

化学衍生物与GC/MS联用的进展(三)

傅道超

(中国科学院大连化物所)

对于有氨基的甲状腺激素及其类似物而言, ME-N, O-bis-HFB衍生物是最有用的。化合物1-4衍生物的质谱, 有丰度强的 M^{+} 、 $(M-213)^+$ 和 $(M-284)^+$ 离子。即质谱中有显著的强丰度离子集中在高质量区, 见 T_4 衍生物的质谱图(图3)。用 $(M-213)^+$ 离子作SIM

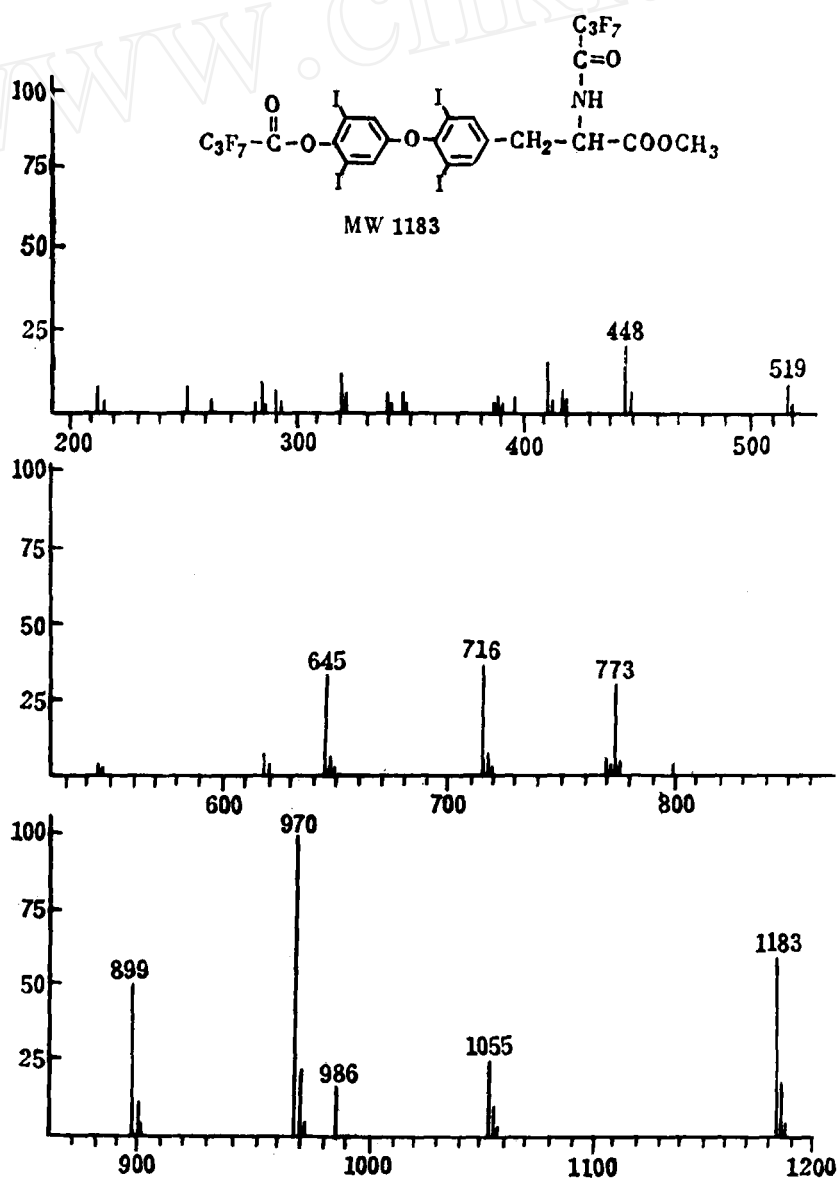


图 3

检测能达到0.5pg数量级。用所建立的渗透—GC—MS—SIM方法，可分析全部甲状腺激素。

甾类化合物⁽²²⁻³⁰⁾

1. 硅烷基衍生物

硅烷化试剂是最广泛地适用于衍生甾类化合物。

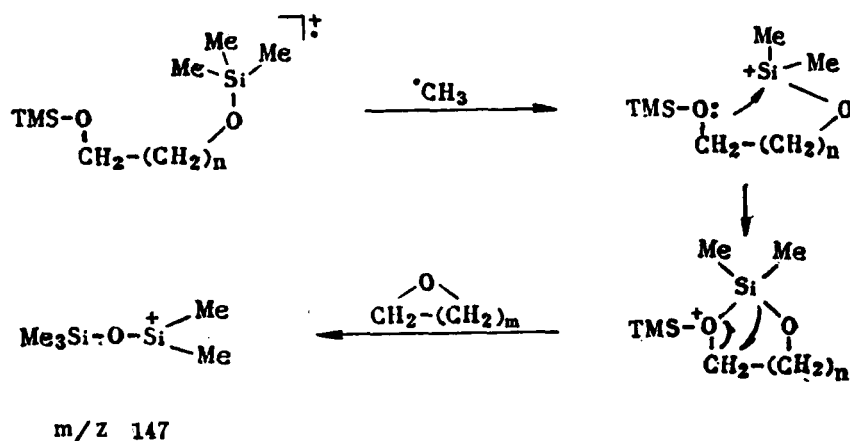
(1) 三甲基硅烷基族

甾类的三甲基硅烷化是最简便而最实用于GC—MS分析。分数甾体的TMS醚具有易识别的M⁺离子，或间接从(M—CH₃)⁺确定分子量。TMS族直接指示分子的碎裂，形成丰度强的((CH₃)₃Si⁺)离子和((CH₃)₂Si—OH)⁺离子。具有结构意义的离子归纳于下：

