

水杨酸甲酯及其同分异构体的气质联用定性分析 ——推荐一个启发思维的质谱实验

丁玉洁¹, 高晓慧², 李昆¹, 蔡焱¹, 陈淑云¹, 彭电², 刘浩然^{1,*}

¹ 湖南大学化学化工学院, 化学生物传感与计量学国家重点实验室, 教育部分析化学课程虚拟教研室, 湖南大学化学实验教学中心, 长沙 410082

² 长沙卫生职业学院, 长沙 410605

摘要: 质谱分析实验是仪器分析中的重要课程。我们在长期的实践摸索中, 选择水杨酸甲酯(邻羟基苯甲酸甲酯)为实验对象进行质谱分析, 并与其同分异构体尼泊金甲酯(对羟基苯甲酸甲酯)、间羟基苯甲酸甲酯、香兰素(3-甲氧基-4-羟基苯甲醛)、2,4-二羟基苯乙酮及3,4-二羟基苯乙酮进行比较。通过本实验, 学生掌握了苯环、羰基、甲氧基、醛基、酚类等特征基团的质谱裂解特征, 又熟悉了“芳环邻位效应”这一分子重排裂解现象。此实验兼具实用性、趣味性, 难度适中, 既能巩固理论知识, 又能锻炼思维, 提升应用能力, 适合药学、化学、食品及相关专业学生选用, 亦可作为研究生质谱解析实验训练素材。

关键词: 质谱实验; 水杨酸甲酯; 分子重排; 思维训练

中图分类号: G64; O6; O657.7

A Thought-Provoking Mass Spectrometry Experiment: GC-MS Analysis of Methyl Salicylate and Its Isomers

Yujie Ding¹, Xiaohui Gao², Kun Li¹, Chi Cai¹, Shuyun Chen¹, Dian Peng², Haoran Liu^{1,*}

¹ State Key Laboratory of Chemo/Biosensing and Chemometrics, Virtual Teaching and Research division of Analytical Chemistry Course, Ministry of Education, Chemical Experimental Teaching Center of Hunan University, College of Chemistry and Chemical Engineering, Hunan University, Changsha 410082, China.

² Changsha Vocational College of Health, Changsha 410605, China.

Abstract: Mass spectrometry experiment is an important course in instrumental chemistry. Based on our long-term practical exploration, we chose Methyl salicylate (methyl *o*-hydroxy Methyl benzoate) as the experimental object for mass spectrometry analysis, and compared it with its isomers 3-Hydroxybenzoic acid methyl ester, nipagin methyl ester (methyl 4-Hydroxybenzoic acid), vanillin (3-nenenebe methoxy 4-hydroxy Benzaldehyde), 2,4-dihydroxy Acetophenone and 3,4-dihydroxy Acetophenone. Through this experiment, students will master the mass spectrum pyrolysis characteristics of benzene ring, carbonyl group, Methoxy group, aldehyde group, phenols *etc.*, and become familiar with the molecular rearrangement phenomenon of “Alpha effect of aromatic ring”. This experiment is practical, interesting with moderate difficulty. It can help students to consolidate theoretical knowledge and exercise thinking, improving practical application ability. It is suitable for students major in pharmacy, chemistry, food or other related ones, and also can be used as experimental training materials for graduate students.

Key Words: Mass spectrometry experiment; Methyl salicylate; Molecular rearrangement; Thinking training

收稿: 2023-07-12; 录用: 2023-09-12; 网络发表: 2023-10-18

*通讯作者, Email: pharmaliu@126.com

基金资助: 湖南省教学改革课题(HNJG-2021-0343, HNJG-2022-0038); 教育科学研究工作者协会课题(XJKX22B291)

质谱分析是仪器分析中一个重要的组成部分。各高校的质谱分析实验目的各不相同，设计各有特色。有的采用气质联用或液质联用检测混合物^[1,2]；有的采用基质辅助激光解析质谱检测蛋白质或其他高分子^[3,4]；有的则把质谱作为制备化合物的一个检测手段用来验证结构^[5]；有的只是用质谱仪检测简单化合物，注重仪器操作而不是解析^[6]。

