

N-烷基酰胺类化合物 电喷雾质谱裂解机制的研究

董洁, 冀娇娇, 王加利, 袁将, 高简, 张亚丽,
姬瑞芳, 全庆华, 谭鹏, 刘永刚

(北京中医药大学, 北京 100102)

摘要:为阐明维吾尔族药阿纳其根中 N-烷基酰胺类成分的质谱裂解机制, 采用电喷雾离子源(ESI)正离子模式进行多级碎片解析, 对阿纳其根中分离得到 5 种 N-烷基酰胺类成分: 十-2*E*, 4*E*-二烯酸-异丁基胺, 十一-2*E*, 4*E*-二烯-8, 10 二炔酸-苯乙胺, 十-2*E*, 4*E*-二烯酸-4-羟基苯乙胺, 十二-2*E*, 4*E*-二烯酸-4-羟基苯乙胺和十四-2*E*, 4*E*-二烯酸-4-羟基苯乙胺, 应用密度泛函(DFT)法比较不同裂解方式的优化结构, 并分析其可能的质谱裂解机制。结果表明, 在正离子模式下, 5 种 N-烷基酰胺类成分均易形成 $[M+H]^+$ 准分子离子, 并进一步发生 N-位的 α 裂解, 丢失酰胺结构中胺部分、羰基以及水等而形成碎片离子。该类化合物的裂解规律可为 N-烷基酰胺类化合物的结构鉴定和定量分析奠定理论基础。

关键词: N-烷基酰胺类成分; 电喷雾串联质谱(ESI-MSⁿ); 裂解途径; 量子计算化学

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2017)01-0083-06

doi: 10.7538/zpxb.2017.38.01.0083

Fragmentation Pathways and Patterns of N-Alkylamides by ESI-MSⁿ

DONG Jie, JI Jiao-jiao, WANG Jia-li, YUAN Jiang, GAO Jian, ZHANG Ya-li,

JI Rui-fang, QUAN Qing-hua, TAN Peng, LIU Yong-gang

(School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100102, China)

Abstract: There are 4 main types of N-alkylamides in *Anacyclus pyrethrum* DC., namely, isobutylamide (IBA), N-Me isobutylamide (N-Me IBA), 2-phenylethylamide (2-PEA) and 4-hydroxyphenylethylamide (4-OH PEA). However, there was very few research on the fragmentation pathways of N-alkylamides by now. In order to obtain accurate and comprehensive information about the fragmentation pathways of N-alkylamides, 5 kinds of N-alkylamides were analyzed by HPLC-ESI-MSⁿ. They are identified as deca-2*E*, 4*E*-dienoic acid isobutylamide, undeca-2*E*, 4*E*-diene-8, 10-dienoic acid phenylethylamide, deca-2*E*, 4*E*-dienoic acid 4-hydroxyphenylethylamide, dodeca-2*E*, 4*E*-dienoic acid 4-hydroxyphenyl-ethylamide and tetradeca-2*E*, 4*E*-dienoic acid 4-hydroxy-

收稿日期: 2016-06-06; **修回日期:** 2016-10-03

基金项目: 新疆自然科学基金项目(201318101-5)资助

作者简介: 董洁(1993—), 女(汉族), 甘肃人, 硕士研究生, 中药化学专业。E-mail: dongjie5255@163.com

通信作者: 谭鹏(1980—), 男(汉族), 山东潍坊人, 副教授, 从事中药炮制研究。E-mail: tanpengtcm@163.com

刘永刚(1981—), 男(汉族), 山东临沂人, 副教授, 从事中药化学研究。E-mail: liuyg0228@163.com

phenylethylamide. Multi-stage mass spectrum diagrams of five *N*-alkylamides were obtained in positive ion mode. Simultaneously, the method of quantum computational chemistry was adopted to verify their fragmentation pathways. Characteristic fragment ions were identified and the patterns were deduced further. The fragmentation patterns and structural assignment of ‘isobutylamides (IBA)’ type, ‘2-phenylethylamide (2-PEA)’ type and ‘4-hydroxyphenylethyl-amides (4-OH PEA)’ type in ESI-MSⁿ under positive ion mode were summarized. The results show that five *N*-alkylamides have the similar fragmentation pathway, $[M+H]^+$ is prone to α -cracking in *N*-position at the first, loss of 28(CO), 18(H₂O) subsequently. These compounds have strong pyrolysis rules and the study can provide reference for *N*-alkylamides in structural identification and quantitative analysis.

