

КИЇВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ ТАРАСА ШЕВЧЕНКА

НАВЧАЛЬНО НАУКОВИЙ ІНСТИТУТ ВИСОКИХ ТЕХНОЛОГІЙ

Завідувач кафедри супрамолекулярної хімії

проф. Сергій Вікторович Рябухін

Протокол №_____засідання кафедри

Від “_____” _____2022 р.

**ХІРАЛЬНІ ХРОМАТОГРАФІЧНІ ФАЗИ З НАНЕСЕНОЮ
ФУНКЦІОНАЛІЗОВАНОЮ АМІЛОЗОЮ**

Випускна кваліфікаційна робота бакалавра

студента спеціальності 102 «Хімія»

ОП «Хімія (високі технології)»

Мосі Олександра Олеговича

Науковий керівник від кафедри:

доцент кафедри супрамолекулярної хімії

к.х.н. Гринь Світлана Валеріївна

Робота виконана на базі

ТОВ «НВП«УКРОРГСИНТЕЗ»

Під керівництвом

К. х. н., доцента **Алексєєва С.О.**

Оцінка захисту роботи

Київ 2022

Анотація

Данна робота присвячена розробці методики виготовлення хіральних хроматографічних колонок із стаціонарною фазою на основі макропористого силікагелю з нанесеним 3,5-диметилфенілкарбаматом амілози. У роботі представлено методики одержання амілози з картопляного крохмалю за «лужним» та «кислотним» способами, методику синтезу хірального селектору, 3,5-диметилфенілкарбамату амілози, та процедуру одержання хіральних хроматографічних фаз шляхом імпрегнації такого селектору на макропористий сферичний силікагель. Показано, що отримана за «лужним» способом амілоза має занадто високий ступінь полімеризації, внаслідок чого відповідний селектор утворює непридатні для імпрегнації високов'язкі розчини в органічних розчинниках. Для «кислотного» методу одержання амілози, знайдено діапазон умов, що дозволяють отримати придатні для нанесення селектору; методом вимірювання граничної в'язкості визначено середній ступінь полімеризації амілози. Проведено фракціонування зразку амілози за молекулярною масою, виготовлено серію хіральних колонок із селекторами синтезованими з отриманих фракцій, та досліджено їх аналітичні параметри, що виявилися близькими до таких для комерційного аналогу.

Ключові слова: високоефективна рідинна хроматографія; хіральні фази; амілоза; ступінь полімеризації; селектор.

Annotation

This paper is aimed at development of manufacturing methods of chiral chromatographic columns with a stationary phase based on macroporous silica gel coated with 3,5-dimethylphenylcarbamate amylose. The paper presents methods of obtaining amylose from potato starch by "alkaline" and "acid" methods, methods of synthesis of chiral selector, amylose 3,5-dimethylphenylcarbamate, and the procedure of obtaining chiral chromatographic phases by impregnation of such selector on macroporous spherical silica. It has been shown that amylose obtained by the "alkaline" method has too high degree of polymerization, and as a result the corresponding selector forms unsuitable for impregnation highly viscous solutions in organic solvents. For the "acid" method of obtaining amylose, was found a range of conditions that allow to obtain selectors suitable for application; the average degree of polymerization of amylose was determined by the method of measuring the limiting viscosity. Fractionation of the amylose sample by molecular weight was performed, a series of chiral columns was made using selectors synthesized from obtained fractions and their analytical parameters were investigated, which turned out to be close to those of commercial analogue.

Keywords: High-performance liquid chromatography; chiral phases, amylose, degree of polymerization, selector.

ЗМІСТ

Вступ	5
1. Літературний огляд	8
1.1. Основні типи хіральных нерухомих фаз	8
1.2. Поширенні методи нанесення селектору	8
1.3. Фенілкарбамати полісахаридів.	9
1.4. Вплив довжини молекули селектору на властивості фази	12
1.5. Отримання, фракціонування, характеристика амілоз	12
1.6. Висновки з літературного огляду	13
2. Результати та обговорення	14
2.1. Загальна схема виготовлення колонки	14
2.2. Виділення фракцій амілози	15
2.3. Визначення середнього ступеня полімеризації амілози	17
2.4. Синтез хірального селектору	17
2.5. Визначення впливу ступеня полімеризації селектору на хроматографічні властивості фази	19
3. Експериментальна частина	22
3.1. Обладнання та реактиви	22
3.2. Характеристики вихідного матеріалу	22
3.3. Виділення амілози	23
3.4. Фракціонування амілози	23
3.5. Синтез 3,5-диметилфенілкарбаматів амілоз	24
3.6. Модифікування поверхні силікагелю	24
3.7. Нанесення селектору на силікагель	25
3.8. Прилади та методи	25
Висновки	27
Список літератури	28

ВСТУП

Актуальність теми дослідження. Розділення енантіомерів та визначення енантіомерного надлишку є важливою задачею сучасної хімічної технології, особливо у фармакологічному напрямку, через різну біологічну активність, ефективність та токсичність енантіомерів. Основним методом розділення оптичних ізомерів та аналізу енантіомерної чистоти оптично активних сполук є високоефективна рідинна хроматографія на хіральных колонках, що з різною інтенсивністю утримують енантіомери. Їх здатність до такого розділення зумовлена наявністю на поверхні нерухомої фази оптично активної речовини – селектору.

Існує висока різноманітність хіральных селекторів різних типів, найпопулярнішими з яких є похідні полісахаридів, на котрих проводиться більше 90% розділень у останні десятиріччя. Близько половини з них проводиться на фазі модифікованій 3,5-диметилфенілкарбаматною похідною амілози, нанесеною чи іммобілізованою на поверхню силікагелю. Ефективність селекторів цього типу зумовлена вторинною структурою спіралі полімеру, яка забезпечує добре повторюване хіральне оточення для молекул досліджуваної речовини. Параметри молекул селектору мають вплив на хроматографічну ефективність фази, і дослідження цього впливу є важливою задачею для покращення якості колонок та оптимізації роздільних властивостей фази під певні задачі.

Темою даної роботи обрано дослідження впливу ступеню полімеризації амілози на ефективність хіральної фази, та методика виготовлення хроматографічних фаз із нанесеним 3,5-диметилфенілкарбаматом амілози.

Висока вартість хіральных ВЄЖХ колонок зумовлює актуальність розробки методики їх виготовлення у лабораторних умовах, а низький асортимент комерційно доступної амілози необхідної якості зумовлює актуальність розробки методики виділення амілози регульованої молекулярної маси, та визначення її впливу на хроматографічну ефективність кінцевої колонки.

Мета роботи:

Встановити вплив ступеню полімеризації амілози на хроматографічні властивості нерухомої фази на основі 3,5-диметилфенілкарбамату амілози, нанесеного на силікагель.

Для досягнення мети необхідно розв'язати наступні задачі:

- Розробити методику виділення амілози регульованої молекулярної маси з комерційно-доступного крохмалю.
- Провести фракційне розділення одержаної амілози.
- Встановити ступінь полімеризації отриманих фракцій.
- Розробити методику одержання хірального селектору - 3,5-диметилфенілкарбамату амілози.
- Розробити методику одержання хіральних хроматографічних фаз шляхом нанесення хірального селектору на макропористий сферичний силікагель.
- Отримати хіральні хроматографічні колонки, визначити вплив ступеню полімеризації амілози на їх роздільну здатність по відношенню до тестових речовин, та порівняти їх із комерційно-доступними колонками.

Об'єкт дослідження – хіральні хроматографічні фази покриті 3,5-диметилфенілкарбаматом амілози.

Предмет дослідження – вплив ступеню полімеризації 3,5-диметилфенілкарбамату амілози на хроматографічні властивості фази та методику одержання даних фаз.

