

电化学酰胺化反应中间体的原位质谱分析

羊雪, 惠人杰, 胡军

(江南大学生命科学与健康工程学院, 江苏 无锡 214200)

摘要: 酰胺键是一种广泛存在的重要化学键, 既是构建蛋白质和多肽的核心, 也是多种药物分子的活性中心。近年来, 基于电化学的酰胺化反应以高选择性、环境友好等优势受到广泛关注, 然而, 受限于反应过程的复杂性以及缺乏适当的分析技术, 其原位监测和机理研究却鲜有报道。本研究通过在纳升电喷雾喷针尖端集成金属工作电极的方式构建了一种新型耦合接口, 实现了电化学与质谱的在线联用。基于该技术原位监测了以三苯基膦为缩合剂的芳伯胺酰胺化反应过程, 并实现了其中多种关键中间体, 特别是一些短寿命自由基中间体的鉴定。该电化学-质谱耦合接口具有延迟低、样品耗量小、制备简单等优点, 有望成为电有机合成反应快速筛选和机理研究的重要工具。

关键词: 酰胺化反应; 自由基中间体; 原位质谱; 三苯基膦

中图分类号: O657.63

文献标志码: A

文章编号: 1004-2997(2024)01-0131-10

doi: 10.7538/zpxb.2023.0089

In-situ Mass Spectrometric Analysis of the Reactive Intermediates Generated in the Electrochemical Amidation Reactions

YANG Xue, HUI Ren-jie, HU Jun

(School of Life Sciences and Health Engineering, Jiangnan University, Wuxi 214200, China)

Abstract: Amide bond is a ubiquitous and crucial functional group that serves as the linchpin for constructing proteins, peptides, and is also the central site in numerous drug molecules. Consequently, it is crucial to investigate the strategies and mechanisms of amidation reactions. In recent years, the use of electrochemistry for amidation has gained significant attention due to its exceptional qualities such as increased selectivity and eco-friendliness. However, due to the complexities of the reaction processes and the scarcity of relevant analytical tools, the studies of *in-situ* monitoring and mechanistic investigations on these electrochemical amidation reactions are rare. In response to this challenge, a novel coupling device was designed in this study. The main component of the coupling device was a glass capillary tube with a metal cover. The metal coating on the tip's outer surface was connected to a high voltage power supply to drive the electrospray ionization process. Additionally, the metal coating inside the tip was also connected to the metal coating on the tip's outer surface and served as the working electrode for an electrochemical reaction. When high voltage was applied, both the electrospray

process and the electrochemical reaction on the tip could be driven simultaneously. The substances produced by the electrochemical reaction in the capillary tip could be quickly transferred to spray droplets, ionized *via* desolvation process, and finally detected *via* mass spectrometry. Based on this technique, a series of aromatic primary amines amidation reactions were observed *in situ* while using triphenylphosphine as the condensing agent. Numerous important intermediates were also discovered during these reactions. Remarkably, this novel approach not only facilitated continuous real-time monitoring of these reactions but also empowered scientists to unambiguously identify an array of key intermediates, including the elusive short-lived free radical intermediates. The electrochemical-mass spectrometry coupling device has numerous advantages, including short analysis delays, the ethical use of sample resources, and uncomplicated, simple preparation processes. It's potential to revolutionize the field of electroorganic synthesis reactions. This cutting-edge technique is poised to become an invaluable tool for rapid screening and in-depth investigations into the complex mechanisms of driving amidation reactions. The coupling device represents an exciting improvement forward in the context of drug investigations, where precision and efficiency are critical. Additionally, as society places increasing emphasis on environmental sustainability and the demand for precise chemical processes intensifies, this breakthrough coupling device is expected to become a formidable instrument in investigating the mechanism of electrochemical reactions.

Key words: amidation reactions; radical intermediate; *in-situ* mass spectrometry; triphenylphosphine

酰胺键是构筑各类生物活性分子的重要化学键,其广泛存在于多肽、蛋白质、临床批准的合成及天然药物中,例如利多卡因、扑热息痛、阿托伐他汀、吗氯贝胺、卡托普利、乙酰唑胺、帕纳替尼、甲氨蝶呤、曲美苄胺、青霉素、氯霉素类药物。酰胺键具有独特的化学结构和性质:1)氮原子为 sp^2 杂化,孤对电子所在的 p 轨道与羰基形成 p- π 共轭,因此,其 C—N 键具有部分双键特征;2)整个酰胺键呈平面几何结构,与酰胺相连的基团之间可呈反式(*trans*)或顺式(*cis*)构象;3)酰胺键中的羰基和氨基可分别作为氢键受体和氢键给体与靶蛋白形成复杂的氢键相互作用^[1]。除作为重要的药效团,酰胺键也常被用作各类化学偶联的连接化学键,在生化传感探针构建中应用广泛^[2]。因此,研究酰胺键的构建方法与机理具有重要意义。

酰胺键的构建除采用羧基(—COOH)与氨基(—NH₂)在高温下直接缩合外,更常见的策略是使用酰卤、酰基叠氮化合物、酸酐、活性酯等活性前体化合物反应生成^[3]。其中,应用最广泛的是活性酯法,常见的缩合试剂(如磷正离

子、脲正离子等)均是通过生成活性酯而最终形成酰胺键^[4]。近年来,利用单电子转移(single electron transfer, SET)的电化学氧化或电化学还原过程,通过产生自由基等活泼中间体促使合成反应在温和条件下平稳进行,有机电化学合成已成为一种高效、高选择性的绿色合成方式。例如,Nagahara等^[5]利用三苯基膦存在情况下的电化学酰胺化反应实现了多种药物分子(如亮丙瑞林)的高选择性合成,但受限于反应的复杂性以及电化学反应产生的自由基活泼中间体的短寿命特性,对该电化学酰胺化反应中自由基中间体形成的实验证据及其超快转化过程的解析仍具有挑战性。