在课程设置上，有的学校是将质谱实验作为波谱分析实验的一部分，也有的学校将质谱实验作为专业实验或综合实验来开设。由于质谱昂贵、复杂，实验中能让学生亲自动手的机会不多，而质谱解析现在大多是通过计算机搜索谱库来完成。由此，在很多质谱实验中中学生可能主要是观摩整个过程，见识一下，参与程度不高。我们认为，除了让学生熟悉基本的质谱操作外，质谱的解析对于本科生来说亦是不可或缺的过程，这一过程不能停留在理论课堂上由老师给出几个图谱来进行训练，更需要通过实验来真切地感受，在实验过程中巩固理论、提升实验技能。笔者经过多年不断地摸索、完善，设计了一个既生动有趣、又能涵盖众多质谱知识的实验，对于学生的质谱分析技能、思维均有良好的提升作用。现推荐如下。

1 实验背景

水杨酸甲酯(**1**, 邻羟基苯甲酸甲酯)是冬青油的主要成分，也是风油精、红花油等药物的化学成分之一^[7,8]。水杨酸甲酯同分异构体众多。我们选择以下5个生活中常见的异构体与之进行对比分析，借以巩固学生的质谱理论知识，并提升其质谱解析的能力。尼泊金甲酯(**2**): 尼泊金甲酯(对羟基苯甲酸甲酯)是经典的防腐剂，在药品、化妆品用有广泛的应用^[9]。间羟基苯甲酸甲酯(**3**): 间羟基苯甲酸甲酯是水杨酸甲酯及尼泊金甲酯的异构体，只是酚羟基的取代位置不同。香兰素(**4**): 香兰素又称香兰醛，在药品、食品中作为香味剂^[10]。2,4-二羟基苯乙酮(**5**)及3,4-二羟基苯乙酮(**6**)二者是化学合成中重要的中间体，可作为合成天然产物查耳酮、黄酮的原料^[11,12]。

包括水杨酸甲酯在内的上述6种物质分子量均为152(图1)，分子式均为 $C_8O_3H_8$ ，但取代基各不相同，性质各异，质谱也不相同。本实验通过质谱测定水杨酸甲酯的“棒图”，并进行解析。同时，对比其上述5个同分异构体的质谱图进行分析，既有利于全面掌握质谱解析方法，又巩固了有机化学等相关学科知识。

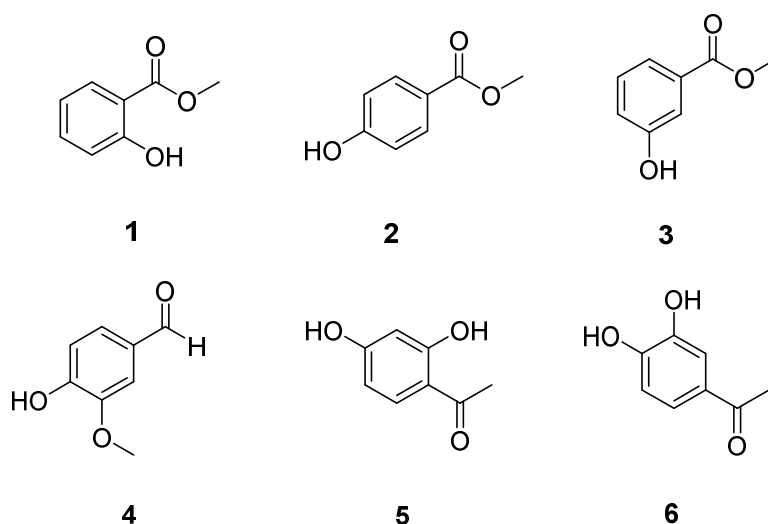


图1 化合物结构式

- 1: 水杨酸甲酯(邻羟基苯甲酸甲酯); 2: 对羟基苯甲酸甲酯(尼泊金甲酯); 3: 间羟基苯甲酸甲酯;
4: 香兰素(香兰醛); 5: 2,4-二羟基苯乙酮; 6: 3,4-二羟基苯乙酮