Методи дослідження – органічний синтез, ІЧ спектроскопія, віскозиметрія, хроматографія.

Особистий внесок здобувача: Пошук та систематизація інформації, наведеної в літературі, основна частина експериментальних досліджень, обробка, систематизація, та узагальнення експериментальних даних виконано здобувачем особисто. Визначення мети та постановка задач дослідження, запис ІЧ-спектрів, обговорення результатів та висновків проведено разом з

науковим керівником, к. х. н., доц. Алексєєвим С.О, віскозиметричні вимірювання – разом з д. ф-м. н., Лазаренком М.М.

Структура та обсяг роботи: робота викладена на 30 сторінках і складається зі вступу, трьох розділів основної частини, висновків, та переліку використаних джерел (20 найменувань). У першому розділі надано літературний огляд інформації про хіральні фази на основі полісахаридів, особливості та властивості даного типу селекторів. У другому розділі обговорюється загальна схема виготовлення хіральної колонки на основі стаціонарної фази з нанесеним 3,5-диметилфенілкарбаматом амілози, вплив умов одержання амілози на ступінь її полімеризації та залежність хроматографічних властивостей стаціонарних фаз від цього параметру. У третьому розділі надано опис реагентів, приладів та детальної методики експериментів.

1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1. Основні типи хіральних нерухомих фаз

Високоєфективна рідинна хроматографія є одним з найпоширеніших методів що використовується розділення енантіомерів. Така хроматографія проводиться на колонках із хіральними нерухомими фазами, що містять хіральний селектор – речовину що зумовлює різну ступінь утримання енантіомерів.

Класифікувати хіральні нерухомі фази можемо за матеріалом основної частинки (силікагелі, оксиди металів, полімерної природи, тощо), їх типом (повністю пористі, «core-shell» частинки, монолітні колонки), типом хірального селектору (Таблиця 1.1) [1, 2]. Найбільш вживаними є нерухомі фази на основі повністю пористих сферичних частинок силікагелю, вкритих полісахаридами [3].

Таблиця 1.1 – Основні типи хіральних селекторів [1]

Тип селектору	Приклади
Олігосахариди та їх похідні	Циклодекстрини, циклофруктани, їх ефіри, карбамати Зшиті циклодекстрини
Полісахариди та їх похідні	Похідні амілози, целюлози, хітину, хітозану «замкнуті» полісахариди
Хінні алкалоїди	Хінін, цинхонін, хінідин
Антибіотики	Ванкоміцин, тейкопланін, ристоцетин, тіостептрон
Протеїни	C1 целюлаза, альбумін, овомукоїд, глікопротеїни
Краун-ефіри	(18-Краун-6)-тетракарбоксистильна кислота, та інші краун-ефірні сполуки

1.2. Поширенні методи нанесення селектору

Методи нанесення хіральних селекторів можна поділити на дві категорії: покриття, та іммобілізація, що проілюстровано на рисунку 1.1. При покритті селектор адсорбується на поверхні нерухомої фази, та утримується

за рахунок нерозчинності у мобільній фазі. При іммобілізації утворюється ковалентний зв'язок між групами на поверхні силікагелю та молекулою селектору, в наслідок чого фазу можна використовувати зі значно більшою кількістю розчинників, але роздільна здатність таких фаз зазвичай нижча за нанесені [4].

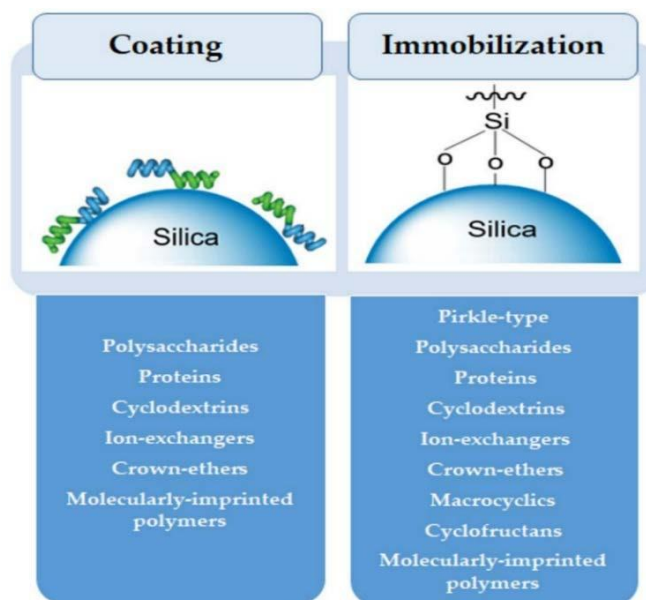


Рисунок 1.1 – Типи хіральних селекторів зазвичай покритих/іммобілізованих на поверхню фази [4]

1.3. Фенілкарбамати полісахаридів.

На початку розвитку хіральної хроматографії широко використовувалися немодифіковані полісахариди, які наразі повністю витіснені їх похідними, через значну перевагу у ефективності. Найбільш поширеними (більше половини згадувань) є фенілкарбамати (OD, AD, IA, IB, IC, AS) та бензоати (OJ) амілози та целюлози[3, 5].

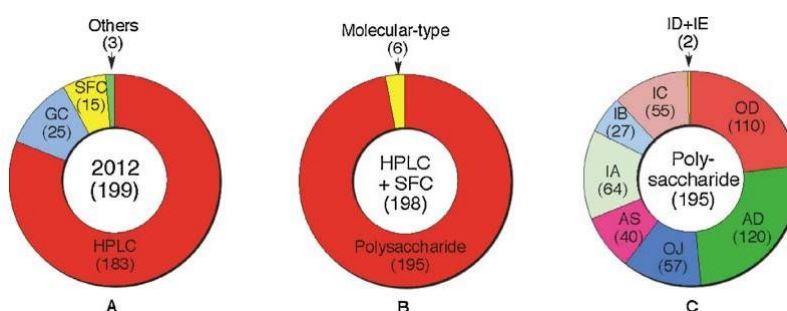


Рисунок 1.2 – Розподілення методів використаних для визначення енантіомерного надлишку у Angew. Chem. Int. Ed. (2012) [3]

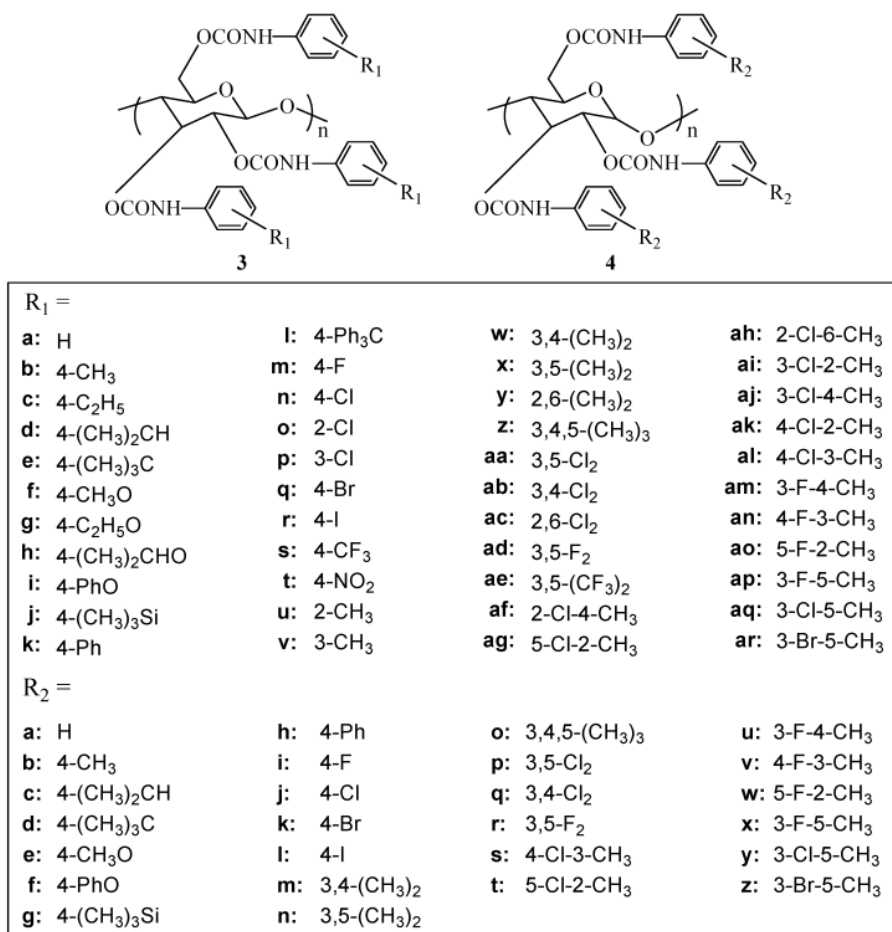


Рисунок 1.3 – Фенілкарбамати целюлози (3) та амілози (4) [6]