电化学反应监测常用的方法有紫外-可见光谱法^[6]、瞬态吸收光谱法^[7]、核磁共振波谱法^[8-9]、电子顺磁共振波谱法^[10]等。虽然光谱法在反应中间体监测方面有较深入的发展,但在直接同时检测多种反应物、中间体、最终产物及副产物,特别是在瞬态中间体的形成与转化动态过程等方面仍存在一定的局限性。质谱法通过测量质荷比能够实现多个物质的同时免标

记、高灵敏测定,利用串联质谱技术能够获取关于电生成物种,特别是自由基中间体的结构信息。在化学反应在线监测方面,已报道多种基于解吸附电喷雾离子化质谱(DESI-MS)^[11-15]、萃取电喷雾离子化质谱(EESI-MS)^[16-20]、纳升电喷雾质谱(nESI-MS)^[21-25]、超声喷雾离子化质谱(SSI-MS)^[26-30]等装置的接口。例如,Liu等^[31]报道了使用纳升解吸电喷雾电离(nano-DESI)装置实现电化学与质谱的在线联用,但受限于 nano-DESI 较慢的流体输运过程,其仅能实现电化学反应产物以及部分长寿命中间体的质谱检测。

本工作拟开发一种新的电化学-质谱联用接口,以实现电化学反应中瞬态中间体的直接质谱检测,并研究这些活泼中间体的形成与转化动态过程,希望为电化学反应的机理研究及电有机合成反应的快速筛选提供参考。

1 实验部分

1.1 仪器与装置

LTQ-Orbitrap Velos 质谱仪:美国 Thermo Fisher Scientific 公司产品,配有 Xcalibur 型数据处理系统;微量上样器:德国 Eppendorf 股份公司产品;P-2000 玻璃管制液仪:美国 Sutter Instrument 公司产品;ZZS700-6/G 电子束蒸发镀膜仪:成都南光机器有限公司产品。

1.2 样品与试剂

三苯基膦(纯度>99.0%)、对甲基苯甲酸

(纯度 98%)、苄胺(纯度 99%)、磺胺噻唑(纯度 98%)、六氟异丙醇(纯度 99.5%);上海麦克林生化股份有限公司产品;二氯甲烷(纯度 99.9%);上海泰坦科技股份有限公司产品。

以二氯甲烷(CH₂Cl₂)-六氟异丙醇(HFIP)溶液(2:1,V/V)作为空白溶剂。分别称取 1 mmol/L 三苯基膦、对甲基苯甲酸、苄胺、磺胺噻唑溶液,加入空白溶剂,配制成 1 mol/L 样品溶液。

1.3 电化学-质谱联用接口的制备与表征

本研究开发的电化学-质谱联用接口示于图 1a。该集成化接口由 1 根喷镀金属薄层的玻璃毛细管构成,其同时作为微型电化学反应池和电喷雾电离的喷针。使用 1 台配备有二氧化碳激光的微电极拉制仪拉制玻璃毛细管(外径 1.00 mm,内径 0.58 mm,长度 10.0 cm),可得到所需开口直径约 2 μm 的锥形空白喷针,示于图 1b。然后,使用电子束蒸发镀膜仪完成毛细管外表面和针尖内壁上金属铂的蒸镀,即得镀铂喷针,其中,针尖内金属镀层的元素表征结果示于图 1c。

1.4 电化学-质谱联用装置

电化学-质谱联用装置的接口针尖外表面的金属镀层与高压电源连通以驱动电喷雾电离过程;针尖内的金属镀层与针尖外表面的金属镀层也呈连通状态,且直接作为电化学反应的工作电极。因此,通过施加高电压可以同时驱动针尖上的电喷雾过程与电化学反应过程,且

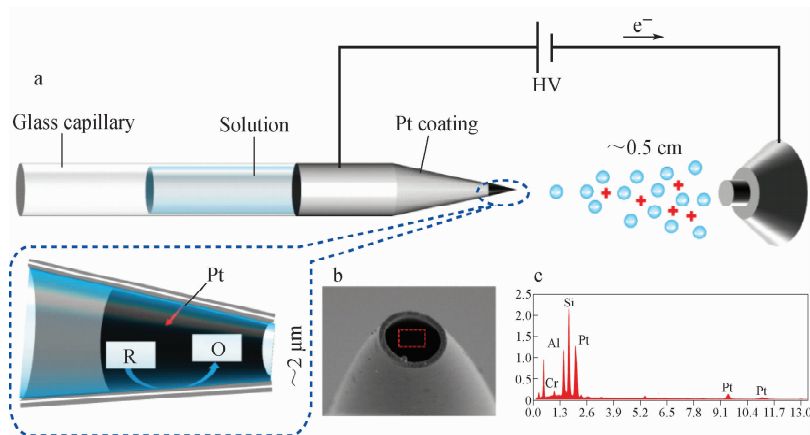


图 1 电化学-质谱联用装置示意图(a),镀铂喷针尖端扫描电镜图(b)和内壁元素表征图(c)

Fig. 1 Schematic illustration of the combination of electrochemistry and mass spectrometry (a), scanning electron microscopy of a Pt-decorated ion emitter (b) and its element characterization (c)

