

## تشکیل پیوند آمیدی با اعمال شوک گرمایی و شناسایی سریع فراورده با طیف‌سنجی تحرک یونی

فرشاد میرزایی ولدی<sup>۱</sup>، حامد بهرامی<sup>۲\*</sup> و منیژه توضیحی<sup>۲</sup>

۱. کارشناسی ارشد شیمی فیزیک، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

۲. استادیار شیمی فیزیک، گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

دریافت: اسفند ۹۸ بازنگری: دی ۹۹ پذیرش: بهمن ۹۹

### چکیده

پیوند آمیدی ستون فقرات پپتیدهای زیستی مهم و همچنین، پروتئین‌ها را تشکیل می‌دهد. گروه آمیدی در بسیاری از ترکیب‌های دارویی موجود است. بنابراین، توسعه کارآمد روش‌های تشکیل پیوند آمیدی همچنان از نظر علمی مورد توجه است. در این پژوهش روشی ساده برای تهیه مستقیم و بدون حلال آمیدها و شناسایی بلادرنگ فراورده معرفی شده است. ابتدا طیف تحرک یونی نمک پریندوپریل ترشیوبوتیل‌آمین به دست آمد و گونه‌های یونی به دست آمده از تبخیر و یونش این نمک در تخلیه کرونا شناسایی شد. در ادامه با اعمال شوک گرمایی در دمای  $400^{\circ}\text{C}$  به نمک پریندوپریل ترشیوبوتیل‌آمین و ثبت بی‌درنگ طیف تحرک یونی، تشکیل فراورده‌ای با جرم بیشتر از پریندوپریل پروتونه شده به اثبات رسید. با بررسی تغییر شدت پیک‌ها در طیف‌های تحرک یونی با گذشت زمان و همچنین، پیش‌بینی جرم گونه‌های یونی در طیف تحرک یونی، ماهیت فراورده جدید به‌عنوان یک ترکیب آمیدی مشخص شد. کارایی روش دو مرجعی برای به‌کارگیری معادله ارتباط جرم و تحرک یونی برای پیش‌بینی جرم گونه‌های یونی در طیف‌سنجی تحرک یونی به اثبات رسید. از نتیجه‌های این پژوهش مشخص شد که اعمال شوک گرمایی به نمک پریندوپریل اربومین افزون بر تخریب نمونه، می‌تواند موجب ایجاد فراورده‌های جدید از راه تشکیل پیوند آمیدی شود.

**واژه‌های کلیدی:** طیف‌سنجی تحرک یونی، تشکیل پیوند آمیدی، شوک گرمایی، پریندوپریل اربومین

### مقدمه

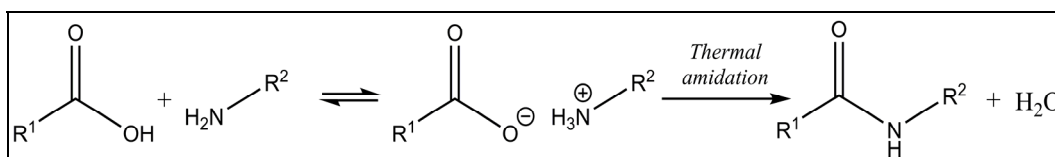
بیش از ۲۵ درصد از داروهای شناخته شده وجود دارد [۱]. تولید آمیدها از واکنش کربوکسیلیک اسیدها با آمین‌ها با روش‌های سریع و بدون حلال بسیار مورد توجه پژوهشگران بوده است. برخی از این روش‌ها شامل گرمادهی با امواج

تشکیل پیوند آمیدی یکی از مهم‌ترین واکنش‌های شیمی، به‌ویژه در صنایع دارویی است. بررسی پایگاه داده جامع شیمی دارویی نشان داده است که گروه کربوکسامید در

شرایط دمایی بالا باشد [۱۱]. تراکم گرمایی انواع کربوکسیلیک اسیدها و آمین‌ها توسط گوشه و همکارانش بررسی شده است. در پژوهش آن‌ها، ترکیب‌های آمیدی با گرمادهی بین ۱۲۰ تا ۱۶۰ °C و زمان واکنش بین ۲ تا ۲۴ ساعت با بازده قابل قبول به دست آمده است [۱۲]. به طور کلی سازوکار پذیرفته شده برای تشکیل مستقیم پیوند آمیدی از کربوکسیلیک اسیدها در شکل ۱ نمایش داده شده است.

رادییوی [۲]، گرمادهی با امواج ریزموج [۳ و ۴]، استفاده از انواع کاتالیست‌ها [۵ تا ۸] و یا ترکیب این روش‌ها [۹ و ۱۰] است. هر کدام از روش‌های بالا پس از تهیه نمونه نیاز به یک مرحله شناسایی فرآورده با روش‌هایی مانند NMR یا IR دارند.

ساده‌ترین و راحت‌ترین راه تشکیل پیوند آمیدی می‌تواند واکنش تراکم مستقیم کربوکسیلیک اسیدها و آمین‌ها تحت



شکل ۱ سازوکار پذیرفته شده برای تشکیل مستقیم پیوند آمیدی از کربوکسیلیک اسیدها

شناسایی گونه‌ها در IMS بر پایه تحرک یون‌ها در یک لوله رانش است. میزان تحرک یونی برای هر یون از روی زمان پرواز آن در ناحیه رانش محاسبه می‌شود. معادله ۱، رابطه کلی مربوط به محاسبه تحرک یون‌ها در IMS را نشان می‌دهد.

$$K = v_d/E \quad (1)$$

که در آن  $K$  تحرک یونی برحسب  $\text{cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ ،  $v_d$  سرعت یون برحسب  $\text{cm} \cdot \text{s}^{-1}$  و  $E$  شدت میدان الکتریکی برحسب  $\text{V} \cdot \text{cm}^{-1}$  است.

