。但常规方法不适用于不溶于非极性溶剂的化合物。可将试样的水或醇溶液注入GC柱, 待样品与水或醇分离后, 注入硅烷化试剂。当硅烷化试剂通过柱上样品区时, 即生成三甲硅基衍生物, 然后在柱上分离^[10]。

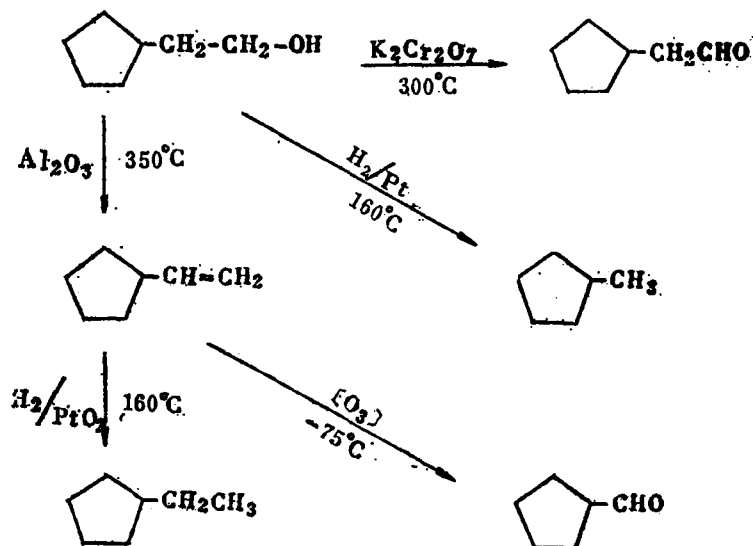
在香料、食品成分、昆虫激素等结构测定中常希望将挥发性成分先经GC分离, 对某一组分进行化学处理后再用质谱进行结构分析。微量毛细管反应技术是Stanley 等发展的微量操作技术, 主要装置包括: 1) 可把GC出口物收集于毛细管中的收集系统; 2) 低压, 低流

速反应气或覆盖气源和一微火焰封头器；3) 在 GC 进样部位粉碎毛细管的装置。微克或更少样品从制备 GC 出口处流出，冷凝在玻璃毛细管中，然后在毛细管中充满反应气，封口后在适当温度下反应。反应气可用氢或臭氧。氢解用 Pt/C 作催化剂，160°C，1 分钟即可完成。臭氧化在 -75°C 反应 30 分钟^[11]。

Park 等用该技术决定了喂以富亚油酸反刍动物脂肪中香味化合物的主要成分 4-羟基-十二碳-顺-6-烯酸内酯的碳链长度、羟基和双碳位置^[12]，反应如下：



微量毛细管反应技术也可用于醇脱水，醛、酮还原到醇，醇氧化为醛或酮等^[13]，于是从制备 GC 得到的某一纯组分可方便地得到几种衍生物供质谱测定。例如由 2-环戊烷基乙醇可制备五种不同衍生物。需经二步的反应可在第一步反应后打开毛细管，充入第二种反应气，再封口进行第二步反应。

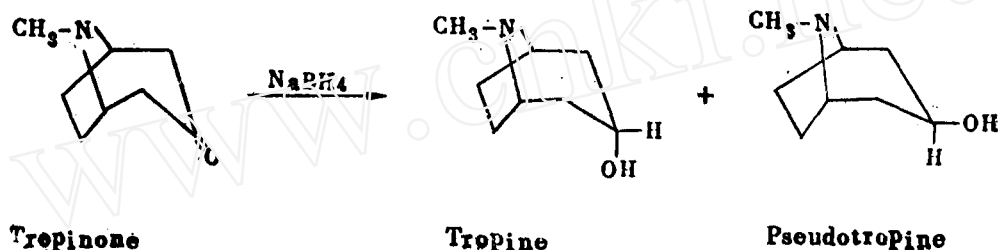


反应薄层色谱(RTLC) Miller和Kirchner等于1953年首次用薄层反应来检定化合物，发展至今，在层析板上已能进行氧化，还原，脱水，水解，酯化，溴化，酶反应以及生成特定衍生物等反应^[14]。

