

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2021.14.010

基于衍生化技术的羰基化合物分析技术研究*

郭宁¹, 张晓洋¹, 夏玉¹, 汤丹², 陈铭祥¹, 王淑美^{2△}

(1. 广东医科大学药学院, 广东 东莞 523808; 2. 广东药科大学中药学院, 广东 广州 510006)

摘要:目的 建立提高羰基化合物质谱检测灵敏度的衍生化方法。方法 以苯甲醛、己醛、庚醛、2-壬酮、2-庚酮5种羰基化合物为样品,用吉拉德试剂P(GP)作衍生化试剂,采用液相色谱串联质谱法分析衍生化产物。结果 苯甲醛、己醛、庚醛、2-壬酮、2-庚酮5种样品衍生前质谱无法检测到,衍生后均能被检测到,检测限分别为0.81,0.53,0.26,0.02,0.28 pmol。结论 所建立的衍生化方法提高了羰基化合物在质谱中的检测灵敏度,丰富了羰基化合物的质谱检测方法。

关键词:羰基化合物;衍生化;吉拉德试剂P;质谱检测;灵敏度

中图分类号:R917

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2021)14-0038-04

Analysis of Carbonyl Compounds Based on Mass Spectrometry Derivative Technology

GUO Ning¹, ZHANG Xiaoyang¹, XIA Yu¹, TANG Dan², CHEN Mingxiang¹, WANG Shumei²

(1. School of Pharmacy, Guangdong Medical University, Dongguan, Guangdong, China 523808; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou, Guangdong, China 510006)

Abstract: **Objective** To establish a derivatization method to improve the sensitivity of the mass spectrometry of carbonyl compounds. **Methods** Five carbonyl compounds including benzaldehyde, hexanaldehyde, heptanal, 2-nonone and 2-heptanone as the target analytes. The derivatization products were analyzed by liquid chromatography tandem mass spectrometry with Girard's reagent P(GP) as derivatization reagent. **Results** Five carbonyl compounds including benzaldehyde, hexanaldehyde, heptanal, 2-nonone and 2-heptanone could not be detected by mass spectrometry before the derivatization, but could be detected after the derivatization, and their limits of detection (LOD) were 0.81, 0.53, 0.26, 0.02 and 0.28 pmol, respectively. **Conclusion** The established derivatization method improves the detection sensitivity of mass spectrometry of carbonyl compounds and enriches the detection methods of carbonyl compounds.

Key words: carbonyl compounds; derivatization; Girard's reagent P; mass spectrometry; sensitivity

羰基化合物含有羰基官能团,主要包括醛酮化合物,在自然界广泛存在。目前已有研究报道生物体内醛酮化合物的变化与很多疾病有关,如糖尿病患者血浆中有大量丙酮醛积累^[1-2];肺癌患者机体中己醛、庚醛的含量增加^[3-5];乙醛在体内的累积会增加女性患乳腺癌的概率^[6]。因此,建立高选择性、高灵敏度的醛酮化合物检测方法对于早期临床诊断具有重要意义。液相色谱串联质谱(LC-MS)法因具有高选择性、高灵敏度及高通量而被广泛应用,但羰基化合物缺少易电离基团,在质谱分析过程中难以带上电荷,因而用于羰基化合物的检测受限。基于LC-MS的化学衍生化技术有优越性^[7],能通过向目标分析物中引入易电离的化学基团来提高其质谱检测的离子化效率^[8-10]。吉拉德试剂P(GP)能在弱酸性条件下与醛酮化合物的羰基发生席夫碱反应,反应条件温和,可形成碳氮双键。另外,GP含有季铵基团,能显著提高衍生物的离子化效率,从而提高其在质谱检测中的灵敏度。基于以上特点,本研究中拟选用GP作为羰基化合物的衍生化试剂,以苯甲醛、己醛、庚醛、2-