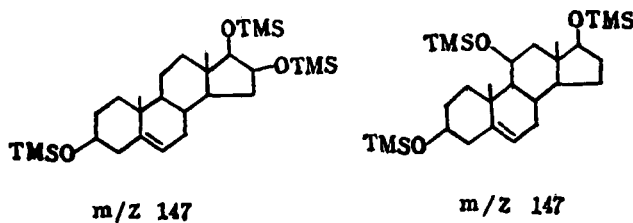
(a) 消去三甲基硅醇过程

逐步消除三甲基硅醇是TMS甾醚质谱的特征过程。相当于M⁺→(M—90)⁺→(M—2×90)⁺→……和(M—CH₃)⁺→(M—CH₃—90)⁺→(M—CH₃—2×90)⁺→……等。三甲基硅醇消除的难易，常受TMS所在的环境影响，据此用以作结构鉴定。

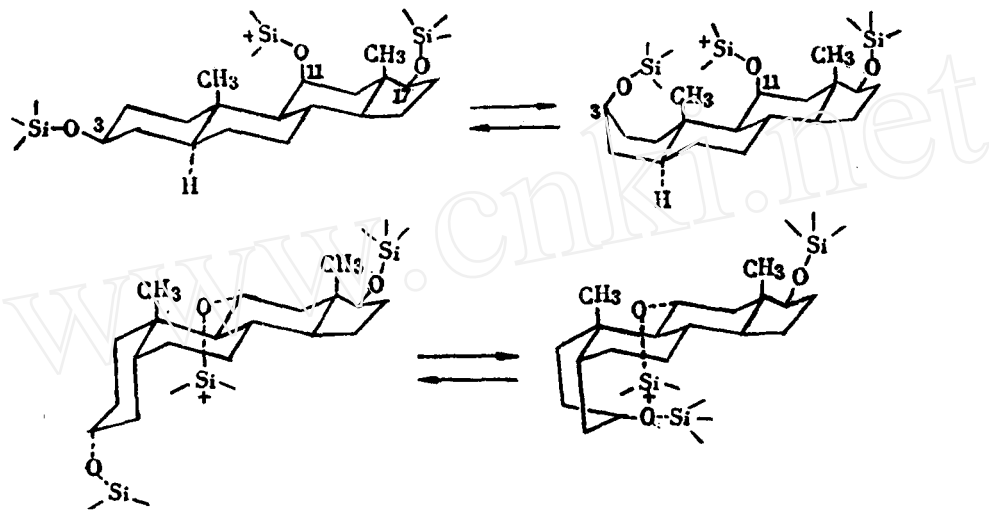
(b) 先丢失TMS中一个甲基后，TMSO移向Si⁺的过程。所形成的m/z 147离子的丰度，常受功能团相邻距离和立体化学的影响。



例如两个雄甾烯异构体的衍生物，因功能基3β, 16α, 17β-三羟基雄甾烯-5的TMS衍生物和3β, 11β, 17β-三羟基雄甾烯-5的TMS衍生物

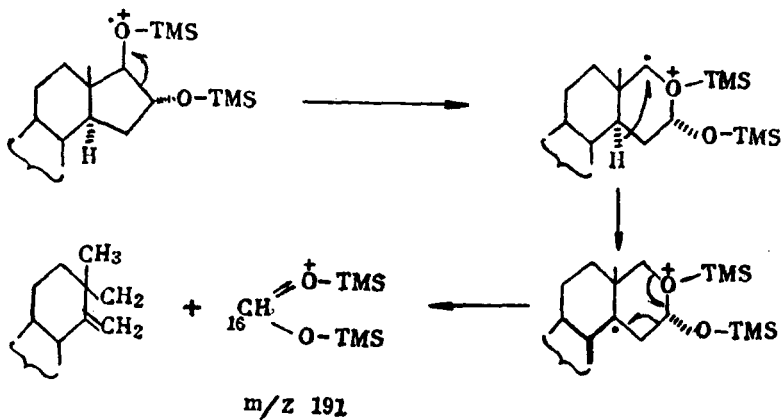


间距离不同^{*} m/z 147离子丰度相应为4:1。又如立体异构的 3β , 11β , 17β 三羟基- 5α -甾烷和 3β , 11α , 17β 三羟基- 5β -甾烷的 m/z 147离子, 由于二者立体构形转变的关系, 使其丰度相应为1:3。

