



引用格式:王国庆,褚铭林,李振兴,等. ESI-HRMS 法在梓醇丙酰化产物合成过程分析中的应用[J]. 轻工学报,2018,33(3):1-7.

中图分类号:O657.63;TS218⁺.2 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2018.03.001

文章编号:2096-1553(2018)03-0001-07

ESI-HRMS 法 在梓醇丙酰化产物合成过程分析中的应用

Application of ESI-HRMS method in analysis of the synthesis process of catalpol propionylated products

王国庆¹,褚铭林¹,李振兴¹,于文浩¹,董春红²,王强³

WANG Guoqing¹, CHU Minglin¹, LI Zhenxing¹, YU Wenhao¹, DONG Chunhong²,
WANG Qiang³

1. 郑州轻工业学院 材料与化学工程学院,河南 郑州 450001;

2. 河南中医药大学 药学院,河南 郑州 450046;

3. 河南省分析测试中心,河南 郑州 450002

1. College of Materials and Chemical Engineering, Zhengzhou University of Light Industry,
Zhengzhou 450001, China;

2. College of Pharmacy, He'nan University of Chinese Medicine, Zhengzhou 450046, China;

3. He'nan Analysis and Testing Centre, Zhengzhou 450002, China

关键词:

梓醇;丙酰化;电喷雾离子化-高分辨质谱;
过程分析

Key words:

catalpol; propionylation;
electrospray ionization-
high resolution mass
spectrometry
(ESI-HRMS);
process analysis

摘要:采用电喷雾离子化-高分辨质谱(ESI-HRMS)法对梓醇丙酰化产物进行定性确认,利用峰面积归一化法对各产物进行半定量分析,建立了梓醇丙酰化过程分析方法.结果表明:ESI-HRMS法可以快速定性丙酰化产物的种类,而峰面积归一法可以计算得到各梓醇丙酰化产物的相对含量,由此可以根据需要,通过控制反应条件,合成有特定结构的主产物或混合产物.ESI-HRMS法在梓醇丙酰化过程分析中的应用,为梓醇丙酰化产物合成过程分析提供了新途径.

收稿日期:2017-11-15

基金项目:国家自然科学基金项目(81373462);国家自然科学基金国际合作与交流基金中泰合作项目(8151101082)

作者简介:王国庆(1965—),男,河南省汤阴县人,郑州轻工业学院教授,博士,主要研究方向为光谱色谱分析与化学计量学.

Abstract: Using electrospray ionization-high resolution mass spectrometry (ESI-HRMS) method to confirm the catalpol propionylated products, and using peak area normalizing method to complete the semi quantitative, the analysis method on the synthesize process of catalpol propionylated products was established. The results showed that the ESI-HRMS method could quickly determine the type of propionylated products; the peak area normalization method could calculate the relative content of each catalpol propionylated products, which could be controlled to synthesize the main or mixed products with the specific structure by controlling the reaction conditions according to the need. The application of ESI-HRMS method in the reaction process of catalpol propanolation could provide a new approach for the analysis of the synthesis process of catalpol propanylated products.

0 引言

梓醇是从玄参科植物地黄的新鲜或干燥块根中提取的小分子环烯醚萜苷类化合物,具有多种药理活性^[1].以梓醇和丙酸酐为原料,可以合成部分或全部丙酰化的梓醇衍生物,该梓醇衍生物可能具有潜在的抗衰老活性^[2].在酯化过程中,梓醇中多个羟基都有可能参与酯化反应,产物为混合物^[3],因此需要建立一种分析方法来分析梓醇的酯化过程.