壬酮、2-庚酮5种样品为目标分析物,建立GP衍生结合LC-MS法检测羰基化合物,从而提高羰基化合物的质谱检测灵敏度。现报道如下。

1 仪器与试剂

1.1 仪器

Triple Quad 4500型高效液相色谱串联三重四极杆质谱仪,包括电喷雾离子源(ESI)、数据处理软件Analyst 1.6 Software(美国AB SCIEX公司);LC-20AD型高效液相色谱系统,包括DGU-20A3型脱气机、LC-20AD型二元梯度泵、SIL-20A型自动进样器、CTO-20AC型柱温箱(日本Shimadzu公司);微量移液枪(大龙兴创实验仪器<北京>有限公司,规格分别为10, 20, 1 000 μ L);针式样品过滤器(规格为0.22 μ m);有机微孔滤膜(天津市津腾实验设备有限公司,规格为0.22 μ m);ATX124型电子天平(日本Shimadzu公司,精度为万分之一);台式高速离心机(江苏科析仪器有限公司);MS-100型恒温混匀仪(杭州奥盛仪器有限公司);DC150-1B型氮吹仪(杭州佑宁仪器有限公司)。

*基金项目:国家自然科学基金[81803723];广东省湛江市科技计划项目[2020B01021];广东省中医药局科研项目[20212102];广东医科大学博士学位人员科研启动项目[B2019010]。

第一作者:郭宁,女,博士,讲师,研究方向为分析化学方法开发及代谢组学,(电子信箱)215363198@qq.com。

△通信作者:王淑美,女,博士,教授,研究方向为中药药效物质,(电子信箱)2395903468@qq.com。

1.2 试药

甲醇(色谱级,含量 $\geq 99.9\%$),乙醇(色谱级,含量 $\geq 99.8\%$),均购于美国Tedia公司;苯甲醛(色谱级,含量 $\geq 99.5\%$),己醛(色谱级,含量 $\geq 99.0\%$),庚醛(色谱级,含量 $\geq 98\%$),2-壬酮(含量99%),2-庚酮(含量99%),吡啶(化学级,含量99.8%),氯乙酸乙酯(化学级,含量98%),均购于阿拉丁生化科技股份有限公司;吡啶、水合肼、甲酸、冰醋酸(分析级,国药集团化学试剂有限公司);水为超纯水(实验室自制)。

2 方法与结果

2.1 GP合成

GP的合成方法参考文献[11],合成过程见图1。精密称取吡啶(0.396 g, 5 mmol)、氯乙酸乙酯(0.613 g, 5 mmol),精密量取乙醇12 mL,依次加入圆底烧瓶中,加入磁子搅拌;混合液在85℃条件下加热搅拌回流6 h,混合液冷却至室温;搅拌并缓慢加入水合肼溶液(0.25 g, 5 mmol)。室温下连续搅拌30 min得固体产物,然后用低温无水乙醇清洗,于真空干燥箱中干燥2 h,得0.672 g白色固体产物,产率为71.9%。 $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, D_2O) δ : 8.94–8.83(2H, m, H-Ar-o), 8.65–8.54(1H, m, H-Ar-p), 8.08(2H, m, H-Ar-m), 5.79(1H, s, NH), 5.40(2H, s, H-2), 3.24–3.21(2H, m, NH_2)。 $^{13}\text{C-NMR}$ (100 MHz, D_2O) δ : 169.05(C-1), 164.3(C-Ar-o), 146.1(C-Ar-p), 127.65(C-Ar-m), 60.46(C-2)。