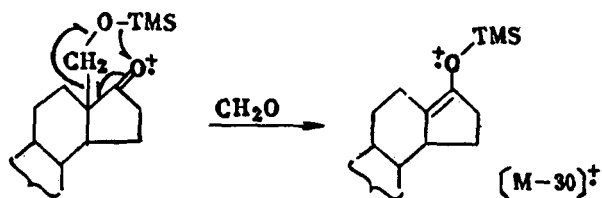


(c) 相邻TMSO族的相互作用

对含两个TMS族的离子结构, 曾用氙标记“D环”上TMS族和18-角甲基详细研究, 认为是环开裂和键转移至正电荷的氧上形成了离子 m/z 191。

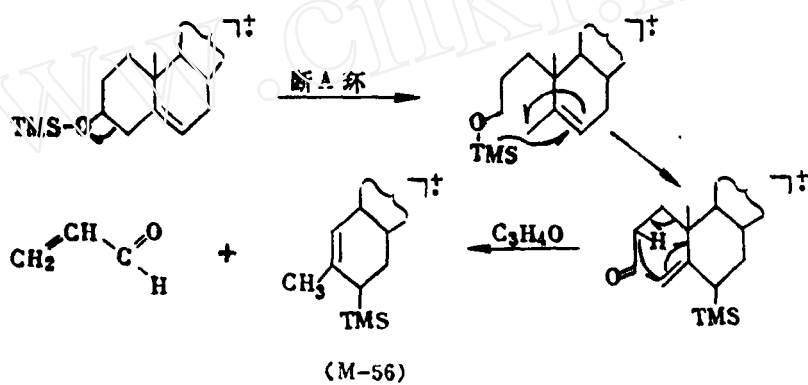


(d) TMS族以McLafferty重排形成 $(M-30)^+$ 离子。见18-TMS-OXY-17-OXO甾族化合物的重排过程。



(e) 分子内的TMS族迁移

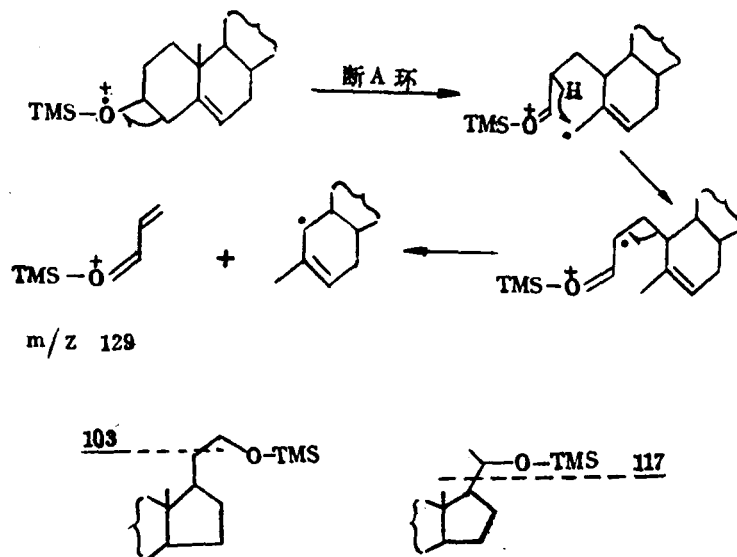
(M-56)⁺离子形成是TMS迁移的典型例子, 它常给质谱解析带来困难。



(f) 由直接断裂形成含TMS的离子

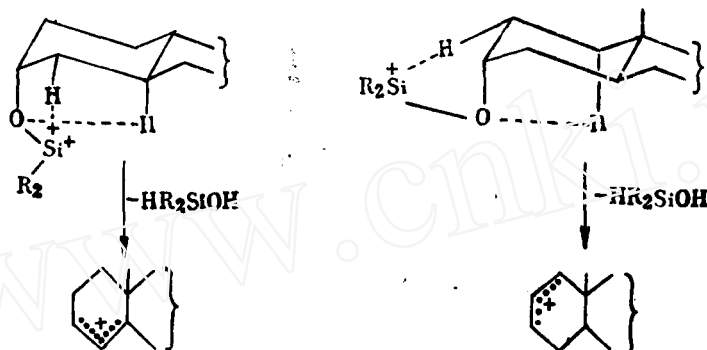
直接断裂后, 常经H重排, 生成m/z129离子, 在结构上也有诊断性。

由β-断裂产生典型的m/z103和m/z117。



除三甲基硅烷基外, 其它的三烷基硅醚的醚体 (一般结构表示为RR₂Si, R=t-butyl或isopropyl R₂=Me₂或-C₄H₉-) 衍生物, 在GC-MS中具有比三甲基硅烷基更多优点:

(1) 有较高的抗水解能力。(2) 提供较高的保留值。(3) 很少有强烈的 破裂过程。
 (4) 丰度强的重要离子在高质量区。(5) 对官能团的立体化学环境较为敏感。用这种三
 烷基硅基衍生物可以抑止很多典型碎裂, 如分子内的 TMS 迁移和直接断裂过程。其分子离
 子峰是低丰度, 但分子量可由强丰度的 $(M-R)^+$ 离子推算。 $(M-R)^+$ 对诊断过程非常有意义。
 因为丢失 R^+ 后, 随之消除 HR_2SiOH 。对于 3α -羟基- 5α -甾体化合物的叔丁基-二甲基硅烷基
 衍生物, 形成 $(M-叔丁基-HR_2SiOH)^+$ 离子。



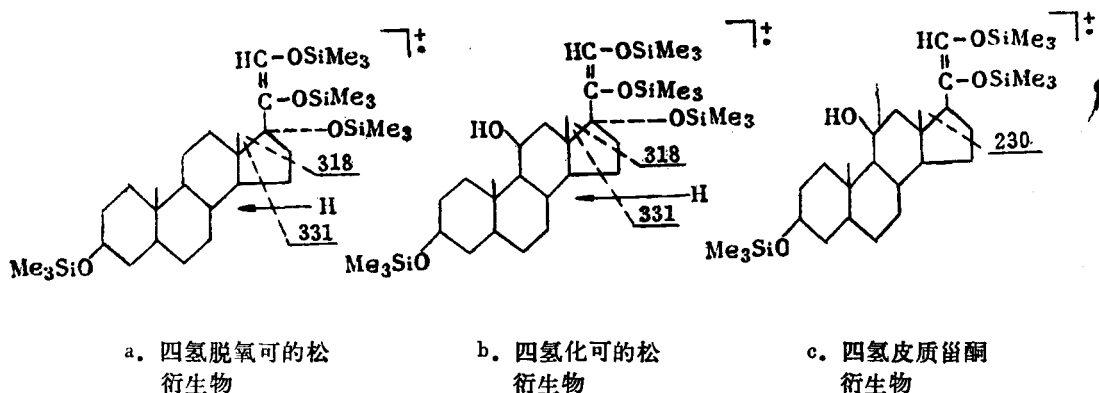
在上面两种可能构形中, 都包括双氢迁移到氧和硅原子上。形成稳定的烯丙基离子使此
 过程更为有利。