2 实验目的

- (1) 掌握气质联用仪的基本操作方法、基本参数;
- (2) 巩固质谱解析的一般方法, 熟悉苯环、酯、酚、醛、甲基、甲氧基等各基团的裂解特征;
- (3) 熟悉质谱中的重排规律。

3 实验材料

3.1 主要试剂

水杨酸甲酯(邻羟基苯甲酸甲酯)、尼泊金甲酯(对羟基苯甲酸甲酯)、间羟基苯甲酸甲酯、香兰素、2,4-二羟基苯乙酮、3,4-二羟基苯乙酮, 以上均为分析纯; 甲醇, 色谱级。

3.2 主要仪器

TRACE200 POLARIS Q型气质联用仪, 美国菲尼根公司。

4 实验方法

4.1 色谱条件

进样器温度250 °C, 载气(氦气)流速1 mL·min⁻¹, 起始温度120 °C, 保持3 min, 10 °C·min⁻¹程序升温, 升至200 °C, 保持2 min。进样分流比1:20。质谱条件: 传输线温度210 °C, 离子源210 °C, 质荷比扫描范围35–500 *m/z*, 溶剂延迟设为3 min。

4.2 操作步骤

用色谱级甲醇配制水杨酸甲酯溶液, 使浓度控制在1 μg·mL⁻¹左右。用进样针吸取上述溶液0.1 μL, 进样。记录总离子流图、质谱图(“棒图”)。

5 结果分析与讨论

5.1 基本信息

水杨酸甲酯总离子流图显示, 其保留时间为4.29 min(图2上)。质谱棒图显示, 其分子离子峰质荷比为152, 基峰为120, 其余碎片有92, 65, 39(图2下)等。

5.2 结果初步分析

m/z 152为最右端的峰, 与之相邻的峰为120, 二者相差32, 差值在合理范围内, 故152为分子离子峰。可能含偶数个氮, 或不含氮。152到120之间差值为32, 一般此为中性片段甲醇^[13]。120到92之间质荷比相差28, 可能为羰基的碎片, 也可能是酚类的裂解碎片^[13]。*m/z* 92或91一般为取代苯的特征离子。以不含氮考虑, 则一般物质含碳、氧、氢。计算分子量为152的分子式。如为10个碳原子, 则分子式为C₁₀OH₁₆或C₁₀O₂, 均不合理。如为9个碳原子, 则分子式为C₉O₂H₁₂, 不饱和度为4; 如为8个碳原子, 则分子式为C₈O₃H₈, 不饱和度为5。

经过上述综合分析, 学生一般能推断出结构为水杨酸甲酯(邻羟基苯甲酸甲酯)、间羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸甲酯其中之一。但要确定为水杨酸甲酯有较大难度。因为本实验涉及重排裂解。

5.3 实验难点、重点讨论

此实验中涉及的第一个知识点是重排裂解, 这也是其中的重点和难点。一般教科书重点讲述的通常是McLafferty重排(麦氏重排)。不过此处涉及的重排却是“芳环邻位效应”, 只有极少数教科书提及^[14]。其原理是一些含有杂原子取代基的邻二取代苯常发生六元环过渡重排, 脱去中性分子碎片。事实上, 在水杨酸甲酯这一裂解过程中有两个途径(图3)。除了上述重排裂解之外, 仍然存在失去·OCH₃自由基的情况^[13,15]。因此, 在质谱棒图中, *m/z* 120占优势, 但也存在*m/z* 121的峰。

就“芳环邻位效应”这一主题, 我们可以拓展一下。类似地, 邻羟基苯甲醇、邻甲基苯胺、水杨酸、邻氨基酚及邻苯二酚在裂解中也会存在芳环邻位效应^[14], 在重排裂解过程中脱去水或氨(图4)。因此, 借助于这一实验, 可直观认识重排裂解, 又可巩固理论知识。对于具有相应结构的分子, 可推断出可能发生的重排。