传统混合物体系的分离分析方法主要有气相色谱-质谱法(GC-MS)、液相色谱-质谱法(LC-MS)等^[4-8].梓醇及其丙酰化产物由于沸点较高,热稳定性较差,利用GC-MS分离分析时需要衍生化,操作步骤繁琐;而丙酰化产物结构相似,难以在液相色谱柱上得到有效分离.高分辨质谱(HRMS)法因具有分辨率高、信息量大、样品用量少、灵敏快速等特点,在精确测定有机化合物分子质量、结构解析、反应机理分析等方面发挥着重要作用^[9-10],可以直接进样进行质谱分离,避免繁琐的预分离,实现高效的定性定量分析.样品中不同化合物的含量不同,其质谱峰的强度也不同,在一定条件下质谱峰的面积与含量成正比,因此可采用相对峰面积比较法进行半定量分析^[11].在常用的质谱电离源中,电喷雾电离源(ESI)因待分析的离子在成为气相离子的过程中不受外界能量激发,不产生碎片,因而在大分子质谱分析中得到广泛应

用^[12].鉴于此,本文拟将ESI-HRMS法应用于梓醇的丙酰化过程分析中,通过反应原料和产物的相对分子质量和电离方式定性确认梓醇丙酰化产物的种类,根据不同原料和反应产物物质谱峰面积进行(半)定量分析,从而实现梓醇丙酰化过程的分析,以期梓醇丙酰化产物合成过程分析提供一种新途径.

1 材料与方法

1.1 主要材料与仪器

主要材料:甲醇、乙腈、甲酸、吡啶等,均为色谱纯,天津市四友精细化学品有限公司产;超纯水,郑州轻工业学院实验室制.

主要仪器与设备:0~10 μL规格的微量进样针,100~1000 μL规格的移液器,德国艾本德公司产;Thermo Fisher-Exactive Obitrapp型质谱仪,美国赛默飞世尔公司产;Mill-Q Advantage A10型纯水仪,美国密理博公司产.

1.2 实验方法

1.2.1 梓醇吡啶溶液的制备 准确称量40.0 mg梓醇,置于微量反应器中,然后用2 mL吡啶充分溶解.用微量进样针抽取10 μL梓醇的吡啶溶液,置于进样瓶中,将进样针用纯乙腈试剂清洗4次,并将清洗液注射于进样瓶中,再用移液器向进样瓶中注射950 μL纯乙腈,密封待测.

1.2.2 反应液的制备条件与取样方法 初始反应条件为梓醇用量40.0 mg,丙酸酐用量

177 μL (丙酸酐与梓醇的物质的量比为 12 : 1), 2 mL 吡啶作溶剂, 反应温度 60 $^{\circ}\text{C}$. 在不同时间点用微量进样针抽取 10 μL 反应液到进样瓶中, 后将进样针用纯乙腈试剂清洗 4 次, 并将清洗液注射进进样瓶中, 再用移液器向进样瓶中注射 950 μL 纯乙腈, 密封待测.

利用正交试验法对全丙酰化产物的合成工艺进行优化, 不同时间点的取样方法与上述方法相同.

1.2.3 分析方法 HRMS 法测试条件: ESI 电离源; 自动进样器流动相比比例为 $V(\text{乙腈}) : V(\text{质量分数 } 1\% \text{ 的甲酸水溶液}) = 10 : 90$; 流速为 200 $\mu\text{L}/\text{min}$; 毛细管温度 250 $^{\circ}\text{C}$; 毛细管电压 60 V; tube 电压 120 V; 进样量 1 μL ; 辅助气为 N_2 (10 L/min); 鞘气 40 L/min; skimmer 电压 22 V; 扫描时间 2 min; 扫描范围 $m/z = 360 \sim 800$; 电子传输管温度 275 $^{\circ}\text{C}$.

分析流程: 将所取样品通过高分辨率质谱仪的自动进样器进入到质谱仪中, 根据梓醇和不同产物在正、负离子扫描方式下电离后的离子 m/z 不同, 对梓醇和丙酰化产物进行定性分析. 将各种产物在负离子扫描方式下质谱图中的相应分子离子峰提取出来, 分别进行积分, 用峰面积归一化法计算得到各种产物的相对

含量. 具体步骤如下: 分别采用正、负离子扫描方式; 对吡啶溶液中梓醇和反应液中梓醇丙酰化产物的电离方式进行确认; 考察正、负离子扫描方式下梓醇丙酰化产物的半定量分析结果的差异, 进而确定合适的扫描方式; 在负离子扫描方式下进行初始反应条件下梓醇与丙酸酐的酯化过程分析; 在负离子扫描方式下进行不同实验条件下各产物的相对含量的计算.

