

电喷雾萃取电离-串联质谱中 *N,N*-二乙基苯胺类化合物的特征碎裂反应

张小平, 钟达财, 陈宏汉, 陈焕文

(东华理工大学, 江西省质谱科学与仪器重点实验室, 江西 南昌 330013)

摘要:掌握串联质谱中的裂解反应是深刻理解质谱裂解规律, 从而对复杂基体中相关化合物进行快速、精准结构解析的关键。本文以电喷雾萃取电离-串联质谱(EESI-MS/MS)为手段, 研究 *N,N*-二乙基苯胺类化合物的串联质谱行为, 考察不同的取代基模式对裂解反应的影响, 揭示裂解反应机理, 总结该类化合物发生裂解反应的特征和基本规律。研究结果不仅丰富了气相离子化学的研究内容, 还从根本上降低了检测的假阳性率, 为实际样品中相关化合物的结构分析鉴定提供了科学依据。

关键词:电喷雾萃取电离串联质谱(EESI-MS/MS); *N,N*-二乙基苯胺; 裂解机理

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2020)06-0529-06

doi: 10.7538/zpxb.2019.0101

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Characteristic Fragmentation Behavior of *N,N*-Diethylaniline Compounds by Extractive Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry

ZHANG Xiao-ping, ZHONG Da-cai, CHEN Hong-han, CHEN Huan-wen

(Jiangxi Key Laboratory for Mass Spectrometry and Instrumentation,

East China University of Technology, Nanchang 330013, China)

Abstract: Electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) is commonly used nowadays in the structural analysis of a large variety of compounds. Successful structure elucidation based on tandem mass spectrometry (MS/MS) data is dependent on correct interpretation of the fragmentation pathways. However, MS/MS based structural elucidation has been challenging due to the widespread rearrangement reactions in the fragmentation process. Thus, mastering the migration reaction mechanism in MS/MS is a key to deeply understand the fragmentation behavior and to clarify the structure elucidation of related compounds in complex matrices. In this work, the fragmentation reac-

收稿日期: 2019-07-26; 修回日期: 2020-04-13

基金项目: 国家自然科学基金(21520102007); 长江学者和创新团队发展计划项目(IRT13054); 东华理工大学科研基金(DHBK2016131)资助

作者简介: 张小平(1989—), 女(汉族), 湖南耒阳人, 讲师, 从事有机质谱分析研究。E-mail: zhangxpsunshine@163.com

通信作者: 陈焕文(1973—), 男(汉族), 江西兴国, 教授, 从事质谱分析研究。E-mail: chw8868@gmail.com

tions of protonated *N,N*-diethylaniline compounds were researched by EESI-MS. The intramolecular reactions included proton transfer, electron transfer, and hydride transfer reaction were occurred in the gas phase dissociation of protonated *N,N*-diethylaniline compounds, which were explored by extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry (EESI-MS/MS). Upon collisional activation, protonated *N,N*-diethylaniline underwent dissociation reaction via cleavage of the bond to give reactive ion-neutral complex (INC) intermediate. INC was found to be ubiquitous in gas-phase ion reactions. To support the proposed mechanism, deuterium-labeled experiments and the effects of different substituents on the fragmentation reaction were prepared and evaluated. The typical characteristics and basic rules of fragmentation reaction of these compounds were summarized. The implementation of this project not only enriches the research content of gas-phase ion chemistry, but also fundamentally reduces the false positive rate of detection, providing a scientific basis for structural analysis and identification of related compounds in actual samples.

Key words: extractive electrospray ionization tandem mass spectrometry (EESI-MS/MS); *N,N*-diethylaniline; fragmentation mechanism

质谱是现代众多分析测试技术中特异性好、灵敏度高、响应速度快的普适性技术。电喷雾串联质谱(ESI-MS/MS)技术因具备多级质谱的结构解析等功能,已成为化合物结构鉴定的重要工具。ESI-MS中形成的离子主要为准分子离子,如 $[M+H]^+$ 、 $[M+Na]^+$ 和 $[M-H]^-$ 等。经过低能量的碰撞诱导解离(CID),准分子离子的裂解一般遵循“偶电子规则”,即产生偶电子碎片离子和中性分子。对碎片离子的结构以及形成机理进行研究有助于推导未知化合物的结构。