یک تفاوت اصلی طیف‌سنج تحرک یونی با طیف‌سنج جرمی این است که جداسازی در طیف‌سنج تحرک یونی نه تنها براساس تفاوت در جرم یون‌ها انجام می‌شود، بلکه اندازه و شکل یون‌ها نیز در این جداسازی اهمیت دارد. ذره‌ای که سطح مقطع بزرگتری دارد، تحرک کمتری نسبت به ذره‌ای که سطح مقطع آن کوچکتر است، خواهد داشت. علت این موضوع در این نکته ریشه دارد که طیف‌سنج تحرک یونی برخلاف طیف‌سنج جرمی در فشار اتمسفر کار می‌کند و یک

طیف‌سنجی تحرک یونی<sup>۱</sup> (IMS) یک روش جداسازی و شناسایی یون‌ها در فاز گازی است که به‌عنوان روشی برای تعیین گزینشی ترکیب‌های آلی در فاز گازی و در فشار محیط به‌طور گسترده به‌کار رفته است [۱۳]. از مزیت‌های طیف‌سنج تحرک یونی می‌توان به حد تشخیص بسیار کم، پاسخ سریع (چند ثانیه)، امکان تجزیه و تحلیل کمی و کیفی به‌صورت آنالین، سهولت آماده‌سازی نمونه، سادگی و اقتصادی بودن روش، حساسیت بالا، کم‌هزینه بودن و همچنین، قابلیت تزریق مستقیم نمونه‌های جامد، مایع و گاز اشاره کرد. برخی از کاربردهای طیف‌سنجی تحرک یونی شامل شناسایی و اندازه‌گیری انواع داروها و مواد مخدر [۱۴ و ۱۵]، تجزیه و تحلیل زیست‌محیطی [۱۶ و ۱۷]، شناسایی و اندازه‌گیری مواد منفجره [۱۸]، تعیین کیفیت و سلامت مواد غذایی [۱۹]، بررسی واکنش‌های یون-مولکول در فاز گازی [۲۰] و همچنین، مطالعه سینتیکی واکنش‌های شیمیایی [۲۱ و ۲۲] است.

## 1. Ion Mobility Spectrometry

ساختار نمک پریندوپریل اربومین با پراش پرتو ایکس تک بلور تعیین شده است [۲۹]. داده‌های بلورنگاری تایید کرده است که پریندوپریل و اربومین در ساختار بلوری با پیوند هیدروژنی بین اتم اکسیژن گروه کربوکسیلات ( $\text{COO}^-$ ) پریندوپریل و گروه آمین کاتیون اربومین ( $\text{NH}^+$ ) به هم پیوند شده‌اند.

در این پژوهش ابتدا طیف تحرک یونی نمک پریندوپریل ترشیوبوتیل‌آمین گرفته شد و فرآورده‌های به‌دست آمده از یونش این ترکیب در طیف‌سنج تحرک یونی با منبع یونش تخلیه کرونا شناسایی شد. در ادامه، برای نخستین بار با اعمال شوک گرمایی، ترکیب آمید به‌دست آمده از واکنش مستقیم پریندوپریل و ترشیوبوتیل‌آمین تولید و بی‌درنگ طیف تحرک یونی فرآورده به‌دست آمد. شواهد تجربی حاصل از پردازش طیف‌های تحرک یونی، تولید فرآورده آمید تایید کرد.

### بخش تجربی

#### مواد و روش تزریق

نمک پریندوپریل اربومین از شرکت مرک تهیه و به صورت جامد و بدون محلول‌سازی به‌کار گرفته شد. در این نمک به ازای هر مول پریندوپریل یک مول ترشیوبوتیل‌آمین وجود داشت. نمونه در حالت جامد با کاوند<sup>۲</sup> تزریق به‌طور مستقیم و بدون محلول‌سازی به دستگاه تزریق شد. گاز آمونیاک به‌عنوان دوپانت در تمام طیف‌گیری‌ها به‌کار رفت. این گاز از لوله رابط و با فشار گاز اصلی دستگاه (نیتروژن) به منطقه یونش وارد می‌شد.

#### دستگاه‌ها و پردازش داده‌ها

طیف‌سنج تحرک یونی به‌کار گرفته‌شده در این پژوهش مدل IMS-300 ساخت شرکت تاف‌فناورپارس مستقر در شهرک علمی و پژوهش‌های اصفهان، ایران است.

یون در طول مسیر خود برخوردهای زیادی با گاز بافر در محیط خواهد داشت [۲۳].

در صورتی که نمونه خالص از یک ترکیب شیمیایی به دستگاه تزریق شده باشد، وجود بیشتر از یک پیک با فاصله زمانی زیاد از هم که شدت آن‌ها با دما و غلظت ارتباط دارد نشان‌دهنده تشکیل قطعه یونی<sup>۱</sup> و یا تشکیل ترکیب یونی<sup>۲</sup> است. گونه‌های به‌دست آمده از شکست یون مادر، در ناحیه رانش تحرک بیشتری داشته و سریع‌تر به آشکارساز می‌رسند و در زمان رانش کمتری در طیف آشکار می‌شوند. از طرف دیگر، گونه ترکیب سنگین‌تر، تحرک کمتری دارد و دیرتر به آشکارساز می‌رسد. با توجه به این توضیحات می‌توان طیف‌سنج تحرک یونی را برای دنبال کردن واکنش‌های شیمیایی و شناسایی فرآورده به‌دست آمده از آن به‌کار برد.

پریندوپریل<sup>۳</sup> یک مهارکننده آنزیم تبدیل‌کننده آنژیوتانسین طولانی اثر است که به‌عنوان داروی کاهنده فشارخون مطرح است و در درمان نارسایی قلبی به‌کار می‌رود [۲۴ و ۲۵]. این پیش‌دارو از تبدیل آنژیوتانسین I به آنژیوتانسین II جلوگیری می‌کند. آنژیوتانسین II عامل تنگ‌شدن رگ‌های خونی است. با جلوگیری از تنگ‌شدن رگ‌ها این دارو فشار داخل رگ‌های خونی و حجم کاری قلب را کاهش می‌دهد. بررسی‌ها نشان داده‌اند که پریندوپریل در درمان سکته مغزی ایسکمی اثر دارد [۲۶ و ۲۷]. پریندوپریل دارای فرمول مولکولی  $\text{C}_{19}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_5$  با جرم مولی  $368/479 \text{g.mol}^{-1}$  است. از نظر بالینی شکل‌های مفیدی از این دارو به‌صورت نمک ترشیوبوتیل‌آمین (پریندوپریل اربومین)<sup>۴</sup> و ال-آرژینین (پریندوپریل ال-آرژینین)<sup>۵</sup> وجود دارد [۲۸].