2 结果与讨论

2.1 吡啶溶液中梓醇电离方式的分析与确定

图 1 和图 2 分别是在正、负离子扫描方式下吡啶溶液中梓醇的质谱图, 梓醇的相对分子质量为 362.33. 图 1 中, $m/z = 385.12870$ 为梓醇的 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 峰; 图 2 中, $m/z = 361.09407$, 397.06878, 407.09693 分别为梓醇的 $[\text{M} - \text{H}]^-$, $[\text{M} + \text{Cl}]^-$, $[\text{M} + \text{HCOO}]^-$ 峰. 因此, 本文方法中负离子扫描方式下梓醇加合离子峰的响应灵敏度更高, 故原料梓醇的扫描方式选择负离子扫描方式.

2.2 梓醇丙酰化产物电离方式的分析与确定

图 3 为梓醇结构图. 梓醇中不同数量 (1—6) 羟基丙酰化产物的 m/z 分别为 418.15, 474.17, 530.20, 586.23, 642.25 和 698.28.

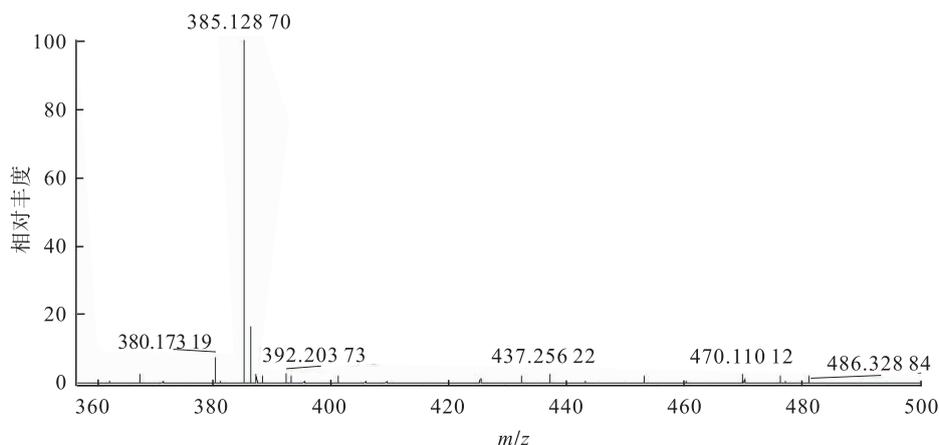


图 1 正离子扫描方式下吡啶溶液中梓醇的质谱图

Fig. 1 Mass spectra of catalpol in pyridine solution under positive ion scanning mode

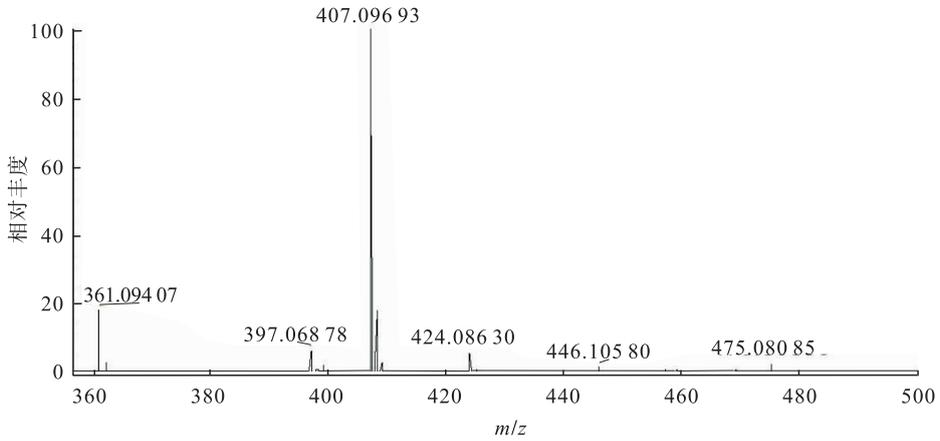


图2 负离子扫描方式下吡啶溶液中梓醇的质谱图

Fig. 2 Mass spectra of catalpol in pyridine solution under negative ion scanning mode

