

甲基化辅助实时直接分析电离的机理研究

于擎^{a,b} 于彬彬^c 越皓^c 焦丽丽^c 刘淑莹^{*,a,c}

(^a中国科学院长春应用化学研究所 长春质谱中心 长春 130022)

(^b中国科学院研究生院 北京 100049)

(^c长春中医药大学 吉林省人参科学研究院 长春 130117)

摘要 实时直接分析电离源(DART)已经广泛应用于固体、液体和气体样品的快速检测。在使用 DART 对低挥发性化合物进行分析时,样品衍生化是十分重要的。四甲基氢氧化铵(TMAH)是强的瞬时甲基化试剂,常用于 GC-MS 的分析中。以人参皂苷及人参寡糖为例,研究了它们在 TMAH 的辅助下在 DART 中发生甲基化及电离的过程,并从凝聚相和气相的角度对电离过程中的甲基化机理进行了研究。人参皂苷主要发生不完全和全甲基化,人参寡糖的甲基化则随着糖链的增长以及羟基的增多由全甲基化主导转变为过甲基化主导。结果表明,凝聚相和气相的共同作用是质谱检测到甲基化及过甲基化样品分子的根本原因。

关键词 实时直接分析电离源;四甲基氢氧化铵;甲基化机理研究;人参皂苷;人参寡糖

Study of Mechanism of Ionization Assisted by Methylation in Direct Analysis in Real Time Ion Source

Yu, Qing^{a,b} Yu, Binbin^c Yue, Hao^c Jiao, Lili^c Liu, Shuying^{*,a,c}

(^a Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Changchun Centre of Mass Spectrometry, Changchun 130022)

(^b Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049)

(^c Changchun University of Chinese Medicine, Jilin Ginseng Academy, Changchun 130117)

Abstract Direct analysis in real time ion source (DART) has been applied to the rapid analysis of solid, liquid and gaseous samples. The compounds with either high volatility or high proton affinity are favorable for DART analysis. However, a lot of natural products such as ginsenosides and ginseng oligosaccharides are difficult to be directly ionized by DART due to their low volatility and proton affinity. Derivatization is very necessary in the analysis of the compounds with low volatility and proton affinity. Tetramethylammonium hydroxide (TMAH) is a frequently used methylation reagent which can be applied to improve the volatility of low volatile compound in GC-MS. In the current work, TMAH was introduced to assist the ionization of ginsenoside and ginseng oligosaccharide in DART. Small amount of ginsenoside standard or ginseng oligosaccharide powder was collected on the end of melting point tubes respectively. Then 5 μ L of liquid from a solution containing 25% solution of TMAH dissolved in MeOH was applied to elute the surface of each melting point tube. Finally, all the end of melting point tubes containing sample powder and TMAH were put on a stainless holder for DART analysis. The solvents were flash evaporated in the DART source at 400 $^{\circ}$ C and the signals of methylated analytes were detected. The mechanism of methylation and ionization in DART was elucidated from the aspects of condensed and gas phase. On the one hand, the methylation enhanced volatility of analytes, on the other hand, a $N(CH_3)_3H^+$ ion was generated to assist the ionization of methylated analytes. Incomplete and complete methylation is the major reaction of ginsenoside, but hypermethylation occurred in ginseng oligosaccharide with the increase of number of hydroxyls. The results showed that the synergy of methylation reaction both in condensed phase and gas phase is the fundamental reason of the generation of methylated ions. The methylation in condensed phase is governed by nucleophilic reaction, and radical reaction is the major reaction in gas phase.

Keywords direct analysis in real time ion source; tetramethylammonium hydroxide; mechanism of methylation; ginsenoside; ginseng oligosaccharide

1 引言

实时直接分析电离源(DART)是一种全新的、非表

面接触型,基于等离子技术的大气压电离源^[1]。对 DART 来说,快速的分析速度和无需或只需简单样品前处理是其最引人注目之处^[2]。除此之外, DART 还具备可

* E-mail: syliu19@yahoo.com.cn

Received May 17, 2012; published June 21, 2012.

Supporting information for this article is available free of charge via the Internet at <http://sioc-journal.cn>

Project supported by the Major Special Project of Scientific and Technological: Major Creation of New Drugs (No. 2010ZX09401-305-07) and the National Natural Science Foundation of China (No. 21175127).