毛细管针尖内电化学反应产生的物质能够快速转移至喷雾液滴中,经历去溶剂过程而完成离子化,并最终被质谱检测。

1.5 质谱条件

LTQ-Orbitrap 质谱仪正离子模式,质量扫描范围 m/z 50~500;毛细管温度 275 °C;喷雾电压 0.5~1.5 kV;最大离子注入时间 50 ms (全扫描模式);二级质谱分析所用的碰撞诱导解离(CID)参数为标准化碰撞能量 25%~35%。质谱测试前,使用微量上样器将约 20 μL 样品灌注镀铂喷针,并置于质谱入口前,其中,针尖前端与质谱入口的距离约 5 mm。使用正离子模式时,将质谱仪内置的正高压电源通过导线与毛细管外表面的金属镀层相连,施加高电压即可触发针尖内的电化学反应和电喷雾电离过程,进而完成针尖内电化学反应的原位质谱分析。

2 结果与讨论

2.1 苄胺的电化学酰胺化反应原位质谱分析

电喷雾电离过程可被看作电化学反应过程。为验证镀铂喷针进行原位电化学反应的能力,本研究考察了空白喷针和镀铂喷针分析三苯基膦溶液的情况,结果示于图 2。使用空白喷针进行电喷雾电离质谱分析时,三苯基膦样

品产生 m/z 263.098 5 质谱峰,示于图 2a。根据精确质量数分析,其为三苯基膦的加氢峰(即 $[\text{PPh}_3 + \text{H}]^+$, 分子式为 $[\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{P} + \text{H}]^+$, 理论质荷比为 263.098 4, 质量偏差 $\Delta m = 0.1$ mu)。进一步对 m/z 263.098 5 进行 CID 分析,结果示于图 2b。根据三苯基膦的分子结构,并结合精确质量数分析,对主要的碎片离子进行结构确认。其中, m/z 262.090 0 是母离子丢失 1 个氢原子(H)后形成的; m/z 185.049 2 是母离子同时丢失 1 个苯基(C_6H_5)和 1 个 H 后形成的;而 m/z 108.012 9 则是母离子同时丢失 2 个 C_6H_5 和 1 个 H 后得到的。以上碎裂形式均与三苯基膦的分子结构吻合。

使用镀铂喷针得到的三苯基膦溶液质谱图示于图 2c。与空白喷针相比,出现了 m/z 262.090 5 谱峰,根据精确质量数,推测其为三苯基膦的自由基阳离子(即 $[\text{PPh}_3]^{\cdot+}$, 分子式为 $[\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{P}]^{\cdot+}$, 理论质荷比为 m/z 262.090 6, $\Delta m = -0.1$ mu)。该自由基阳离子的形成主要源自电喷雾电离过程中三苯基膦分子在喷针尖端内金属铂层上的单电子转移电化学反应。使用串联质谱对该阳离子自由基结构进行确认,结果示于图 2d。其中, m/z 261.082 5 是母离子丢失 1 个 H 形成的; m/z 184.043 4 是母离子同时丢失 1 个 C_6H_5 和 1 个 H 形成的;

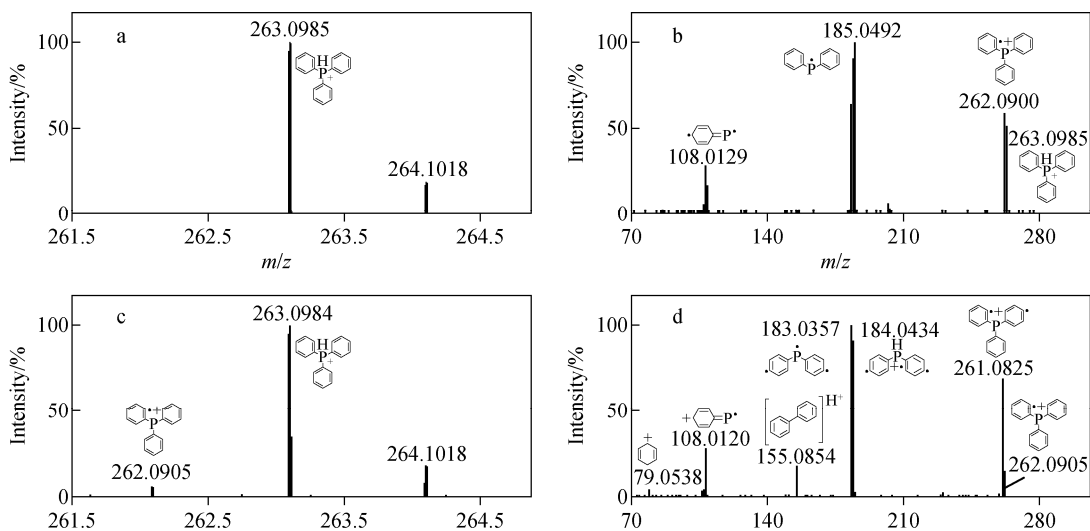


图 2 使用空白喷针得到的三苯基膦质谱图(a)和 m/z 263 二级质谱图(b),
使用镀铂喷针得到的三苯基膦质谱图(c)和 m/z 262 二级质谱图(d)