Key words: *N*-alkylamides; ESI-MSⁿ; fragmentation pathways; quantum computational chemistry

N-烷基类化合物多为一端较长不饱和酸和另一端有较少取代基的胺构成的酰胺结构,是广泛存在于菊科、马兜铃科等植物中的一类重要天然产物。据文献报道,*N*-烷基类成分具有抗病毒、抗炎等药理活性^[1],此外还具有酪氨酸酶激活作用^[2]。

目前,关于 *N*-烷基类成分的研究报道多为对其提取物进行 LC/MS 分析,如,Boonen 等^[3-4]采用 HPLC-UV-ESI-MS 法从阿纳其根的乙醇提取物中鉴定了 13 种 *N*-烷基类成分,从金纽扣的乙醇提取物中鉴定了 11 种 *N*-烷基类成分,但并未进一步研究这一类单体成分的质谱裂解机制。高效液相色谱-电喷雾串联质谱(HPLC-ESI-MSⁿ)技术集合了色谱强大的分离能力与质谱优越的定性功能,现已广泛用于中药复杂成分分析和化合物结构鉴定等领域^[7-10],而量子化学计算^[11-15]可以辅助推测化合物的电喷雾质谱裂解途径和裂解规律。

鉴于目前对 *N*-烷基类成分物质基础研究的缺乏,本研究拟采用 HPLC-ESI-MSⁿ 结合量子化学计算方法,对维吾尔族药阿纳其根中分离得到的 5 种 *N*-烷基酰胺类成分的质谱裂解机制进行研究,以期对 *N*-烷基酰胺类成分的结构鉴定及复杂样品的快速检测和定量分析提供理论依据和方法参考。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Agilent 1100 series HPLC 色谱仪:美国 Ag-

ilent 公司产品,配有在线脱气机、四元泵、自动进样器、柱温箱、DAD 检测器、Chem stations 色谱工作站等;Agilent 1100 MSD XCT/plus 离子阱质谱仪:美国 Agilent 公司产品;Satorious 十万分之一电子天平:德国 Satorious 公司产品。

化合物 a~e:均由本实验室从阿纳其根(*Anacyclus pyrethrum* DC.)中提取分离制备得到,经核磁共振确定其结构,经 HPLC-UV 鉴定其纯度达 98% 以上;乙腈(色谱纯):美国 Fisher Scientific 公司产品;甲酸:美国 Sigma 公司产品;实验用水:屈臣氏蒸馏水;其他试剂均为分析纯。

1.2 实验条件

1.2.1 样品制备 将 2 kg 阿纳其根药材粉碎成粗粉,用 10 倍量 70% 乙醇回流提取 3 次,每次 1.5 h,回收溶剂,得到 272 g 浸膏。依次用石油醚、二氯甲烷、乙酸乙酯萃取浸膏,减压回收溶剂,得到 40 g 二氯甲烷部位。用 1.5 倍硅胶拌样,200~300 目硅胶装柱(硅胶与浸膏质量比为 1:50),依次用不同体积比的石油醚-乙酸乙酯(10:1,7:1,5:1,3:1,1:1)及乙酸乙酯进行梯度洗脱,洗脱液经硅胶薄层鉴别后,合并组成相似的流分,每个流分再经硅胶、C18 反复柱层析,得到化合物 a~e。