项目受“重大新药创新”科技重大专项(No. 2010ZX09401-305-07)和国家自然科学基金(No. 21175127)资助。

分析极性较低化合物^[3]、样品导入速度快^[4]、电离源不易被污染^[5]并可与需大量缓冲盐的色谱分离方法联用等特点^[6]。DART 目前已经在反应监测^[7]、薄层色谱分析^[8]、食品药品非法添加^[9,10]、环境监测^[11]等领域得到广泛的应用,并已经被多家跨国制药公司(Merk 等)所认可,成为了强有力的质量监控工具。

尽管如此, DART 技术在分析一些挥发性和质子亲和势都较低天然产物时还有一些不足之处。例如,在没有任何衍生化试剂参与的情况下, DART 不能直接使常见的人参皂苷或寡糖电离,这是由于它们的挥发性很小,并且人参皂苷本身的质子亲和势也较小^[12]导致的。所以,在分析此类化合物时,瞬时衍生化试剂的参与是必不可缺少的。四甲基氢氧化铵(TMAH)是一种在 GC-MS 中经常使用的甲基化试剂。刘春胜等^[13]认为, TMAH 作为瞬时衍生化试剂在辅助人参皂苷在 DART 下电离时主要起到两个作用:一方面通过甲基化作用使人参皂苷的挥发性得以提高,另一方面提供 1 个质子化的三甲胺通过非共价作用与甲基化的人参皂苷结合使其电离并进入质量分析器。衍生化试剂的使用极大地扩展了 DART 的应用领域,使其可以分析挥发性和质子亲和势都很小的化合物。但是由于 DART 的电离机制比较复杂,而且其中的甲基化形式多样并涉及到多种凝聚相和气相反应,所以关于 DART 中的甲基化机理还未见报道。

在本工作中,以 TMAH 为甲基化试剂,研究了人参皂苷和人参寡糖在 DART 中的甲基化及电离过程。本研究对甲基化的机理进行了探索,并从凝聚相和气相的角度分别阐述了全甲基化机理。同时,也为研究其他甲基化试剂在 DART 中的甲基化机理提供可借鉴的途径。

2 结果与讨论

2.1 人参皂苷及人参寡糖的 DART 全扫描质谱图

由于 DART 电离源不能直接使人参皂苷和人参寡糖电离,所以在质谱中不能检测到它们的信号。当滴加有 TMAH 溶液的人参皂苷样品置于 DART 工作环境时,在高温工作气流作用下, TMAH 溶液被快速蒸干,同时甲基化的人参皂苷离子信号被质谱所检测到。图 1a 所示为人参皂苷 Rf 的 DART 全扫描质谱图。其中,基峰 m/z 986.7 为 9 个羟基被甲基化并结合 1 个质子化三甲胺的人参皂苷 Rf,而 m/z 1000.7 为全甲基化的人参皂苷 Rf。与此同时,在谱图中也发现了一些丰度较低的奇特离子,如 m/z 1016.7,是全甲基化的人参皂苷 Rf 结合了 1 个氧原子,而丰度较小的 m/z 1058.7 和 1072.7 的离子则是在 m/z 1016.7 基础上发生了更大程度上的甲基化。图 1b 为人参皂苷 Rc 的 DART 全扫描质谱图。人参皂苷 Rc 在发生甲基化之前发生了 C₂₀ 位糖苷键的断裂,所以在谱图中所观察到的 m/z 938.7 离子为失去 20 位二糖链后全甲基化并结合 1 个质子化三甲胺的离子。同时,在