Fig. 2 Mass spectrum of PPh_3 using a bare ion emitter (a) and MS/MS spectrum of m/z 263 (b),
mass spectrum of PPh_3 using a Pt-decorated ion emitter (c) and MS/MS spectrum of m/z 262 (d)

m/z 183.035 7可能是 m/z 184.043 4继续失去 1 个 H 后形成的; m/z 108.012 0是母离子丢失 2 个 C_6H_5 形成的。此外,还观察到 m/z 155.085 4谱峰,其可能为母离子丢失 $[C_6H_4P]$ 碎片形成的; m/z 79.053 8可能为母离子丢失 $[C_{12}H_8P]$ 碎片形成的。可以看出,在相同的 CID 能量下,三苯基膦自由基产生了丰富的碎片离子,其碎裂模式与其加氢峰不同,主要体现在 $[C_6H_4P]$ 、 $[C_{12}H_8P]$ 等中性丢失过程。对三苯基膦自由基阳离子的成功检测,表明了本研究的镀铂喷针具有监测电化学反应过程的能力,能够实现原位质谱分析电氧化反应产生的自由基中间体。

为进一步研究三苯基膦对羧基的活化过程,在相同实验条件下,向已含有三苯基膦溶液的空白喷针和镀铂喷针中加入等摩尔质量的对甲基苯甲酸,其结果示于图 3。可以看出,加入对甲基苯甲酸后,空白喷针和镀铂喷针的谱图中均出现了 m/z 137 谱峰,其为对甲基苯甲酸的加氢峰(即 $[4\text{-methylbenzoic acid} + H]^+$, 分子式为 $[C_8H_8O_2 + H]^+$, 理论质荷比为 m/z 137.059 7, $\Delta m = 0.4$ mu)。与空白喷针相比,在镀铂喷针的质谱图上还观察到 m/z 397.135 9 谱峰。根据精确质量数分析,其为对甲基苯甲酸与三苯基膦进行电化学氧化反应得到的活性酯中间体(即 $((4\text{-methylbenzoyl oxy})\text{triphenylphosphonium})$, 分子式为 $[C_{26}H_{22}O_2P]^+$, 理论质荷比为 m/z 397.135 2, $\Delta m = 0.7$ mu)。对活性酯中间体进行串联质谱 CID 模式分析,结果示于图 3c。其中, m/z 279.093 1 和 119.049 3 是该活性酯中间体酯键断裂后形成的; m/z 263.098 2 则是母离子 P—O 键断裂后形成的,即三苯基膦的质子化离子,其碎裂形式与其分子结构吻合。

本实验进一步研究电化学反应产生的活性酯中间体与氨基的反应,向三苯基膦-对甲基苯甲酸溶液中加入苄胺,原位质谱分析结果示于图 4。由于苄胺的加入,质谱图中出现了 m/z 108.081 0 谱峰,为苄胺的加氢峰(即 $[\text{benzylamine} + H]^+$, 分子式为 $[C_7H_9N + H]^+$, 理论质荷比为 m/z 108.080 8, $\Delta m = 0.2$ mu), 示于图 4a。除苄胺信号,在使用镀铂喷针所得的质谱图中还观察到酰胺化反应产物的信号峰 m/z

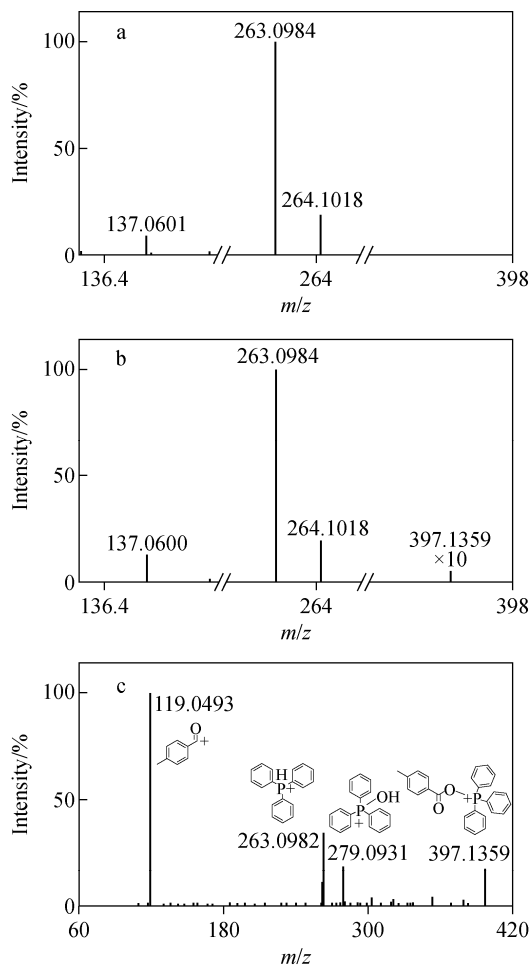


图 3 使用空白喷针(a)和镀铂喷针(b)得到的三苯基膦-对甲基苯甲酸混合溶液的质谱图, m/z 397 二级质谱图(c)

Fig. 3 Mass spectra of mixed solution of PPh_3 and 4-methylbenzoic acid using ion emitters of bare (a) and Pt-decorated (b), MS/MS spectrum of m/z 397 (c)

226.122 5(即 $[N\text{-benzyl-4-methylbenzamide} + H]^+$, 分子式为 $[C_{15}H_{15}NO + H]^+$, 理论质荷比为 m/z 226.122 6, $\Delta m = -0.1$ mu), 示于图 4b,进一步的串联质谱分析结果示于图 4c,可以看出碎裂主要发生在酰胺键位置。其中, m/z 119.050 0 和 106.065 8 是母离子酰胺键断裂后产生的, m/z 91.054 8 可能为 m/z 119.050 0 丢失 1 分子 CO 后形成的苄基碳正离子。需要指出的是,在使用空白喷针所得的三苯基膦-对甲基苯甲酸-苄胺质谱图中未见酰胺化反应产物的质谱峰,表明电化学在该酰胺化反应中具有重要作用。