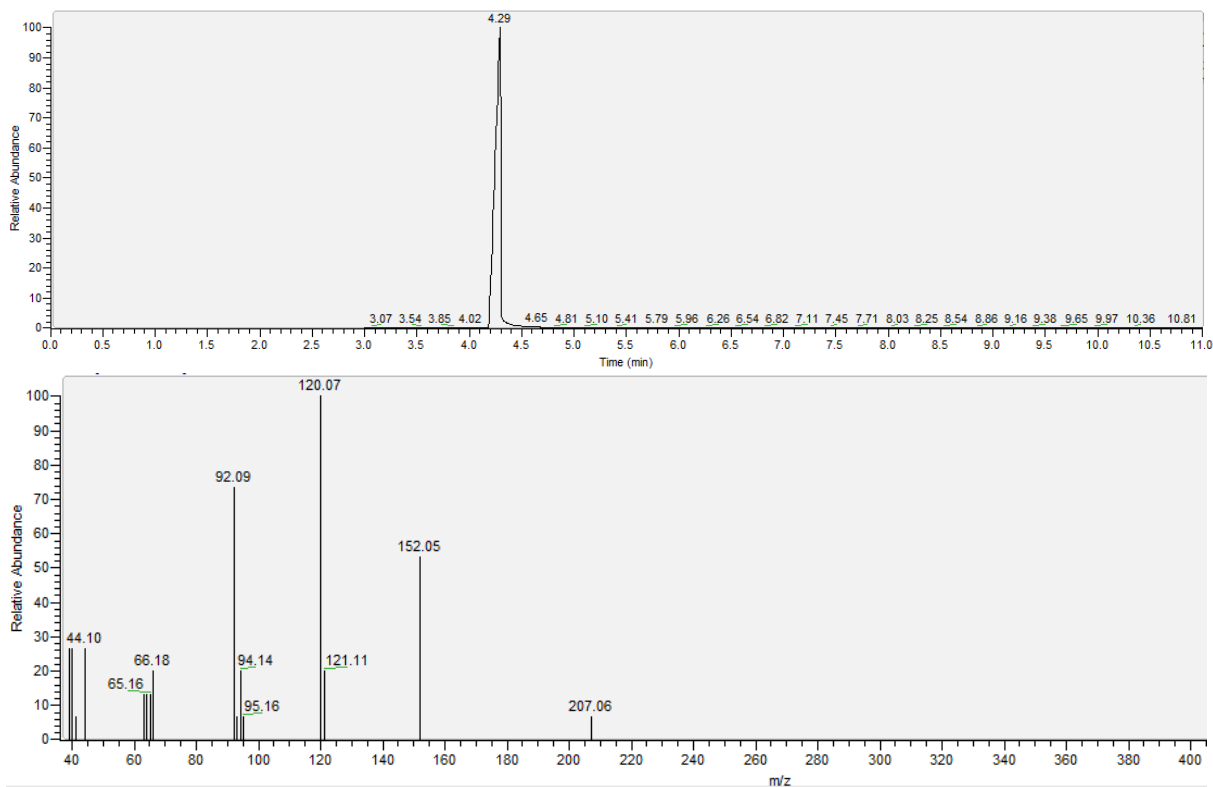


图2 水杨酸甲酯的质谱总离子流图(上)及质谱棒图(下)

