

应用纪要

将Waters ACQUITY UPLC H-Class PLUS 二元系统与光电二极管阵列以及ACQUITY QDa质谱检测器联用进行合成反应监测

Chris Henry, Paul D. Rainville

Waters Corporation



摘要

反应监测是合成新型候选药物的关键步骤。可能需要进行多种分析，以评估各种不同条件下（例如，不同溶剂或催化剂）的化学反应进程。加快样品分析速度以进行反应监测，有助于快速制定决策并提高实验室效率。本研究证明，将ACQUITY UPLC H-Class PLUS二元系统与ACQUITY PDA以及ACQUITY QDa质谱检测器联用能够分离阿替洛尔、其中间体4-羟基苯乙酰胺(4-HPA)和反应副产物4-羟苯乙酸。总运行时间只需1.2 min即可实现关键分离，同时提供信息量丰富的质谱和UV数据，从而轻松、可靠地实施反应监测，拥有各种不同水平分析经验的药物化学家均可使用。

优势

- 采用不到1 min的快速梯度，可实现高样品通量并快速获得结果
- PDA检测可提供更丰富的样品信息
- 质谱检测可支持质量数确认和快速决策

简介

在药物设计的发现化学工作流程中，通常会进行构效关系(Structure Activity Relationship, SAR)研究，药物化学家通过将不同的官能团引入已知的生物活性分子来优化目标化合物的特性。这些实验的目的是获得具有理想生物活性的合适的候选药物。

发现匹配的化合物并完成验证之后，就会对化合物的所需特性进行优化。该步骤需要对新化合物的合成和反应性测量进行迭代过程，以推动候选药物开发进入先导化合物阶段¹。

由于这些反应可能需要较长时间，化学家们有必要尽早确定合成过程是否在按预期进行。这就需要样品制备过程简单、响应速度快且检测限低的检测手段。所选分析技术的另一项优势可能是能够同时测量多种参数（例如，杂质形成和理想的终产物产率）²。

本应用纪要的目的是展示ACQUITY UPLC H-Class PLUS二元系统执行短时高效梯度以实施快速、高通量色谱分析的能力。将ACQUITY UPLC H-Class PLUS二元系统与光电二极管阵列和质谱检测的正交检测技术联用，有助于合成化学家深入了解反应进程、潜在副产物以及可能在简单易用的反应监测工作流程解决方案中发生的任何其他问题。

实验

在ACQUITY UPLC H-Class PLUS二元系统上进行色谱分离。采用0.7分钟的梯度洗脱样品（总运行时间1.2分钟），并使用PDA检测器和ACQUITY QDa质谱检测器采集数据。

样品描述

制备阿替洛尔（终产物）、4-羟基苯乙酰胺(4-HPA)（反应中间体）和4-羟基苯乙酸(4-HPAA)（反应副产物）的制剂，模拟阿替洛尔的合成过程。所有标准品均购自Sigma Aldrich chemicals（英国多塞特郡普尔）。

方法条件

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC H-Class PLUS二元系统
检测器：	ACQUITY 光电二极管阵列检测器(PDA)
样品瓶：	沃特世全回收样品瓶
色谱柱：	ACQUITY BEH C ₁₈ 30 mm × 2.1 mm, 1.7 μm
柱温：	45 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	0.5 μL
流速：	0.8 mL/min
流动相A：	0.1% v/v甲酸水溶液
流动相B：	0.1% v/v甲酸的乙腈溶液
梯度：	流动相B在0.7 min内从5%上升至95%

MS条件

质谱系统：	ACQUITY QDa质谱检测器
电离模式：	ESI+
采集范围：	100–800 Da
毛细管电压：	1.5 kV
碰撞能量：	N/A
锥孔电压：	20 V

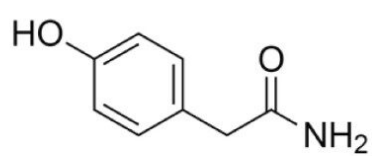
数据管理

MS软件：	MassLynx 4.1版
-------	---------------

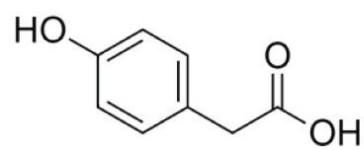
结果与讨论

在发现工作流程的目标化合物优化阶段，快速筛选对于药物化学家加快决策速度并快速识别具有理想亲和力和选择性的化合物至关重要。在所有情况下，化学家都需要能够快速评估是否已合成正确的产物以及反应是否已达到终点，以便淬灭反应以获得出色产率。