1.2.2 色谱条件 Agilent Extend-C18 柱(4.6 mm×250 mm, 5 μm);流动相:乙腈-0.1% 甲酸水溶液(70:30, V:V);流速 1 mL/min;柱温 30 °C;进样体积 10 μL。

1.2.3 质谱条件 电喷雾(ESI)离子源,正离子模式;质量扫描范围 m/z 100~1 500;雾化气和干燥气均为氮气,纯度>99.99%;干燥气流速11 L/min;雾化气压力 241.5 kPa;碰撞气为氦气;喷雾电压 3 500 V;碰撞能量 1 eV;采用 Agilent 6300 离子阱工作站(6.1版)进行数据处理。

1.2.4 量子化学计算方法 所有理论计算均应用 Gaussian03 程序完成,采用密度泛函(DFT)法并选择 6-31G 基组,几何优化分析在 B3LYP/6-31d 水平上计算。

2 结果与讨论

2.1 一级质谱分析

N-烷基酰胺类成分可分为 *N*-异丁基酰胺类(IBA),苯乙基酰胺类(2-PEA),苯乙基酰胺类(4-OH PEA)等,它们结构相似,区别仅见于组成它们的胺结构不同。在电喷雾正离子模式下,5种化合物均以 $[M+H]^+$ 准分子离子形式存在,几乎没有碎片离子,易于确定化合物的相对分子质量。5种 *N*-烷基酰胺类成分(分别对应化合物 a~e)的化学结构式示于图 1,其一级质谱图示于图 2。

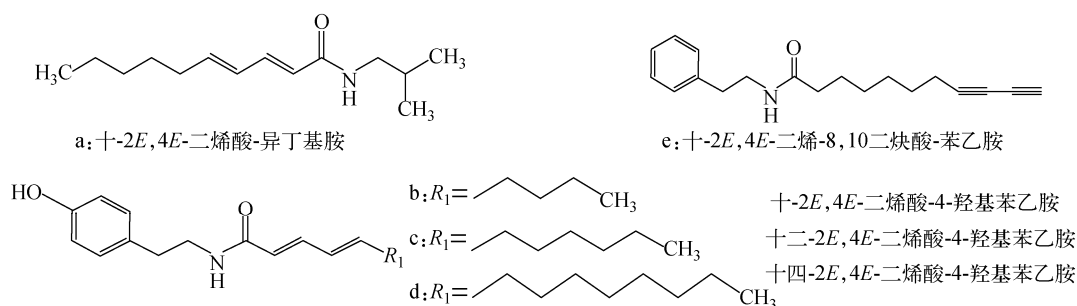
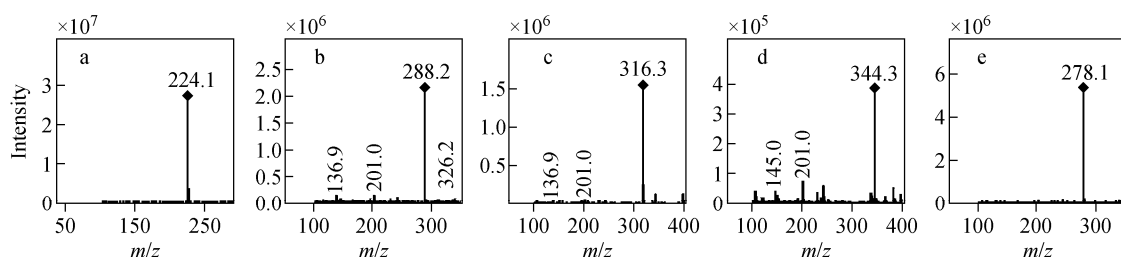


图 1 5种 *N*-烷基酰胺类化合物的化学结构式

Fig. 1 Chemical structures of five *N*-alkylamides



注: a. 十-2*E*,4*E*-二烯酸-异丁基胺; b. 十-2*E*,4*E*-二烯酸-4-羟基苯乙胺;

c. 十二-2*E*,4*E*-二烯酸-4-羟基苯乙胺; d. 十四-2*E*,4*E*-二烯酸-4-羟基苯乙胺; e. 十一-2*E*,4*E*-二烯-8,10二炔酸-苯乙胺