经过几十年的发展,ESI-MS/MS技术在有机化合物的气相裂解反应机理研究方面取得了较大进步,一些具有普适性的裂解规律模型在化合物的结构解析方面得到了较好应用。如美国华人质谱学家涂亚平提出的ESI-MS/MS中“解离的质子化位点”理论模型^[1]。国内学者潘远江教授课题组^[2-7]系统地研究了一系列含氮药物分子的质子在不同位点间的转移,进一步完善并拓宽了该理论模型的应用范围。该课题组还提出了苄基迁移反应理论模型,用来解释多种药物分子的异常碎裂反应^[8-9]。离子/中性复合物(INC)中间体介导的裂解模型也被提出并受到质谱学家们的广泛关注,该模型可用来解释特殊的裂解反应^[10]。了解基本的碎裂规律是理解复杂重排反应的关键,发现特殊反应并总结其裂解规律,可为实际样品中相关化

合物的结构表征提供理论依据。

近年来,随着常压质谱电离技术的出现,无需样品预处理即可直接获得复杂基体中目标物分子层次上的结构信息。为适应不同形态复杂基体样品快速直接分析的需求,国内外提出了100余种新型直接电离技术。本课题组^[11-14]开发的电喷雾萃取电离(EESI)技术的工作原理是样品(含有复杂基体)在电中性条件下被气动雾化,形成微小液滴后再与ESI产生的试剂液滴(甲醇/水)在敞开的大体积空间交叉、碰撞、融合,伴随着发生在敞开环境中的液-液微萃取过程,在三维空间内完成能荷传递作用,形成目标分子离子,从而在快速分析复杂生物样品的同时极大地降低了基体信号干扰。EESI电离区的独特设计使样品分子避免了高能量直接撞击,所以这是一种比ESI更温和的软电离技术。自发明后,EESI迅速在生物气体和流体等分析领域得到广泛应用,拓展了直接质谱分析技术在粘稠液体、固态、气态等样品检测中的应用^[11-12,15]。本实验室前期研究以一价正离子为例,采用EESI-MS/MS和ESI-MS/MS技术研究罗丹明B的裂解行为,发现仅改变离子源,碎片离子的种类没有明显变化,而碎片离子的丰度存在显著差异,来源于两种离子源的内能差异^[16]。因此,为适应复杂基体样本中实际样本结构鉴定分析的需要,有必要开展直接质

谱技术中化合物的碎裂过程与碎裂规律研究。

芳香胺类化合物是一种重要的化工原料或中间体,是农药、高分子材料、医药、橡胶、炸药、以及染料等的重要原料^[17]。该类化合物可通过吸入或皮肤渗透而导致中毒,具有致癌作用^[17]。近年来,芳香胺的大量使用给人类健康与环境带来了巨大危害,欧盟等已将其列入环境中必须监测的污染物。目前,对芳香胺类化合物的分析检测方法有气相色谱-质谱法^[18]、液相色谱-质谱法^[19-20]、电化学法^[21]、表面增强拉曼光谱法^[22]等。已有文献对 ESI-MS/MS 芳香胺的裂解行为进行报道^[23-24],为该类化合物的结构解析提供了理论依据。但采用 EESI-MS/MS 技术研究芳香胺类化合物的碎裂行为的报道则较少。

本工作以 EESI-MS/MS 为手段,研究 *N,N*-二乙基苯胺类化合物的串联质谱行为,考察不同的取代基模式对裂解反应的影响,揭示其裂解反应的机理,总结该类化合物发生裂解反应的特征和基本规律。

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

EESI 离子源:本实验室自行研制搭建; LTQ-XL 型线性离子阱质谱仪:美国 Thermal Fisher 公司产品,配有 Xcalibur 数据处理系统; N_2 、Ar 气:纯度 $>99.999\%$,江西国腾气体有限公司产品。

甲醇:色谱纯,美国 Sigma-Aldrich 公司产品; *N,N*-二乙基苯胺、4-甲基-*N,N*-二乙基苯胺、4-醛基-*N,N*-二乙基苯胺、*N,N*-二乙基(d_6)苯胺:均为上海百灵威有限公司产品。