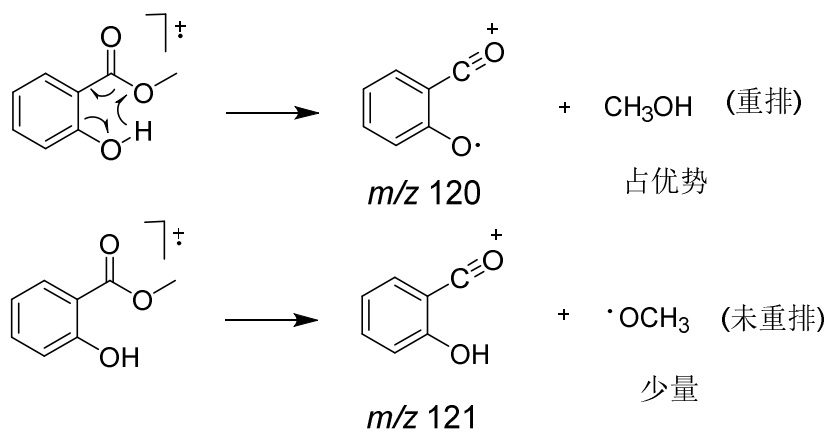


图3 水杨酸甲酯的重排(脱去CH₂OH中性分子)与非重排裂解(脱去OCH₃自由基)

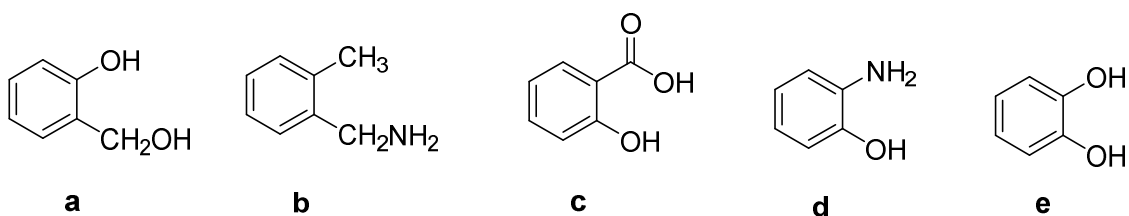


图4 具有“芳环邻位效应”的几个化合物

(a) 邻羟基苯甲醇; (b) 邻甲基苯胺; (c) 水杨酸; (d) 邻氨基酚; (e) 邻苯二酚

通过上述例子,结合理论课上的基础,学生无需刻板记忆即能基本掌握质谱的“芳环邻位效应”这一重排裂解规律,并能运用到其他类似化合物的解析之中,通过实验“反哺”理论知识。

第二个知识点是酚类的裂解规律。酚羟基上的氢容易离去重排到芳环上,随后发生 α 裂解,引起开环。接着可发生*i*断裂,失去CO,得到[M-28]的奇电子碎片离子。也可以再发生氢重排和置换反应,得到[M-29]的碎片离子。

第三个知识点是较常规的苯环裂解规律。 m/z 77, 65, 51, 39一般为苯环关联的特征峰。取代苯可能出现 m/z 91或92的峰,这也是理论及实验教学中应把握的基本知识点。

虽然随着科技的发展,质谱的解析主要依靠计算机技术,极大减少了人工解析的工作量。但面对计算机给出的可能结构式,最终确定结构仍需要人的判断。因此,对本科生而言在质谱解析中巩固、延伸基础知识,培养、提升思维能力十分重要。

5.4 与同分异构体的对比分析

为加深学生对“芳环邻位效应”知识的理解,并在实验中巩固理论知识,我们通过搜索谱库,找到下述水杨酸甲酯几个异构体的质谱图,进行对比分析。

(1) 对比分析尼泊金甲酯(对羟基苯甲酸甲酯)(图5A)、间羟基苯甲酸甲酯(图5B)的质谱图。由于二者的酚羟基没有处于甲酯的邻位,不会形成重排。因此,二者没有 m/z 120的峰,只有脱去 $\cdot\text{OCH}_3$ 自由基后的 m/z 121的峰。这一对比可以加深对“芳环邻位效应”的理解。

(2) 对比分析香兰素的质谱图(图5C)。因香兰素为醛类,其特点是有较大的[M-1]及[M-29]的峰。这是醛的特征。较易识别。

(3) 对比分析2,4-二羟基苯乙酮(图5D)、3,4-二羟基苯乙酮(图5E)的质谱图。二者的基峰都是脱去甲基后 m/z 137的峰。前者除基峰以外,其余峰的丰度均非常小。而后者先脱去一分子CO产生一个 m/z 109的峰,再脱去一分子CO后形成 m/z 81的峰。

