

应用纪要

以直接电离技术充当反应监测的快速筛查工具

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。研究人员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。

优势

- 轻松获得名义质量数数据，提高结果特异性
- 快速确定反应进程
- 快速分析易受时间/湿度影响的不稳定化合物
- RADIANT ASAP简便易用、体积小，可轻松集成到现有工作流程中

简介

药物化学的目标是设计并合成先导分子，这些先导分子在成功完成药物开发过程后，最终成为药物。SAR优化过程涉及数百种化合物的合成，因此需要实施大量反应。化学家必须深入了解这些反应才能制定明智且及时的决定。了解实时反应情况有助于化学家设计并控制工艺容器中的反应，提高产物收率和纯度，减少副反应和副产物，从而降低与意外工艺相关的成本和风险¹。

沃特世近期推出了RADIANT ASAP（快速直接分析大气压固相分析探头），这是一种专用的名义质量数检测器，适用于在几乎无需样品前处理的情况下直接分析固体和液体样品。

RADIANT ASAP的推出使分析人员可直接从反应容器中取样，然后将样品引入质谱检测器中，几乎无需样品前处理步骤，以近乎瞬时的速度为用户提供结果，有助于快速确定反应进程。

稳定可靠的单四极杆检测器与技术成熟的ASAP直接样品分析相结合²，使拥有不同程度分析经验的药物化学家能够在药物合成反应过程中快速获得名义质量数数据。

本研究展示了一种快速筛查工作流程，适用于在β-受体阻滞剂阿替洛尔合成反应监测工作流程中进行直接分析。

制备样品以模拟中间体4-羟基苯乙酰胺(4-HPA)向阿替洛尔的转化过程。

RADIAN ASAP成功检出两种分析物，表明4-HPA (m/z 152 Da)的响应下降并伴有阿替洛尔(m/z 267 Da)响应增加(图1)。

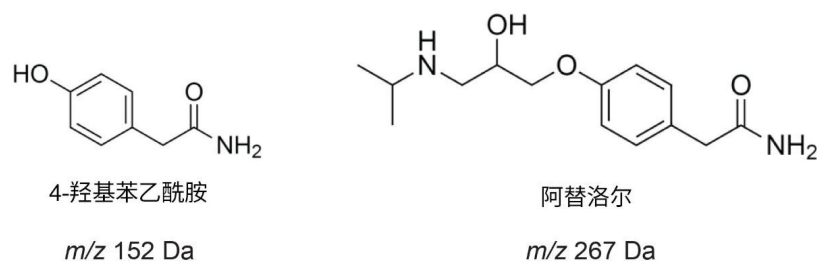


图1.4-HPA、4-HPAA和阿替洛尔的结构

实验

样品描述

制备阿替洛尔和4-HPA样品，以模拟阿替洛尔在五个时间点的合成进程。

为证明结果重现性，每个“时间点”分析五个样品，评估各分析物响应的%RSD（相对标准偏差），以及反映反应进程的阿替洛尔:4-HPA的比率。

所有标准品均购自Sigma Aldrich chemicals（英国多塞特郡普尔）。

RADIAN ASAP操作

每个重复样品均使用玻璃毛细管取样，取样前先将玻璃毛细管插入RADIAN ASAP中，使用MassLynx中的“Bakeout”（烘干）功能（图2）进行清洁，自动选择该功能后，流动气体的温度将在1 min的固定时间内升至600°C，以除去可能干扰样品结果的任何污染物。完成该过程后，软件将通知用户系统已准备好分析样品。