Реакцією з ізоціанатом, що наведена на схемі 1.1 було отримано високе різноманіття (Рисунок 1.3) фенілкарбаматів полісахаридів, серед яких найбільш вживаним є 3,5-диметилфенілкарбамат. (AD, OD, IA, IB на рисунку 1.2)

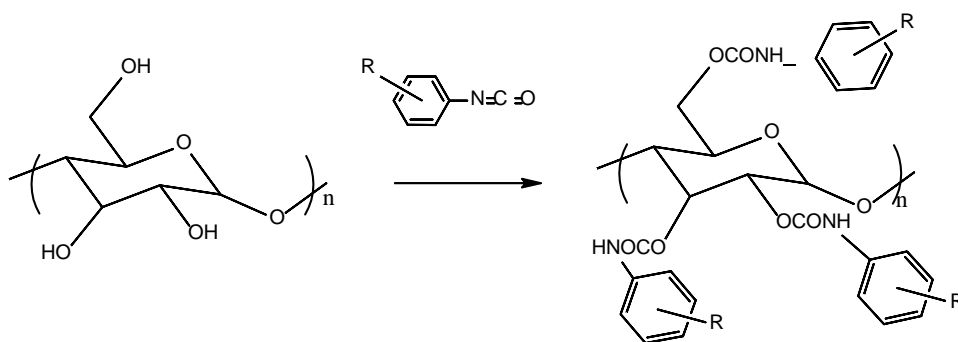


Схема 1.1 – Реакція отримання фенілкарбаматів полісахаридів

Висока ефективність полісахаридів зумовлена утворенням селектором вторинної спіральної структури, що створює повторюване хіральне оточення. Структури спіралей полісахаридних похідних активно досліджуються, їх приблизні параметри наведені на рисунку 1.4, але необхідно зазначити на практиці ці параметри залежать від великої кількості факторів таких як розчинник, температура, тощо [7, 8, 9, 10, 11].

Інформація про структуру спіралей селектора, її зміни у різних умовах, та взаємодію із хіральною речовиною є важливою для дослідження механізмів хірального розділення на полісахаридних фазах з метою розвинення хроматографічної технології. Це використовується не тільки для покращення якості виготовлених фаз, а і для інформаційної складової технології, наприклад, комп'ютерного моделювання взаємодії речовин із хіральною фазою, що вже зараз досягло значних успіхів у прогнозуванні результатів хроматографії [12, 13].

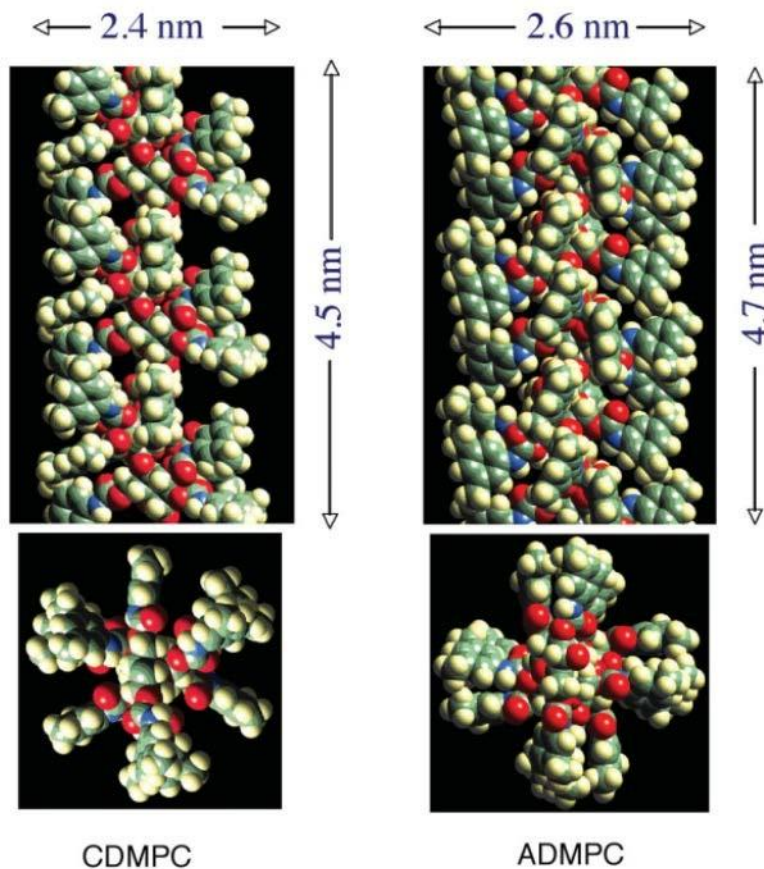


Рисунок 1.4 – Спіральні структури диметилфенілкарбаматів целюлози (зліва) та амілози (справа) [7]

1.4. Вплив довжини молекули селектору на властивості фази

Вплив параметрів молекул селектору на хроматографічні властивості фази активно досліджується від початку використання фаз на основі модифікованих полісахаридів з метою покращення якості хроматографії та розуміння деталей механізму хірального розділення на них, що є корисним для подальшого проектування та розробки нових фаз [14, 15].

У роботі [16] вивчалась залежність роздільної здатності фенілкарбаматів целюлози, від ступеня полімеризації вихідного олігомеру. Було виявлено що фази з селектором низького ступеня полімеризації мають нижчу роздільну здатність, проте із його зростанням вище 18, вплив поступово зменшується, і роздільна здатність мало відрізняється від фаз з селектором із мікрокристалічної целюлози (ступінь полімеризації > 100).

Також слід враховувати, що розчини селектору більшого ступеня полімеризації мають вищу в'язкість, що має значення для процесу нанесення, та може впливати на параметри отримуваної фази, а також нижчу розчинність, що має позитивний вплив на термін роботи колонки.

1.5. Отримання, фракціонування, характеристика амілоз

Амілоза є лінійним полісахаридом, одним із двох складових крохмалю разом з амілопектином – розгалуженим полісахаридом, що складається з того ж мономеру, але має інші властивості через розгалужену будову.

Через високу вартість комерційно доступної чистої амілози та низьку доступність амілози невеликого ступеня полімеризації, актуальним є пошук методики отримання, очищення, та характеристики амілози у лабораторних умовах. Надоступніше джерело амілози – крохмаль, з дисперсії якого вона може бути вибірково осаджена рядом комплексоутворювачів, оптимальними по ефективності та доступності з яких є н-бутанол та циклогексанол.

Очищення амілози від залишку амілопектину виконують повторним розчиненням та осадженням. [17, 18, 19].