(2) 氯甲基-二甲基硅醚 (CMDMS)

甾类化合物的CMDMS衍生物与其TMS醚衍生物极类似, 含氯同位素有利于质谱解
 析。已用在研究雄甾酮、表雄甾酮类。

(3) TMS醚-enol-TMS醚衍生物

TMS醚-enol-TMS醚是一种新型的气相研究甾体激素的衍生物。在碱-催化条件下,
 BSTFA与甾族化合物上的羰基反应, 生成enol衍生物。这种衍生反应最适于对热不稳定的
 乙醇酮和含有二羟基丙酮侧链的甾体激素。它优先地使甾族化合物上的酮基形成enol-
 TMS, 而不影响羟基的硅烷化速度。



2. 甲基衍生物

甾醇的甲基醚有防止水解和良好的GC性质, Idler^[2]等研究了很多甲基衍生化的甾醇
 质谱, 其特性要点如下:

(1) 与其它衍生物相比, 衍生物质量增加不大。

(2) 一般都观察到强的分子离子。

(3) 清除 CH_3OH , 形成 $(\text{M}-\text{CH}_3\text{OH})^+$ 离子, 主要出现在 5β -差向异构体。

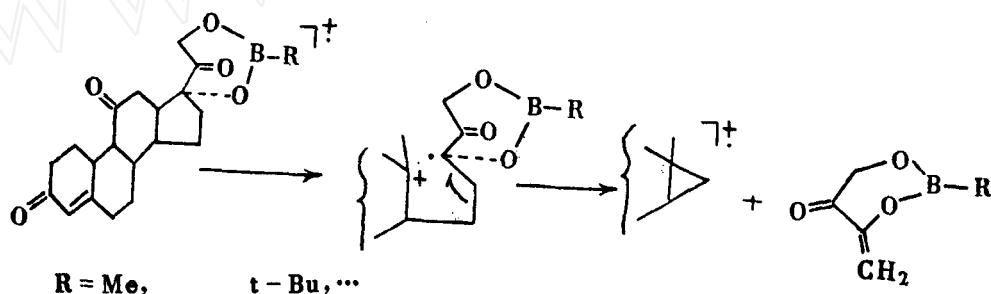
(4) Δ^5 -甾醇甲基醚具有强的 $(\text{M}-\text{CH}_3\text{OH})^+$ 峰。还有 $(\text{M}-\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_3\text{H}_4)^+$, 其碎裂过程与TMS醚中形成的 $(\text{M}-129)$ 离子相类似。

(5) 较多地发生骨架开裂。

虽然全甲基化对GC和MS都有很多优点, 但用在甾体GC-MS分析受限制。因为要使全部羟基上的氢被甲基取代, 则采用剧烈条件, 往往使双键异构化, 或者改变了母体分子的结构。

3. 硼酸酯衍生物

在甾族化合物分析中, 环状硼酸酯是最适用于皮质甾类的GC-MS分析。能形成C-17/C-21、C-20/C-21或C-17/C-20硼的六员或五员环二酯。多种烷基的和苯基的硼酸酯已经研究, 其质谱都具有强的分子离子峰。甲基硼酸酯因其易挥发, 质量增加少而受欢迎。叔丁基硼酸酯有相当于丢失叔丁基的 $(\text{M}-57)^+$ 强峰。硼酸酯的典型D环碎裂过程如下:



4. 甲基脲衍生物

对甾基族一般用甲基脲衍生物。从GC和MS观点, 甲基脲比苯基脲或O-TMS脲衍生物更合乎需要。苯基脲有主要的 m/z 91离子。而形成O-TMS脲需要两步衍生。甾族化合物的甲基脲衍生物质谱具特征峰 $(\text{M}-31)^+$, 相当于N-O键断消除一个甲基基。对C=N的碳原子言, 有显著的 β - (或麦氏重排) 或 γ -键断裂的过程。

二甲基二乙酰氧基硅烷 $(\text{ACO})_2\text{Si}(\text{CH}_3)_2$ 已用于某些皮质甾二醇类的衍生化。对胆汁酸的羧基一般用甲基化, 羟基用乙酰化或三氟乙酰衍生化。

脂肪酸^[31-36]

McCloskey^[31]曾综述过脂肪酸衍生物的质谱, 在此着重讨论较近的发展。

1. 饱和直链酸

对饱和直链脂肪酸多转化为甲酯衍生物, TMS酯衍生物, 二者的质谱有很多相似之处。值得注意的是后者没有 $(\text{M}-\text{TMSO})^+$ 离子 (相当于 $\text{M}-\text{OCH}_3$ 离子), 它具有 $\text{TMSO}-\text{CO}(\text{CH}_2)_n$ 离子系列, 和低16质量单位的另一离子系列 (来源于从相应的离子丢失 CH_4 , 即TMS的甲基加H)。

长链脂肪酸也可与苯基偶氮甲烷衍生化形成脂肪酸苯酯, 其质谱特征在 $\text{C}_{11}\sim\text{C}_{12}$ 范围, 分子离子强度随着烃链长度而降低, $>\text{C}_{14}$ 观测不出 M^+ 离子时, 分子量可由 $(\text{M}-91)^+$ 特征离子测定, 与全氟烷基酯衍生物类似, 特别适用于羧酸与同分子量烃类、醇类混在一起时的分析。

脂肪酸的酸性氯化物与环丙烯反应, 用吡啶作催化剂, 产物再经偶氮甲烷处理, 得到

DCM (dicyanomethylene) 甲醚衍生物。其质谱特征显示 $(CH_2)_n - (OCH_3)C = C(CN)_2^+$ 强丰度的离子系列扩展到分子离子区。见图4(a)(b)(c)(d)。