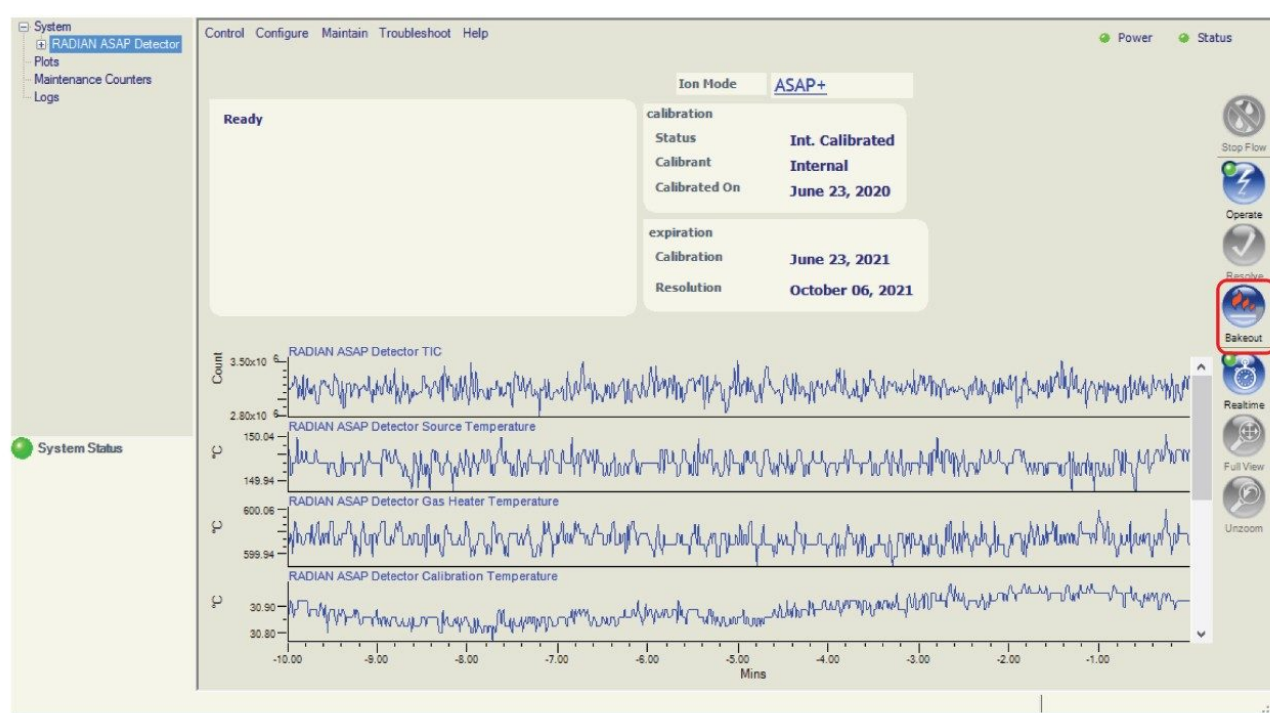


图2.仪器控制台页面，显示了“Bakeout”（烘干）功能（以红色突出显示）

烘干程序完成后，将玻璃棒取出并冷却约10 s，浸入第一个样品中，然后引入RADIANT ASAP（图3），再将其取出。每个样品均在完成上述烘干程序后，使用不同的玻璃毛细管执行五次进样程序。



图3.RADIANT ASAP的进样步骤

仪器条件

电离模式：	ASAP+
电晕针电流：	3 μ A
脱溶剂气(N ₂)温度：	500 °C
脱溶剂气(N ₂)流速：	3 L/min
采样锥孔电压：	10 V
采集模式：	全扫描（Continuum模式）
质量范围：	100-600 Da
扫描速度：	2 Hz
取样方式：	毛细管蘸取

数据管理

MS软件：

MassLynx4.1

通过将样品引入玻璃棒上的电晕放电区域，使用RADIANT ASAP（图4）实现样品电离。使用加热的氮气流使样品挥发。现在，气态分析物分子被 N_2 等离子体电离。气态分析物离子被导入仪器，并利用单四极杆质谱检测器进行分析。