2.2 GP质谱图

称取合成的GP 21.2912 mg,精密称定,置8 mL样品瓶中,加入7 mL甲醇制成20 $\mu\text{mol/mL}$ 的样品;量取

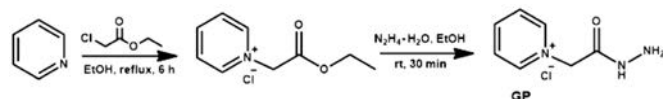
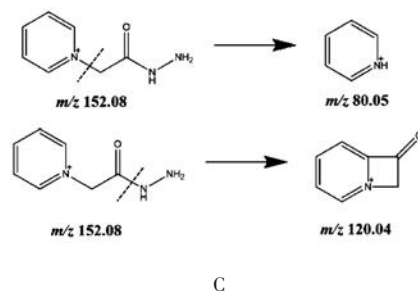
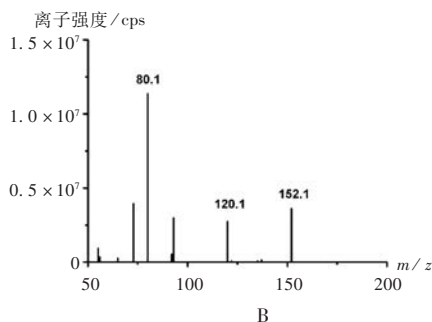
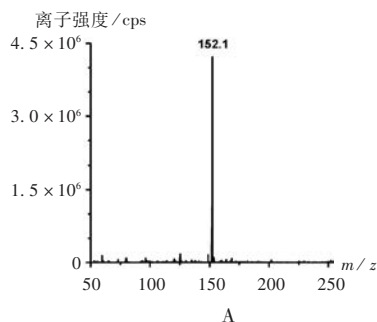


图1 GP合成路线

Fig. 1 The synthetic route of GP



A. 一级离子质谱图 B. 二级离子质谱图 C. 二级离子质谱图的结构推测

图2 GP质谱图及结构推测

A. The primary mass spectrum B. The secondary mass spectrum of fragment ions C. Structure speculation of fragment ions

Fig. 2 The mass spectrogram and structure speculation of GP

10 μL GP母液逐级稀释至200 nmol/mL,进行质谱分析,一级质谱图见图2A,GP的质荷比(m/z)为152.1;二级碎裂质谱图见图2B,GP有 m/z 80.1和 m/z 120.1的碎片离子;由图2C可知, m/z 80.1的碎片离子来自GP的吡啶环, m/z 120.1的碎片离子是GP失去 NH_2-NH_2 后成环得到。由以上结果判断,已合成出GP。

2.3 GP液相色谱串联质谱分析

色谱条件:色谱柱为Shimadzu Inertsil™ ODS-3柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 3 μm);流动相为0.1%甲酸溶液(A)-乙腈(B),梯度洗脱(0 min时5% B,5 min时5% B,22 min时40% B,40 min时90% B,45 min时90% B,48 min时5% B);流速为0.2 mL/min;柱温为40℃;进样量为5 μL 。

质谱条件:正离子模式下的多反应监测模式(MRM),离子源温度为550℃,喷雾电压为4.5 kV,雾化气为40 psi,气帘气压为40 psi,干燥气为60 psi。

分析结果:GP与醛酮化合物衍生化反应式见图3。5种衍生化产物的质谱参数和色谱保留时间见表1。

2.4 GP标记样品质谱特征

5种衍生化产物的二级碎裂质谱图见图4。结果显示,样品经GP标记后形成带正电的胺;5种样品在GP标记后都产生相同的特征碎片离子 m/z 80.1,该碎片来自GP的吡啶环;且均含有1个丢失了79 Da的离子。由上述结果可知,GP能标记这5种样品。

2.5 衍生化反应条件优化

为了获得较好的标记效率,本研究中优化了衍生化反应条件,包括衍生化反应温度、醋酸用量、GP用量及反应时间^[12],所有反应均在200 μL 甲醇体系中执行。样品用量均为1 nmol。

衍生化反应温度:分别选择30,40,50,60,70℃作为反应温度,GP用量为1.5 μmol ,15 000 r/min振荡反应3 h。结果表明,在反应温度为40℃时,衍生化产物的峰面积最大(见图5A)。故选择衍生化反应温度为40℃。

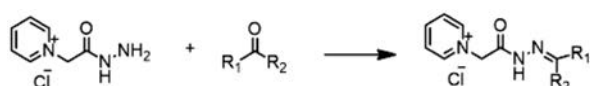


图3 GP与醛酮化合物衍生化反应式

Fig. 3 The derivatization reaction equation of GP with the aldosterone compounds

表1 5种衍生化产物的质谱参数和色谱保留时间

Tab. 1 The Mass spectrometric parameters and chromatographic retention time of five derivatization products