1.2 质谱条件

1.2.1 直接进样串联质谱实验 ESI 电离源,正离子模式检测,质量扫描范围 m/z 50~300。首先用甲醇溶解待测样品,稀释至 0.1 mg/L,再用注射泵将稀释液以 3 $\mu\text{L}/\text{min}$ 注入离子源。

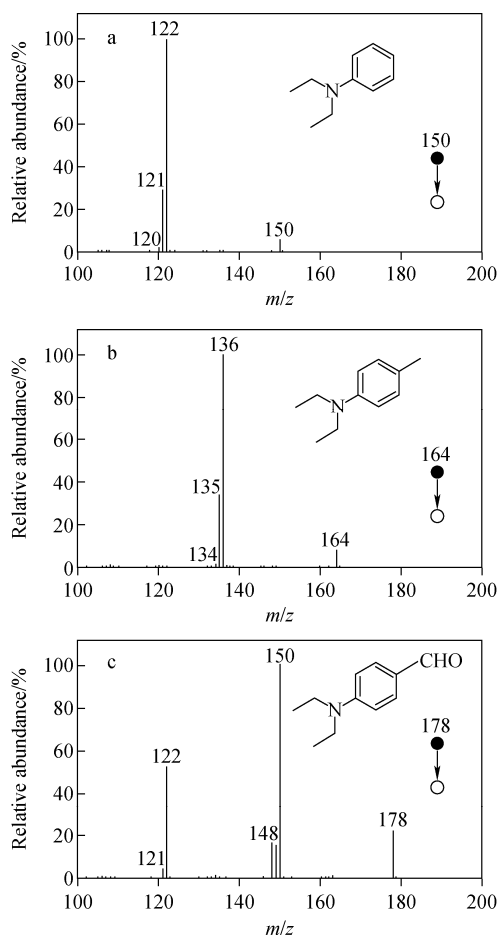
1.2.2 EESI-MS/MS 实验 雾化气(氮气, 99%)压力 1 MPa,喷雾针电压 4 kV,离子传输管温度 200 $^{\circ}\text{C}$,毛细管锥孔电压 8 V,透镜电压 95 V。整个质谱仪真空系统主要由三级差分抽气真空组成:前级真空度 173.29 Pa,二级真空度 0.13 Pa,离子阱真空度 1.33×10^{-3} Pa。

1.2.3 二级质谱实验 离子阱中缓冲气和多级质谱的碰撞气均为高纯氦气(99.999%);碰撞能量设定在 15%~30%(100%相当于 5 V 的激发电压);目标离子的质量选择宽度为 m/z 1.0,碰撞活化时间为 30 ms;碰撞活化值 Q 为 0.25;每一张质谱图都是超过 50 次扫描的平均图;采用 Xcalibur 1.4 软件进行数据采集和处理。

2 结果与讨论

2.1 *N,N*-二乙基苯胺的裂解行为

N,N-二乙基芳香胺类化合物中的氮原子含有孤对电子,容易缔合质子,形成稳定的质子化离子 $[M+H]^+$,因此,需选用正离子模式进行检测分析。*N,N*-二乙基芳香胺类化合物的碰撞诱导解离质谱(CID-MS)示于图 1。以



注:a. 质子化 *N,N*-二乙基苯胺 (m/z 150);

b. 质子化 4-甲基-*N,N*-二乙基苯胺 (m/z 164);

c. 质子化 4-醛基-*N,N*-二乙基苯胺 (m/z 178)

图1 *N,N*-二乙基苯胺类化合物的串联质谱图

Fig. 1 MS/MS spectra of *N,N*-diethyl benzenamines

N,N-二乙基苯胺为模型化合物,研究其在电喷雾萃取电离-串联质谱中的裂解行为。在一级质谱图中可观测到基峰 *N,N*-二乙基苯胺质子化分子离子 m/z 150,示于图 1a。 m/z 150 离子经碰撞活化,主要产生 3 个碎片离子,即 m/z 122、121、120。其中, m/z 122 离子为 *N*-乙基苯胺质子化离子, m/z 121 离子为 *N*-乙基苯胺奇电子离子,其形成途径示于图 2。质子化 *N,N*-二乙基苯胺首先发生 i 断裂形成[乙基阳离子/*N*-乙基苯胺]离子中性复合物,该离子中性复合物继续发生质子迁移和单电子迁移,分别得到产物离子 m/z 122 和 m/z 121。