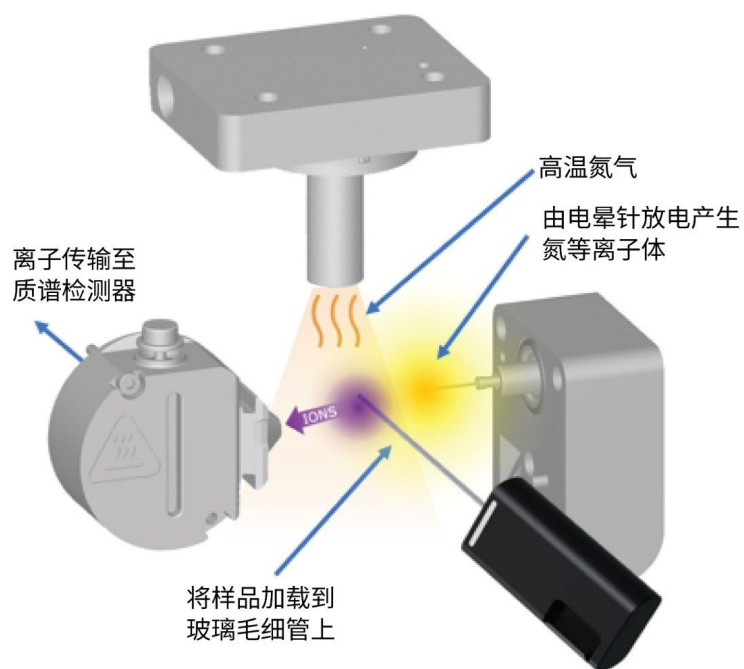


图4.RADIANT ASAP样品电离过程示意图

Horning³等人于1973年概述了APCI电离的两种主要机理。

第一种是电荷转移机理，由离子源中氮气的电晕放电电离启动（图5）。生成氮自由基阳离子，然后与分析物分子之间发生电荷转移，生成分析物分子的自由基阳离子。

这种电离方式对于非极性化合物的分析特别有用，并且在不存在质子溶剂的离子源条件下更常见。

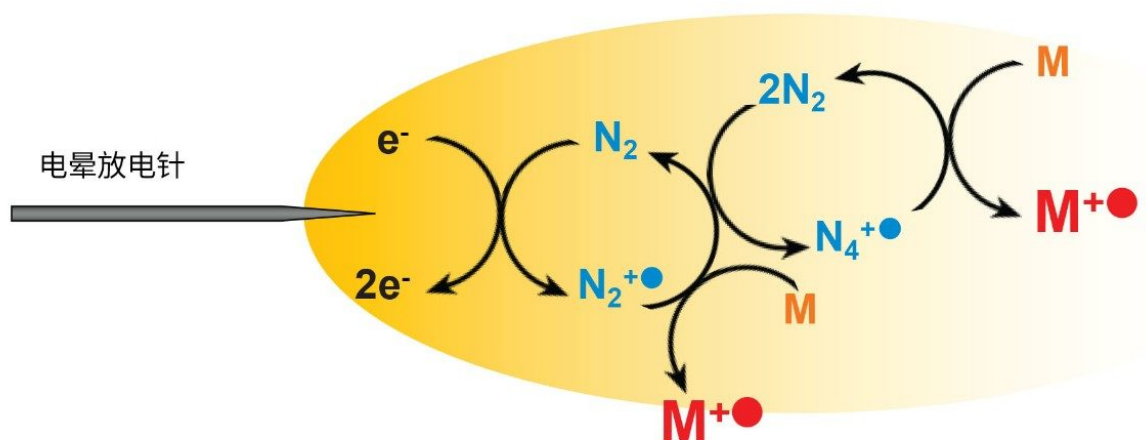


图5.电荷转移

第二种电离机理是质子转移（图6）。

如图所示，这种机理需要使用水或其他溶剂（诸如甲醇）作为质子源以形成离子化溶剂簇。

然后，分析物通过质子转移发生电离，这是LC-MS中与APCI相关的主要电离途径。

本实验适用后者，因为所有样品均溶于甲醇中。