1. Fragment ion

2. Adduct ion

3. Perindopril

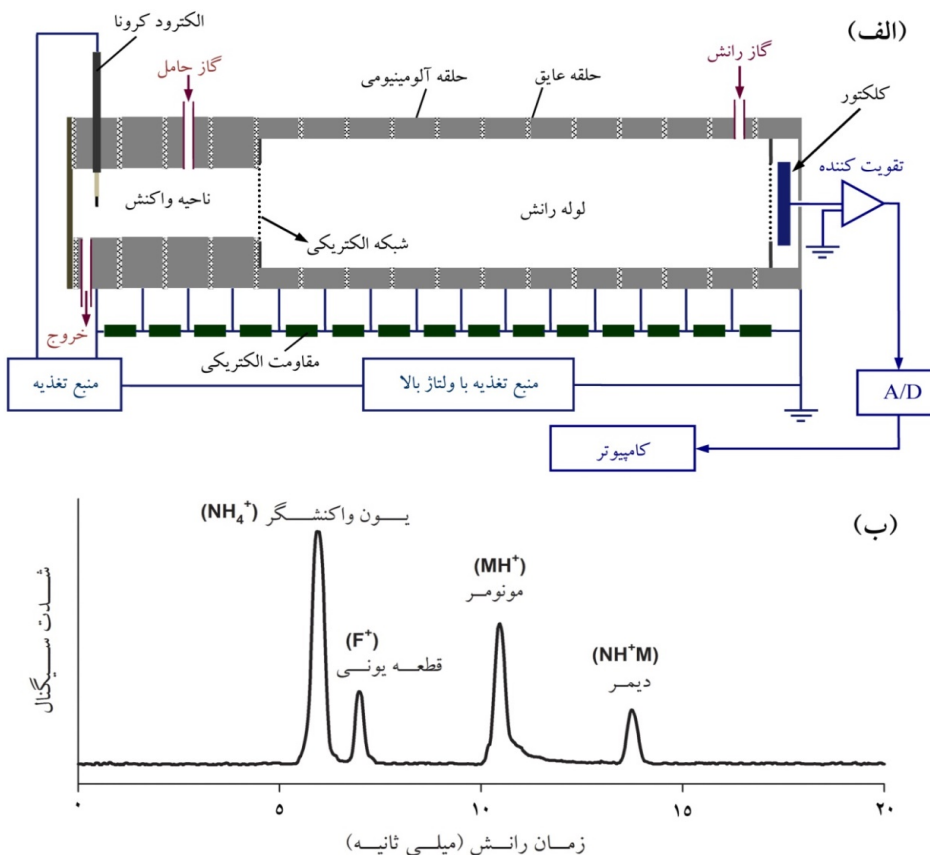
4. perindopril erbumine

5. perindopril L-arginine

6. Probe

در شکل ۲ نشان داده شده است.

طرحواره‌ای از چیدمان اجزاء دستگاه طیف‌سنج تحرک یونی با منبع یونش تخلیه کرونا و طیف نوعی به‌دست آمده از آن



شکل ۲ طرح کلی از (الف) چیدمان اجزاء دستگاه طیف‌سنج تحرک یونی با منبع یونش تخلیه کرونا و (ب) طیف تحرک یونی نوعی به‌دست آمده از آن

نشان‌دهنده نوع گونه و شدت آن متناسب با غلظت آن گونه است. با تغییر قطبیت دستگاه می‌توان یون‌های مثبت یا منفی را آشکار کرد. نوع منبع یونش در طیف‌سنج تحرک یونی به‌طور مستقیم تعیین‌کننده سازوکار یونش و فراورده‌های به‌دست آمده از یونش است. تاکنون منبع‌های متنوعی برای تولید یون در طیف‌سنج تحرک یونی معرفی شده است. از منابع‌های یونش متداول می‌توان به تخلیه کرونا، مواد رادیواکتیو مانند  $^{63}Ni$ ، الکترواسپری، منابع

در این دستگاه نمونه به همراه گاز حامل به ناحیه یونش دستگاه وارد می‌شود و فرایند یونش بر آن صورت می‌گیرد. سپس یون‌های تولیدشده در هنگام بازبودن شبکه الکتریکی به ناحیه رانش وارد می‌شوند و تحت میدان الکتریکی یکنواخت این ناحیه، به سمت جمع‌کننده حرکت می‌کنند و برحسب تحرکشان از یکدیگر جدا می‌شوند و در زمان‌های متفاوت به جمع‌کننده می‌رسند. با برخورد هر گروه از یون‌ها به جمع‌کننده، یک نشانک ایجاد می‌شود که زمان هر کدام

طیف‌های تحرک یونی، برنامه VisIMS به کار گرفته شد. این نرم‌افزار برای تحلیل داده‌های پیکواسکوپ مربوط به دستگاه IMS توسط شرکت تاف‌فناورپارس طراحی شده است. یکی از قابلیت‌های این نرم‌افزار تبدیل طیف تحرک یونی به طیف جرمی بر مبنای معادله منحنی ارتباط جرم به تحرک است (معادله ۲) [۳۲].

$$\log(m) = -a \times K_0 + b \quad (2)$$

که در آن،  $a$  و  $b$  ضرایب تجربی و  $K_0$  تحرک کاهش یافته است و از معادله (۳) به دست می‌آیند.

$$K_0 = \frac{d}{E \times t_d} \frac{273}{T} \frac{P}{760} \quad (3)$$

که در آن،  $d$  طول لوله رانش بر حسب  $cm$ ،  $E$  شدت میدان الکتریکی در ناحیه رانش بر حسب  $V/cm$ ،  $t_d$  زمان رانش،  $T$  دمای خانک بر حسب کلونین و  $P$  فشار در آزمایشگاه بر حسب  $mmHg$  است. پس از وارد کردن اطلاعات یا شده، همه زمان‌های رانش به جرم تبدیل می‌شوند و طیفی به دست می‌آید که محور عمودی آن شدت نشانک و محور افقی آن جرم پیش‌بینی شده برای هر زمان رانش در طیف تحرک یونی است.

یک روش برای به کارگیری معادله ۲، روش دو مرجعی یا دو جرم استاندارد است. در این روش زمان رانش و جرم قطعی دو نقطه از طیف تحرک یونی به برنامه داده شده است و طیف جرمی بدون نیاز به در نظر گرفتن شرایط آزمایشگاهی به دست می‌آید. پایه این روش و معادله‌های مربوط در مرجع [۳۳] بیان شده است. در این پژوهش روش دو مرجعی برای پیش‌بینی جرم گونه‌های یونی ناشناخته در طیف تحرک یونی پریندوپریل اربومین به کار رفته است.