在 ESI-MS/MS 中,质子转移反应是最常见的重排反应。潘远江课题组提出了“解离的质子化位点”理论模型,并报道了一系列质子转移的相关碎裂反应^[7]。在 ESI-MS/MS 碎裂过程中,单电子转移反应相对比较罕见,原因是共价键的直接均裂需要克服较高的能垒,而碰撞诱导解离过程中优先发生低能量的重排反应。若要发生单电子转移反应,则要求中性粒子的电离能足够低,从而为电子转移反应创造有利条件。因此,相对来说,单电子转移反应比质子转移反应更难发生。

母离子丢失 30 u(乙烷)生成 m/z 120 离子。从分子结构来看,有两种丢失的可能:一种是丢失末端的 2 个甲基自由基;另一种是乙基夺取另一侧的 1 个氢后进一步丢失乙烷,即发生负氢迁移反应,示于图 2。负氢迁移反应需要有合适的供体和受体。比如,存在苄基阳离子时,非常容易发生负氢迁移反应^[25-26]。

2.2 同位素标记实验

为进一步确定 m/z 120 等离子的形成途径,开展了同位素标记实验。将末端的 2 个甲基替换成氘代甲基,并对其碎裂行为进行研究。质子化 *N,N*-二乙基(d_6)苯胺(m/z 156)的串联质谱图示于图 3。 m/z 156 离子经碰撞活化,主要产生 m/z 126、124、123、106 碎片离子。其中, m/z 126 和 m/z 124 为母离子发生裂解形成离子中性复合物后,分别继续发生氘迁移和单电子转移形成的,对应于丢失 $CD_2=CH_2$ 和 CD_3CH_2 自由基。 m/z 123 为母离子丢失 33 u 产生的,可确定是丢失了 CD_3-CH_3 中性分子,即母离子 m/z 156 发生裂解形成离子中性

复合物后继续发生负氢迁移而产生,发生负氢迁移的氢原子来自与氮相邻碳上的氢原子。由于未见 m/z 120 离子的形成,因此,可以排除丢失末端 2 个氘代甲基的途径,即图 1a 中的 m/z 120 离子为 *N*-亚乙基苯胺质子化离子。离子 m/z 106 的形成可能是由于 m/z 124 在自由基的驱动下发生 α 断裂丢失氘代甲基自由基产生的。

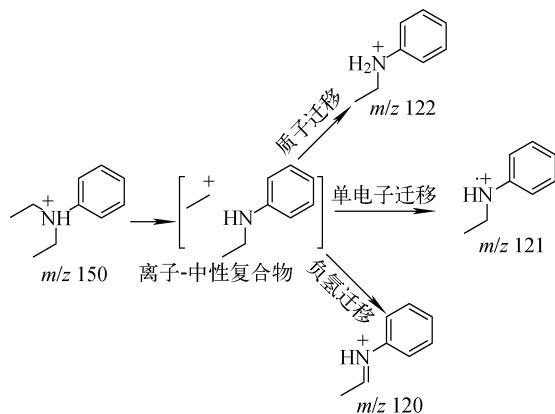


图 2 质子化 *N,N*-二乙基苯胺的碎裂途径
Fig. 2 Possible fragmentation pathways of protonated *N,N*-diethyl aromatic amine

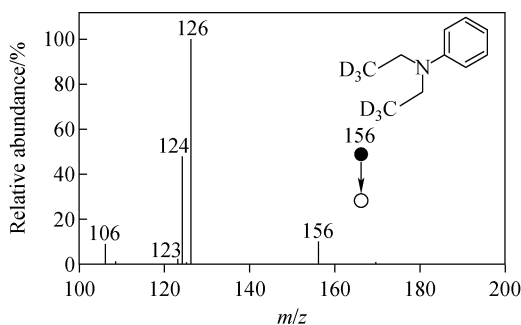


图 3 质子化 *N,N*-二乙基(d_6)苯胺(m/z 156)的串联质谱图

Fig. 3 MS/MS spectrum of *N,N*-diethyl- d_6 benzenamine at m/z 156

2.3 裂解规律

通过研究不同苯环对位取代的 *N,N*-二乙基苯胺类化合物(对位甲基取代和醛基取代)的质谱碎裂行为,探索该类化合物的裂解规律。从图 1 可以看出,这些化合物都显示出类似的质谱裂解行为,即母离子经碰撞活化后发生 i 断裂形成离子中性复合物后均会发生质子迁