图 2 正离子模式下,5种 *N*-烷基酰胺化合物的 ESI-MS 图

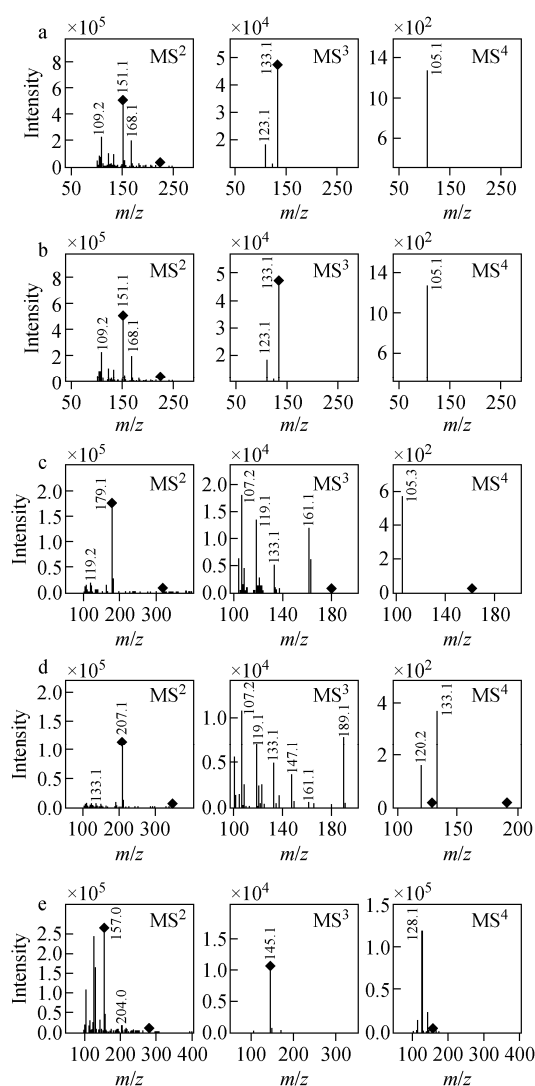
Fig. 2 ESI-MS spectra of five *N*-alkylamides in positive ion mode

2.2 ESI-MSⁿ 分析

为进一步分析化合物的结构与裂解途径的关系,对 5 种化合物的 ESI-MSⁿ 碰撞诱导裂解(CID)规律进行研究,所得的质谱图示于图 3。5 种化合物在正离子模式下的 ESI-MSⁿ 碎片裂解信息列于表 1。

2.2.1 异丁基酰胺类(IBA)化合物的质谱裂解途径分析 十-2*E*,4*E*-二烯酸-异丁基胺属于 IBA 类,准分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 224。由

图 3a 可知,在二级质谱图中出现了两个相对丰度较高的碎片离子 m/z 168 和 m/z 151。其中, m/z 168 是化合物结构上的 *N* 位发生 α 裂解丢失异丁基而形成的碎片离子; m/z 151 是化合物结构上的 *N* 位发生 α 裂解丢失 *N*-异丁基而形成的碎片离子。在其三级质谱图中,出现了 m/z 133 和 m/z 123 碎片离子。其中, m/z 123 是由 m/z 151 离子碎裂失去羰基(28 u)形成的碎片离子; m/z 133 可能是由 m/z 151 离



注: a. 十-2E,4E-二烯酸-异丁基胺;
b. 十-2E,4E-二烯酸-4-羟基苯乙胺;
c. 十二-2E,4E-二烯酸-4-羟基苯乙胺;
d. 十四-2E,4E-二烯酸-4-羟基苯乙胺;
e. 十一-2E,4E-二烯-8,10-二炔酸-苯乙胺