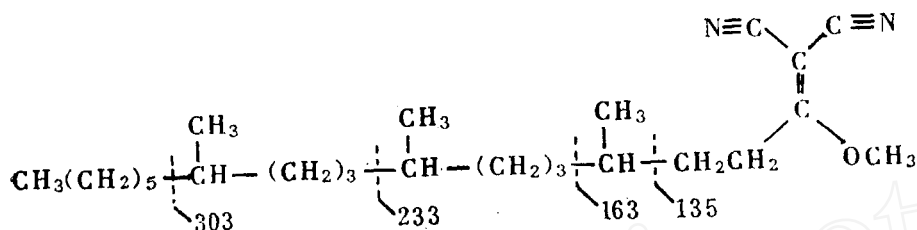


图4(a)

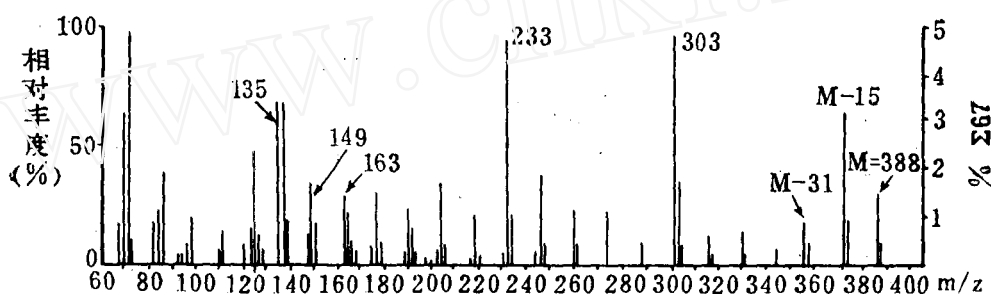


图4(b)

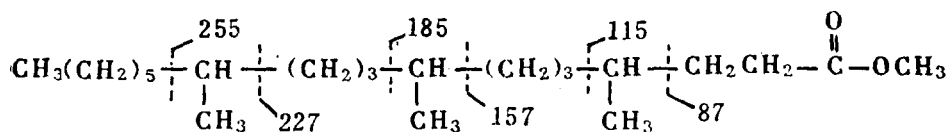


图4(c)

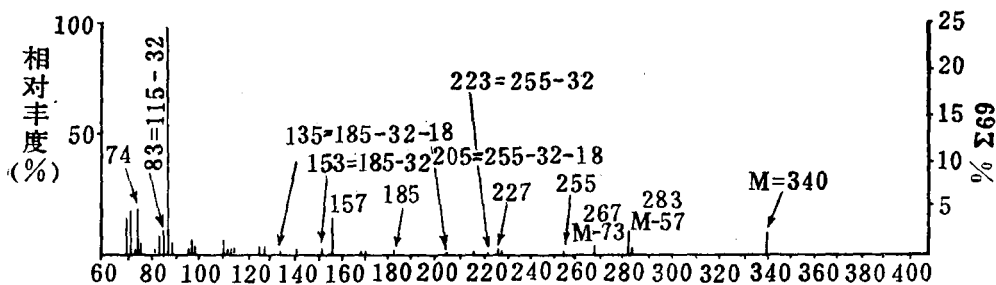
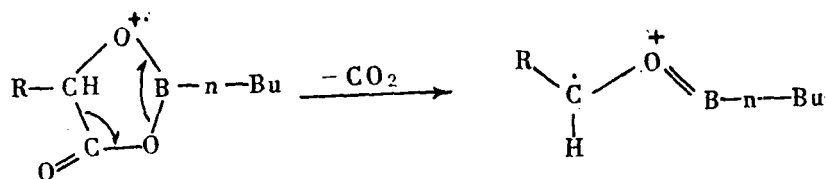


图4(d)

DCM衍生物表示的分支位置比甲酯衍生物强得多。从实用观点, DCM不如甲酯用得广泛, 但可利用其优点确定分支位置。

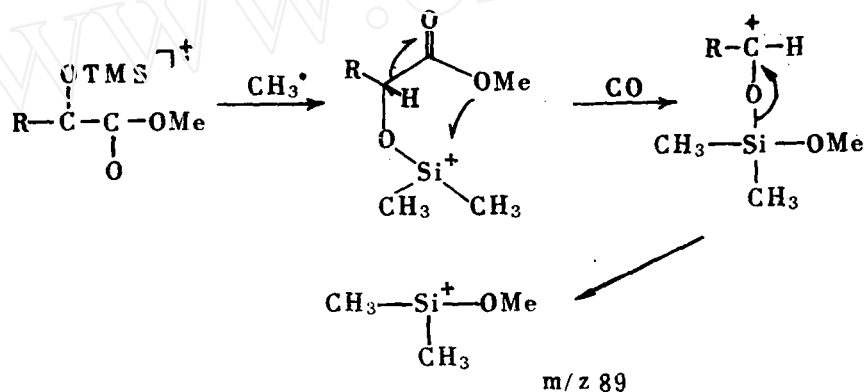
2. 羟基脂肪酸

α 或 β -羟基酸与正丁基-硼酸(实际是游离酸和其酸酐的混合物)反应, 给出环状硼酸酯的衍生物。一般的脂肪酸硼酸酯衍生物分子离子强度变化很大, 强度很弱时可用有关的碎片离子(衍生物失 CO_2 离子)推算化合物的分子量。但是在 β -羟基酸中此碎片离子不明