移、单电子迁移和负氢迁移反应,分别丢失乙烯、乙基自由基和乙烷,只是碎片离子的丰度有差异。当苯胺环对位取代基连有吸电子基团(醛基)时,会促进负氢迁移反应途径的发生;当苯胺环对位取代基连有供电子基团(甲基)时,则抑制该反应的发生。

3 结论

本工作采用 EESI-MS/MS 技术研究 *N,N*-二乙基苯胺类化合物的质谱行为。结果发现,这类化合物具有类似的裂解行为,即发生裂解后首先形成离子中性复合物。该离子中性复合物内部进一步发生质子迁移、单电子迁移和负氢迁移反应,分别对应于丢失乙烯、乙基自由基和乙烷分子,这些碎裂途径通过同位素标记实验得以验证。通过研究该类化合物的气相碎裂反应,获得了该类化合物的质谱裂解规律,有助于鉴定含类似骨架的药物分子结构。

参考文献:

- [1] TU Y P. Dissociative protonation sites; reactive centers in protonated molecules leading to fragmentation in mass spectrometry[J]. The Journal of Organic Chemistry, 2006, 71(15): 5 482-5 488.
- [2] ZHANG J, CHAI Y, JIANG K, YANG H, PAN Y, SUN C. Gas phase retro-Michael reaction resulting from dissociative protonation; fragmentation of protonated warfarin in mass spectrometry[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2012, 47(8): 1 059-1 064.
- [3] GUO C, JIANG K, YUE L, XIA Z, WANG X, PAN Y. Intriguing roles of reactive intermediates in dissociation chemistry of *N*-phenylcinnamides [J]. Organic & Biomolecular Chemistry, 2012, 10(35): 7 070-7 077.
- [4] CHAI Y, JIANG K, SUN C, PAN Y. Gas-phase nucleophilic aromatic substitution between piperazine and halobenzyl cations; reactivity of the methylene arenium form of benzyl cations[J]. Chemistry, 2011, 17(39): 10 820-10 824.
- [5] JIANG K, BIAN G, HU N, PAN Y, LAI G. Coordinated dissociative proton transfers of external proton and thiocarbamide hydrogen; MS

experimental and theoretical studies on the fragmentation of protonated *S*-methyl benzenylmethylenhydrazine dithiocarboxylate in gas phase[J]. International Journal of Mass Spectrometry, 2010, 291(1/2): 17-23.

- [6] GUO C, WAN J, HU N, JIANG K, PAN Y. An experimental and computational investigation on the fragmentation behavior of enamines in electrospray ionization mass spectrometry[J]. Journal of Mass Spectrometry, 2010, 45(11): 1 291-1 298.
- [7] HU N, TU Y P, LIU Y, JIANG K, PAN Y. Dissociative protonation and proton transfers; fragmentation of α , β -unsaturated aromatic ketones in mass spectrometry[J]. The Journal of Organic Chemistry, 2008, 73(9): 3 369-3 376.
- [8] SUN H, CHAI Y, PAN Y. Dissociative benzyl cation transfer *versus* proton transfer; loss of benzene from protonated *N*-benzylaniline[J]. The Journal of Organic Chemistry, 2012, 77(16): 7 098-7 102.
- [9] CHAI Y, SUN H, PAN Y, SUN C. *N*-centered odd-electron ions formation from collision-induced dissociation of electrospray ionization generated even-electron ions; single electron transfer *via* ion/neutral complex in the fragmentation of protonated *N,N'*-dibenzylpiperazines and protonated *N*-benzylpiperazines[J]. Journal of the American Society for Mass Spectrometry, 2011, 22(9): 1 526-1 533.
- [10] LONGEVIALLE P. Ion-neutral complexes in the unimolecular reactivity of organic cations in the gas phase[J]. Mass Spectrometry Reviews, 1992, 11(3): 157-192.
- [11] CHEN H, WORTMANN A, ZHANG W, ZENOBI R. Rapid in vivo fingerprinting of nonvolatile compounds in breath by extractive electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry[J]. Angewandte Chemie International Edition, 2007, 46(4): 580-583.
- [12] LI M, HU B, LI J, CHEN R, ZHANG X, CHEN H. Extractive electrospray ionization mass spectrometry toward in situ analysis without sample pretreatment[J]. Analytical Chemistry, 2009, 81(18): 7 724-7 731.
- [13] ZHANG H, ZHU L, LUO L, WANG N, CHINGIN K, GUO X, CHEN H. Direct assess-