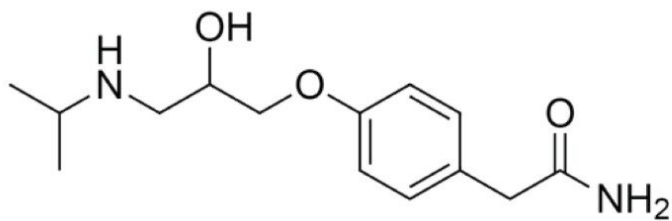
该阶段可能耗时耗力，因此需要有一种快速可靠的方法来监测实验进程。我们使用阿替洛尔的合成（图1）作为反应模型展示该工作流程。



4-羟基苯乙酰胺



4-羟苯乙酸



阿替洛尔

图1.4-HPA、阿替洛尔和4-HPAA的结构

监测到阿替洛尔形成增加以及中间体4-羟基苯乙酰胺减少（图2）。还观察到反应副产物4-羟苯乙酸。

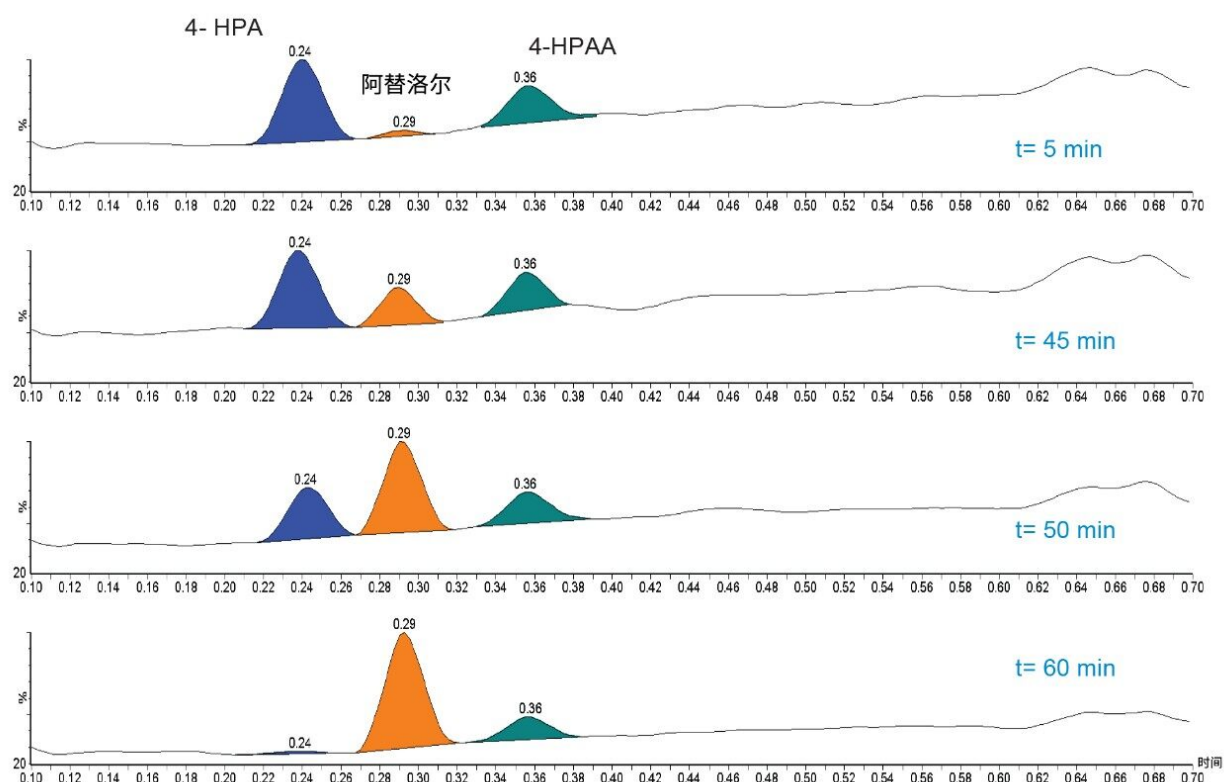


图2.反应混合物的TIC色谱图，显示了随着时间推移，阿替洛尔含量增加（橙色），4-HPA含量减少（蓝色）

将PDA与ACQUITY QDa检测器结合使用，提供了一种简单的正交检测系统，能够监测具有不同理化属性的化合物。4-HPAA副产物的UV信号响应很强，阿替洛尔和4-HPA的UV信号响应则相对较弱。借助ACQUITY QDa检测（ESI+模式），阿替洛尔/4-HPA的信号响应明显增加（图3）。