گرمایی، تابش فرابنفش و تابش لیزر اشاره کرد [۳۰]. یونش با تخلیه کرونا یکی از روش‌های مهم یونش در طیف‌سنج تحرک یونی بشمار می‌آید. به طور ساده تخلیه کرونا با اعمال پتانسیل الکتریکی بین دو الکترود فلزی که به یک منبع تغذیه DC متصل شده‌اند، تشکیل می‌شود [۳۱]. از طراحی-های متنوعی برای ایجاد تخلیه کرونا استفاده می‌شود که از میان آن‌ها طراح نقطه‌ای - صفحه‌ای جریان الکتریکی بیشتر و پایداری را به وجود می‌آورد. اگر پلاریته الکترود نقطه‌ای مثبت باشد کرونا به وجود آمده را کرونا مثبت می‌نامند. با برقراردن تخلیه الکتریکی یک سری واکنش‌های زنجیره‌ای اتفاق می‌افتد که اگر گاز موجود در محیط هوا باشد، فراورده‌های نهایی اصلی این واکنش‌ها در تخلیه کرونا مثبت شامل یون‌های آب پوشیده  $H_3O^+$  و  $NH_4^+$  است که یون‌های واکنشگر نامیده می‌شوند. شرایط دستگاهی در تمام آزمون‌های در این پژوهش در جدول ۱ ارایه شده است.

جدول ۱ عامل‌های دستگاه طیف‌سنج تحرک یونی

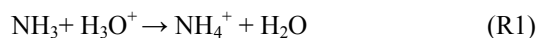
عامل	مقدار
گاز رانش و حامل	نیتروژن
سرعت جریان گاز رانش	۵۰۰ ml/min
سرعت جریان گاز حامل	۴۰۰ ml/min
سرعت جریان دوپانت (آمونیاک)	۲۰ ml/min
میدان ناحیه رانش	۵۰۰ V/cm
دمای محفظه تزریق	۲۳۰ °C
دمای خانک	۲۰۰ °C
پهنای پالس دروازه یونی	۳۰ us
قطبیت	مثبت

نشانک جمع شده در آشکارساز پس از رقمی شدن و ورود به کامپیوتر، با برنامه پیکواسکوپ ۶ مدل (۶.۱۰.۱۶.۲) نمایش داده شده و ثبت می‌شود. برای پردازش پیشرفته

## نتیجه‌ها و بحث

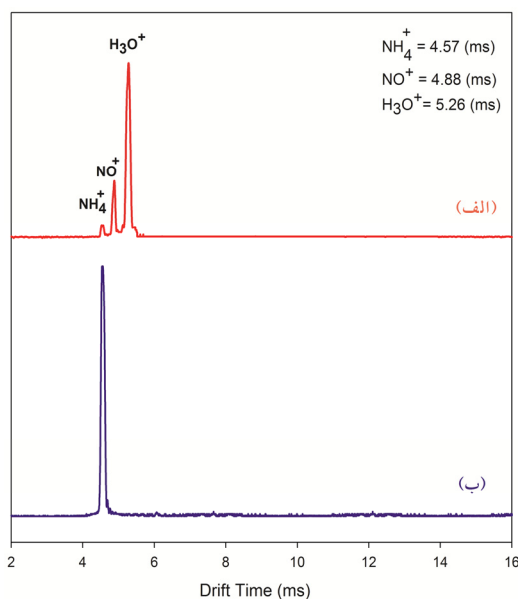
هر پیک در طیف تحرک یونی به وجود آمده از یک گونه یونی ویژه است. به طور معمول، در طیف تحرک یونی با منبع یونش تخلیه کرونا در صورتی که غلظت نمونه به اندازه کافی زیاد باشد، بیشتر از یک پیک برای هر نمونه شیمیایی مشاهده می‌شود. این پیک‌ها می‌توانند منشأهای متفاوتی داشته باشند: (الف) پیوند پروتون به مکان‌های متفاوت در یک مولکول و ایجاد همپارهای پروتونه شده با تحرک یونی متفاوت [۳۴]، (ب) شکسته شدن مولکول‌های اولیه در محل تزریق در اثر گرما و پیوند پروتون به قطعات به وجود آمده در ناحیه یونش [۳۵]، (ج) شکسته شدن یون‌های پروتونه شده اولیه در اثر برخورد‌های یون-مولکولی در ناحیه یونش و یا رانش [۳۲] و (د) تجمع گونه‌های یونی و خنثی موجود در ناحیه یونش و تشکیل خوشه‌های یونی [۳۳]. شناسایی این پیک‌ها می‌تواند به فهم سازوکار یونش آن گونه و فرایند قطعه‌قطعه شدن و یا تجمع گونه‌ها کمک کند.

شکل ۳ طیف‌های تحرک یونی زمینه با منبع یونش تخلیه کرونا در گاز نیتروژن و در مد مثبت را نشان می‌دهد. سه پیک در شکل ۳-الف به ترتیب از چپ به راست مربوط به یون‌های آب پوشیده  $\text{NH}_4^+$ ،  $\text{NO}^+$  و  $\text{H}_3\text{O}^+$  هستند [۳۶] و شکل ۳-ب طیف تحرک یونی زمینه را در حضور بخار آمونیاک به عنوان دوپانت در ناحیه یونش نشان می‌دهد. با ورود بخار آمونیاک به ناحیه یونش دستگاه، با توجه به اینکه آمونیاک پروتون‌خواهی بیشتری نسبت به آب دارد، واکنش زیر اتفاق می‌افتد:



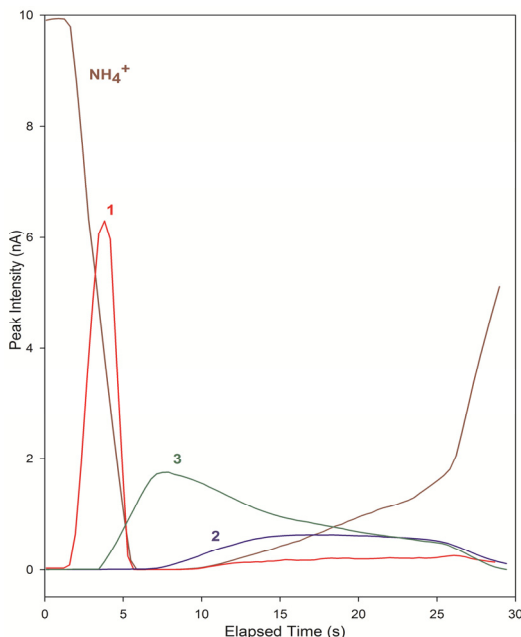
در نتیجه یون‌های هیدرونیوم مصرف شده و یون‌های آمونیم تولید می‌شوند و تعداد یون‌های آمونیم افزایش می‌یابد تا آن جایی که تنها پیک موجود در طیف زمینه پیک مربوط به یون‌های آمونیم خواهد بود.