人参皂苷 Rc 的 DART 质谱图中,也可以观察到结合氧原子的甲基化人参皂苷离子(m/z 954.7)。

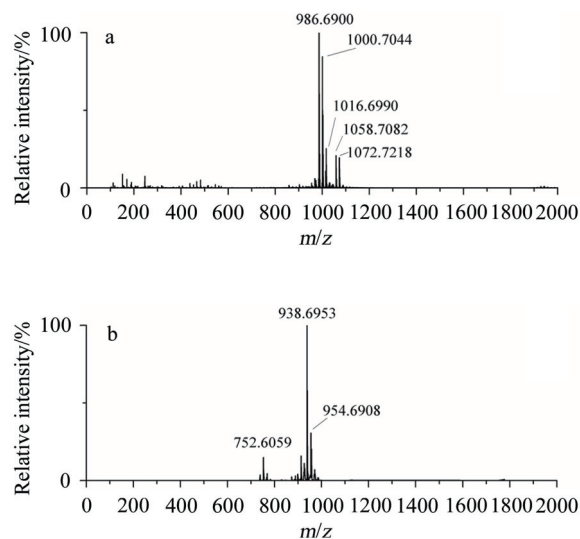


图 1 人参皂苷 Rf(a)和人参皂苷 Rc(b)的 DART 全扫描质谱图
Figure 1 DART full scan mass spectra of ginsenoside Rf (a) and ginsenoside Rc (b)

人参寡糖的 DART 质谱图情况比较复杂。图 2a 为人参寡糖的基本组成单元葡萄糖标准品的 DART 全扫描质谱图,其中 m/z 310.2 为全甲基化的葡萄糖结合质子化的三甲胺,然而除了全甲基化的葡萄糖以外,还存在着丰度较高的 m/z 514.3 和 718.4 两个特殊的离子。根据高分辨质谱数据可知,它们分别为全甲基化的由葡萄糖构成的二糖和三糖,说明 DART 的甲基化过程中涉及多种复杂分子离子反应。图 2b 为人参二糖(异麦芽糖,由两个葡萄糖以 1,6 糖苷键连接而成)的 DART 全扫描质谱图。和图 2a 相似,除了缺少全甲基化的葡萄糖外,其他的两个主要离子是完全一致的[全甲基化的由葡萄糖构成的二糖(m/z 514.3)和三糖(m/z 718.4)]。人参三糖(由 3 个葡萄糖以 1,6 和 1,4 糖苷键连接而成)的 DART 全扫描质谱图如图 2c 所示,除了 m/z 718.4 离子外,在它的谱图中同样发现了更高一级的全甲基化寡糖离子的存在(由葡萄糖构成的四糖, m/z 922.5)。更重要的是,除了全甲基化的寡糖离子,一些乙基化甚至更高级烷基化的离子也被检测到(m/z 732.4 和 936.5 等)。图 2d 是人参四糖的 DART 全扫描质谱图,其中的基峰已经由全甲基化的人参寡糖离子(m/z 922.5)转变成了 1 个羟基被乙基化的人参寡糖离子(m/z 936.5),除此之外,还存在其他过甲基化的寡糖离子(m/z 950.5 和 964.5)。人参三糖到十五糖的混合物的 DART 全扫描质谱图如图 2e 所示,从谱图中发现,使用 DART 作为电离源最多可以检测到人参六糖(m/z 1344.7)且丰度极低。这可能是由于过多的糖基极大地降低了人参寡糖的挥发性,即使完全甲基化,也不能轻易离子化进入质量分析器所导致。所有质谱峰的