Фракціонування амілози за молекулярною масою здійснюється використовуючи коагулятори, додавання яких призводить до випадання осаду полісахариду з великою довжиною ланцюга внаслідок меншої розчинності їх комплексів порівняно з більш короткою амілозою. [17]

Визначення ступеня полімеризації амілози можливе за допомогою вимірювання граничної в'язкості, вимірювання відновлювальної здатності, різного типу титруваннями, нефелометрією [17, 20].

1.6. Висновки з літературного огляду

Хроматографія на хіральних колонках із селекторами фенілкарбаматів полісахаридів (амілози та целюлози) є найпопулярнішим методом визначення енантімерного надлишку. Їх ефективність зумовлена наявністю у молекулі полісахариду хірального глюкозного кільця із замісниками, що здатні до гідрофобних взаємодій, та стабільною вторинною спіральною структурою, що зумовлює добре повторюване хіральне оточення.

Хіральний селектор може бути нанесений на силікагель покриттям, або іммобілізацію – із закріпленням його на поверхні за допомогою ковалентних зв'язків. Параметри молекул полімеру впливають на хроматографічні властивості фази через зміни параметрів спіралей вторинної структури, та технологічні фактори (розчинність селектору, густина його розчинів, тощо). Вплив ступеню полімеризації було досліджено для диметилфенілкарбамату целюлози, дослідження його для амілози дає можливість покращити якість виготовлених фаз даного типу.

2. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

2.1. Загальна схема виготовлення колонки

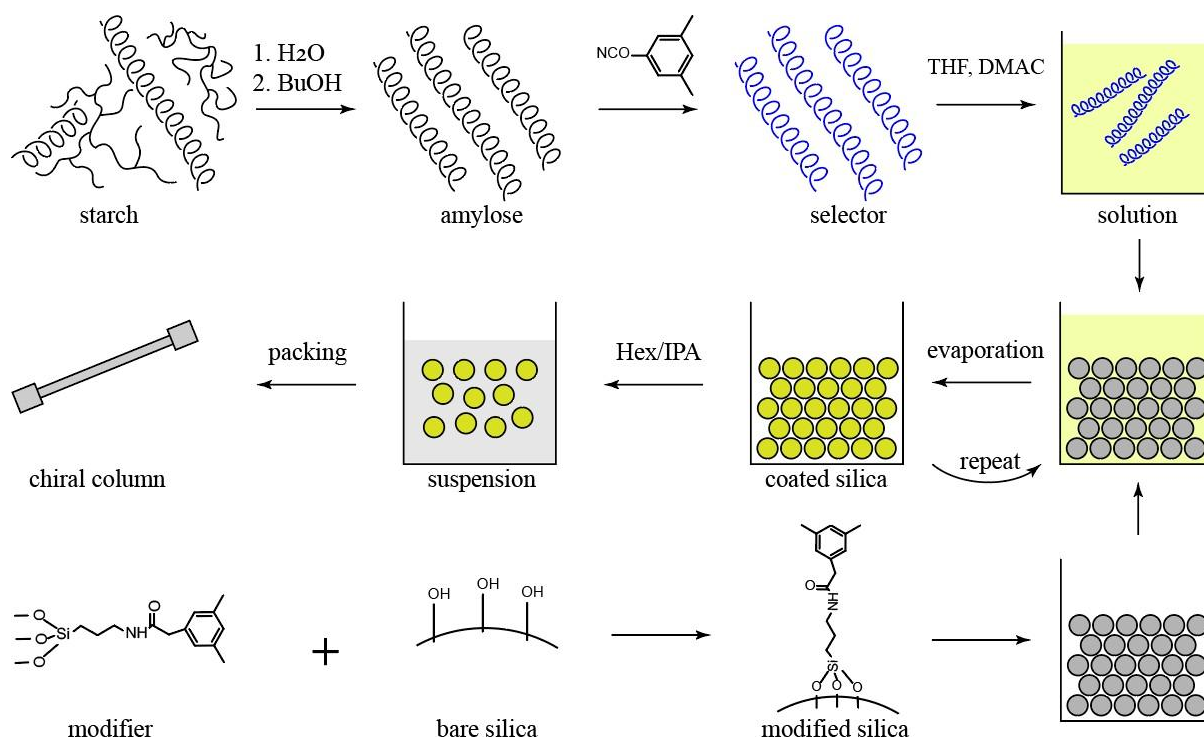


Рисунок 2.1 – схема процесу виготовлення хіральної колонки

Основні етапи методики виготовлення хіральної колонки із фазою покритою 3,5-диметилфенілкарбаматом амілози наведено на рисунку 2.1.

Амілозу виділяють із розчину крохмалю селективним осадженням бутанолом, після чого вводять в реакцію із 3,5-диметилфенілізоціанатом, отримуючи 3,5-диметилфенілкарбамат амілози. Синтезований полімер розчиняють у суміші тетрагідрофурану та диметилацетаміду, отримуючи 5% розчин селектору.

Поверхню сферичного макропористого силікагелю модифікують реакцією гідроксильних груп із попередньо синтезованим 3,5-диметилфенілкарбамідопропілтриметоксисиланом.

На отриманий модифікований силікагель порціями наносять розчин селектору, упарюючи розчинник після додавання кожної порції.

Отриману фазу суспендують у суміші гексану із 2-пропанолом, і набивають у корпус колонки прокачуванням суспензії. Набита колонка зберігається заповнена даною сумішшю та щільно закрита.

2.2. Виділення фракцій амілози

Згідно літературним даним [17], для виділення амілози з крохмалю використовують методику його розчинення у лужних розчинах, оскільки швидкість гідролізу амілози у таких розчинах низька, отже, молекулярна маса одержаного продукту близька до такої у природній сировині. Вихід отриманого за такою методикою продукту (зразок АТБ_ОН-_1, Табл. 2.1) виявився близьким до теоретичного вмісту амілози у картопляному крохмалі. Одержаний зразок амілози було введено у реакцію з ізоціанатом і одержано хіральний селектор. Однак, розчинення цього селектору у ТГФ відбувалося дуже повільно, а в'язкість навіть розведених розчинів була занадто високою для їх використання для нанесення на силікагель. Найбільш ймовірною причиною цього є занадто високий ступінь полімеризації одержаною «лужним» способом амілози.

Тому подальші експерименти з виділення амілози проводили у присутності соляної кислоти, наявність якої сприяє гідролізу крохмалю та утворенню амілози меншої молекулярної маси. З таблиці 2.1 можна бачити, що використання 0,1М кислоти (зразок АТБ_Н+_0) призводить до глибокого (ймовірно, до декстринів) гідролізу крохмалю, і фракція амілози практично не утворюється. Властивості ж амілози, одержаної при використанні розведеної 0,002 М кислоти (зразок АТБ_Н+_5) близькі до амілози, одержаної в лужних умовах: в'язкість розчинів селектору дуже висока.

При використанні кислоти середньої концентрації амілозу з крохмалю можна отримати із прийнятним виходом (Таблиця 2.1), а в'язкість розчинів в ТГФ одержаного з неї селектору придатна для нанесення на силікагель.

Враховуючи те, що одержані шляхом часткового розриву ланцюгу високомолекулярного полімеру суміші полімерів нижчої молекулярної маси звичайно мають широкий молекулярно-масовий розподіл, наближений до нормального, було вирішено розділити одержану амілозу на фракції з різними молекулярними масами (Таблиця 2.2). Масовий розподіл отриманих фракцій схожий на очікуваний нормальний розподіл (Рисунок 2.2).

Таблиця 2.1 - Ключові зразки підбору умов гідролізу та виходи продукту.