استفاده از دوپانت آمونیم حساسیت و گزینش پذیری دستگاه را نسبت به بعضی از مواد افزایش می‌دهد. با یون آمونیم تنها ترکیباتی با پروتون‌خواهی بالاتر از آن را می‌توان یونیده کرد. هدف اصلی از این پژوهش شناسایی فرآورده آمید به وجود آمده از واکنش دو مولکول حاوی گروه‌های کربوکسیلیک اسید و آمین با اعمال شوک گرمایی است. ترکیبات آمیدی پروتون‌خواهی بیشتری از آمونیاک دارند [۳۸] و با دریافت پروتون از یون‌های واکنشگر آمونیم یونیده می‌شوند. از طرفی در صورت استفاده از یون آمونیم، ناخالصی‌ها و سایر فرآورده‌های به وجود آمده از تخریب گرمایی یونیده نمی‌شوند و در نتیجه تداخل پیک‌ها کاهش می‌یابد. به همین دلیل، همه طیف‌های تحرک یونی در این پژوهش با یون واکنشگر آمونیم به دست آمده‌اند.



شکل ۳ طیف تحرک یونی زمینه با گاز رانش نیتروژن (الف) در غیاب دوپانت (ب) با تزریق آمونیاک به عنوان دوپانت

تحول زمانی پیکها است. در واقع طیف‌های نمایش داده شده در شکل‌های ۳ و ۴، طیف‌های با شدت نشانک بیشینه هستند. اما از لحظه تزریق نمونه به دستگاه، ابتدا شدت پیک‌های نمونه افزایش می‌یابد، به بیشینه می‌رسد و سپس کاهش می‌یابد تا این که همه نمونه تزریق شده وارد خانک شود و تجزیه به پایان برسد. دستگاه در هر ثانیه چندین طیف ثبت می‌کند. اگر شدت پیکها بر حسب گذشت زمان رسم شود، اطلاعاتی در مورد ماهیت گونه‌های سازنده پیکها به دست خواهد آمد. تغییر در شدت پیکها از لحظه تزریق تا ۳۰ ثانیه پس از آن مربوط به طیف شکل ۴ در شکل ۵ نمایش داده شده است.



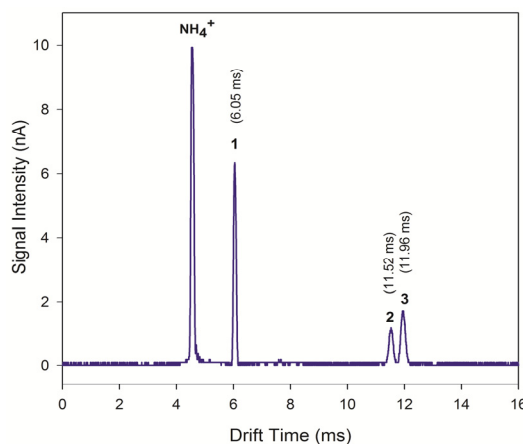
شکل ۵ تحول زمانی پیک‌های آشکار شده در طیف تحرک یونی پریندوپریل اربومین

همان‌طور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، پیک شماره ۱ بی‌درنگ پس از تزریق نمونه آشکار شده، به شدت بیشینه رسیده و شدت آن به سرعت کاهش یافته است. این مشاهده

### طیف تحرک یونی پریندوپریل اربومین

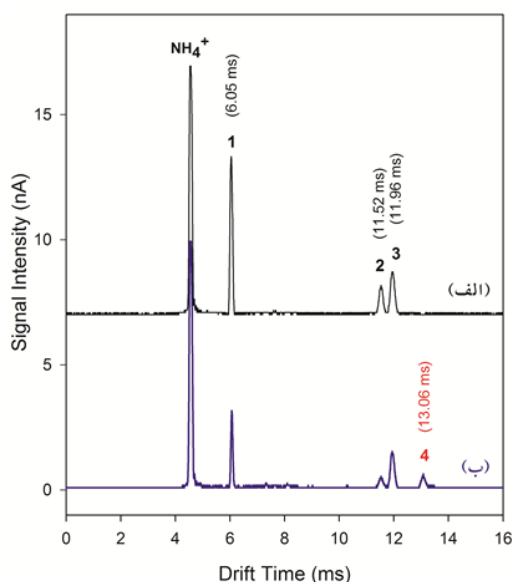
شکل ۴ طیف تحرک یونی نمک پریندوپریل اربومین را با یون واکنشگر غالب آمونیم نشان می‌دهد. برای تزریق نمونه، کاوند تزریق تا دمای محیط سرد شد و پس از تماس با نمونه جامد پریندوپریل اربومین، به محل تزریق وارد شد. همان‌طور که در شکل ۴ مشاهده می‌شود، غیر از پیک یون‌های واکنشگر، سه پیک یون فرآورده مشاهده می‌شود که با شماره‌های ۱ تا ۳ مشخص شده‌اند.

نظر به اینکه سازوکار یونش چیره در تخلیه کرونا انتقال پروتون از یون‌های واکنشگر به گونه خنثی و تولید یون پروتونه شده ( $MH^+$ ) است، می‌توان پیک شماره ۳ را به گونه یونی  $MH^+$  نسبت داد. چرا که پیک شماره ۳ در بیشترین زمان رانش آشکار شده است. از طرف دیگر، پیک‌های شماره ۱ و ۲ که در زمان رانش کمتری از پیک شماره ۳ آشکار شده‌اند ناشی از گونه‌های یونی هستند که جرم یا حجم و یا قطبیت کمتری نسبت به  $MH^+$  دارند.



شکل ۴ طیف تحرک یونی پریندوپریل اربومین با یون واکنشگر آمونیم

یک روش برای اظهار نظر در مورد ماهیت گونه‌های یونی تشکیل‌دهنده پیکها در طیف تحرک یونی بررسی



شکل ۶ طیف تحرک یونی پریندوپریل اربومین با یون واکنشگر آمونیم، (الف) بدون اعمال شوک گرمایی و (ب) با اعمال شوک گرمایی در دمای  $400^{\circ}\text{C}$  پیش از تزریق

یک نتیجه قابل تامل از این روش تزریق به دست آمده است و آن اینکه، افزون بر سه پیک آشکار شده در طیف تحرک یونی پریندوپریل اربومین بدون اعمال شوک گرمایی (شکل ۶-الف)، یک پیک جدید در طیف در زمان رانش  $13.06$  میلی ثانیه آشکار شد که با شماره ۴ مشخص شده است. این پیک در زمان رانش بالاتری نسبت به پیک شماره ۳ ( $\text{MH}^+$ ) آشکار شده است. به نظر می رسد اعمال گرمای شدید به نمونه موجب انجام یک واکنش شیمیایی بین فراورده های به دست آمده از شکست و مولکول پایه، شده است. به طور کلی در طیفسنجی تحرک یونی، پیک های با زمان رانش بالاتر از پیک مولکول پروتونه شده مادر به دوپار با مرز پروتون  $[40]$  و یا به خوشه به دست آمده از پیوند یون-های واکنشگر به مولکول نمونه  $[41]$  نسبت داده می شوند. اما این گونه خوشه ها به طور معمول در دمای بالا پایدار نیستند  $[33]$  و  $[42]$ . با توجه به این که دمای خانک طیفسنج