6 教学思考

本实验具有以下特点:

(1) 所选化合物均为生活中常见或者具有重要生物活性的物质,学生实验时倍感亲切,能激发其对专业的兴趣。除上述六种化合物外,有学生想到生活中常用的樟脑、木糖醇分子量亦为152,也想测一测它们的质谱图。正如科学家爱因斯坦所言,“兴趣是最好的老师”。

(2) 联系理论与实验教学,启发思维。以水杨酸甲酯为中心设计,通过对其同分异构体质谱图的对比,不仅让学生掌握了气质联用仪的基本操作方法,又巩固了学生的质谱解析知识,在相互关联的实例中熟悉了苯环、酯、酚、醛、甲基、甲氧基等各基团的质谱裂解特征。特别是对“芳环邻位效应”这一重排裂解知识加深了认识。

(3) 本实验可培养学生综合思维能力,充分调动学生的主观能动性。笔者曾问学生,“如果用气质联用仪测间羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸甲酯,从质谱图上是否能区分开来?”答曰“非常难”或“不可能”。又问“用什么分析方法容易区分二者?”答曰“核磁共振”。由此,学生意识到“尺有所短,寸有所长”的哲学道理,也更加理解为什么化合物解析通常是四大谱进行综合解析。

(4) 本实验学时、难度灵活可调。本实验如果只测定水杨酸甲酯一般2小时内可完成。如果要测定多个化合物,学时可设置为4学时。也可以将其中一个化合物作为常规实验用,将其他化合物作为未知物进行实验考核。由于均为同分异构体,学生如果只看分子量而不进行详细解析并结合其他方法(红外、核磁)是难以得到正确答案的。