- ment of phytochemicals inherent in plant tissues using extractive electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61(45): 10 691-10 698.
- [14] ZHANG H, CHINGIN K, ZHU L, CHEN H. Molecular characterization of ongoing enzymatic reactions in raw garlic cloves using extractive electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Analytical Chemistry*, 2015, 87(5): 2 878-2 883.
- [15] CHEN H, YANG S, LI M, HU B, LI J, WANG J. Sensitive detection of native proteins using extractive electrospray ionization mass spectrometry[J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2010, 49(17): 3 053-3 056.
- [16] 张小平, 钟达财, 刘建川, 熊剑亮, 陈焕文. 电喷雾萃取电离和电喷雾电离所获一价正离子内能差异的比较研究[J]. *质谱学报*, 2018, 39(6): 663-669.
- ZHANG Xiaoping, ZHONG Dacai, LIU Jianchuan, XIONG Jianliang, CHEN Huanwen. Internal energy difference of singly charged cations generated by electrospray ionization and extractive electrospray ionization[J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2018, 39(6): 663-669(in Chinese).
- [17] SKIPPER P L, KIM M Y, PATTY SUN H L, WOGAN G N, TANNENBAUM S R. Monocyclic aromatic amines as potential human carcinogens: old is new again[J]. *Carcinogenesis*, 2009, 31(1): 50-58.
- [18] FENG W, JIANG R, CHEN B, OUYANG G. Fiber-assisted emulsification microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry for the determination of aromatic amines in aqueous samples[J]. *Journal of Chromatography A*, 2014, 1 361: 16-22.
- [19] MORTENSEN S K, TRIER X T, FOVERSKOV A, PETERSEN J H. Specific determination of 20 primary aromatic amines in aqueous food simulants by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1 091(1/2): 40-50.
- [20] AZNAR M, CANELLAS E, NERIN C. Quantitative determination of 22 primary aromatic amines by cation-exchange solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1 216(27): 5 176-5 181.
- [21] SEYMOUR E H, LAWRENCE N S, BECKETT E L, DAVIS J, COMPTON R G. Electrochemical detection of aniline: an electrochemically initiated reaction pathway[J]. *Talanta*, 2002, 57(2): 233-242.
- [22] DORONIN C Y, CHERNOVA R, GUSAKOVA N. 4-dimethylaminocinnamaldehyde as a photometric reagent for primary aromatic amines[J]. *Journal of Analytical Chemistry*, 2004, 59(4): 335-344.
- [23] WANG S, GUO C, ZHANG N, WU Y, ZHANG H, JIANG K. Tosyl oxygen transfer and ion-neutral complex mediated electron transfer in the gas-phase fragmentation of the protonated *N*-phenyl *p*-toluenesulfonamides[J]. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2015, 376: 6-12.
- [24] PAULOSE J, ACHUTHAN R P, LINSHA M P L, MATHAI G, PRASANTH B, TALLURI M V N K, SRINIVAS R. Protonated *N*-benzyl- and *N*-(1-phenylethyl)tyrosine amides dissociate via ion/neutral complexes[J]. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 2015, 29(17): 1 577-1 584.
- [25] YAO L, CHAI Y, SUN C, PAN Y. Competitive proton and hydride transfer reactions *via* ion-neutral complexes: fragmentation of deprotonated benzyl *N*-phenylcarbamates in mass spectrometry[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2015, 50(2): 364-370.
- [26] LI F, ZHANG X, ZHANG H, JIANG K. Gas-phase fragmentation of the protonated benzyl ester of proline: intramolecular electrophilic substitution *versus* hydride transfer[J]. *Journal of Mass Spectrometry*, 2013, 48(4): 423-429.