ثابت می کند که گونه یونی سازنده پیک شماره ۱ از شکست پریندوپریل در ناحیه یونش به وجود نیامده است بلکه این گونه در محل تزریق وجود داشته است. به عبارت دیگر، گونه سازنده پیک شماره ۱ به همراه مولکول های پریندوپریل وارد محفظه تزریق شده و به دلیل سبک تر بودن سریع تر از مولکول های پریندوپریل به ناحیه یونش رسیده و پس از دریافت پروتون به صورت یک پیک در طیف تحرک یونی دیده شده است. بنابراین، پیک شماره ۱ به احتمال مربوط به گونه ترشیوبوتیل آمین است که با نسبت مولی برابر با پریندوپریل در نمونه وجود دارد. این گونه به دلیل سبک تر بودن، با وجود ورود هم زمان با پریندوپریل به محل تزریق، پیش از پریندوپریل با گاز حامل به ناحیه یونش رسیده و یونیده شده است. این ادعا با نتیجه های مطالعات پایداری گرمایی پریندوپریل اربومین نیز تایید می شود. پایداری گرمایی پریندوپریل - ترشیوبوتیل آمین دی هیدرات<sup>۱</sup> در هوا توسط بودا<sup>۲</sup> و همکارانش بررسی شد  $[39]$ . نتیجه های تجزیه گرمایی (TG) به وجود آمده از این پژوهش نشان داد که در گستره دمایی  $125$  تا  $170^{\circ}\text{C}$  گروه ترشیوبوتیل آمین (اربومین) از پریندوپریل جدا می شود.

طیف تحرک یونی پریندوپریل با اعمال شوک گرمایی در دمای  $400^{\circ}\text{C}$

نمونه پریندوپریل اربومین پیش از تزریق به دستگاه با یک روش ساده تحت شوک گرمایی قرار گرفت. به این منظور ابتدا دمای کاوند تزریق تا  $400^{\circ}\text{C}$  بالا برده شد و بی درنگ در تماس با نمونه جامد قرار گرفت و سپس به محل تزریق وارد شد. در این روش تزریق، دست کم بخشی از نمونه پیش از ورود به محفظه تزریق به طور آبی در معرض گرمای بالا قرار می گیرد. طیف تحرک یونی به دست آمده از این روش تزریق با یون واکنشگر آمونیم در شکل ۶-ب نمایش داده شده است.

1. Perindopril tert-butylamine dihydrate

2. Buda et al.

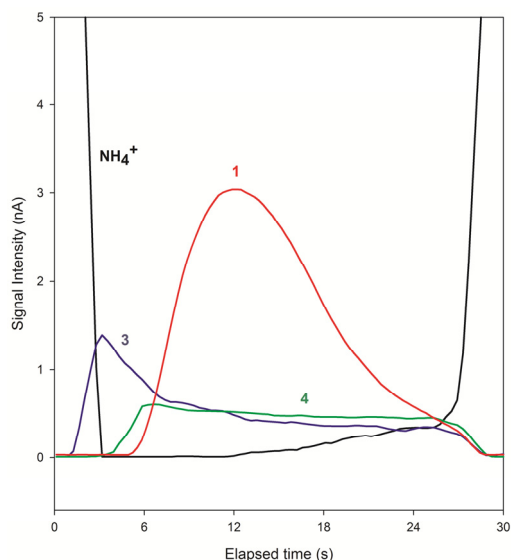


آشکار شده و ناپدید می‌شود. در حالتی که نمونه پیش از تزریق تحت شوک گرمایی در دمای  $400^{\circ}\text{C}$  قرار می‌گیرد، پیک شماره ۱ با اندکی تأخیر پس از پیک‌های شماره ۳ و ۴ آشکار می‌شود. همچنین، در این حالت پیک شماره ۱ طول عمر خیلی زیادی نیز دارد.

از این مشاهده‌ها می‌توان نتیجه گرفت که گونه سازنده پیک شماره ۱ در روش اعمال شوک گرمایی در دمای  $400^{\circ}\text{C}$ ، بر خلاف حالت پیشین در ناحیه یونش طیف‌سنج و از شکستن شدن گونه یونی سازنده پیک شماره ۴ به وجود آمده است. پیک شماره ۴ که در زمان رانش بالاتری از پیک شماره ۳ ( $\text{MH}^+$ ) آشکار شده، به‌طور قطع مربوط به یک گونه یونی است که از پیوند یک قطعه به مولکول مادر به وجود آمده است. محتمل‌ترین قطعه برای این مورد ترشیوبوتیل‌آمین است. همان‌طور که در مقدمه بیان شد، کربوکسیلیک اسیدها و آمین‌ها قابلیت واکنش تولید آمید را در دمای بالا با حذف یک مولکول آب دارند. بنابراین، می‌توان پیک شماره ۴ را به آمید به‌وجود آمده از واکنش پریندوپریل با ترشیوبوتیل‌آمین نسبت داد که در اثر گرما در نوک کاوند تزریق تولید شده و با ورود به ناحیه یونش دستگاه، پس از دریافت پروتون، گونه یونی با جرم واقعی  $424/5$  را تولید کرده است. در ادامه برای تایید این ادعا جرم گونه‌های سازنده پیک‌ها در طیف تحرک یونی پریندوپریل اربومین پیش‌بینی شد.

تخمین جرم گونه‌های سازنده پیک‌ها در طیف تحرک یونی برای تخمین جرم گونه‌های سازنده پیک‌ها در طیف تحرک یونی پریندوپریل اربومین، روش دومرجعی در نرم افزار VisIMS بکار گرفته شد. به این منظور، پیک‌های شماره ۱ و ۳ به عنوان مرجع انتخاب شدند. جرم  $74$  معادل جرم گونه ترشیوبوتیل‌آمین پروتونه شده به پیک شماره ۱ نسبت داده شد. جرم  $369/5$  واحد برای پیک شماره ۳ در نظر گرفته شد که

تحرک یونی در همه آزمون‌های این پژوهش  $200^{\circ}\text{C}$  بوده است، نسبت‌دادن پیک شماره ۴ به گونه یونی خوشه منطقی به نظر نمی‌رسد. برای بررسی دقیق‌تر، تحول زمانی پیک‌ها در طیف تحرک یونی شکل ۶-ب در شکل ۷ ارایه شده است.