Назва зразку	Концентрація HCl або NaOH, M	Вихід продукту від маси крохмалю, %
АТБ_ОН-_1	1 (NaOH)	23
АТБ_Н+_0	0,1 (HCl)	<1
АТБ_Н+_5	0,002 (HCl)	17
АТБ_Н+_6	0,005 (HCl)	15,4
АТБ_Н+_10	0,007 (HCl)	15,8

Таблиця 2.2 – Отримані фракції амілози

Назва фракції	Маса фракції, г	Вихід по масі від нефракціонованого зразку, %	Відповідний селектор та колонка
АТБ_10.1	1,51	14,8	AD_10.1
АТБ_10.2	1,96	19,2	AD_10.2
АТБ_10.3	2,51	24,6	AD_10.3
АТБ_10.4	2,14	20,9	AD_10.4



Рисунок 2.2 – виходи отриманих фракцій

2.3. Визначення середнього ступеня полімеризації амілози

Визначення середнього ступеня полімеризації амілози проводилось за допомогою вимірювання граничної в'язкості її розчину.[17]

Вимірявши їх динамічну в'язкість, та динамічну в'язкість р-ну NaOH, обчислили питому в'язкість, та граничну в'язкість, що пов'язана із середнім ступенем полімеризації співвідношенням наведеним у формулі 2.1 Графік залежності наведено на рисунку 2.3.

$$\bar{DP}_w = \frac{[\eta]_{\text{пит}}}{0,164} \quad , \text{де} \quad [\eta] = \lim_{C \rightarrow 0} \frac{\eta_{\text{пит}}}{C}$$

Формула 2.1 – Формула для обчислення середнього ступеню полімеризації

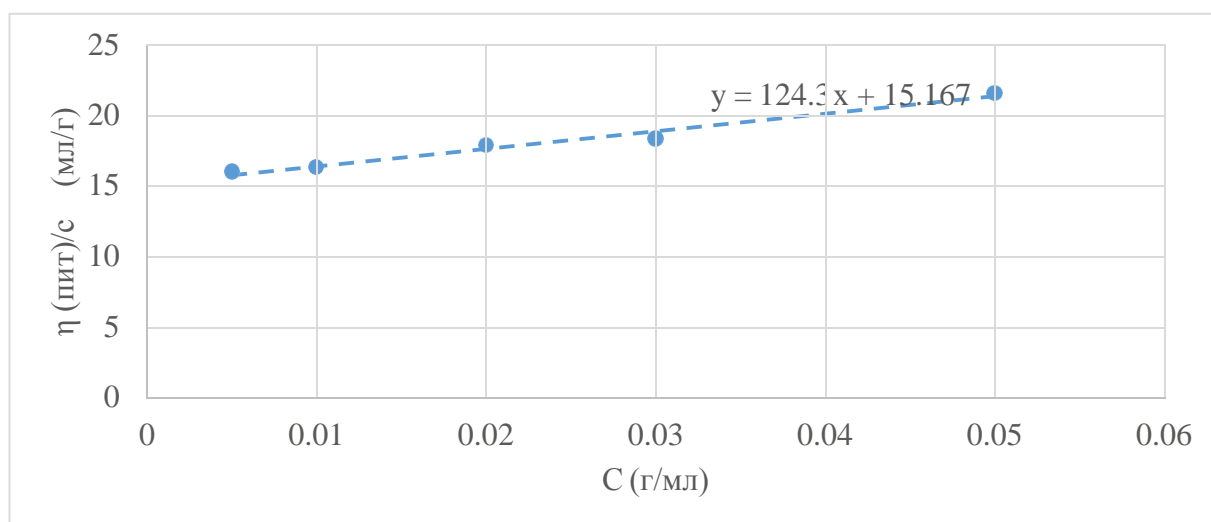


Рисунок 2.3 – графічне обчислення величини $[\eta]$

Для нефракціонованого зразку АТБ_Н+_10 обчислений середній ступінь полімеризації складає **130**. Через форс-мажорні обставини середній ступінь полімеризації фракцій не виміряно.

2.4. Синтез хірального селектору

З отриманих фракцій амілози синтезовано хіральний селектор за реакцією зображеної на схемі 2.1.