综上所述,本实验能提升本科生质谱分析的思维能力,可推荐为化学、药学、食品等相关专业本科生作为实验项目,亦可作为研究生训练素材。

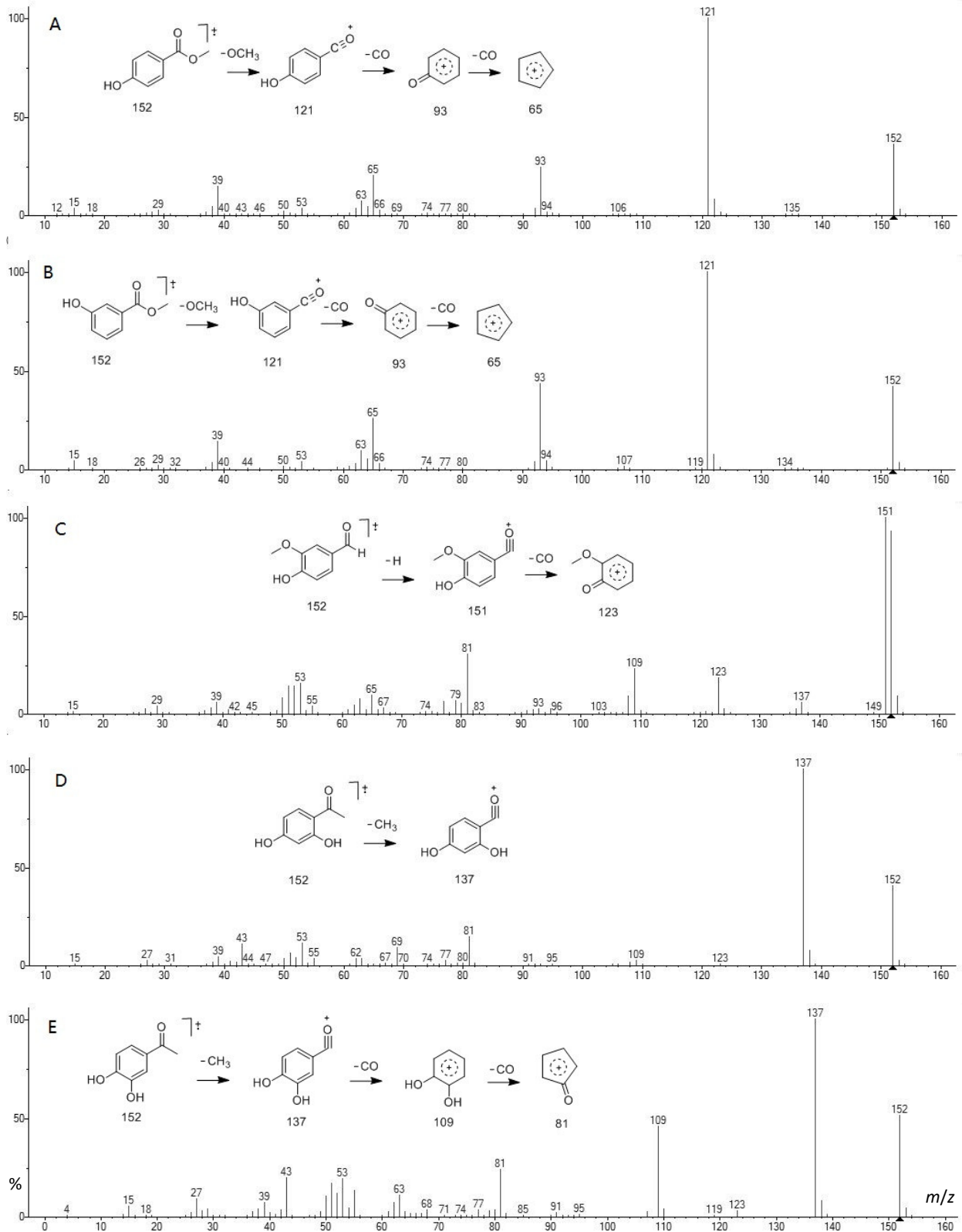


图5 质谱图

(A) 尼泊金甲酯; (B) 间羟基苯甲酸甲酯; (C) 香兰素; (D) 2,4-二羟基苯乙酮; (E) 3,4-二羟基苯乙酮

参 考 文 献

- [1] 李善奇. 化工设计通讯, **2020**, *46* (2), 143.
- [2] 肖寒霜, 朱仲良, 王晓岗, 吴梅芬, 李明芳. 实验室科学, **2014**, *17* (2), 67.
- [3] 朱秀珍, 李晓华. 首都师范大学学报(自然科学版), **2022**, *43* (5), 71.
- [4] 刘雅琴, 邹建凯, 裘雅渔. 实验室研究与探索, **2015**, *34* (10), 183.
- [5] 吴性良, 张祥民. 大学化学, **2003**, *18* (5), 48.
- [6] 王秧年, 陆大东, 叶涛, 奚中华, 李琳. 实验技术与管理, **2011**, *28* (12), 63.
- [7] 陈海滨, 池文杰, 黄晓姗. 海峡药学, **2012**, *24* (3), 56.
- [8] 张伟, 吴鹏昌. 中成药, **2009**, *31* (6), 972.
- [9] 刘玉婷, 尹大伟, 何珍红. 广州化工, **2020**, *48* (10), 153.
- [10] 杨文文, 吴秋林, 唐鸿志, 许平. 微生物学通报, **2013**, *40* (6), 1087.
- [11] 孙莉莉, 赵永梅, 罗稳. 精细化工, **2016**, *33* (2), 172.
- [12] Qian, Y. P.; Shang, Y. J.; Teng, Q. F.; Chang, J.; Fan, G. J.; Wei, X.; Li, R. R.; Li, H. P.; Yao, X. J.; Fang, D. *Food Chem.* **2011**, *126*, (1), 241.
- [13] 王光辉, 熊少祥. 有机质谱解析. 第1版. 北京: 化学工业出版社, 2005: 63–159.
- [14] 卢汝梅, 何桂霞. 波谱分析. 第1版. 北京: 中国中医药出版社, 2017: 218–219.
- [15] 陈焕文. 分析化学手册-9A-有机质谱分析. 北京: 化学工业出版社, 2020: 394–395.