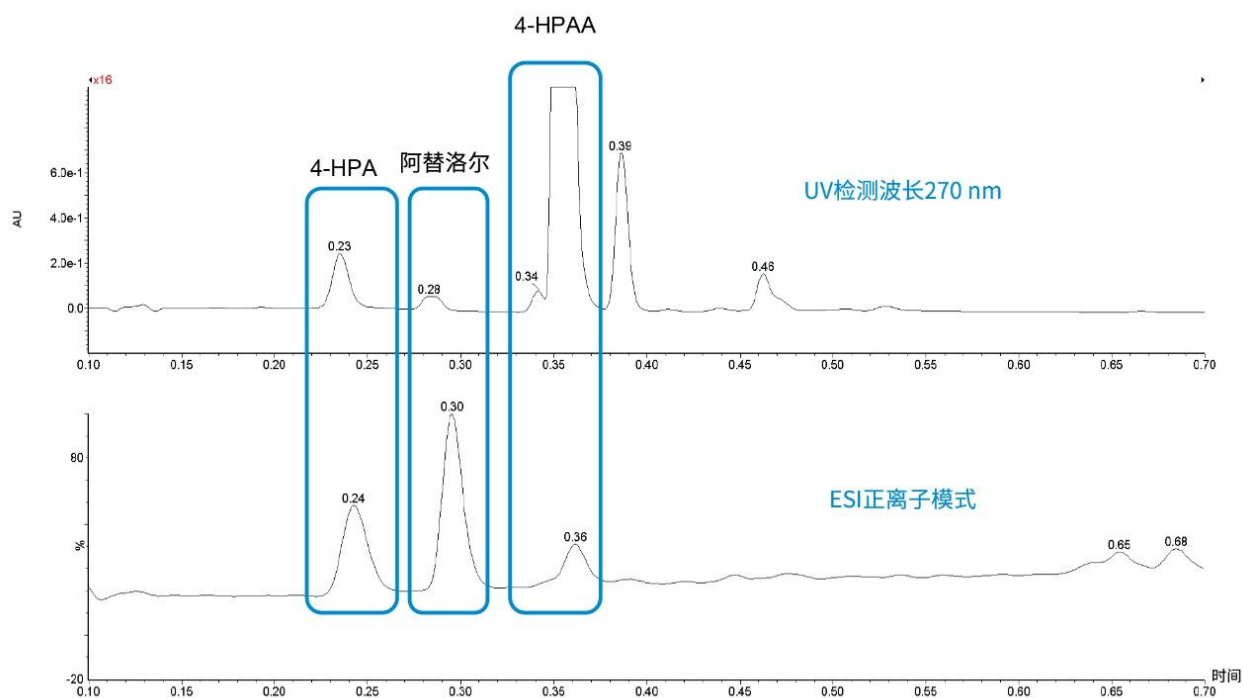


图3.所有三种化合物的PDA和ACQUITY QDa响应比较

集成的ACQUITY QDa质谱检测器可轻松完成质量数确认，这个显著优势使化学家对反应成功更有信心。所生成数据的质谱分析显示了与预期化合物对应的 m/z 值（图4）。