目标分析物	扫描模式	母离子	子离子	碰撞能量	保留时间(min)
苯甲醛	+	240.1	80.1, 161.1	26	7.85
己醛	+	234.2	155.1, 80.1	27	10.62
庚醛	+	248.2	169.1, 80.1	30	14.12
2-壬酮	+	276.2	197.2, 169.1	30	17.19
2-庚酮	+	248.2	169.1, 141.2	27	12.66

醋酸用量:醋酸用量的考察范围是0~10%。结果表明,当醋酸用量为1%时,衍生化产物的峰面积已达到平台(见图5B)。故选择醋酸用量为1%。

GP用量:GP与样品物质量之比考察范围为50~1000倍。结果表明,当GP与样品物质量之比为300时,衍生化产物的峰面积达到平台(见图5C)。故选择GP用量为300倍。

反应时间优化:优化范围为0.5~10.0h。结果表明,当反应时间从0.5h增加至3.0h时,衍生化产物的峰面积比逐渐增加,3.0h后,峰面积比不再增加(见图5D)。故选择反应时间为3.0h。

通过以上优化,最优GP标记反应条件为,在200 μL甲醇反应体系中,40℃下反应3.0h,醋酸用量为1%,GP与标品的物质的量之比为300。

2.6 衍生化产物色谱行为

对5个标品衍生前后分别进行LC-MS分析,5个衍生化产物的色谱图见图6。可见,非衍生状态时5个标品由于离子化效率低,即使很高浓度时仍未检测到信号,而衍生后均有明显信号。其中,苯甲醛、己醛、2-庚酮、庚醛、2-壬酮的保留时间分别为7.85, 10.62, 12.66, 14.12, 17.19 min。

2.7 衍生前后灵敏度比较

在最优衍生化条件下,将苯甲醛、己醛、庚醛、2-壬酮、2-庚酮制成浓度为0.25, 2.5, 25, 250 pmol/mL的混标溶液,以GP标记,进行质谱分析,其中以信噪比(S/N)为3:1时作为检测限(LOD)。结果显示,当非衍生状态时,5个样品在质谱上看不到峰,无法用质谱检测;经过GP标记后,5个衍生化产物的LOD分别为0.81, 0.53, 0.26, 0.02, 0.28 pmol。这表明经GP衍生后大大提高了5种样品质谱检测的灵敏度。其中,GP的季铵部分对于灵敏度的提高起了很大作用。

3 讨论

本研究中利用GP作为羰基化合物的衍生化试剂,基于席夫碱反应,其结构中的氨基可与羰基化合物的羰基形成碳氮双键,其结构中的季铵盐基团极易带电,故可提高羰基化合物在质谱检测中的灵敏度。GP标记5种