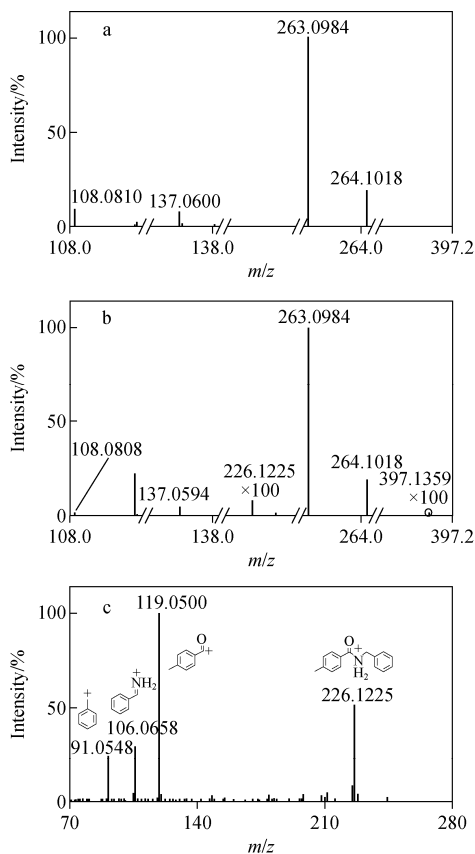


图4 使用空白喷针(a)和镀铂喷针(b)得到的三苯基膦-对甲基苯甲酸-苄胺混合溶液的质谱图, m/z 226 二级质谱图(c)

Fig. 4 Mass spectra of mixed solution of PPh_3 , 4-methylbenzoic acid and benzylamine using ion emitters of bare (a) and Pt-decorated (b), MS/MS spectrum of m/z 226 (c)

根据上述实验结果,推测三苯基膦电化学氧化介导的苄胺酰胺化反应机理示于图5。首先,三苯基膦分子在阳极上发生单电子氧化形成阳离子自由基($[\text{PPh}_3]^+$);然后,其作为缩合剂与对甲基苯甲酸上的羧基反应,期间进一步在阳极上发生单电子、单质子转移的氧化反应,形成活性酯中间体;最后,活性酯中间体与苄胺的氨基反应脱去1分子三苯基氧膦($\text{Ph}_3\text{P}=\text{O}$),形成相应的酰胺化产物。通过原位监测上述酰胺化反应中关键中间体(如三苯基膦自由基、活性酯中间体等)的形成与转化过程,为 Nagahara 等^[5]提出的反应机理提供了直接的实验证据支持。

2.2 磺胺噻唑电化学酰胺化反应原位质谱分析

磺胺类药物为人工合成的抗菌药,临床使用已超过50年,具有抗菌谱广、性质稳定、使用简便等优点。其中,磺酰胺基对位上的游离氨基是抗菌活性的必需基团,若该游离氨基被酰胺化,则通常会失去抗菌活性。因此,制备用于特殊病灶的磺胺类药物需要进行前药修饰(如酰胺化修饰),以增加药物稳定性、延长药物作用时间、提高药物选择性。以酞磺胺噻唑为例,游离氨基的酰胺化使其成为主要作用于肠道感染的抗菌药。该化合物在肠道内被水解为游离氨基,进而产生抑菌作用,常用于治疗细菌痢疾^[32]。用传统方法合成酞磺胺噻唑需要将磺胺噻唑与苯酞进行酰化反应,但这一过程往往