显。因此，与下述的TMS-酯-TMS-醚相比，应用有限。

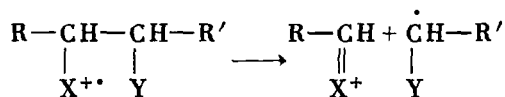
羟基脂肪酸也可以简单地衍生为羟基脂肪酸甲酯以进行GC-MS分析。若为多羟基酸，则形成甲酯后需三甲基硅醚化。在 α -羟基酸的O-TMS-醚-甲酯衍生物质谱中，有下列意义的碎裂过程。最初失去TMS中的甲基，然后迁移OCH₃至Si⁺中心上。在脂肪酸TMS醚的酯衍生物中，迁移“TMS族”到羰基氧上是很普遍的。所谓“Silyl 麦氏重排”是羧酸和羟



基二酸的TMS衍生物质谱的主要过程。据Petersson^[32,33]研究，也有 γ -H麦氏重排，但与TMS重排相比，丰度很低，其意义是次要的。

3. 不饱和脂肪酸

已经公认，EI电离双键形成的游离基阳离子，引起H沿烃链迁移，结果双键移动，因之失去双键的特异性，及在某种程度上不规则的碎裂行为，以至不能推断双键位置和立体异构。除少数例外，长链脂肪酸中双键的衍生化是使之成为饱和体系，用引入杂原子功能团，再导至稳定正电荷的 β -断裂。

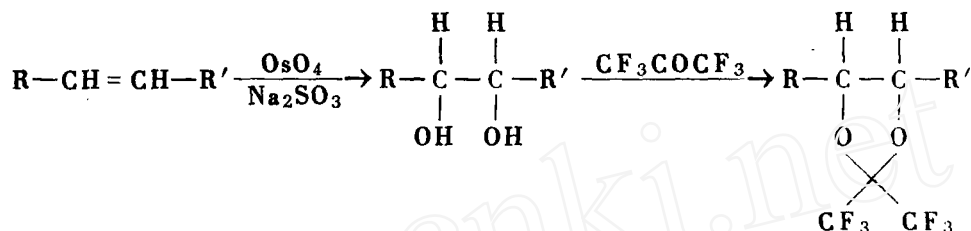


如上式反应，常碰到一个困难是形成异构体的混合物（当X和Y位置互换时），使质谱解析发生混淆。含多个烯链比单个烯链更困难。烯链衍生化包括形成相邻的二醇（X=Y=OH），相邻的氨基醇（X=N(CH₃)₂、Y=OH或X=OH、Y=N(CH₃)₂），相邻的二甲醚（X=Y=OCH₃），和相邻的两个三甲基硅醚（X=Y=TMSO），其中最有用的是先氧化为二醇，然后三甲基硅醚化。其优点是双键位置易识别，缺点是无分子离子峰，也不能区别顺式与反式异构。Wolff等^[2]采用OsO₄氧化后，进一步形成O-异丙叉衍生物，保留其双键的特征。此衍生物也无分子离子峰，但可由（M-CH₃）⁺离子间接推出分子量。双键位置可以从直接 β -断裂生成的离子识别。主要缺点是由于其它的竞争碎裂使这些离子丰度很低。降低电子能量

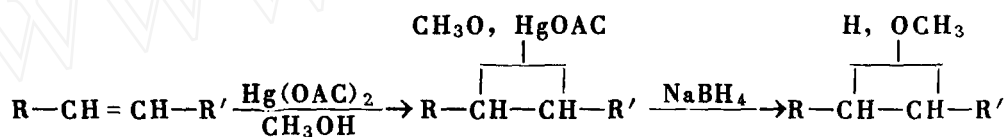
至20电子伏特, 立体异构特征反映在 (M-89)⁺ 离子 (由 M⁺ $\xrightarrow{-CH_3}$ (M-15)⁺ $\xrightarrow{-CH_2=C=O}$ (M-57)⁺ $\xrightarrow{-CH_3OH}$ (M-89)⁺) 强度, 顺式高于反式异构体, CI 质谱 也可达同样目的。

最近的GC-MS分析不饱和脂肪酸类的衍生物有下列几种, 其生成过程如下:

(1) 六氟异丙叉衍生物^[34]一般与异丙叉衍生物有类似的质谱行为。

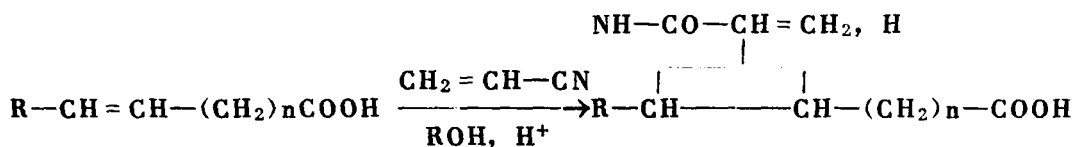


(2) 甲氧基衍生物



由β-断裂产生两对强的离子, 对确定不饱和位置相当有用。

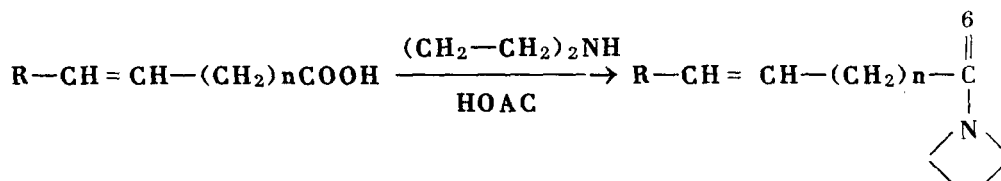
(3) N-取代的酰胺衍生物^[35]



具有强的分子离子峰, 但异构体产物多, 特别是在多烯链情况, 解析困难。

(4) 吡咯基类衍生物 (pyrrolidides)

在不饱和体系的化学衍生化中, 以此类衍生物是最有效的。上述几种方法均是双键本身化学改性, 而此衍生物是在羧基引入吡咯功能基, 可以认为分子离子在碎裂前, 双键向更极性的吡咯端移动, 这样可以解释跨于烯键的断裂。可从明显的中断14amu碎裂谱, 出现差12质量单位的两个强峰识别双键位置。此外, 衍生物还出现