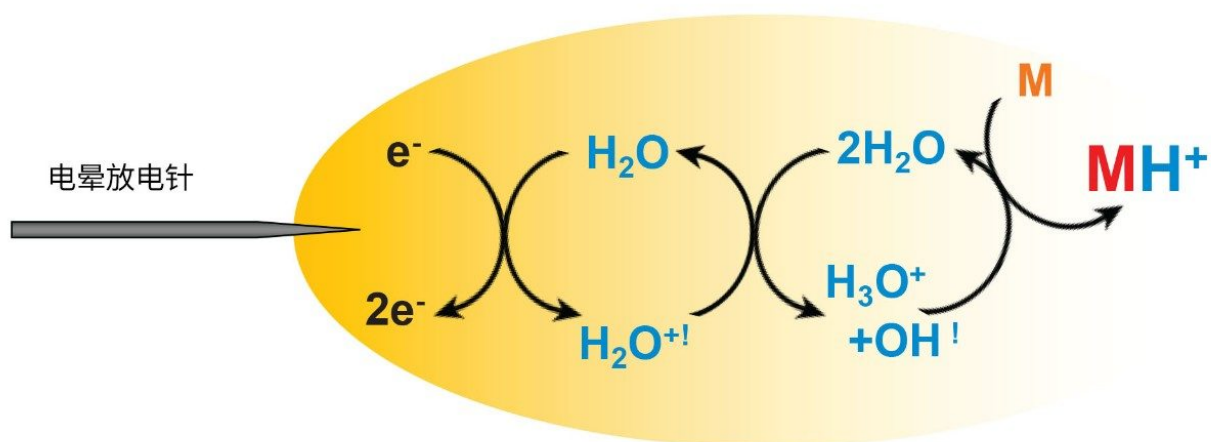


图6.质子转移

结果与讨论

按照“仪器条件”所述进行设置仪器。按照“实验”部分所述将样品引入RADIANT ASAP，直接利用MassLynx软件评估离子强度和比率。

在实践中，将单独使用快速反应监测样品来快速评估反应进程，但本研究对每个样品重复分析五次($n=5$)以证明结果重现性。

引入样品并获得TIC（总离子计数色谱图）。TIC示例见图7。

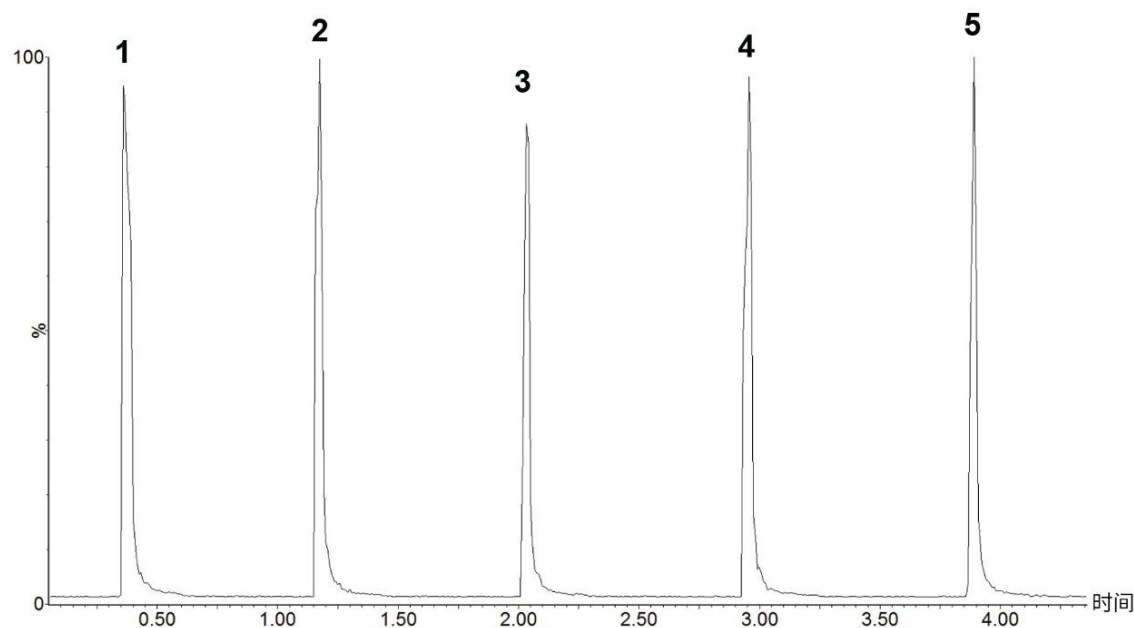


图7.TIC示例

提取每个模拟时间点的TIC谱图，结果清晰展示出4-HPA (m/z 152 Da)的减少和阿替洛尔(m/z 267 Da)的增加，反映了样品中各种化合物的相对浓度（图8）。观察到4-HPA的潜在片段(m/z 107 Da)和二聚体(m/z 303 Da)。前者是源内碎裂的结果，后者是与高浓度4-HPA相关的源内反应的结果。