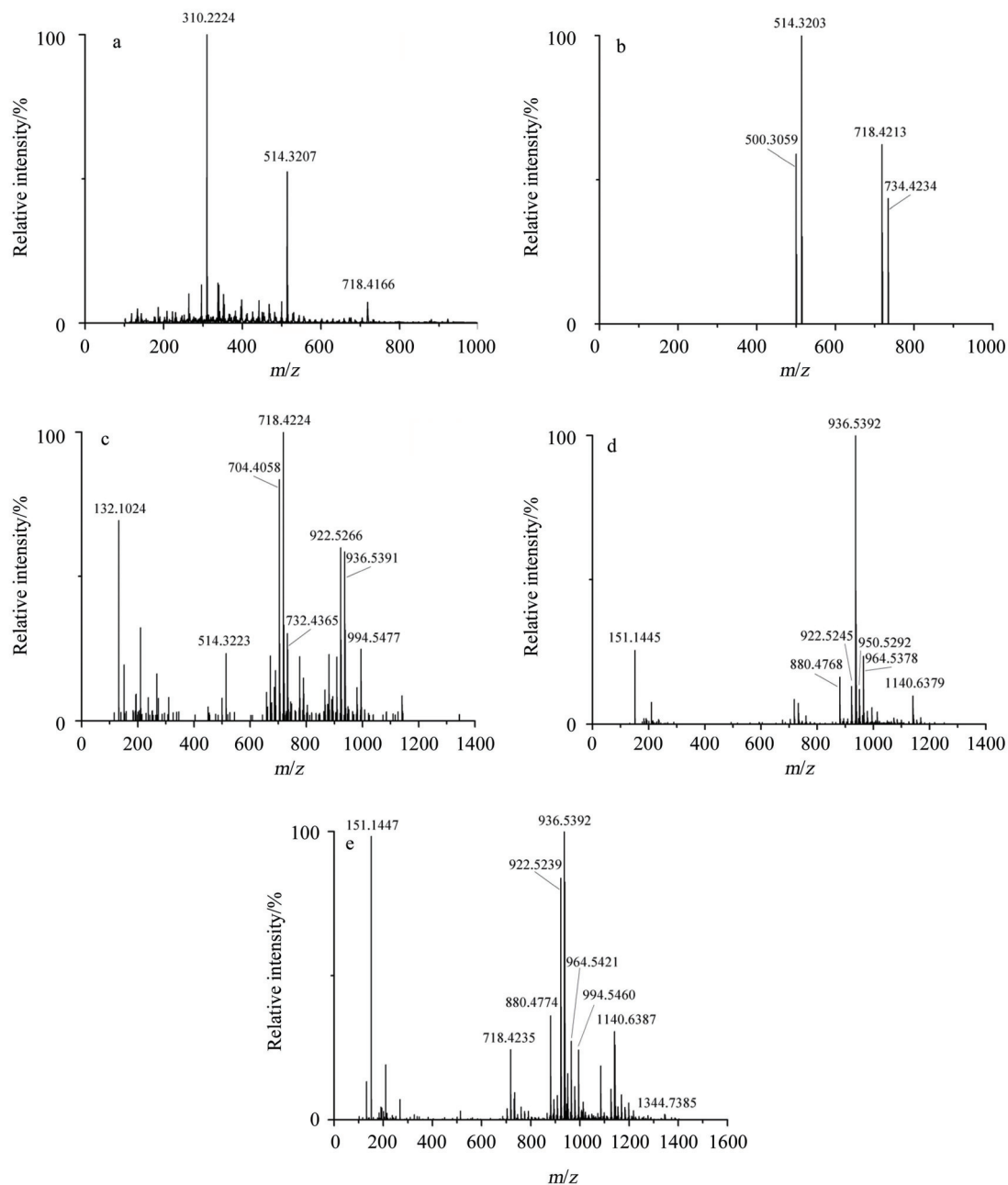


图2 葡萄糖标准品及人参寡糖的 DART 全扫描质谱图

Figure 2 DART full scan mass spectra of glucose standard and ginseng oligosaccharides

(a) glucose standard, (b) ginseng disaccharide, (c) ginseng trisaccharide, (d) ginseng tetrasaccharide, (e) ginseng oligosaccharides mixture

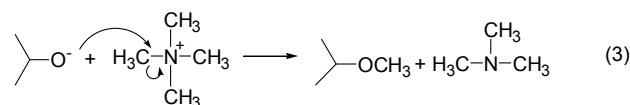
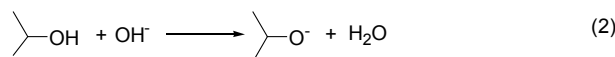
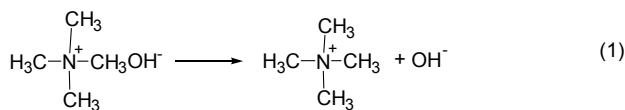
归属都通过精确分子量并结合安捷伦定性分析软件生成分子式功能完成, 质量误差均在 5×10^{-6} 以内.