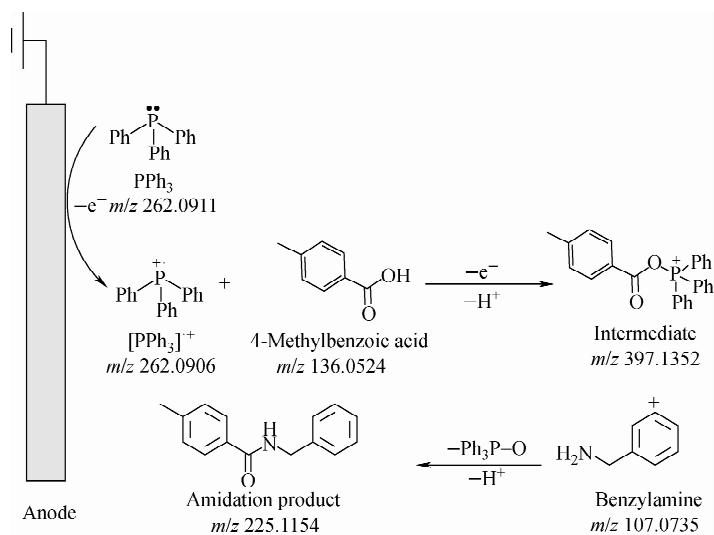


图5 苄胺的电化学酰胺化反应机理

Fig. 5 Proposed mechanism of the benzylamine amidation

需要较长的反应时间,并涉及复杂的步骤。鉴于此,利用原位质谱技术探究磺胺噻唑(ST)的电化学酰胺化反应发生的可能性。

本实验分别使用空白喷针和镀铂喷针分析磺胺噻唑-对甲基苯甲酸-三苯基膦的混合溶液,考察电化学酰胺化的反应情况,结果示于图6。由于磺胺噻唑的加入,谱图中均出现了其加氢峰 m/z 256.021 0(即 $[\text{ST}+\text{H}]^+$,分子式为 $[\text{C}_9\text{H}_9\text{N}_3\text{O}_2\text{S}_2+\text{H}]^+$,理论质荷比为 m/z 256.020 9, $\Delta m=0.1$ mu)。使用镀铂喷针在 m/z 374.063 1处观察到新的谱峰,根据精确质量数,推测其是磺胺噻唑酰胺化产物的加氢峰(即 $[\text{4-methyl-N-(4-(N-(thiazol-2-yl) sulfamoyl) phenyl) benzamide}+\text{H}]^+$,分子式为 $[\text{C}_{17}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_2+\text{H}]^+$,理论质荷比为 m/z 374.062 8, $\Delta m=0.3$ mu),示于图6b。串联质谱结果验证了该酰胺化产物的形成,示于图6c。其中, m/z 358.031 8是母离子同时丢失1个 CH_3 和1个 H 形成的; m/z 345.060 3是母离子同时丢失1个 CH 和1个 O 形成的; m/z 276.069 8是母离子失去 $[\text{C}_3\text{H}_2\text{N}_2\text{S}]$ 碎片后形成的; m/z 156.011 4是 m/z 276.069 8碎

片离子的酰胺键断裂,进一步丢失 $[\text{C}_8\text{H}_7\text{O}]$ 碎片和1个 H 形成的,其中 $[\text{C}_8\text{H}_7\text{O}]$ 碎片对应图6c中 m/z 119.049 0; m/z 219.056 8可能是母离子丢失 $[\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2\text{S}]$ 碎片形成的; m/z 201.048 1可能是碎片离子 m/z 219.056 8上的羰基发生酮式-烯醇式互变,进一步丢失1分子 OH 和1个 H 形成的。此外,在图6c中还观察到 m/z 108.044 1谱峰,可能是碎片离子 m/z 156.011 4失去1分子 SO 后产生的 $[\text{C}_6\text{H}_6\text{NO}]^+$,这与Du等^[33]的报道一致。

根据上述实验结果推测的电氧化三苯基膦介导的磺胺噻唑酰胺化反应机理示于图7。首先,电氧化三苯基膦形成的 $[\text{PPh}_3]^+$ 与对甲基苯甲酸上的羧基反应,同时在阳极上进一步发生单电子、单质子转移的氧化反应,形成活性酯中间体;随后,活性酯中间体与磺胺噻唑的氨基反应,脱去1分子三苯基氧膦($\text{Ph}_3\text{P}=\text{O}$),最终形成相应的酰胺化产物。利用镀铂喷针的原位电化学-质谱监测能力,成功验证了电氧化三苯基膦介导的磺胺噻唑酰胺化反应的可能性,为后续磺胺类药物的酰胺化修饰提供了思路。

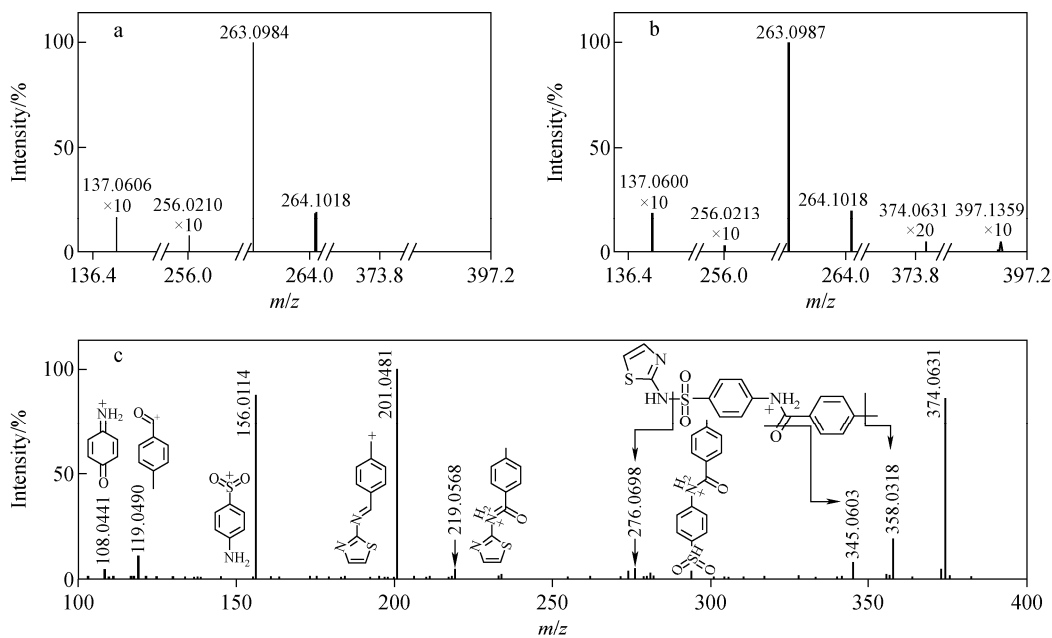


图6 使用空白喷针(a)和镀铂喷针(b)得到的三苯基膦-对甲基苯甲酸-磺胺噻唑混合溶液的质谱图,以及 m/z 374 二级质谱图(c)

Fig. 6 Mass spectra of mixed solution of PPh_3 , 4-methylbenzoic acid and ST using ion emitters of bare (a) and Pt-decorated (b), MS/MS spectrum of m/z 374 (c)