图3 5种N-烷基酰胺类化合物的ESI-MSⁿ图
Fig.3 ESI-MSⁿ spectra of five N-alkylamides

子经电荷转移和重排失去水(18 u)形成的碎片离子。在四级质谱图中, m/z 133 碎片进一步丢失 C_2H_4 (28 u) 碎片,生成 m/z 105 碎片离子。

2.2.2 4-羟基苯乙基烷基酰胺类(4-OH PEA)化合物的质谱裂解途径分析 十-2E,4E-二烯酸-4-羟基苯乙胺、十二-2E,4E-二烯酸-4-羟基苯乙胺、十四-2E,4E-二烯酸-4-羟基苯乙胺 3 个化合物属于 4-OH PEA 类,它们的区别是不饱和脂肪酸链长度不同,结构上相差 $(C_2H_4)_n$ 。下面以十-2E,4E-二烯酸-4-羟基苯乙胺为例,对这类成分的裂解途径进行阐释。

十-2E,4E-二烯酸-4-羟基苯乙胺的准分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 288,由图 3b 可见,在二级质谱图中出现了两个相对丰度较高的碎片离子 m/z 168 和 m/z 151。其中, m/z 168 是准分子离子 $[M+H]^+$ 化合物结构上的 N 位发生 α 裂解丢失 4-羟基苯乙胺而形成的碎片离子;而 m/z 151 是该化合物结构上的 N 位发生 α 裂解丢失 N -4-羟基苯乙胺而形成的碎片离子。在三级质谱图中,出现了 m/z 133 和 m/z 123 碎片离子。其中, m/z 123 是由 m/z 151 离子碎裂失去羰基(28 u)形成的碎片离子; m/z 133 离子可能是由 m/z 151 离子经电荷转移和重排失去水(18 u)形成的碎片离子。在四级质谱图中, m/z 133 而进一步丢失 C_2H_4 (28 u) 而生成 m/z 105 碎片离子。

十-2E,4E-二烯酸-异丁基胺和十-2E,4E-二烯酸-4-羟基苯乙胺的裂解模式示于图 4。

十二-2E,4E-二烯酸-4-羟基苯乙胺(图 3c)与十四-2E,4E-二烯酸-4-羟基苯乙胺(图 3d)因结构上有较长的直链烷基,还出现了一系列相差 $(CH_2)_n$ 的碎片离子,如:十四-2E,4E-二烯酸-4-

表 1 正离子模式下,5 种 N-烷基酰胺类化合物的多级碎片信息

Table 1 Fragmentation of five N-alkylamides in positive ion mode

化合物 Compound	$[M+H]^+$	MS ²	MS ³	MS ⁴
A	224.1	168.1 151.1	133.1,123.1	105.2
B	278.1	157.0	145.1	128.1
C	288.2	168.1 151.2	133.1,123.2	105.2
D	316.3	179.1	161.1,133.1,119.1	105.3
E	344.3	207.1	189.1,161.1,147.1,133.1,119.1	

羟基苯乙胺的三级质谱图中,母离子 m/z 207 丢失水及质量数相差 14 的一系列碎片离子生成 m/z 189 和 m/z 161、147、133、119。

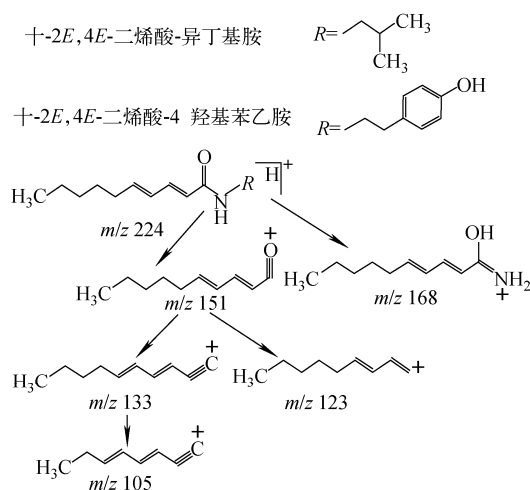


图 4 十-2*E*,4*E*-二烯酸-异丁基胺和十-2*E*,4*E*-二烯酸-4-羟基苯乙胺的裂解模式
Fig. 4 Fragmentation patterns of deca-2*E*, 4*E*-dienoic acid isobutylamide and deca-2*E*, 4*E*-dienoic acid-4-hydroxyphenylethylamide