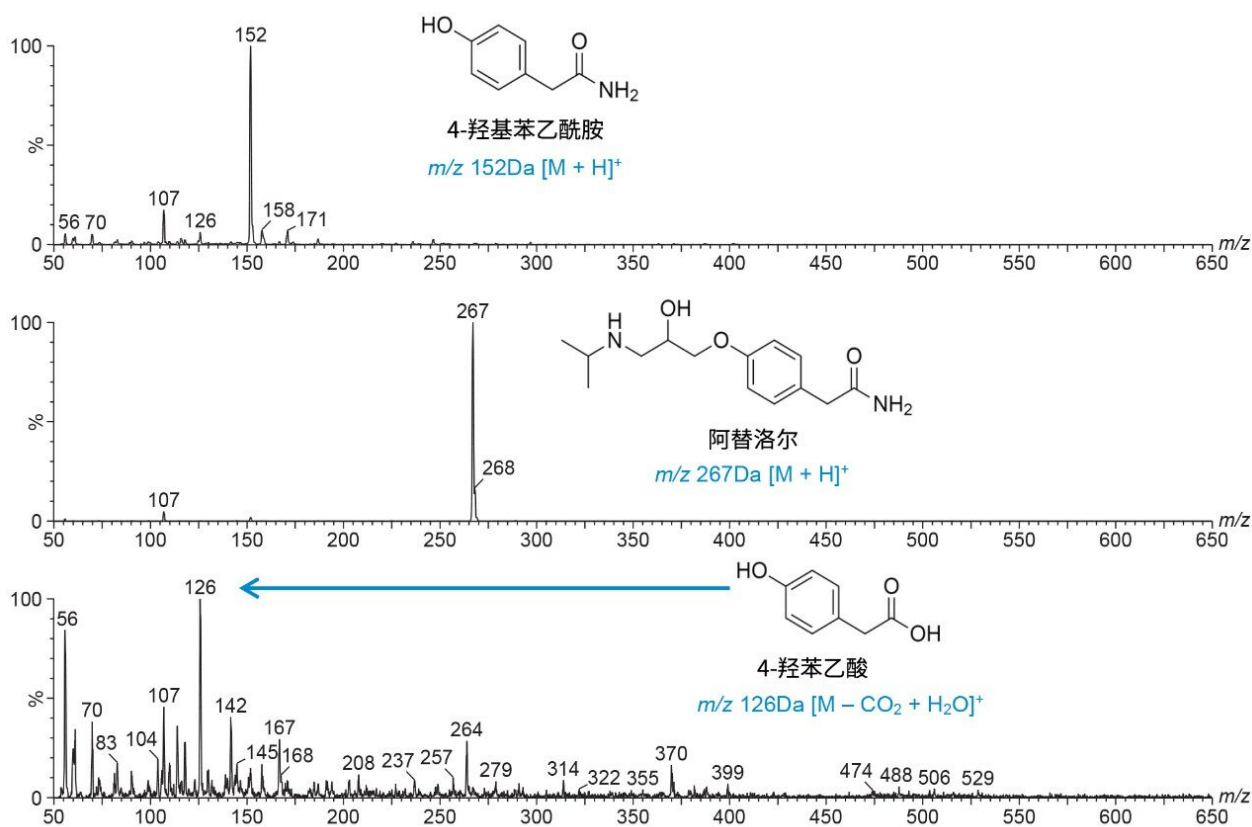


图4.使用ACQUITY QDa质谱检测器得到的三种化合物的质谱图

结论

通过将ACQUITY UPLC H-Class PLUS二元系统与PDA/ACQUITY QDa检测器联用，该工作流程的UPLC分析时间只需1.2分钟，即可分离所需的反应产物、反应中间体和副产物。

质谱检测能够轻松完成所有化合物的质量数确认，而PDA能够在同一次进样中提供更多的UV光谱信息。

该平台使非专家水平的质谱用户能够在反应监测过程中获得重要的质谱信息，从而加快药物发现过程。

参考资料

1. Twohig, M.; Shave, D.; LeFebvre, P.; Plumb, R. Synthetic Reaction Monitoring Using UPLC-MS. Waters Application Note, 2007, 720002258EN. <<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2007/synthetic-reaction-monitoring-using-uplc-ms.html>>
 2. Analytical and Purification methods in Combinatorial Chemistry, *Wiley-Interscience* (5): 87–123.
 3. Dahlin, J.; Walters, M. The Essential Roles of Chemistry in High Throughput Screening Triage. *Future Med Chem.*, 2014, July; 6(11): 1265–1290.
-

特色产品

ACQUITY UPLC H-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/10138533>>

ACQUITY UPLC PDA检测器 <<https://www.waters.com/514225>>

ACQUITY QDa质谱检测器 <<https://www.waters.com/134761404>>

MassLynx MS软件 <<https://www.waters.com/513662>>

720007074ZH, 2020年10月