شکل ۷ تحول زمانی پیک‌های آشکار شده در طیف تحرک یونی پریندوپریل اربومین با اعمال شوک گرمایی در دمای  $400^{\circ}\text{C}$  پیش از تزریق

با تزریق نمونه، نخستین پیک یون فرآورده آشکار شده در طیف تحرک یونی، پیک شماره ۳ است و با ۳ ثانیه تأخیر پیک شماره ۴ آشکار شده است. پیک شماره ۱ در ثانیه ۶ پس از تزریق نمونه آشکار شده و با افزایش شدت آن، افزایش شدت پیک شماره ۴ متوقف شده است. یک تفاوت قابل مشاهده در حالت اعمال شوک گرمایی به نمونه نسبت به دمای پایین‌تر، در زمان پیدایش و طول عمر پیک شماره ۱ است. در حالتی که نمونه در محفظه تزریق در دمای حدود  $200^{\circ}\text{C}$  گرمادهی می‌شود (شکل ۵)، پیک شماره ۱ پیش از آشکار شدن پیک پریندوپریل پروتونه شده (پیک شماره ۳)

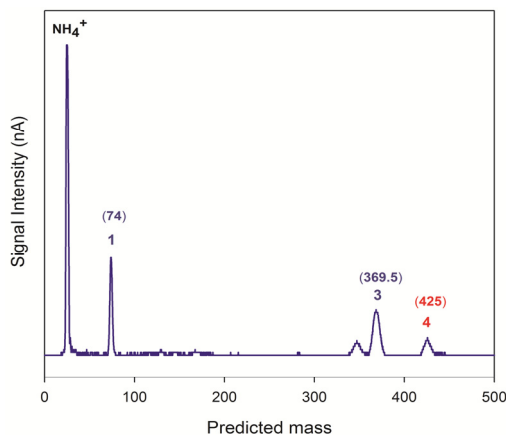
## نتیجه‌گیری

از ابتدای پیدایش شیمی آلی، روش‌های متفاوتی برای تشکیل پیوند آمیدی ارائه شده است. اما با توجه به اهمیت پیوند آمیدی در علوم دارویی و زیستی، معرفی روش‌های نوآورانه برای تشکیل این نوع پیوند هنوز مورد توجه پژوهشگران است. در این پژوهش، تشکیل پیوند آمیدی از واکنش مستقیم و بدون حلال بین پریندوپریل و ترشیوبوتیل‌آمین با اعمال شوک گرمایی در دمای  $400^{\circ}\text{C}$  به اثبات رسید. طیف‌سنج تحرک یونی به‌عنوان یک روش تجزیه ارزان و سریع برای شناسایی بی‌درنگ فرآورده‌های واکنش بالا معرفی شد. نتایج این پژوهش نشان داد که با بررسی تغییر شدت پیک‌ها در طیف‌های تحرک یونی یک نمونه شیمیایی می‌توان در مورد ماهیت گونه‌های یونی ایجاد کننده پیک‌ها اظهار نظر کرد. قابلیت روش دو مرجعی برای اجرای معادله ارتباط جرم به تحرک یونی، به‌منظور پیش‌بینی جرم گونه‌های یونی ایجادکننده پیک‌ها در طیف تحرک یونی به اثبات رسید.

## سپاسگزاری

نویسندگان از حمایت مالی دانشگاه زنجان و همچنین، آقای دکتر بهمن فرجمند در اجرای پروژه قدردانی می‌کنند.

معادل جرم یک مولکول پریندوپریل پروتونه شده است. طیف جرمی حاصل در شکل ۸ نمایش داده شده است.



شکل ۸ طیف جرمی پیش‌بینی شده از روی طیف تحرک یونی پریندوپریل اربومین با به‌کارگیری روش دو مرجعی

همان‌طور که در شکل ۸ مشاهده می‌شود، جرم ۴۲۵ برای پیک شماره ۴ پیش‌بینی شده است که معادل جرم ترکیب امید پروتونه‌شده به‌دست آمده از واکنش پریندوپریل و ترشیوبوتیل‌آمین با فرمول مولکولی  $[\text{C}_{23}\text{H}_{41}\text{N}_3\text{O}_4]\text{H}^+$  و جرم دقیق ۴۲۴٫۶ واحد است. بنابراین، از یک طرف تشکیل ترکیب امید از واکنش پریندوپریل و ترشیوبوتیل‌آمین با اعمال شوک گرمایی به اثبات می‌رسد و از طرف دیگر قابلیت روش دو مرجعی برای پیش‌بینی دقیق جرم گونه‌های سازنده طیف تحرک یونی تایید می‌شود.

## مراجع

- [1] Ghose, A.K.; Viswanadhan, V.N.; Wendoloski, J.J.; J. Comb. Chem. 1, 55-68, 1999.
- [2] Houlding, T.K.; Tchabanenko, K.; Rahman, M.T.; Rebrov, E.V.; Org. Biomol. Chem. 11, 4171-4177, 2013.
- [3] Gelens, E.; Smeets, L.; Sliedregt, L.A.; Van Steen, B.J.; Kruse, C.G.; Leurs, R.; Orru, R.; Tetrahedron let. 46, 3751-3754, 2005.
- [4] Wang, X.J., Yang, Q., Liu, F., You, Q.; Synth. Commun. 38, 1028-1035, 2008.
- [5] Lundberg, H.; Tinnis, F.; Adolffson, H.; Chem. Eur. J. 18, 3822-3826, 2012.