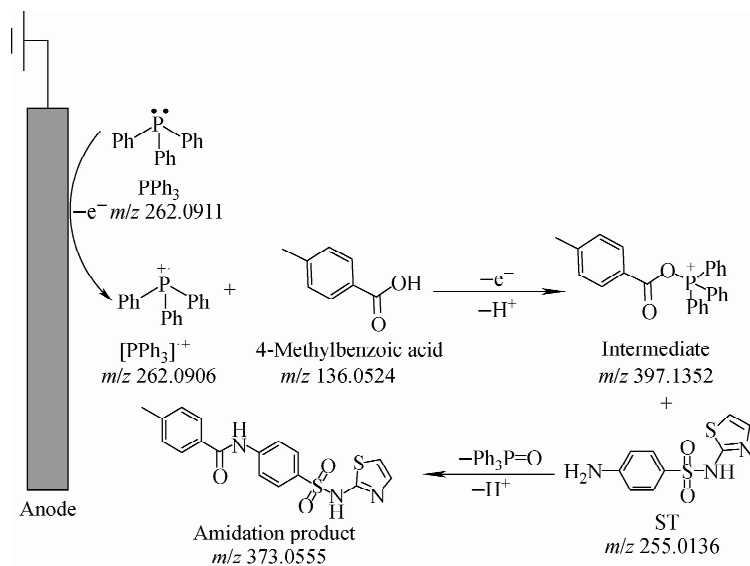


图7 磺胺噻唑酰胺化机理

Fig. 7 Proposed mechanism of sulfathiazole amidation

3 结论

本研究通过在纳升电喷雾电离的喷针尖端集成金属工作电极的方式,构建了一种新型的电化学-质谱联用接口,实现了对电化学反应的原位质谱监测。通过在线监测一系列以三苯基磷为缩合剂的芳伯胺酰胺化反应过程,该装置接口的适用性得到了较好验证,特别是对多种关键中间体(如三苯基磷阳离子自由基、活性酯中间体等)的质谱鉴定,首次为 Nagahara 等提出的反应机理提供了直接的实验证据。此外,利用该原位质谱方法成功验证了磺胺噻唑酰胺化反应的可能性,为磺胺类药物的酰胺化修饰提供了思路。该电化学-质谱耦合接口具有延迟低、样品耗量小、制备简单等优点,有望成为电有机合成反应快速筛选和机理研究的重要工具。

参考文献:

- [1] KUEMIN M, NAGEL Y, SCHWEIZER S, MONNARD F, OCHSENFELD C, WENNEMERS H. Tuning the *cis/trans* conformer ratio of Xaa-Pro amide bonds by intramolecular hydrogen bonds: the effect on PPII helix stability[J]. *Angewandte Chemie*, 2010, 49(36): 6 324-6 327.
- [2] LIU H, LIU F, WANG F, YU R Q, JIANG J H. A novel mitochondrial-targeting near-infrared

fluorescent probe for imaging γ -glutamyl transpeptidase activity in living cells[J]. *Analyst*, 2018, 143(22): 5 530-5 535.

- [3] de FIGUEIREDO R M, SUPPO J S, CAMPAGNE J M. Nonclassical routes for amide bond formation[J]. *Chemical Reviews*, 2016, 116(19): 12 029-12 122.
- [4] ELWOOD J M L, HENRY M C, LOPEZ-FERNANDEZ J D, MOWAT J M, BOYLE M, BUIST B, LIVINGSTONE K, JAMIESON C. Functionalized tetrazoles as latent active esters in the synthesis of amide bonds[J]. *Organic Letters*, 2022, 24(51): 9 491-9 496.
- [5] NAGAHARA S, OKADA Y, KITANO Y, CHIBA K. Biphasic electrochemical peptide synthesis[J]. *Chemical Science*, 2021, 12(39): 12 911-12 917.
- [6] MCGILL C A, NORDON A, LITTLEJOHN D. Comparison of in-line NIR, Raman and UV-visible spectrometries, and at-line NMR spectrometry for the monitoring of an esterification reaction[J]. *Analyst*, 2002, 127(2): 287-292.
- [7] NAGASAKA T, KUNISHI T, SOTOME H, KOGA M, MORIMOTO M, IRIE M, MIYASAKA H. Multiphoton-gated cycloreversion reaction of a fluorescent diarylethene derivative as revealed by transient absorption spectroscopy[J]. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 2018, 20(30): 19 776-19 783.