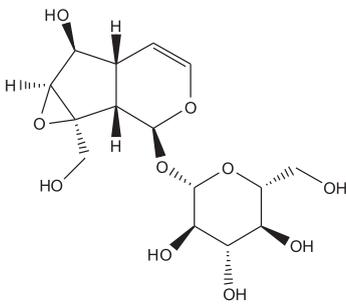


图3 梓醇结构图

Fig. 3 Structure digram of catalpol

图4 为正离子扫描方式下反应 1 h 后所取反应液的质谱图, $m/z = 554.219 83, 610.275 69, 666.304 97, 722.333 27, 778.361 99$ 分别为梓醇中 2—6 个羟基丙酰化产物的 $[M + C_5H_6N]^+$

峰. 图5 为负离子扫描方式下反应 1 h 后所取反应液的质谱图, $m/z = 463.118 78, 519.142 78, 575.165 83, 631.188 78, 687.211 87, 743.236 11$ 分别为梓醇中 1—6 个羟基丙酰化产物的 $[M + HCOO]^-$ 峰. 表 1 为梓醇及不同丙酰化产物在质谱图上所出峰的 m/z . 从表 1 可知, 在负离子扫描方式下, 梓醇中 1—6 个羟基丙酰化产物的质谱峰都可以检测出来. 因此, 梓醇丙酰化产物也选择负离子扫描方式.

2.3 梓醇丙酰化产物的半定量分析

图6 为负离子扫描方式下反应 1 h 后所取反应液中各产物所出质谱峰的积分图, 从上往下依次为梓醇分子结构中 1—6 羟基丙酰化产

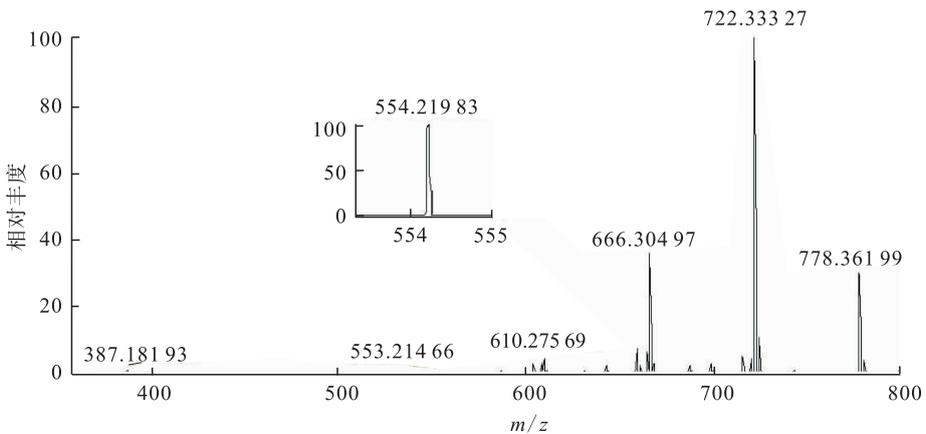


图4 正离子扫描方式下 1 h 后所取反应液的质谱图

Fig. 4 Mass spectra of reaction solution after one hour under positive ion scanning mode

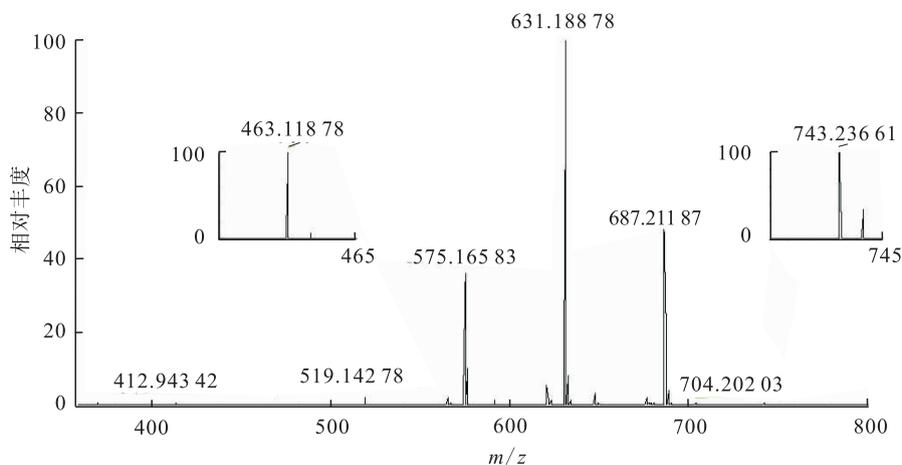


图5 负离子扫描方式下反应 1 h 后所取反应液的质谱图

Fig. 5 Mass spectra of reaction solution after one hour under negative ion scanning mode