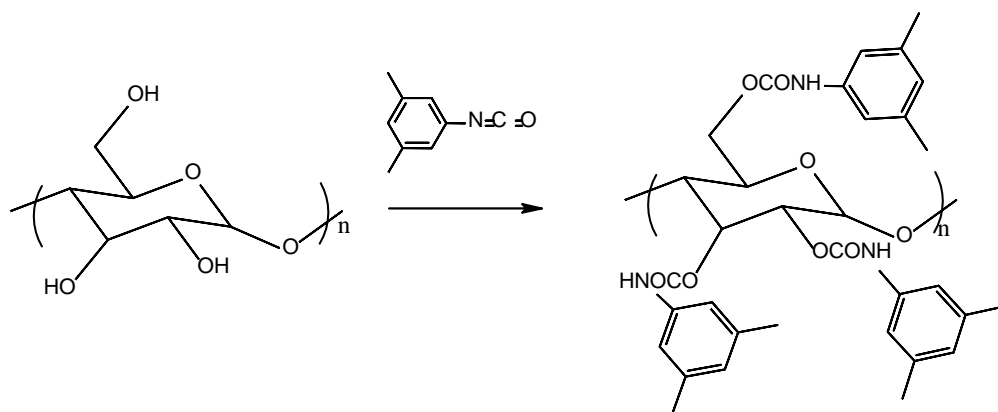


Схема 2.1 – реакція отримання селектору

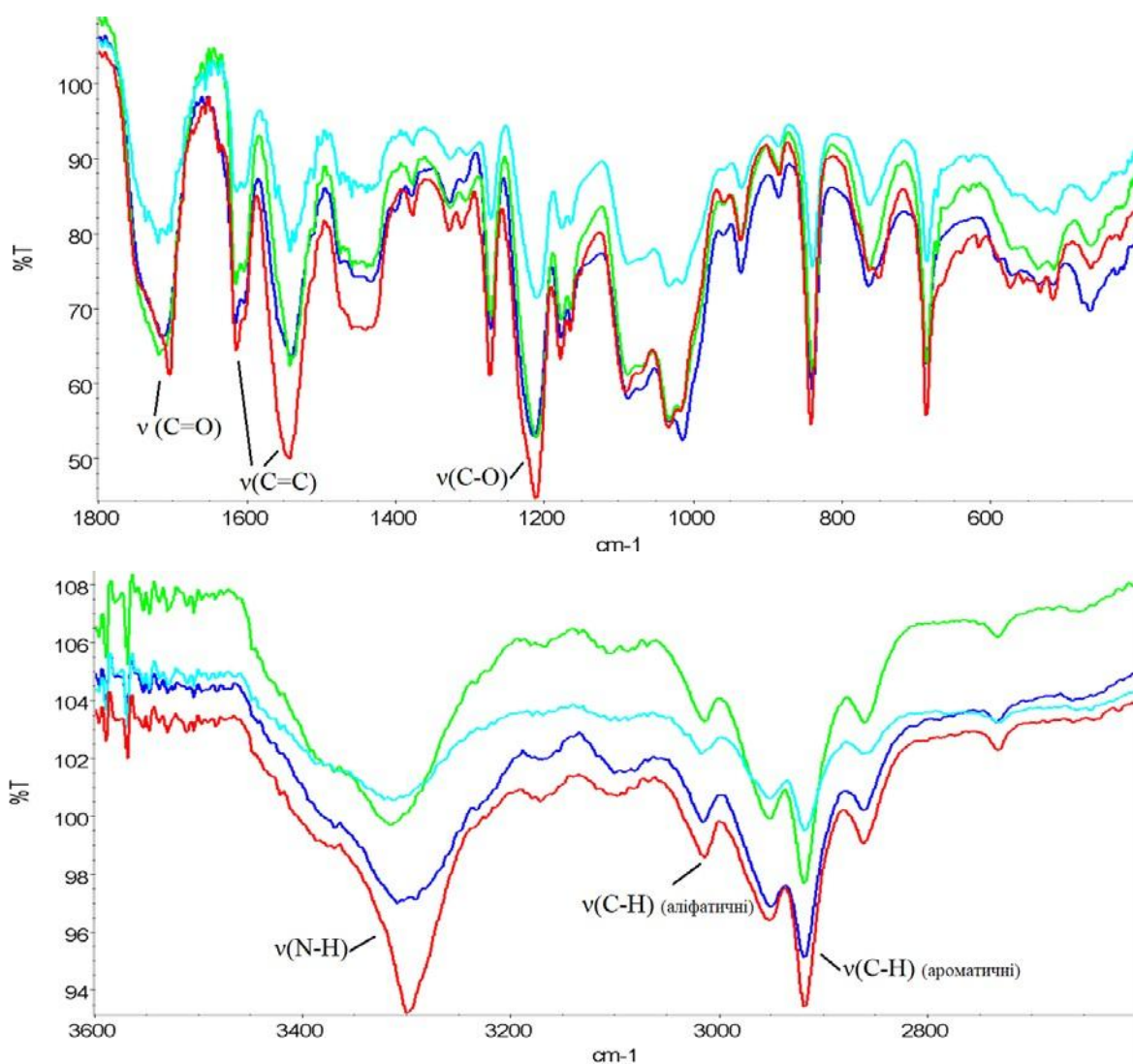


Рисунок 2.4 – ІЧ спектри селекторів АД. АД-Н – синій, АД_6– червоний, АД_10.1 – голубий, АД_10.3 – зелений

Протікання реакції перевірено ІЧ спектроскопією, також порівняно спектр отриманих селекторів із селектором комерційної колонки Chiralpak

AD-H (Рисунок 2.4), що був змитий з промислової колонки сумішшю ТГФ та диметилацетаміду, осаджений та промитий метанолом і висушений у вакуумі масляного насосу при 80 °С.

Смуги валентних коливань C=O при 1730 cm^{-1} підтверджують утворення карбамату. Смуги при 1620 та 1550 cm^{-1} що відповідають валентним коливанням зв'язку C=C ароматичного кільця, підтверджують наявність фенільного замісника у отриманій сполуці.

Спектри між собою майже не відрізняються, що свідчить про повторюваність протікання реакції та відповідність нашого селектора промислового аналогу.

2.5. Визначення впливу ступеня полімеризації селектору на хроматографічні властивості фази

Селектори були нанесені на модифікований силікагель, фази суспендовано у суміші гексан/2-пропанол та набиті у аналітичні колонки прокачуванням суспензії. Зроблено хроматограми тестових речовин у умовах аналогічних до хроматограми паспорту якості промислового аналогу.

В якості індикаторів хроматографічних параметрів фаз обрано час утримання першого піку t_1' , та коефіцієнт розділення α .

Час утримання першого піку характеризує здатність колонки до утримання речовини на нерухомій фазі, і обраховується як різниця між часом виходу досліджуваної речовини і часом виходу речовини що не утримується колонкою. Речовиною що не утримується є, наприклад, гексан, їм і було визначено «мертвий час» колонки.

Коефіцієнт розділення є співвідношенням часів утримання енантіомерів, і характеризує здатність колонки ділити речовини, чим він більший – тим більш розходяться піки на хроматограмі.

Для зручності представлення, показники нормовані на показники промислової колонки Chiralpak AD-H, представлені у таблиці (Таблиця 2.3),

та побудовано графіки (Рисунки 2.5 та 2.6). Чим ближче точки на графіку до 1 – тим ближче відповідний показник до показника промислової колонки.

Таблиця 2.3 – відношення індикаторів хроматографічних параметрів виготовлених та комерційної колонок

Колонка	t1' (10.X)/t1' (Chiralpak AD-H)			α (10.X)/ α (Chiralpak AD-H)		
	TSO	benzoin	phenylacetate	TSO	benzoin	phenylacetate
AD_10.1	1,234	1,076	1,054	0,620	0,849	1,058
AD_10.2	1,202	1,110	1,061	0,714	0,857	1,034
AD_10.3	1,191	1,185	1,076	0,767	0,896	1,039
AD_10.4	1,306	1,180	1,061	0,629	0,866	1,066

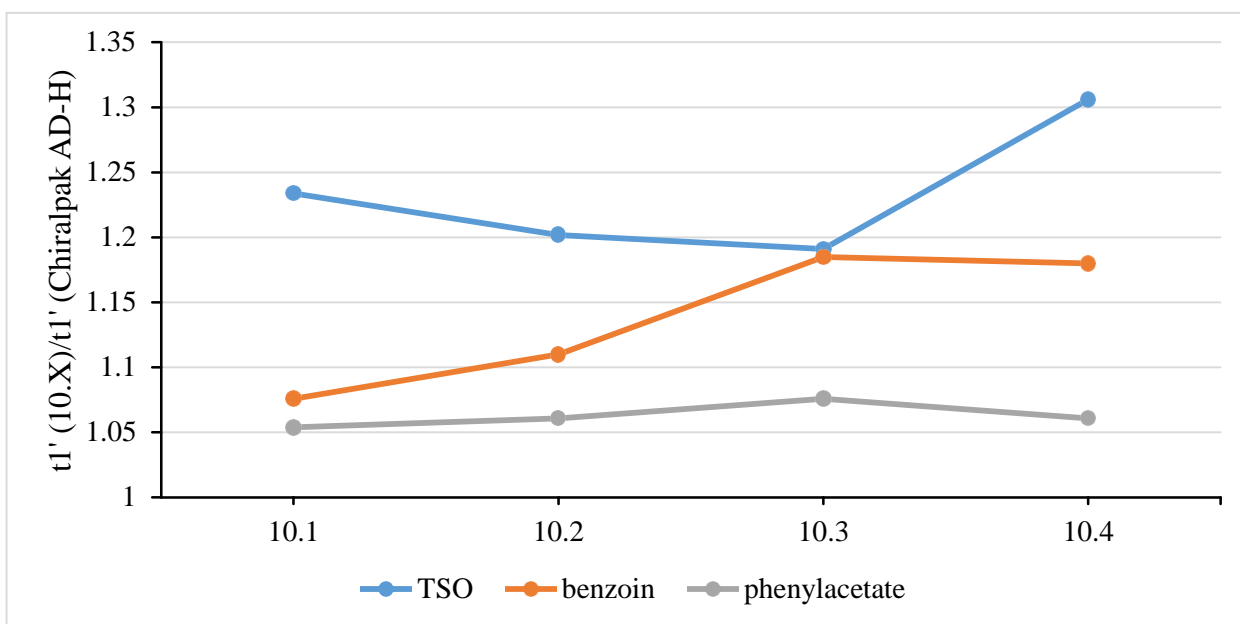


Рисунок 2.5 – відношення часів утримання першого піку тестових рацематів на виготовлених та комерційній колонках