2.2.3 苯乙基酰胺类(2-PEA)化合物的质谱裂解途径分析 十一-2*E*,4*E*-二烯-8,10-二炔酸-苯乙胺属于 2-PEA 类化合物,其分子离子 $[M+H]^+$ 为 m/z 278,由图 3e 可见,二级质谱图中, m/z 157 是由 m/z 278 化合物结构上的 *N* 位发生 α 裂解丢失 *N*-苯乙基而形成的碎片离子;在三级质谱图中,出现了 m/z 145 碎片离子,它是由 m/z 157 离子碎裂失去 C(12 u)形成的碎片离子;在四级质谱图中,母离子 m/z 145 经电荷转移和重排失去水(18 u)生成了 m/z 127 碎片离子,其可能的裂解途径示于图 5。

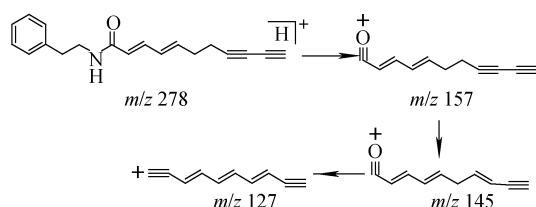


图 5 十一-2*E*,4*E*-二烯-8,10-二炔酸-苯乙胺的裂解模式
Fig. 5 Fragmentation pattern of undeca-2*E*, 4*E*-diene-8,10-diynoic acid phenylethylamide

2.2.4 质谱裂解的量子化学计算 通过分析十-2*E*,4*E*-二烯酸-异丁基胺、十-2*E*,4*E*-二烯酸-4-羟基苯乙胺、十二-2*E*,4*E*-二烯酸-4-羟基苯乙胺和十四-2*E*,4*E*-二烯酸-4-羟基苯乙胺这 4 种化合物的多级质谱数据,发现它们具有相似的质谱裂解规律,即在发生酰胺结构上 *N*-位,裂解后,继续丢失 H_2O (18 u),推测其脱水后可能生成的结构为二烯炔或二炔。采用量子化学计算分别对这两种结构进行最低能量构象的优化,二烯炔结构优化后最低能量 HF = -388.319 2 a. u.,二炔结构优化后最低能量 HF = -388.233 1 a. u.,说明二烯炔结构更加稳定,可由此确认以上 4 种化合物的三级质谱离子为二烯炔结构。

3 结论

采用 HPLC-ESI-MSⁿ 法对阿纳其根中分离得到的 5 种 *N*-烷基酰胺类成分进行质谱裂解机制研究,结合量子化学计算法,分析了这类成分的主要碎片离子和裂解模式。结果表明,在正离子模式下,5 种 *N*-烷基类成分具有相似的质谱裂解规律,均易形成 $[M+H]^+$ 准分子离子,然后进一步发生 *N*-位的 α 裂解,丢失酰胺结构中胺的部分、羰基、水等碎片形成碎片离子。采用量子化学计算法对十-2*E*,4*E*-二烯酸-异丁基胺、十-2*E*,4*E*-二烯酸-4-羟基苯乙胺、十二-2*E*,4*E*-二烯酸-4-羟基苯乙胺和十四-2*E*,4*E*-二烯酸-4-羟基苯乙胺等 4 种化合物的三级质谱离子进行了最低能量构象的优化,结果显示,二烯炔结构更加稳定。通过对这 5 种 *N*-烷基酰胺类成分质谱裂解机制的研究,可为 *N*-烷基酰胺类成分的结构鉴定及复杂样品的快速检测提供理论依据和方法参考。

