



Projekt współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego
w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka

Tytuł Projektu: "Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym"
Nr POIG.01.03.01-00-158/09

Opracowanie zrealizowano w ramach projektu POIG 01.03.01-00-158/09
Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym
Zadanie badawcze nr 6. Biokatalityczne metody syntezy alkoholi chiralnych

Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni PAN Kraków

Instrukcja chromatograficznej identyfikacji chiralnych produktów reakcji katalizowanej przez dehydrogenazę etylobenzenową

Chiralne alkohole alkiloaromatyczne stanowią produkty reakcji utleniania węglowodorów aromatycznych katalizowanej przez dehydrogenazę etylobenzenową (EBDH). Reakcja prowadzona jest w środowisku wodnym a mieszanina reakcyjna obok substratu i enzymu zawiera reutleniacz.

Po zakończeniu reakcji anality należy zateżyc i przenieść do izopropanolu, stosując ekstrakcję do fazy stałej (SPE) wg następującej procedury:

20 ml mieszaniny reakcyjnej nanieść na kondycjonowane wcześniej złożo SPE (masa złożo 100 mg). Następnie wysuszyć złożo i ekstrahować izopropanolem, zbierając frakcję o objętości 0.5 ml. Tak przygotowana próbka zawiera produkt(y) i nieprzereagowany substrat, jest natomiast wolna od białka enzymatycznego.

Analizy chromatograficzne prowadzone w fazie ciekłej na chromatografii Agilent 1100 wyposażonym w autosampler, piec kolumnowy oraz detektor DAD i MS. Charakterystyka kolumny Daicel CHIRALCEL® OB-H: złożo stanowi modyfikowana celuloza, wymiary 250x4.6 mm, ziarno 5 µm. Fazę mobilną stanowi n-heksan z dodatkiem izopropanolu o składzie dopasowanym do danego analitu (patrz Tabela 1). Większości rozdzielów wymaga stałego składu fazy mobilnej przy przepływie 0.5 ml/min w temperaturze 25°C.

Detekcja dokonywana jest za pomocą detektora DAD oraz MS (spektrometr Agilent VL), wykorzystując APCI jako źródło jonów. Ponieważ faza normalna nie jest stabilna w jonizacji APCI ze względu na niebezpieczeństwo wybuchowego zapłonu heksanu w



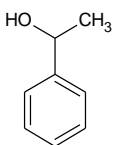
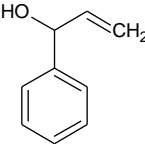
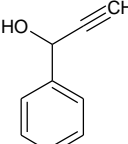
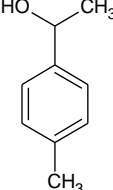
Projekt współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego
w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka

Tytuł Projektu: "Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym"
Nr POIG.01.03.01-00-158/09

wyładowaniu koronowym wymagany jest dodatek postkolumnowy, umożliwiający bezpieczną jonizację fazy normalnej.

Przygotowanie dodatku postkolumnowego: sporządzić 25 mM wodny roztwór mrówczanu amonu i mieszać z izopropanolem w proporcji: 75% izopropanol/25 % mrówczan. Tak otrzymany roztwór powinien być mieszany z fazą mobilną w proporcji 1:1.

Tabela 1. Wyniki optymalizacji metody rozdzielów mieszanin reakcyjnych dehydrogenazy etylobenzenowej. Produkt: nazwa angielska i wzór chemiczny, MM – masa molowa produktu, NP-APCI – detekcja MS w normalnej fazie ze źródłem APCI, k^S – współczynnik retencji dla izomeru *S*, k^R – współczynnik retencji izomeru *R*, IPA/n-heksan – skład fazy mobilnej. Czas martwy kolumny 6.43 min.

Analit	MM	NP-APCI	k^S	k^R	Faza mobilna IPA/n-heksan
 1-phenylethanol	122	-	1.862	2.505	10/90
 1-phenylprop-2-en-1-ol	134	[M-OH] ⁺ 117	2.217	2.133	10/90
 1-phenylprop-2-yn-1-ol	132	[M+H] ⁺ 133 [M-OH] ⁺ 115	4.590	3.365	10/90
 1-(4-methylphenyl)ethanol	136	[M-OH] ⁺ 119	2.852	3.399	5/95

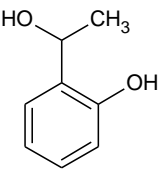
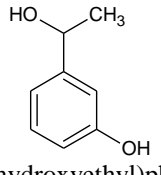

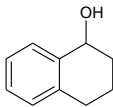
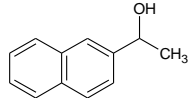
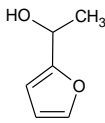
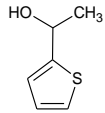
Projekt współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego
w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka

Tytuł Projektu: "Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym"
Nr POIG.01.03.01-00-158/09

	136	[M-OH] ⁺ 119	2.171	3.382	5/95
1-(2-methylphenyl)ethanol					
	136	[M-OH] ⁺ 119	1.779	2.281	5/95
1-(3-methylphenyl)ethanol					
	150	[M-OH] ⁺ 133	1.597	1.850	10/90
1-(4-ethylphenyl)ethanol					
	166	[M-H ₂ O-OH] ⁺ 131	1.367	1.597	10/90
(1 <i>S</i>)-1,1'-(benzene-1,4-diyl)diethanol					
	166	[M-H ₂ O-OH] ⁺ 131	3.636		10/90
(1 <i>S</i> ,1' <i>S</i>)-1,1'-(benzene-1,4-diyl)diethanol					
	152		4.087	5.533	10/90
1-(4-methoxyphenyl)ethanol					

Projekt współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego
w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka

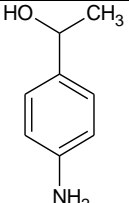
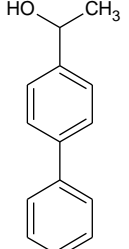
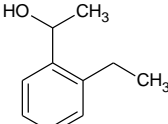
Tytuł Projektu: "Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym"
Nr POIG.01.03.01-00-158/09

	138	M ⁻ 137	1.592	2.455	15/85
2-(1-hydroxyethyl)phenol					
	138	M ⁻ 137	1.930		15/85
3-(1-hydroxyethyl)phenol					
	134	[M-OH] ⁺ SIM 117	2.950	1.966	15/85
2,3-dihydro-1 <i>H</i> -inden-1-ol					
	148	[M-OH] ⁺ SIM 131	2.617	1.725	10/90
1,2,3,4-tetrahydronaphthalen-1-ol					
	172	-	1.840	2.215	10/90
1-(naphthalen-2-yl)ethanol					
	112		2.419	2.142	10/90
1-(furan-2-yl)ethanol					
	128		2.624	3.053	10/90
1-(thiophen-2-yl)ethanol					



Projekt współfinansowany ze środków Europejskiego Funduszu Rozwoju Regionalnego
w ramach Programu Operacyjnego Innowacyjna Gospodarka

Tytuł Projektu: "Biotransformacje użyteczne w przemyśle farmaceutycznym i kosmetycznym"
Nr POIG.01.03.01-00-158/09

	137	118	3.490	3.95	30/70
1-(4-aminophenyl)ethanol					
	198	[M-OH] ⁺ 181	6.610	6.199	3/97
1-([1,1'-biphenyl]-4-yl)ethanol					
	150	[M-OH] ⁺ SIM 133	2.591	2.824	grad 97- 90%
1-(2-ethylphenyl)ethanol					