- [6] Deiana, C.; Sakhno, Y.; Fabbiani, M.; Pazzi, M.; Vincenti, M.; Martra, G.; *ChemCatChem*. 5, 2832-2834, 2013.
- [7] Lundberg, H.; Adolfsson, H.; *ACS Catal.* 5, 3271-3277, 2015.
- [8] Krause, T.; Baader, S.; Erb, B.; Gooßen, L.J.; *Nat. Commun.* 7, 11732, 2016.
- [9] Liu, Y.; Cherkasov, N.; Gao, P.; Fernández, J.; Lees, M.R.; Rebrov, E.V.; *J. Catal.* 355, 120-130, 2017.
- [10] Mirza-Aghayan, M.; Tavana, M.M.; Boukherroub, R.; *Ultrason. Sonochem.* 29, 371-379, 2016.
- [11] de Figueiredo, R.M.; Suppo, J.-S.; Campagne, J.-M.; *Chem. Rev.* 116, 12029-12122, 2016.
- [12] Goossen, L.J.; Ohlmann, D.M.; Lange, P.P.; *Synth.* 2009, 160-164, 2009.
- [13] Eiceman, G.A.; *Crit. Rev. Anal. Chem.* 22, 471-490, 1991.
- [14] Bahrami, H.; Farrokhpour, H.; *Spectrochim. Acta A* 135, 646-651, 2015.
- [15] Forbes, T.P.; Lawrence, J.; Verkouteren, J.R.; Verkouteren, R.M.; *Analyst* 144, 6391-6403, 2019.
- [16] Zheng, X.; Wojcik, R.; Zhang, X.; Ibrahim, Y.M.; Burnum-Johnson, K.E.; Orton, D.J.; *Annu. Rev. Anal. Chem.* 10, 71-92, 2017.
- [17] Rearden, P.; Harrington, P.B.; *Anal. Chim. Acta* 545, 13-20, 2005.
- [18] Shahraki, H.; Tabrizchi, M.; Farrokhpour, H.; *J. Hazard. Mater.* 357, 1-9, 2018.
- [19] Hernández-Mesa, M.; Ropartz, D.; García-Campaña, A.M.; Rogniaux, H.; Dervilly-Pinel, G.; Le Bizec, B.; *Molecules* 24, E2706, 2019.
- [20] Bahrami, H.; Salehabadi, H.; *J. Mol. Struct.* 1083, 330-335, 2015.
- [21] Valadbeigi, Y.; Farrokhpour, H.; Rouholahnejad, F.; Tabrizchi, M.; *Int. J. Mass Spectrom.* 369, 105-111, 2014.
- [22] Jazan, E.; Tabrizchi, M.; *Chem. Phys.* 355, 37-42, 2009.
- [23] Baumbach, J.I.; Eiceman, G.A.; *Appl. spectrosc.* 53, 338A-355A, 1999.
- [24] Parker, E.; Aarons, L.; Rowland, M.; Resplandy, G.; *Eur. J. Pharm. Sci.* 26, 104-113, 2005.
- [25] Ferrari, R.; *Expert Rev. Cardiovasc. Ther.* 3, 15-29, 2005.
- [26] Hurst, M.; Jarvis, B.; *Drugs* 61, 867-896, 2001.
- [27] Fogari, R.; Pasotti, C.; Zoppi, A.; Corradi, L.; Mugellini, A.; Preti, P.; *J. Hypertens.* 22, S173, 2004.
- [28] Remko, M.; *Eur. J. Med. Chem.*, 44, 101-108, 2009.
- [29] Remko, M.; Bojarska, J.; Ježko, P.; Sieroń, L.; Olczak, A.; Maniukiewicz, W.; *J. Mol. Struct.* 997, 103-109, 2011.
- [30] Guharay, S.K.; Dwivedi, P.; Hill, H.H.; *IEEE Trans. Plasma Sci.* 36, 1458-1470, 2008.
- [31] Tabrizchi, M.; Khayamian, T.; Taj, N.; *Rev. Sci Instrum.* 71, 2321-2328, 2000.
- [32] Bahrami, H.; Farajmand, B.; Lakmehsari, M.S.; *Int. J. Mass Spectrom.* 430, 110-116, 2018.
- [33] Tozih, M.; Bahrami, H.; Farajmand, B.; Tabrizchi, M.; *Int. J. Mass Spectrom.* 448, 116272-116284, 2020.
- [34] Marlton, S.J.P.; McKinnon, B.I.; Ucur, B.; Maccarone, A.T.; Donald, W.A.; Blanksby S.J.; Trevitt, A.J.; *Faraday Discuss.* 217, 453-475, 2019.
- [35] Valadbeigi, Y.; Bayat, S.; Ilbeigi, V.; *Anal. Chem.* 92, 7924-7931, 2020.
- [36] Carroll, D.I.; Dzidic, I.; Stillwell, R.N.; Horning, E.C.; *Anal. Chem.* 47, 1956-1959, 1975.
- [37] Valadbeigi, Y.; Ilbeigi, V.; Michalczuk, B.; Sabo, M.; Matejcik, S.; *J. Phys. Chem. A* 123, 313-322, 2018.
- [38] Grützmacher, H.F.; Caltapanides, A.; *J. Am. Soc. Spectrom.* 5, 826-836, 1994.
- [39] Buda, V.; Andor, M.; Ledeti, A.; Ledeti, I.; Vlase, G.; Vlase, T.; Cristescu, C.; Voicu, M.; Suci, L.; Tomescu, M.; *Int. J. Mol. Sci.* 18, 164-179, 2017.
- [40] Ewing, R.G.; Eiceman, G.A.; Harden, C.S.; & Stone, J.A.; *Int. J. Mass Spectrom.* 255, 76-85, 2006.
- [41] Valadbeigi, Y.; Ilbeigi, V.; Mirsharifi, M.S.; *J. Mass Spectrom.* 55(10), e4586, 2020.
- [42] An, X.; Eiceman, G.A.; Räsänen, R.M.; Rodriguez, J.E.; Stone, J. A.; *J. Phys. Chem. A* 117, 6389-6401, 2013.

## Amide bond formation by applying thermal shock and rapid identification of the products using ion mobility spectrometry

Farshad Mirzaee Valadi<sup>1</sup>, Hamed Bahrami<sup>2,\*</sup>, Manijeh Tozihi<sup>2</sup>

1. M.Sc. in Physical Chemistry, Department of Chemistry, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

2. Assistant Prof. in Physical Chemistry, Department of Chemistry, University of Zanjan, Zanjan, Iran.

**Abstract:** The amide bond constitutes the skeleton of biologically significant peptides and proteins. The amide group exists in many pharmaceutical compounds. Thus, the development of an efficient amidation method continues to be an essential scientific pursuit. In this research, a simple method was introduced for the direct and solvent-free formation of amides, and also for real-time product identification. At first, the ion mobility spectrum of perindopril erbumine salt was obtained, and the ionic species resulting from evaporation and ionization of this salt in corona discharge were identified. Subsequently, the formation of a product ion having heavier mass than protonated perindopril was demonstrated by applying thermal shock at 400 °C to perindopril erbumine salt. The variation of the intensities of the peaks in the ion mobility spectra over the elapsed time, and also predicting the mass of the ionic species were examined to determine the nature of the newly formed product. Through the method described in this article the new product was identified to be an amide compound. The efficiency of the two-reference method for applying the mass-mobility correlation equation to predict the masses of ion species in the ion mobility spectrometry was demonstrated. The results of this study showed that applying thermal shock to perindopril erbumine in addition to degradation of the sample could cause to create new products through the formation of amide bond.

**Keywords:** Ion mobility spectrometry, Amide bond formation, Thermal shock, Perindopril erbumine.