- [8] FISCHER H, GYLLENHAAL O, VESSMAN J, ALBERT K. Reaction monitoring of aliphatic amines in supercritical carbon dioxide by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy and implications for supercritical fluid chromatography [J]. *Analytical Chemistry*, 2003, 75(3): 622-626.
- [9] LAMM J H, NIERMEIER P, MIX A, CHMIEL J, NEUMANN B, STAMMLER H G, MITZEL N W. Mechanism of host-guest complex formation and identification of intermediates through NMR titration and diffusion NMR spectroscopy [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2014, 53(30): 7 938-7 942.
- [10] WANG T, SCHREMPF M, BERNDHÄUSER A, SCHIEMANN O, MENCHE D. Efficient and general aerobic oxidative cross-coupling of THIQs with organozinc reagents catalyzed by CuCl_2 : proof of a radical intermediate [J]. *Organic Letters*, 2015, 17(16): 3 982-3 985.
- [11] PERRY R H, BROWNELL K R, CHINGIN K, CAHILL T J, WAYMOUTH R M, ZARE R N. Transient Ru-methyl formate intermediates generated with bifunctional transfer hydrogenation catalysts [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2012, 109(7): 2 246-2 250.
- [12] PERRY R H, SPLENDORE M, CHIEN A, DAVIS N K, ZARE R N. Detecting reaction intermediates in liquids on the millisecond time scale using desorption electrospray ionization [J]. *Angewandte Chemie*, 2011, 50(1): 250-254.
- [13] BADU-TAWIAH A, COOKS R G. Enhanced ion signals in desorption electrospray ionization using surfactant spray solutions [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2010, 21(8): 1 423-1 431.
- [14] BADU-TAWIAH A, BLAND C, CAMPBELL D I, COOKS R G. Non-aqueous spray solvents and solubility effects in desorption electrospray ionization [J]. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 2010, 21(4): 572-579.
- [15] TAKÁTS Z N, WISEMAN J M, GOLOGAN B, COOKS R G. Mass spectrometry sampling under ambient conditions with desorption electrospray ionization [J]. *Science*, 2004, 306(5 695): 471-473.
- [16] LO T J, CHANG C H, CHEN Y C. Syringe infusion-based contactless atmospheric pressure ionization mass spectrometry for small and large biomolecules [J]. *Mass Spectrometry Letters*, 2012, 3(4): 87-92.
- [17] MARQUEZ C A, WANG H, FABBRETTI F, METZGER J R O. Electron-transfer-catalyzed dimerization of trans-anethole: detection of the distonic tetramethylene radical cation intermediate by extractive electrospray ionization mass spectrometry [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2008, 130(51): 17 208-17 209.
- [18] MARQUEZ C A, FABBRETTI F, METZGER J O. Electrospray ionization mass spectrometric study on the direct organocatalytic alpha-halogenation of aldehydes [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2007, 46(36): 6 915-6 917.
- [19] CHEN H, VENTER A, COOKS R G. Extractive electrospray ionization for direct analysis of undiluted urine, milk and other complex mixtures without sample preparation [J]. *Chemical Communications*, 2006(19): 2 042-2 044.
- [20] 周鹏, 裴妙荣, 杨美玲, 乐长高, 陈焕文. 电喷雾萃取电离质谱监测 Paal-Knorr 反应的研究 [J]. *质谱学报*, 2016, 37(3): 282-288.
ZHOU Peng, PEI Miaorong, YANG Meiling, LE Changgao, CHEN Huanwen. Study on monitoring Paal-Knorr reaction by electrospray extraction ionization mass spectrometry [J]. *Journal of Chinese Mass Spectrometry Society*, 2016, 37(3): 282-288 (in Chinese).
- [21] CHINTALAPUDI K, BADU-TAWIAH A K. An integrated electrocatalytic nESI-MS platform for quantification of fatty acid isomers directly from untreated biofluids [J]. *Chemical Science*, 2020, 11(36): 9 891-9 897.
- [22] CHENG H, TANG S, YANG T, XU S, YAN X. Accelerating electrochemical reactions in a voltage-controlled interfacial microreactor [J]. *Angewandte Chemie International Edition*, 2020, 59(45): 19 862-19 867.
- [23] WAN Q, CHEN S, BADU-TAWIAH A K. An integrated mass spectrometry platform enables picomole-scale real-time electrosynthetic reaction screening and discovery [J]. *Chemical Science*, 2018, 9(26): 5 724-5 729.

- [24] MA X, CHONG L, TIAN R, SHI R, HU T Y, OUYANG Z, XIA Y. Identification and quantitation of lipid C=C location isomers: a shotgun lipidomics approach enabled by photochemical reaction[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2016, 113(10): 2 573-2 578.
- [25] MA X, XIA Y. Pinpointing double bonds in lipids by Paternò-Büchi reactions and mass spectrometry[J]. Angewandte Chemie, 2013, 126: 2 630-2 634.
- [26] LIU N, LU X, YANG Y, YAO C X, NING B, HE D, HE L, OUYANG J. Monitoring binding affinity between drug and α 1-acid glycoprotein in real time by Venturi easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry[J]. Talanta, 2015, 143: 240-244.
- [27] HAN J, HAN F, OUYANG J, LI Q, NA N. Venturi-electrosonic spray ionization cataluminescence sensor array for saccharides detection[J]. Analytical Chemistry, 2013, 85 (16): 7 738-7 744.
- [28] SANTOS V G, REGIANI T, DIAS F F G, ROMÃO W, JARA J L P, KLITZKE C F, COELHO F, EBERLIN M N. Venturi easy ambient sonic-spray ionization[J]. Analytical Chemistry, 2011, 83(4): 1 375-1 380.
- [29] HADDAD R, MILAGRE H M S, CATHARINO R R, EBERLIN M N. Easy ambient sonic-spray ionization mass spectrometry combined with thin-layer chromatography[J]. Analytical Chemistry, 2008, 80(8): 2 744-2 750.
- [30] HIRABAYASHI A, SAKAIRI M, KOIZUMI H. Sonic spray ionization method for atmospheric pressure ionization mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 1994, 66(24): 4 557-4 559.
- [31] LIU P, LANEKOFF I T, LASKIN J, DEWALD H D, CHEN H. Study of electrochemical reactions using nanospray desorption electrospray ionization mass spectrometry[J]. Analytical Chemistry, 2012, 84(13): 5 737-5 743.
- [32] 尚占. 酞磺胺噻唑片是什么药? [J]. 商业研究, 1978(1):16.
SHANG Zhan. Phthalein sulfathiazole tablet is what medicine? [J]. Business Research, 1978 (1): 16(in Chinese).
- [33] DU J, AN Z, HU Y, YI X, ZHOU H, ZHAN J, WU M. Identification and characterization of Fe₃O₄/peroxodisulfate advanced oxidation products from sulfameter[J]. Journal of Environmental Sciences, 2022, 122(12): 227-235.
(收稿日期:2023-08-16;修回日期:2023-09-26)