参考文献:

- [1] BOONEN J, BRONSELAER A, NIELANDT J, et al. Alkamid database: chemistry, occurrence and functionality of plant *N*-alkylamides[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 142(3): 563-590.
- [2] 古丽娜尔·卡斯木. 阿纳其根化学成分及其酪氨酸酶活性筛选研究[D]. 乌鲁木齐:新疆医科大学,2014.
- [3] BOONEN J, BAERT B, BURVENICH C, et al.

- LC-MS profiling of *N*-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol[J]. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 2010, 53(3): 243-249.
- [4] BOONEN J, SHARMA V, DIXIT V K, et al. LC-MS *N*-alkylamide profiling of an ethanolic *Anacyclus pyrethrum* root extract[J]. *Planta Medica*, 2012, 78(16): 1 787-1 795.
- [5] ANNALAKSHMI R, UMA R, CHANDRAN G S, et al. A treasure of medicinal herb-*Anacyclus pyrethrum*-A review[J]. *Indian Journal of Drugs and Diseases*, 2012, 1(3): 59-67.
- [6] KUMAR V K, LALITHA K G. Pharmacognostical studies on the root of *Anacyclus pyrethrum* DC[J]. *Indian Journal of Natural Products and Resources*, 2012, 3(4): 518-526.
- [7] HAYASHIDA M, HAYAKAWA H, WADA K, et al. A column-switching LC/MS/ESI method for detecting tetrodotoxin and *Aconitum alkaloids* in serum[J]. *Legal Medicine*, 2003, 5: S101-S104.
- [8] HAN J, TAN P, LI Z, et al. Fuzi attenuates diabetic neuropathy in rats and protects schwann cells from apoptosis induced by high glucose[J]. *Plos One*, 2014, 9(1): e86 539-e86 539.
- [9] LIU Y G, ZHANG Q S, LU Y Q, et al. Analysis of aconitine metabolites in ten-year aconitine poisoning human liver sample using high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Asian Journal of Chemistry*, 2014, 26(14): 4 277-4 280.
- [10] LIU Y G, TAN P, LI F, et al. Study on the aconitine-type alkaloids of and its processed products using HPLC-ESI-MS[J]. *Drug Testing & Analysis*, 2013, 5(6): 480-484.
- [11] 詹雪艳, 张燕玲, 张加余, 等. 积雪草苷和羟基积雪草苷的电喷雾质谱裂解机制研究[J]. *质谱学报*, 2015, 36(4): 289-295.
- ZHAN Xueyan, ZHANG Yanling, ZHANG Jia-yu, et al. Fragmentation pathway and patterns of *Asiaticoside* and *Madecassoside* in ESI-MSⁿ [J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2015, 36(4): 289-295(in Chinese).
- [12] 欧阳永中. 电子轰击和电喷雾电离源有机质谱裂解规律的量子化学解析[D]. 长沙: 中南大学, 2010.
- [13] 梦海. 量子化学计算方法与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
- [14] 陈兰慧, 金莲姬, 苏忠民, 等. 乌头碱类生物碱电喷雾串联质谱行为及碎片离子稳定性的量子化学计算[J]. *高等学校化学学报*, 2005, 26(12): 2 340-2 344.
- CHEN Lanhui, JIN Lianji, SU Zhongmin, et al. ESI-MS behavior and quantum chemistry calculation of stability of fragmentation of diester-diterpenoid alkaloids[J]. *Chemical Journal of Chinese University*, 2005, 26(12): 2 340-2 344(in Chinese).
- [15] ZHANG G, MUSGRAVE C B. Comparison of DFT methods for molecular orbital eigenvalue calculations[J]. *The Journal of Physical Chemistry A*, 2007, 111(8): 1 554-1 561.