表1 梓醇与不同丙酰化产物在质谱图上所出峰的 m/z

Table 1 m/z of catalpol and its different propionylated products on the mass spectrum

峰	梓醇	C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆
M	362.33	418.15	474.17	530.20	586.23	642.25	698.28
[M - H] ⁻	361.094 07	—	—	—	—	—	—
[M + Cl] ⁻	397.068 78	—	—	—	—	—	—
[M + HCOO] ⁻	407.096 93	463.118 78	519.142 78	575.165 83	631.188 78	687.211 87	743.236 11
[M + Na] ⁺	385.128 70	—	—	—	—	—	—
[M + C ₅ H ₆ N] ⁺	—	—	554.219 83	610.275 69	666.304 97	778.361 99	722.333 27

注:C₁—C₆ 分别为梓醇中 1—6 个羟基丙酰化产物,下同

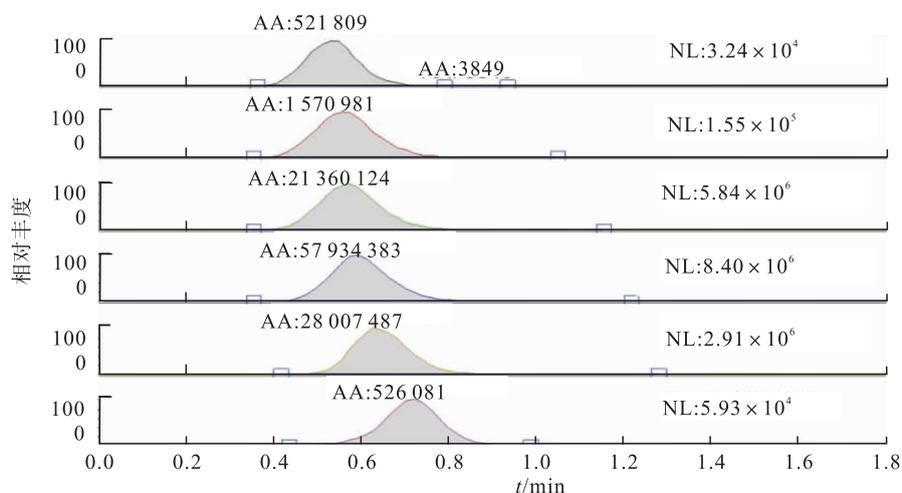


图6 负离子扫描方式下反应 1 h 后所取反应液中各产物所出质谱峰的积分图

Fig. 6 Integral graph of various mass spectra peaks

of each product in reaction solution after one hour under negative ion scanning mode

物的 $[M + HCOO]^-$ 峰,其中AA代表质谱峰的峰面积,NL代表质谱仪的响应强度.该扫描方式下各种产物 C_1-C_6 的相对含量分别为0.47%,1.43%,19.43%,52.71%,25.48%和0.48%.因此,在不同的反应时间中,梓醇分子不同数目羟基丙酰化产物的相对含量不同,这些不同反应时间的反应结果可以反映相应丙酰化产物的变化趋势,跟踪分析梓醇丙酰化反应过程.

2.4 梓醇的丙酰化反应进程分析

表2为特定初始反应条件不同反应时间下各种产物的相对含量.由表2可知,随着反应时间的延长,梓醇上参与反应的羟基数量越来越多,至反应终点(48 h)时,以梓醇中全部羟基丙酰化产物为主,相对含量为80.75%.