典型离子 m/z 70((CH₂)₄N)⁺、m/z 98((CH₂)₄NCO)⁺和 m/z 113 (由γ-H 麦氏重排) 离子, 见图 5 (a, b)。单烯不饱和酸的吡咯基衍生物的质谱解释规则, 也能应用于双烯和三

烯脂肪酸。Dommes^[36]报导,先用OsO₄氧化后,再转化为甲醚、或TMS醚、或异丙叉、或烷基硼酸酯衍生物以鉴别多烯脂肪酸混合物。对比结果,证明只有TMS醚衍生物能得到全部需测定的烃链长度、双键数目和双键位置。

N-OCTADEC-6-ENOYLPYRROLIDINE

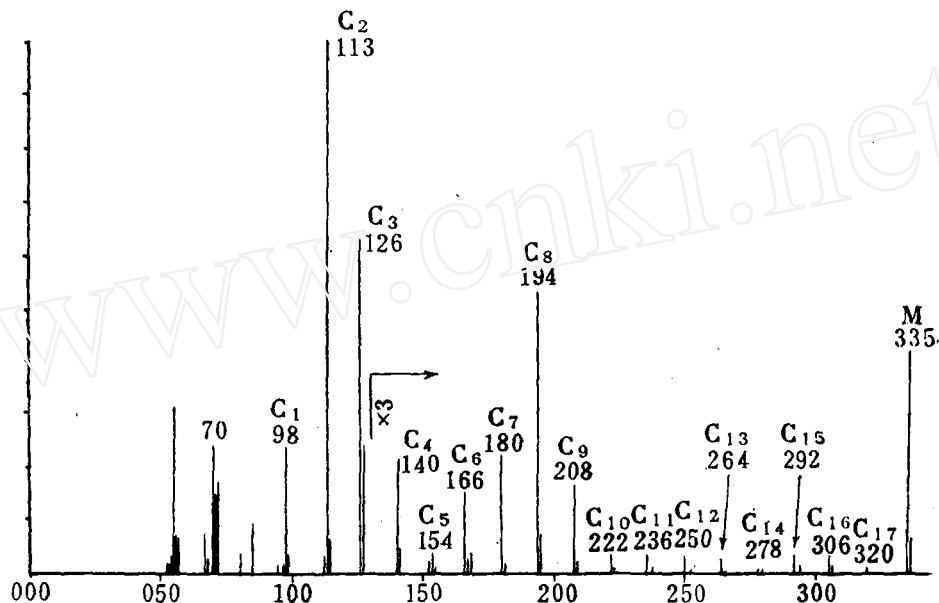
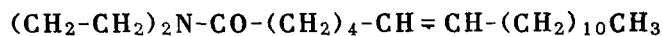


图5 (a)

N-OCTADEC-11-ENOYLPYRROLIDINE

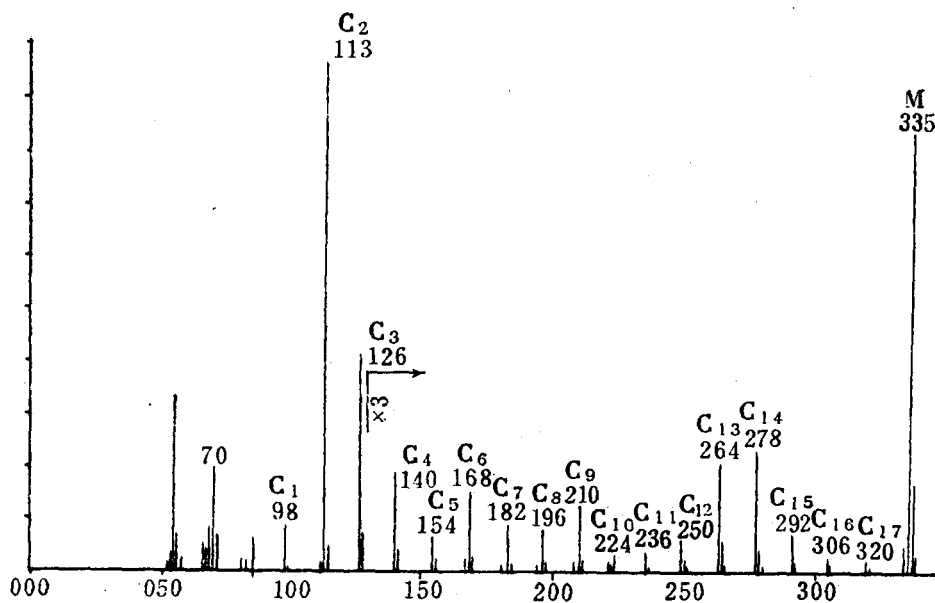
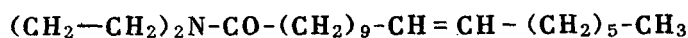