反应薄层可分为三类：1) 反应试剂加在样品点上^[2]，2) 反应试剂置于展开剂中^[15]，3) 反应试剂与层析载体混和后制板^[16]。其中反应试剂加在样品点上是最常用的。一般将样品溶液点在层析板上，待干后将反应试剂溶液重叠地点在样品点上，室温或置于恒温烘箱

内, 待反应毕, 取出冷却, 用展开剂展开, 待溶剂挥发后, 割下反应产物区, 用溶剂提出进行分析。例如甾醇的乙酰化即可在层析薄板上进行^[2], 反应后, 产物就在板上分离, 免去了样品转移的损失。

质谱法一般不能区分立体异构体, 当用反应薄层色谱时, 反应产物如果是立体异构体就可能在板上分开, 给鉴定提供了额外信息。如Tropinone在板上用 NaBH_4 还原, 展开后可得约2:1的Tropine和Pseudotropine, 反应和分离只需2小时便可完成^[17]。



对来自植物或生物样本的复杂混合物样品, 可用双向反应色谱法, 在第一向先分离, 经过分离的纯组分点上加反应试剂, 经反应后向第二向展开, 得到纯样品的反应产物, 这种方法特别适用于磷酸^[18]和多糖的水解^[19]。

反应液相色谱 (RLC) 无机担体能促进许多类型的化学反应, 在合成上已被广泛应用。许多在没有担体时不发生或生成混合物的反应, 应用结合在担体上的试剂时, 反应在温和条件下进行, 而且干净, 速度快, 产率高^[20], 反应试剂和产物在反应过程中被吸附在担体上, 因而不易被污染。

Schwarz 在应用毛细管柱进行微量反应方面作了大量工作。一般步骤是将担体同反应试剂在研钵中研磨均匀, 装入内径为1.2~1.4毫米, 长约5厘米的测熔点毛细管中。装1.8~2厘米带试剂的担体后, 两头用细金属丝压紧至1厘米。毛细管两端分别空出1厘米和2厘米(图1)。将样品溶于溶剂中, 缓缓地上样在柱顶, 再将管壁上的样品用少量溶剂冲下, 待反应完全, 用溶剂将产物从柱中洗出, 用微型注射器在毛细管底端吸出反应产物, 即可直接进行GC/MS分析, 若干毛细管柱反应见表2。

值得提出的是用 CrO_3 —硅藻土柱氧化不饱和和酸酯以确定双键位置, 因为确定不饱和脂肪酸中双键位置是质谱较为困难的问题。虽然制成衍生物可判断双键位置, 但有的生化步骤较多, 经分离、纯化后产率较低, 有的则特征离子不明显。常规的 CrO_3 氧化断裂双键反应条件剧烈, 产物复杂。用微量RLC技术, 仅用0.5~5微克样品即可得双键位置信息。不饱和脂肪酸甲酯经 CrO_3 —硅藻土毛细管柱氧化, 分子在双键外裂开成为一个单羧酸和一个双羧酸单甲酯。此外, 双键的 α 位也能被氧化分裂而生成比前者少一个碳原子的单羧酸和双