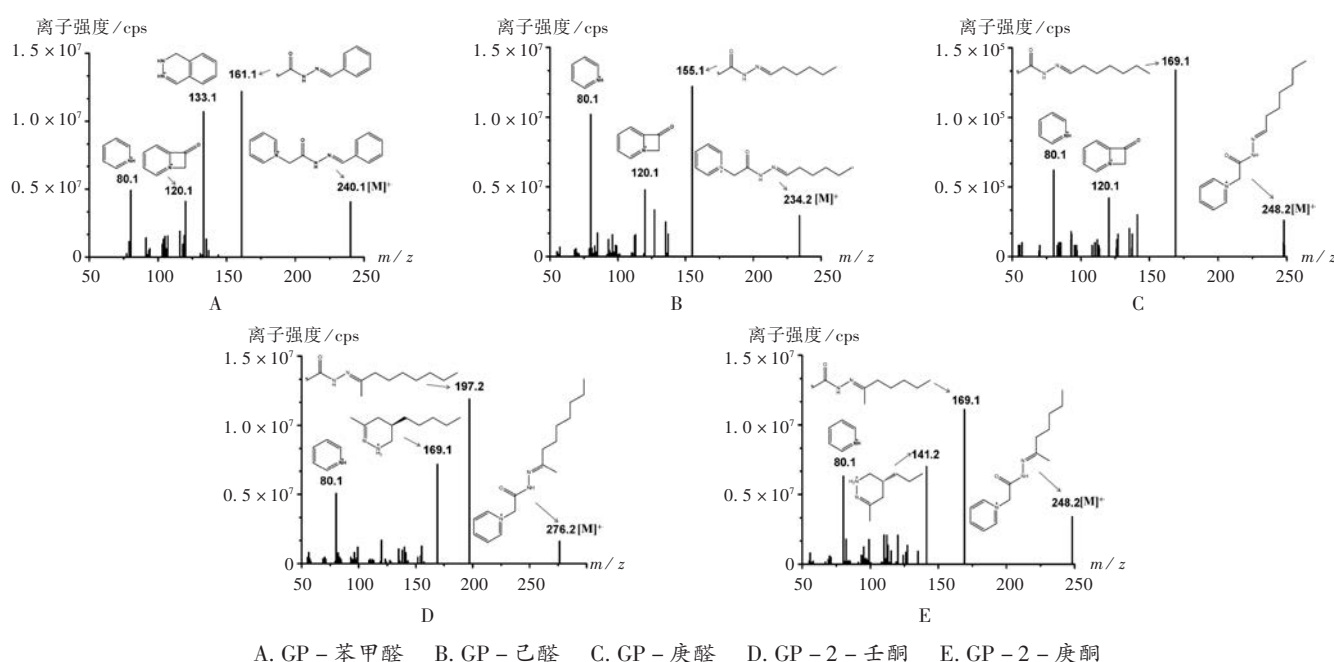
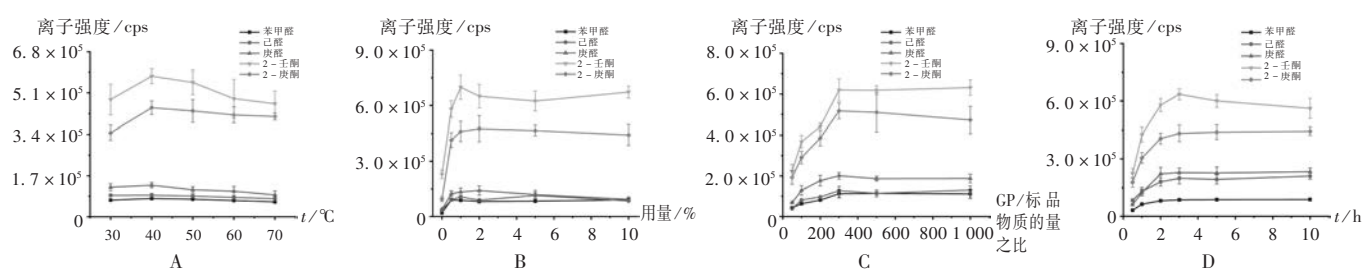


图4 5种衍生化产物的二级碎裂质谱图

A. GP-benzaldehyde B. GP-hexaldehyde C. GP-heptaldehyde D. GP-2-nonone E. GP-2-heptanone

Fig. 4 The secondary mass spectrogram of fragment ions of five derivatization products