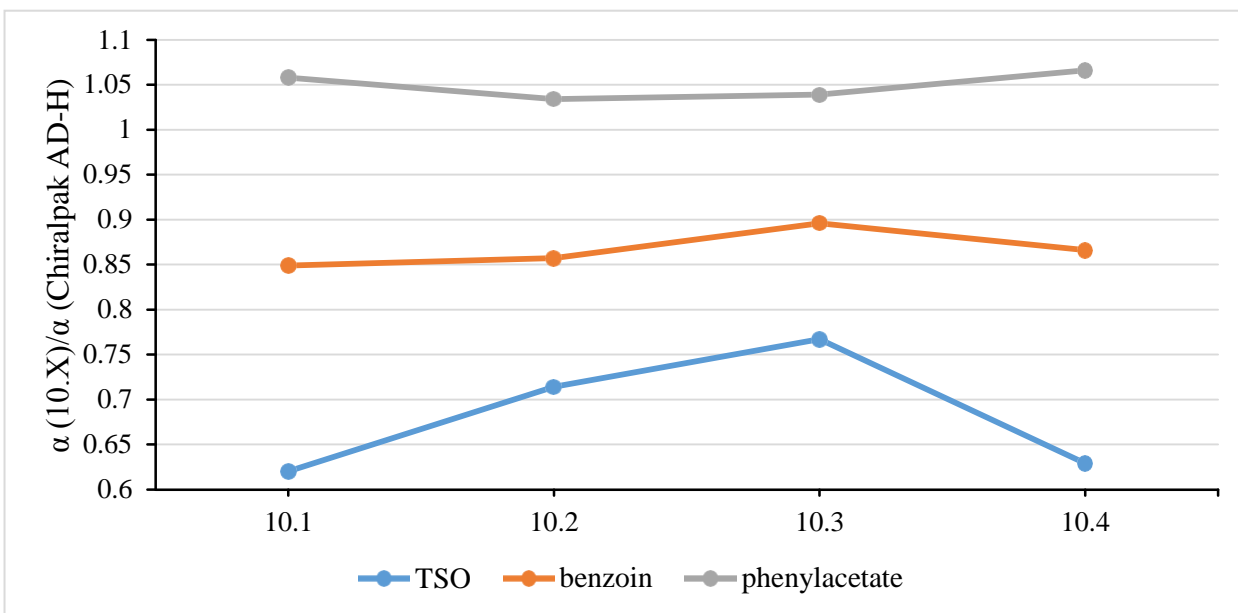


Рисунок 2.6 – відношення часів утримання першого піку тестових рацематів на виготовлених та комерційній колонках

Виявлено, що ступінь полімеризації диметифенілкарбамату амілози впливає на хроматографічні показники хіральної фази. Вплив неоднаковий для різних речовин. Для колонки AD_10.3 виявлена чітка тенденція наближення показників до комерційного аналогу порівняно із іншими виготовленими колонками. Показано, що наші колонки повністю придатні для аналітичних цілей, та розділяють деякі речовини (фенілацетат із тестової вибірки) не гірше промислового аналогу. Виготовлені колонки утримують тестові речовини краще ніж колонка Chiralpak AD-H, для двох тестових речовин мають нижчі коефіцієнти розділення.

3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА

3.1. Обладнання та реактиви

- Вода дистильована
- н-Бутанол
- Метанол
- Піридин
- 1,4-Діоксан
- Тетрагідрофуран
- н-Гексан
- 2-Пропанол
- N,N-Диметилацетамід
- 0.5М розчин соляної кислоти
- Гідроксид натрію
- (3-амінопропіл)триметоксисилан
- 3,5-диметилфенілізоціанат
- Транс-стильбен оксид
- Бензоїн
- Метил 2-гідрокси-2-фенілацетат
- Крохмаль картопляний «Розумний вибір», АТБ
- Силікагель S10005T виробництва SiliCycle, розмір частинок 5мкм, діаметр пор – 1000Å

3.2. Характеристики вихідного матеріалу

Вихідний матеріал для нанесення хірального селектору – силікагель Spherical Silica Gel 1000 Å серії SiliaSphere виробництва SiliCycle. Має вигляд білого порошку, складається із сфер макропористого силікагелю з немодифікованою поверхнею.

3.3. Виділення амілози

Основний гідроліз

20г крохмалю розчинили у 400 мл 1Н NaOH. Реакційну суміш перемішували 60 хв при температурі 80 °С. Нейтралізували HCl по метиловому червоному. Додали 60 мл бутанолу, суміш поступово охолола при перемішуванні с випаданням білого осаду, що був виділений центрифугуванням та промитий насиченим водним розчином бутанолу. Бутанольний комплекс перемішували 4 години у 100 мл метанолу, промили отриману амілозу невеликими порціями метанолу, висушили на роторному випарювачі та за допомогою масляного насосу. Назва зразку - АТБ_ОН_1.

Кислотний гідроліз

60г крохмалю суспендували у 570 г дистильованої води при постійному перемішуванні механічною мішалкою, додали 0.5М розчин HCl для отримання необхідної концентрації, реакційну суміш нагріли до 85°C та перемішували 60 хв. Реакційну суміш нейтралізували розчином NaOH з індикацією метиловим червоним, додали 100 мл н-бутанолу, залишили перемішуватись 12 годин без нагріву. Випадає білий осад.

Бутанольний комплекс відділили центрифугуванням, промили 2 рази 300 мл насиченого водного розчину н-бутанолу з повторним центрифугуванням. Отриманий осад 3 години перемішували з 200 мл метанолу для розкладання комплексу, відділили на фільтрі Шотта, повторно промивали метанолом (3*100 мл) щоб позбутись залишків н-бутанолу.

Продукт сушили на роторному випарювачі та за допомогою масляного насосу. Ключові зразки наведено у підрозділі 2.1.

3.4. Фракціонування амілози

Фракціонування амілози було проведено повністю дотримуючись методики описаної в літературі [17]

В 300 мл води суспендували 10 г АТБ_Н+_10, додали 300 мл 1М NaOH. Плавнo прикапали 100 мл 1,4-діоксану (на 100 мл спостерігали першу точку помутніння). Додавши 20 мл діоксану відділили осад центрифугуванням та повторили осадження тричі, зібравши сумарно 4 фракції. Кожний отриманий зразок розчинили у 100 мл води, нейтралізували 0.5М р-ном HCl по фенолфталеїну, додали 50 мл діоксану, та залишили на 24 години для повного випадання комплексу діоксанового комплексу.

Осади відділили центрифугуванням, суспендували у 100 мл метанолу для руйнування діоксанового комплексу, тричі промивали метанолом по 20 мл, відокремлення осаду у всіх операціях було здійснено центрифугою, продукт сушили спочатку на роторному випарювачі, потім на вакуумі масляного насосу при 65°C.

3.5. Синтез 3,5-диметилфенілкарбаматів амілоз

1 г амілози суспендували у 20 мл піридину, додавали 4 мл 3,5-диметилфенілізоціанату, перемішували на магнітній мішалці 15 год при температурі 85°C з дефлегматором та хлоркальцієвою трубкою. До отриманої в'язкої коричневої рідини поступово при інтенсивному перемішуванні додавали 100 мл метанолу, фільтрували отриманий осад, відмивали від залишків реакційної суміші повторним суспендуванням у метанолі (3*30мл) та фільтруванням.

3.6. Модифікування поверхні силікагелю

10,47 мл амінопропілтриметоксисилану розчинили у 100 мл толуолу, додали 8,45 г 3,5-диметилфенілізоціанату, перемішували магнітною мішалкою 1 годину при температурі 90°C.

200 г силікагелю S10005T висушили прогріванням до 200°C на повітрі, суспендували у 1,3 л толуолу, додали розчин 540 мкл води в 20 мл сухого ізопропанолу.

Додали весь отриманий розчин 3,5-диметилфенілкарбамідопропіл триметоксисилану у толуолі до суспензії силікагелю, перемішували реакційну суміш 24 години механічною мішалкою при 110°C. Після охолодження, силікагель відділили центрифугуванням, та промили від залишків реакційної суміші 1 л толуолу та 2 метанолу у ВСЖХ колонці. Висушили при температурі 110°C. Схему наведено на схемі 3.1

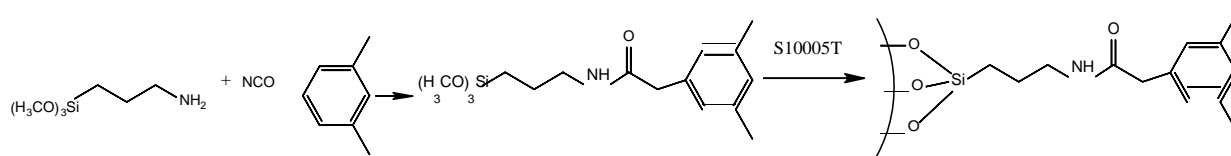


Схема 3.1 – отримання модифікованого силікагелю

3.7. Нанесення селектору на силікагель

1 г 3,5-диметилфенілкарбамату амілози розчиняли у суміші 19 мл ТГФ та 1 мл ДМАЦ. Невеликими порціями розчин додавали до 4 г силікагелю, випаровуючи розчинник при постійному перемішуванні на роторному випарювачі, періодично знижуючи та підвищуючи тиск. Отриманий сухий порошок висушували при 60°C за допомогою масляного насосу.