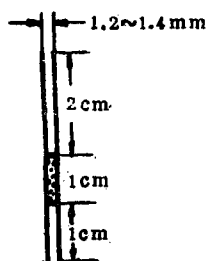


图1 微型柱

表2 若干毛细管柱反应

反应类型	反 应 式	担 体	试 剂
氧 化	$\begin{array}{c} \text{R}-\text{CH}-\text{OH} \\ \\ \text{R}'-\text{CH}-\text{OH} \end{array} \rightarrow \text{RCHO} + \text{R}'\text{CHO}$	CaSO_4	HIO_4
	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{R}-\text{CH}-\text{CH}-\text{R}' \\ \\ \text{OH} \end{array} \rightarrow \text{RCHO} + \text{R}'\text{CHO}$	CaSO_4	HIO_4
	$\text{R}-\text{CH}-\text{COOH} \rightarrow \text{RCHO}$	CaSO_4	HIO_4
	$\text{R}-\text{CH}_2\text{OH} \rightarrow \text{RCHO}$	Celite 545	CrO_3
	$\text{R}-\text{CH}=\text{CH}-\text{R}'-\text{COOH} \rightarrow \text{RCOOH} + \text{R}'\text{COOH}$	Celite(AGC)	CrO_3
还 原	$>\text{C}=\text{O} \rightarrow -\text{CH}_2\text{OH}$	Celite	NaBH_4
氢 化	$>\text{C}=\text{C}< \rightarrow \text{CH}-\text{CH}<$	Celite	Pd/H_2
乙酰化	$\text{R}-\text{OH} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOR}$	Celite 545	$\text{CH}_3-\overset{\text{O}}{\underset{\text{O}}{\parallel}}{\text{S}}-\text{O}-$
甲基化	$-\text{COOH} \rightarrow -\text{COOCH}_3$	Celite 545	$\text{CCH}_3, \text{P}_2\text{O}_5$ CH_2N_2
转酯化	$\begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{R}-\text{C}-\text{O}-\text{CH}_2 \\ \\ -\text{O}-\text{CH} \\ \\ -\text{O}-\text{CH}_2 \end{array} \rightarrow \text{R}-\overset{\text{O}}{\parallel}{\text{C}}-\text{DCH}_3$	Hyblo-Super-Cel	CH_3OK
羰基化合物再生	$\text{>C}=\text{N}-\text{NH}-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2 \rightarrow \text{>C}=\text{O}$	MgSO_4	$\text{HIO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$
衍生物生成	$\begin{array}{ccc} \text{CH}-\text{OH} & \text{CH}-\text{O} & \text{CH}_3 \\ & & \diagup \\ \text{CH}-\text{OH} & \text{CH}-\text{O} & \text{CH}_3 \end{array} \rightarrow \text{X}$	Celite	$\text{P}_2\text{O}_5-\text{H}_3\text{PO}_4 +$ $+ \text{CH}_3-\text{CO}$

续表

反应类型	反 应 式	担 体	试 剂
衍生物 生 成	$>C=O \rightarrow >C=N-NH-\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2$	Celite	$\text{H}_2\text{N}-\text{NH}-$ $\text{C}_6\text{H}_3(\text{NO}_2)_2$

羧酸单甲酯，这四个产物经甲酯化后，由GC/MS分析便能定出双键位置^[21]。

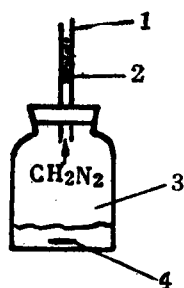
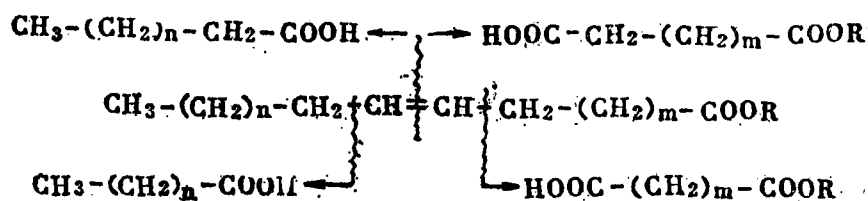


图2 微型柱上甲酯化

1—微型柱 2—样品 3—重氮甲烷发生器 4—搅拌棒

用重氮甲烷在微型柱上酯化微克量的有机酸也是一个设计巧妙的实验。上了有机酸样品

表3 注射器内反应

试 剂	反 应	反应时间(分)
NaBH ₄ 饱和醇溶液	$>C=O \rightarrow -CH_2OH$	2
KMnO ₄ 饱和丙酮溶液	$-CHO \rightarrow -COOH$ $-CH_2OH \rightarrow -COOH$	10
NaOH饱和醇溶液	$>CHOH \rightarrow >C=O$	15
甲醇/51% BF ₃	$-COOR \rightarrow ROH$ $-COOH \rightarrow -COOC^H_3$	5

的微型柱, 通过橡皮塞倒插在装有N-甲基-N-亚硝基对甲苯磺酰氨溶液的容器上(图2)。向容器中加入50% KOH 溶液后, 立即塞紧, 容器内产生的重氮甲烷在通过柱时把有机酸转变为甲酯。待 CH_2N_2 放毕, 取下微型柱, 冲出甲酯, 反应几乎是定量的^[22]。