2.2 DART 中的甲基化机理

Fabbri 等^[14]曾经报道了在高温下使用 TMAH 辅助糖类碱水解, 并对生成的甲基化产物的反应机理进行了分析. DART 下的反应条件与上述反应相近, 例如, 人参皂苷 Rc 的 20 位糖链的断裂就是由热碱水解导致的, 所以可以以此为依据推测凝聚相中的甲基化反应. 结合上述文献, 在凝聚相中的甲基化过程可以用 Eqs. 1~3 来表示. TMAH 的碱性很强, 在溶液中可以快速电离成为

四甲铵阳离子和氢氧根(Eq. 1). 大量的氢氧根可以夺取糖类或皂苷羟基的氢, 使其成为氧负离子(Eq. 2). 氧负离子有很强的亲核性, 在高温作用下, 将进攻四甲铵阳离子的 N—C 键, 夺取 1 个甲基使自身发生甲基化, 同时形成三甲胺, 它通常以质子化的形式结合在甲基化的样品分子上(Eq. 3). 因为氢氧根和羟基氢的反应本质上是酸碱反应, 所以羟基酸性的强弱会对凝聚相中的甲基化产生极大的影响. 对于人参皂苷来说, 糖链上羟基的酸性要大于皂苷元上羟基的酸性, 所以当皂苷元上的羟基数目很多时, 发生的甲基化一般是不完全的. 例如,

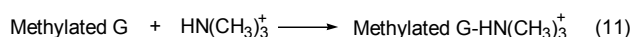
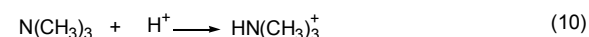
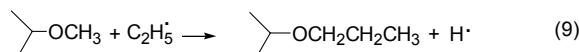
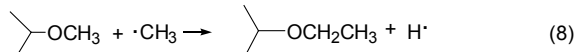
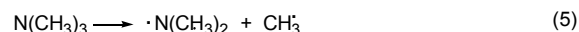
在皂苷元含有 3 个羟基的人参皂苷 Rf 的 DART 全扫描质谱图中, 可以检测到作为基峰的 m/z 986.7 离子, 对应于皂苷元上的 1 个羟基未被甲基化的人参皂苷 Rf. 而人参皂苷 Rc 的皂苷元上只有 1 个羟基, 所以它的不完全甲基化的离子丰度较低. 而对于人参寡糖来说, 所有的羟基酸性都是一致的, 所以不完全甲基化的情况比较少见.



发生在凝聚相中的甲基化作用并不能说明人参寡糖中的过甲基化反应的产生机制, 所以过甲基化反应可能发生在气相中. 在凝聚相中的甲基化完成后, 人参皂苷或人参寡糖的挥发性得到增加, 并可以进入气相. 同时, TMAH 在高温下也会发生分解, 生成三甲胺并进入气相. 在激发态的 He 原子作用下, 三甲胺的 N—C 键发生均裂, 形成甲基自由基和二甲胺自由基. 甲基自由基可以迅速地与甲氧基结合, 形成乙氧基和 1 个氢自由基, 这使得在质谱中可以观察到 1 个羟基被乙基化的样品分子(图 2c 中的 m/z 732.4 和图 2d 中的 m/z 936.5 离子等). 由于潘宁电离^[1]可以生成 O_2^+ 的缘故, 因此在此反应区域内还可以发生一系列连锁的自由基反应, 生成低质量端的一些含氮氧的离子(如 m/z 132.1 和 151.1). 与此同时, 烷基自由基之间还可以发生复杂反应, 生成更高级的烷基自由基, 这也是在谱图中可以观察到多种过甲基化形式的原因. 由于三聚以上的寡糖中羟基的数量比人参皂苷中羟基的数量多, 所以在羟基数目很大的人参四糖及五糖的 DART 全扫描质谱图中更容易观测到丰度很高过甲基化的产物. 另外, 三甲胺还有一个重要的作用. 进入气相中的三甲胺有着比水更强的质子亲和势, 可以快速的与由潘宁电离形成的水合氢离子发生质子交换, 形成质子化的三甲胺, 并与甲基化的人参皂苷或寡糖通过非共价作用结合, 形成复合物离子, 从而被质谱所检测. 气相中的主要反应过程显示在 Eqs. 4~11 中. 由此可见, 人参皂苷及人参寡糖在 DART 中实现甲基化和电离是凝聚相和气相反应共同作用的结果.