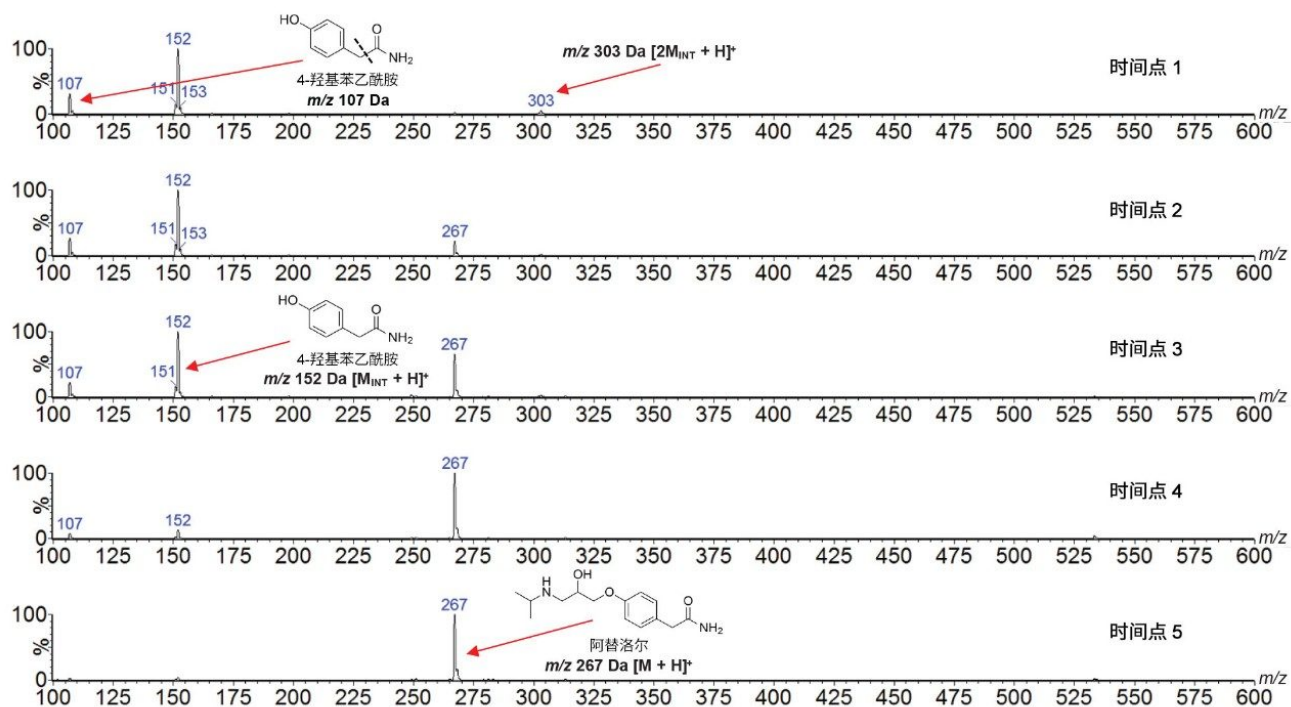


图8.五个时间点比较

先前已使用内标通过ASAP实现了半定量分析^{4,5}。由于反应监测是研究反应物与产物的相关性，因此可以通过测量目标化合物之间的比率随时间的变化进行半定量监测。

绘制两种分析物的平均响应以及平均响应比与时间的关系图（图9）。从图中可以直观地看到各种分析物的强度变化，红线表明阿替洛尔相对强度存在明显的上升趋势。

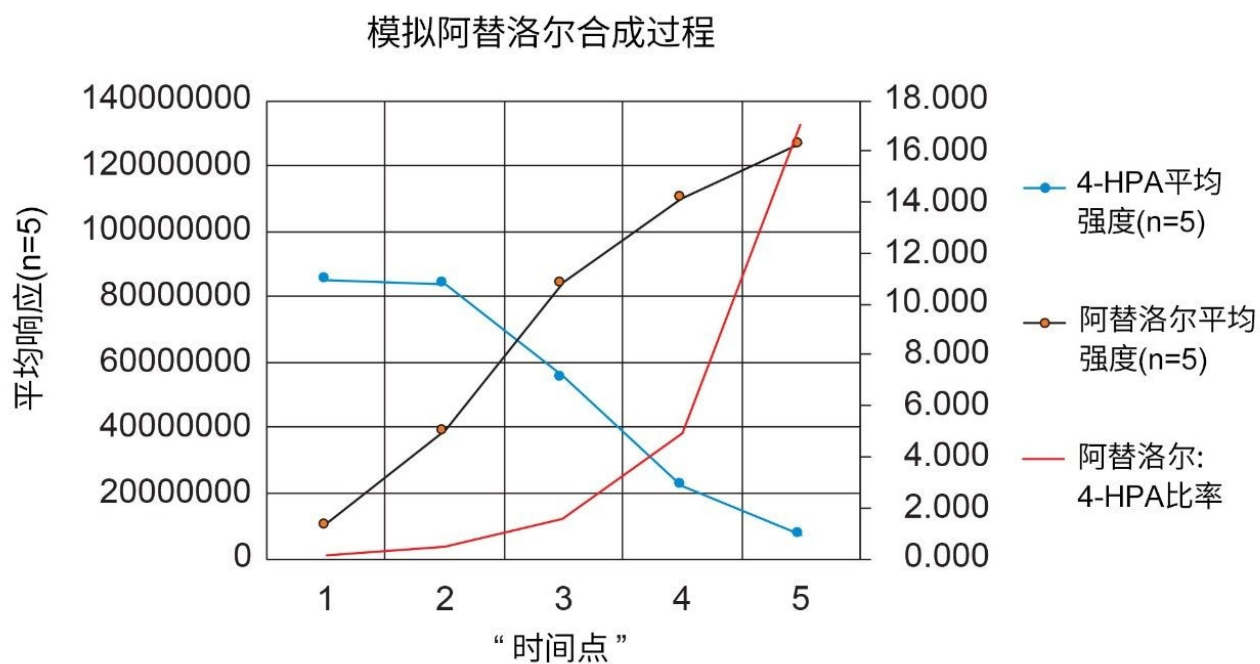


图9.4-HPA:阿替洛尔图示

重现性

如前文所述，对样品重复测定五次，以确保方法重现性。

常规执行的任何反应监测方法都会利用一些要素进行验证，以确保结果可重现。

表1显示了制得的所有样品在五次重复测定中获得的两种分析物的强度。每个样品的平均比率RSD在4.8~15.8的范围内。

鉴于样品是手动引入仪器并且无需色谱分离，因此这一结果表明变异性非常低。

观察到最低浓度的阿替洛尔的%RSD为15.8%。在这些实验中，阿替洛尔的电离强度高于4-HPA，这可能导致在较低浓度下产生较高的实验变化。

	时间点 1			时间点 2			时间点 3			时间点 4			时间点 5		
	4-HPA	阿替洛尔	比率	4-HPA	阿替洛尔	比率	4-HPA	阿替洛尔	比率	4-HPA	阿替洛尔	比率	4-HPA	阿替洛尔	比率
	69797728	9548753	0.14	85268720	36474560	0.43	55840576	79328216	1.421	21455328	106919880	4.98	6640223	126643424	19.07
	98104488	8827152	0.09	87853136	40763524	0.46	46602032	68273608	1.465	24765742	113274448	4.57	7636814	129148800	16.91
	56667828	7673887	0.14	85550440	38398836	0.45	54468860	88261552	1.620	23971888	110600984	4.61	7390648	120899248	16.36