注射器内反应 (In-Syringe Reaction)^[23] 一些容易进行的反应可以直接在注射器内进行(表3)。0.5微升试剂由柱塞效应(Plunger-effect)分布在注射器的壁上, 吸入1微升约1%的样品溶液, 反应后, 全部反应物用GC或GC/MS鉴定。

结 论

有机化学、生物化学、环境科学、医学化学等对质谱的要求促进了质谱技术的发展, 而质谱的进展帮助解决了这些学科中以前难以解决的分析问题, 反过来又推动它们前进。时至今日, 质谱方法与其它物理或化学方法的结合已是有机质谱的大势所趋。近年来, 质谱学的优秀工作无一不是这些结合的产物^[24]。现在, 实现化学修饰的微反应技术已成为质谱技术中的一个组成部分, 而反应色谱法由于其本身的优点, 比常规的微化学反应方法更适合于质谱法。可以预期反应色谱—质谱将与GC—MS, LC—MS一样成为有机质谱中的一个新的分枝。

参 考 文 献

1. 黄知恒、虞启涛, 化学通报, 待发表。
2. S. A. Wassei, J. M. Weber, T. S. Ma, *Mikrochim. Acta*, 1982 (II), 215.
3. K. Blau, C. S. King, *Handbook of Derivatives for Chromatography*, p321 Heyden & Son Ltd., 1977
4. M. Beroza, R. Sarmiento, *Anal. Chem.*, 35, 1353 (1963).
5. R. M. Silverstein et al., *Science*, 159, 889 (1968).
6. M. Beroza, R. Sarmiento, *Anal. Chem.*, 38, 1042 (1966).
7. H. Halvarson, *J. Chromatogr.*, 57, 406 (1971).
8. C. Pantarotto et al., *J. Chromatogr.*, 99, 519 (1974).
9. R. G. Teece, D. Slowikowski, K. H. Seham, *Biomed. Mass Spectrom.*, 10, 30 (1983).
10. G. C. Esposito, *Anal. Chem.*, 40, 1902 (1968).
11. G. Stanley, B. H. Kennett, *J. Chromatogr.*, 75, 304 (1973).
12. R. J. Park et al., *Chem. & Ind.*, 1974, 380.
13. G. Stanley, *J. Chromatogr.*, 178, 487 (1979).
14. M. S. Dallas, *J. Chromatogr.*, 48, 193 (1970).
15. J. M. Copius-peereboom, H. W. Beekes, *J. Chromatogr.*, 17, 99 (1965).
16. A. R. Thawley, *J. Chromatogr.*, 38, 399 (1968).
17. J. Polesuk, T. S. Ma, *J. Chromatogr.*, 57, 315 (1971).
18. V. E. Vaskovsky, V. M. Dembitzky, *J. Chromatogr.*, 115, 645 (1975).
19. A. Lombard, M. L. Tourn, M. Buffa, *J. Chromatogr.*, 134, 242 (1977).
20. A. McKillop, D. W. Young, *Syn.*, 1979, 401, 481.
21. D. P. Schwartz, *Anal. Biochem.*, 74, 320 (1976).
22. D. P. Schwartz, R. S. Bright, *Anal. Biochem.*, 61, 271 (1974).
23. K. M. Fredricks, R. Taylor, *Anal. Chem.*, 38, 1961 (1966).
24. a) B. J. Bergot et al., *Science*, 210, 336 (1980), b) G. P. Arsenault et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 90, 5636 (1968), c) H. Kesai et al., *Biochem.*, 14, 4198 (1975), d) J. A. McCloskey, S. Nishimura, *Acc. Chem. Res.*, 10, 403 (1977).

Reaction Chromatography—A Microreaction Technique for Chemical Modification in Mass Spectrometry

Yu Chitao, Huang Zhiheng

(Shanghai Institute of Materia Medica, Academia Sinica)

Received 14, June 1985

Abstract

The reaction chromatographic technique including reaction gas chromatography (RGC), reaction thin layer chromatography (RTLc) and reaction liquid chromatography (RLC) has been reviewed in the present paper. This technique has following advantages: 1) scaled-down sample size to μg level or less, 2) a minimum loss of material, and 3) free of sample contamination. This method may be used as a potential technique for chemical modification in mass spectrometry.