3 结论

DART 中甲基化试剂的使用使难挥发的化合物挥发性增强, 进而扩展了 DART 的使用领域. 人参皂苷的甲基化以不完全和全甲基化为主, 人参寡糖的甲基化则随着糖链的增长由全甲基化主导转变为过甲基化主导. 甲



基化作用发生在凝聚相和气相中. 凝聚相中的甲基化是由氧负离子的亲核反应导致的, 而过甲基化则是由气相中的自由基反应产生的. 对甲基化机理的理解有助于衍生化试剂的选择, 这将对利用 DART 来研究低挥发性化合物发挥重要作用.

4 实验部分

4.1 仪器与试剂

见支持信息(包含人参皂苷与人参寡糖的结构).

4.2 实验方法

用一端封死的熔点管蘸取少量样品粉末, 并滴加 1 滴 25%(质量浓度)的 TMAH 甲醇溶液, 将其置于 DART MS 离子源气体流出口与质谱进样口之间, 即可得到甲基化的该样品的实时质谱图(图 3).

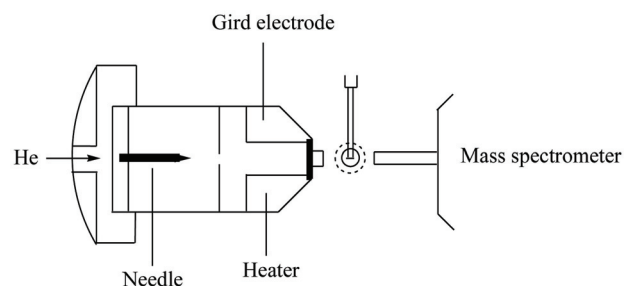


图 3 直接实时分析质谱装置示意图

Figure 3 Schematic diagram of direct analysis in real time mass spectrometry

致谢 感谢中国科学院长春应用化学研究所韩福祉研究员对机理研究给予的帮助.

References

- [1] Cody, R. B.; Laramée, J. A.; Durst, H. D. *Anal. Chem.* **2005**, *77*, 2297.
- [2] Jones, R. W.; Cody, R. B.; McClelland, J. F. *J. Forensic Sci.* **2006**, *51*, 915.
- [3] Cody, R. B. *Anal. Chem.* **2008**, *81*, 1101.
- [4] Haeffliger, O. P.; Jeckelmann, N. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2007**, *21*, 1361.
- [5] Harris, G. A.; Galhena, A. S.; Fernandez, F. M. *Anal. Chem.* **2011**,

- 83, 4508.
- [6] Eberherr, W.; Buchberger, W.; Hertsens, R.; Klampfl, C. W. *Anal. Chem.* **2010**, 82, 5792.
- [7] Petucci, C.; Diffendal, J.; Kaufman, D.; Mekonnen, B.; Terefenko, G.; Musselman, B. *Anal. Chem.* **2007**, 79, 5064.
- [8] Zhang, J.; Zhou, Z.; Yang, J.; Zhang, W.; Bai, Y.; Liu, H. *Anal. Chem.* **2012**, 84, 1496.
- [9] Kubec, R.; Cody, R. B.; Dane, A. J.; Musah, R. A.; Schraml, J.; Vattekkatte, A.; Block, E. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, 58, 1121.
- [10] Fernández, F. M.; Cody, R. B.; Green, M. D.; Hampton, C. Y.; McGready, R.; Sengaloundeth, S.; White, N. J.; Newton, P. N. *ChemMedChem* **2006**, 1, 702.
- [11] Curtis, M. E.; Jones, P. R.; Sparkman, O. D.; Cody, R. B. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2009**, 20, 2082.
- [12] Song, F.-R.; Yan, C.-Y.; Liu, N.; Liu, Z.-Q.; Liu, S.-Y. *Acta Chim. Sinica* **2009**, 67, 1103. (宋凤瑞, 闫存玉, 刘宁, 刘志强, 刘淑莹, 化学学报, **2009**, 67, 1103.)
- [13] Liu, R. N.; Yue, H.; Krechmer, J.; Jiao, L.; Liu, C. C.; Musselman, B.; Liu, S.-Y. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **2011**, 22 (Supplement 1), 88.
- [14] Fabbri, D.; Helleur, R. *J. Anal. Appl. Pyrolysis* **1999**, 49, 277.

(Qin, X.)