	96348800	10437770	0.11	89373688	39397464	0.44	56718248	89737968	1.582	18525202	98140456	5.30	7612385	125588232	16.50
	104590456	14399747	0.14	71997912	40277748	0.56	63833132	95981352	1.504	23894724	121769960	5.10	7995430	132226616	16.54
平均值	85101860	10177462	0.1	84008779	39062426	0.5	55492570	84316539	1.5	22522577	110141146	4.9	7455100	126901264	17.0
%RSD	21.8	22.6	15.8	7.4	3.9	10.1	9.9	11.4	4.8	10.2	7.0	5.7	6.1	3.0	6.0

表1.原始数据

结论

本研究证明RADIANT ASAP可以用作重要的反应监测工具。该仪器可快速完成阿替洛尔合成的模拟进程，无需进行色谱分离，同时提供名义质量数数据以实现近乎瞬时的质量数确认。

RADIANT ASAP体积小且简便易用，无论用户是否为专家水平，都能在各种分析环境下轻松部署。

参考资料

1. What is Reaction Monitoring? *Chromatography Today*. July 21, 2015.
2. McEwen CN, McKay RG, Larsen BS. Analysis of Solids, liquids, and Biological Tissues Using Solids Probe Introduction at Atmospheric Pressure on Commercial LC-MS Instruments. *Anal. Chem.* 2005, 77, 7826–7831.
3. Horning EC, Horning MG, Carroll DI, Dzidic I, Stillwell RN. New Picogram Detection System Based on a Mass Spectrometer With an External Ionization Source at Atmospheric Pressure. *Anal. Chem.* 1973, 45, 936–943).
4. Xiao X, Miller LL, Parchert K J, Hayes D, Hochrein J M. Atmospheric Solids Analysis Probe Mass Spectrometry for the Rapid Identification of Pollens and Semi-Quantification of Flavonoid

Fingerprints I w. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2016 Jul 15;30(13):1639–46.doi: 10.1002/rcm.7601.

5. l Doué M, Dervilly-Pinel.G, Gicquiau A, Pouponneau K, Monteau F, and Le Bizec, B. High Throughput Identification and Quantification of Anabolic Steroid Esters by Atmospheric Solids Analysis Probe Mass Spectrometry for Efficient Screening of Drug Preparations.*Anal.Chem.* 2014, 86, 12, 5649–5655, Publication Date: May 5, 2014, <https://doi.org/10.1021/ac501072g>.

特色产品

RADIAN ASAP直接质谱检测器 <<https://www.waters.com/135073413>>

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

720007111ZH, 2021年1月

© 2022 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie](#) [设置](#)

沪 ICP 备06003546号-2

京公网安备 31011502007476号