A. 反应温度 B. 醋酸用量 C. GP与样品物质的量之比 D. 反应时间

图5 优化衍生化反应条件

A. Reaction temperature B. The percentage of acetic acid C. The molar ratio of GP to standards D. Reaction time

Fig. 5 Optimization of derivatization reaction conditions

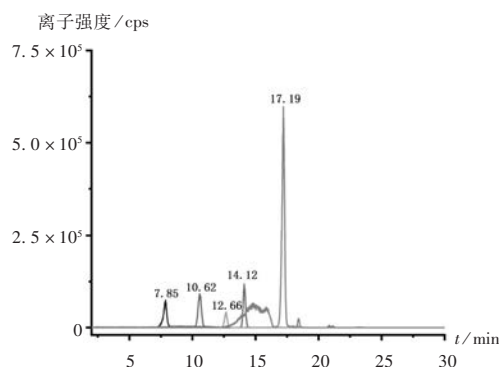


图6 5种衍生化产物色谱图

Fig. 6 The ion chromatograms of five derivatization products

标品的二级碎片中均有1个 m/z 80.1 的碎片,该碎片来自 GP 的吡啶环部分,这一特点可提高羰基化合物的选择性。所建立的方法对羰基化合物的分析有2个优势:1)通过 GP 衍生,向羰基化合物中引入了季铵结构,提高了羰基化合物的质谱离子化效率,进而提高了正离子扫描模式下质谱检测的灵敏度。2)GP 衍生后,衍生化产物的二级碎片中均含有1个 m/z 80.1 的碎片,基于此特点,在研究非目标性化合物时可从众多分析物中筛选出羰基化合物,提高羰基化合物的选择性。另外,由于席夫碱反应中的氨基不仅可与饱和醛酮化合物反应,还可与不饱和醛酮化合物反应,故 GP 不仅可检测饱和醛酮化合物,还可检测不饱和醛酮化合物。

综上所述,所建立的 GP 衍生结合 LC-MS 法检测羰基化合物,大大提高了羰基化合物在质谱中的检测灵敏度,丰富了羰基化合物的质谱检测方法。

参考文献

- [1] CHAN WH, WU HJ, SHIAO NH. Apoptotic signaling in methylglyoxal-treated human osteoblasts involves oxidative stress, c-Jun N-terminal kinase, caspase-3, and p21-activated kinase 2[J]. Journal of Cellular Biochemistry, 2007, 100(4): 1056-1069.
- [2] MATAFOME P, SENA C, SEIÇA R. Methylglyoxal, obesity, and diabetes[J]. Endocrine, 2013, 43(4): 472-484.
- [3] XU H, YAN Z, SONG D. Development of a novel monolith frit-based solid-phase microextraction method for determination of hexanal and heptanal in human serum samples[J]. Journal of Separation Science, 2012, 35(5/6): 713-720.
- [4] SONG D, GU Y, LIANG L, et al. Magnetic solid-phase extraction followed by high performance liquid chromatography for determination of hexanal and heptanal in human urine[J]. Analytical Methods, 2011, 3(6): 1418-1423.
- [5] ZHANG HJ, HUANG JF, LIN B, et al. Polymer monolith microextraction with in situ derivatization and its application to high-performance liquid chromatography determination of hexanal and heptanal in plasma[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1160(1/2): 114-119.
- [6] LIU JF, YUAN BF, FENG YQ. Determination of hexanal and heptanal in human urine using magnetic solid phase extraction coupled with in-situ derivatization by high performance liquid chromatography[J]. Talanta, 2015, 136: 54-59.
- [7] YIN D. Studies on age pigments evolving into a new theory of biological aging[J]. Gerontology, 1995, 41(suppl 2): 159-172.
- [8] SALVADOR A, MORETTON C, PIRAM A, et al. On-line solid-phase extraction with on-support derivatization for high-sensitivity liquid chromatography tandem mass spectrometry of estrogens in influent/effluent of wastewater treatment plants[J]. Journal of Chromatography A, 2007, 1145(1/2): 102-109.
- [9] CHEN ML, HUANG YQ, LIU JQ, et al. Highly sensitive profiling assay of acidic plant hormones using a novel mass probe by capillary electrophoresis-time of flight-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2011, 879(13/14): 938-944.
- [10] LAMSHÖFT M, GROBE N, SPITELLER M. Picomolar concentrations of morphine in human urine determined by dansyl derivatization and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. Journal of Chromatography B, 2011, 879(13/14): 933-937.
- [11] MIRZAEI H, REGNIER F. Identification and quantification of protein carbonylation using light and heavy isotope labeled Girard's P reagent[J]. Journal of Chromatography A, 2006, 1134(1/2): 122-133.
- [12] GUO N, LIU P, DING J, et al. Stable isotope labeling Liquid chromatography/mass spectrometry for quantitative analysis of androgenic and progestagenic steroids[J]. Analytica Chimica Acta, 2016, 905: 106-114.

(收稿日期: 2021-01-20)