表2 不同反应时间下各种产物的相对含量

Table 2 Relative contents of each product with different reaction time %

反应时间/h	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6
1	0.47	1.43	19.43	52.71	25.48	0.48
2	ND	0.13	13.66	45.32	30.75	10.14
4	ND	ND	5.01	33.15	41.61	20.23
8	ND	ND	ND	15.23	49.50	35.27
12	ND	ND	ND	6.56	43.33	50.11
24	ND	ND	ND	ND	35.33	64.69
48	ND	ND	ND	ND	19.25	80.75

注:ND表示未检出,下同

2.5 不同正交试验条件下梓醇的丙酰化反应情况分析

表3为一组 $L_9(3^4)$ 正交试验条件下各产物的相对含量.由表3可知,不同正交试验条件下梓醇参与反应的羟基数目有较大差异;在设定的正交试验条件下,以梓醇分子结构中3—6个羟基丙酰化产物为主.正交试验结果表明,可以控制反应条件生成梓醇分子结构中特定数量羟基丙酰化产物为主的产物.

3 结论

本文采用ESI-HRMS法实现了梓醇丙酰化

表3 一组正交试验条件下各产物的相对含量

Table 3 Relative content of each product under a set of orthogonal test %

试验序号	C_1	C_2	C_3	C_4	C_5	C_6
1	0.63	7.30	28.11	36.06	23.33	4.47
2	0.13	1.46	8.67	22.86	54.22	12.66
3	0.76	4.58	22.98	35.15	25.08	11.45
4	ND	1.18	4.23	28.03	40.25	26.31
5	ND	ND	1.40	21.41	37.37	39.82
6	ND	ND	3.53	26.75	39.66	30.06
7	ND	ND	ND	1.03	30.15	68.82
8	ND	ND	ND	4.37	35.52	60.11
9	ND	ND	0.65	1.36	33.08	64.91

产物种类的快速定性确认,利用原料和梓醇丙酰化产物的质谱峰面积计算得到各产物的相对含量,完成了各产物的半定量分析,从而实现了对梓醇丙酰化过程的分析.ESI-HRMS法在梓醇丙酰化过程的应用避免了采用传统的HPLC法对混合物体系须作分离分析的繁琐,为梓醇丙酰化产物的合成过程提供了一种新的分析方法.

参考文献:

- [1] LIN C, LU Y, YAN X J, et al. Catalpol protects glucose-deprived rat embryonic cardiac cells by inducing mitophagy and modulating estrogen receptor [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 89: 973.
- [2] 董春红, 王强, 王国庆, 等. 一种丙酰化的梓醇衍生物及其制备方法和应用 [P]. 中国: 201710974075.3, 2017-10-19.
- [3] 段煜, 杜宗良, 李瑞霞, 等. 天然多羟基化合物在酶催化下的选择性酯化 [J]. *天然产物研究与开发*, 2006, 18(4): 702.
- [4] SHETTAR A K, SATEESH M K, KALI WAL B B, et al. In vitro antidiabetic activities and GC-MS phytochemical analysis of *Ximenia americana* extracts [J]. *South African Journal of Botany*, 2017, 111: 202.
- [5] 王国庆, 彩倩杰, 刘云, 等. 顶空-气相色谱-

- 质谱法测定改性聚硫橡胶中挥发性成分[J]. 郑州轻工业学院学报(自然科学版),2015,30(2):1.
- [6] 胡玉熙,刘清飞,从文娟,等. 气质联用技术在生物医药领域中的应用进展[J]. 药物分析杂志,2008,28(6):999.
- [7] FENG Y K, LIU Z Z, PENG Y, et al. Validated LC-MS method for simultaneous quantitation of catalpol and harpagide in rat plasma: Application to a comparative pharmacokinetic study in normal and diabetic rats after oral administration of Zeng-Ye-Decoction [J]. Biomedical Chromatography,2013,27(11):1503.
- [9] 孙雨安,柯玮,李振兴,等. DART-Orbitrap 质谱法快速筛查饲料中磺胺类药物[J]. 质谱学报,2014,35(1):52.
- [10] 汪亚丽,王鹭,曾苏,等. 质谱法在药物立体异构体区分中的应用及发展[J]. 质谱学报,2017,38(4):400.
- [11] 田桂花,范子琳,邓震宇,等. 半定量和定量分析测定 SBS 颗粒抗氧化剂含量[J]. 消防科学与技术,2011,30(2):171.
- [12] 李佳斌,郝斐然,田芳,等. 质谱电喷雾电离源研究新进展[J]. 质谱学报,2013,34(2):65.