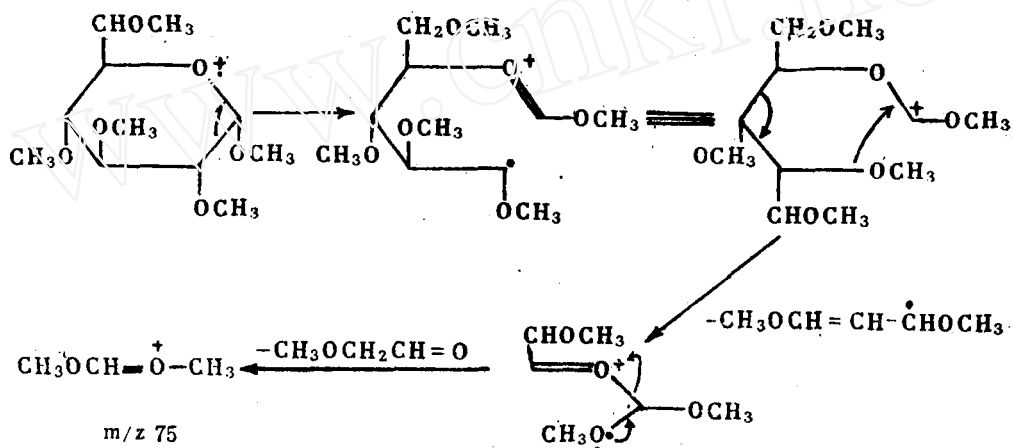
图5 (b)

碳水化合物^[37-40]

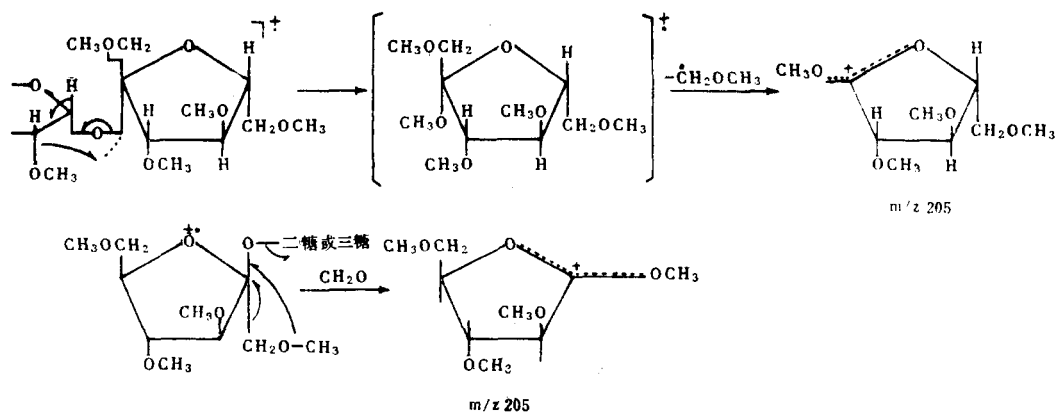
碳水化合物衍生物的质谱已有专著评述^[37,38], 在此主要讨论较有意义的特定功能基相关的质谱过程, 及对结构解析的诊断价值。

1. 全甲基醚衍生物

碳水化合物的甲基醚衍生物因其容易制备, 易挥发, 分子量低, 特别适于GC-MS分析。以此优点而言, 对多醚类也很适合。但遗憾的是, 一般全甲基化的醚类质谱都没有分子离子峰。在环状吡喃式或环状呋喃式醚的骨架开裂中, 可认为最初电荷定域在环氧上, 然后进行β-断裂, 消除CH₃OH或CH₃O, 特别显著的是甲氧基族从C-3迁到C-1上, 结果形成 m/z 75离子。



Das等^[39]曾对一些含果糖的寡糖全甲基醚质谱进行过研究, 指出也有迁移 OCH₃ 的过程。对多种寡糖作对比, 如果含有的呋喃果糖单元经C₂及末端呋喃糖单元经C₁或C₆与另一糖相连者, 具有特征的m/z205离子峰。由亚稳离子峰观测确定m/z205是分别经过迁移一个甲氧基和甲基的重排过程产生的, 例如蔗糖 (sucrose)、棉子糖 (raffinose)、水苏糖 (stachyose), 而palatinose不是这样, m/z205离子是由呋喃果糖单元的C₅-C₆键简单断裂产



生, 而不是上述讨论的重排过程。呋喃果糖单元经 C₂ 与另一糖相连的另外一个特征是有显著的m/z219离子峰。此离子在蔗糖 (75%)、棉子糖 (100%) 和水苏糖 (100%) 的全甲基醚衍生物中均有很大强度。因为己酮糖呋喃式阳离子比相应的己酮糖吡喃式阳离子稳定,

而有利于此离子形成。甲基醚衍生物中的这些特征离子，对推断寡糖中配糖体的连接方式是很有意义的。

2. O-乙酰基衍生物和TMS醚衍生物

碳水化合物的O-乙酰基衍生物和TMS醚衍生物具有良好的挥发性，可微量制备，有丰富的质谱信息。但O-乙酰基衍生物常无分子离子峰。乙酸酯的功能基以 CH_3COOH 、 CH_3COO 、 CH_3CO 、 $\text{CH}_2=\text{C}=\text{O}$ 形式（或其相互组合的形式）丢失。有离子分子反应产生 $(\text{M} + \text{CH}_3\text{CO})^+$ 离子。都有 CH_3CO^+ （基峰）、 $\text{CH}_3\text{COO}^+(\text{H})-\text{COCH}_3$ ($m/z103$) 和 $\text{CH}_3\text{COO}^+(\text{COCH}_3)_2$ ($m/z145$) 三种离子。乙酰基衍生物的骨架开裂与甲醚衍生物相同，碎裂谱也与之平行。糖的TMS醚虽然分子离子丰度低，但可从 $(\text{M}-15)^+$ 离子指示化合物的分子量。TMS族的重排过程很类似前面介绍的甾类TMS衍生物。用重排离子 $m/z147$ 可以鉴定立体化学特征。TMSO族从C-3迁至C-1重排生成的 $(\text{CH}_3)_3\text{Si}-\text{O}-\text{CH}=\text{O}^+-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 离子 ($m/z191$)，可用于推测C-1上的取代基。区分吡喃甙与呋喃甙不难，可从 β -断裂形成的离子 $m/z204$ 与离子 $m/z205$ 看出。