3.8. Прилади та методи

Віскозиметрія

Вимірювання в'язкості розчинів здійснювалось на мікрівіскозиметрі Lovis 2000 M при температурі 20°C. 100мкл розчину амілози поміщали у капіляр для визначення динамічної густини з автоматичним п'ятикратним вимірюванням.

0,5 г амілози розчиняли у 9,5 г 0,5М р-ну NaOH (отримали 5% р-н амілози), незначну кількість нерозчинного осаду відцентрифугували з отриманням прозорого розчину, потім розведенням отримували по 2 мл розчинів із масовою часткою амілози 3, 2, 1, та 0,5 %

ІЧ-спектроскопія

Спектри речовин записані за допомогою спектрометра Nicolet Nexus 470, в діапазоні 4000-400 cm^{-1} , 32 скани, роздільна здатність – 4 cm^{-1} , пресуючи невелику кількість зразку з бромідом калію у таблетку.

Хроматографія

Хроматографічне тестування робили на аналітичному хроматографі Agilent 1200 при потоці 1мл/хв, склад елюенту: гексан/2-пропанол 9:1, об'єм інжекції 5мкл, концентрація розчинів 1мг/мл. Формули тестових речовин, їх назви та скорочені назви для використання у зображенні результатів наведені на рисунку 3.1.

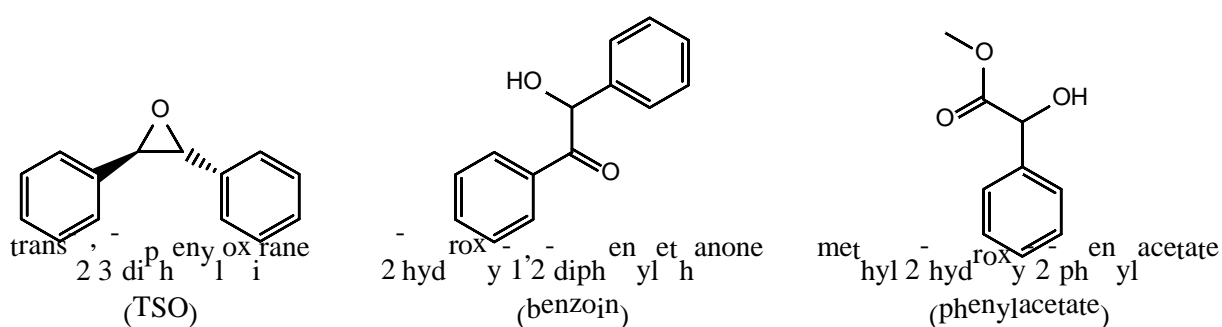


Рисунок 3.1 – Обрані речовини для тестування колонок

Отриманий силікагель суспендували у суміші гексан/2-пропанол, та набивали у аналітичні колонки діаметром 4,6 мм та довжиною 250 мм, що є одним з найпоширеніших комерційних стандартів, за допомогою спеціалізованої установки. Колонки зберігались заповнені сумішшю гексан/2-пропанол та щільно закритті.

ВИСНОВКИ

1. Показано, що лужний гідроліз крохмалю і наступне осадження *n*-бутанолом призводить до високомолекулярної амілози. Варіювання умов кислотного гідролізу (концентрації кислоти) дозволяє одержати амілози регульованої молекулярної маси з меншим ступенем полімеризації; так, за даними віскозиметричних вимірювань, для амілози, одержаної при розчиненні крохмалю в 0,05 М соляній кислоті, $D_p = 130$.
2. Одержані амілози можна поділити на вузчі за молекулярною масою фракції методом переосадження.
3. На основі літературних даних розроблено методику одержання хірального селектору – 3,5-диметилфенілкарбамату амілози. Методом ІЧ спектроскопії підтверджено його будову, ідентичну такій для селектора, виділеного з колонки промислового виробництва.
4. Розроблено методику одержання стаціонарних хіральних хроматографічних фаз шляхом імпрегнаційного нанесення селектора на модифікований макропористий сферичний силікагель.
5. Показано, що використання для синтезу хірального селектора високомолекулярної амілози, одержаної лужним способом, не є доцільним через надлишкову в'язкість розчинів цього селектора в органічних розчинниках. Використання ж селекторів, синтезованих з низькомолекулярних амілоз – продуктів кислотного гідролізу крохмалю, дозволило отримати хіральні колонки з характеристиками, що наближаються до комерційного аналогу.
6. При порівнянні колонок, виготовлених на основі вузьких фракцій амілози, показано, що для різних тестових речовин оптимальними є різні фракції амілози. Це є передумовою для створення колонок, оптимізованих під розділення різних типів речовин.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Teixeira, Joana; Tiritan, Maria Elizabeth; Pinto, Madalena M. M.; Fernandes, Carla (2019). Chiral Stationary Phases for Liquid Chromatography: Recent Developments. *Molecules*, 24(5), 865-904
2. Jun-Hui Zhang, Sheng-Ming Xie, Li-Ming Yuan. (2022) Recent progress in the development of chiral stationary phases for high-performance liquid chromatography. *Journal of Separation Science* Volume 45, Issue 11
3. Shen, J., Ikai, T., & Okamoto, Y. (2014). Synthesis and application of immobilized polysaccharide-based chiral stationary phases for enantioseparation by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1363, 51–61
4. Carla Fernandes, Joana Teixeira, Madalena M. M. Pinto and Maria Elizabeth Tiritan. (2021) Strategies for Preparation of Chiral Stationary Phases: Progress on Coating and Immobilization Methods, *Molecules* 2021, 26(18), 5477
5. Okamoto, Y. (2015). Precision synthesis, structure and function of helical polymers. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 91(6), 246–261
6. Chen, Xiaoming; Yamamoto, Chiyo; Okamoto, Yoshio (2007). Polysaccharide derivatives as useful chiral stationary phases in high-performance liquid chromatography. *Pure and Applied Chemistry*, 79(9), 1561-1573
7. Yoshio Okamoto (2009). Chiral polymers for resolution of enantiomers. *Journal of Polymer Science*, 47(7), 1731–1739

8. Zhao, B., Oroskar, P. A., Wang, X., House, D., Oroskar, A., Murad, S. (2017). The Composition of the Mobile Phase Affects the Dynamic Chiral Recognition of Drug Molecules by the Chiral Stationary Phase. *Langmuir*, 33(42), 11246–11256
9. Ikai, T., & Okamoto, Y. (2009). Structure Control of Polysaccharide Derivatives for Efficient Separation of Enantiomers by Chromatography. *Chemical Reviews*, 109(11), 6077–6101.
10. Eiji Yashima; Pennapa Sahavattanapong; Yoshio Okamoto (1996). HPLC enantioseparation on cellulose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) as a chiral stationary phase: Influences of pore size of silica gel, coating amount, coating solvent, and column temperature on chiral discrimination, *Chirality*, 8(6), 446–451.
11. Terao, K. (2009). Dimensional and hydrodynamic properties of amylose tris(phenylcarbamate) in various solvents. *Journal of Physics: Conference Series*, 184.
12. Wang, Xiaoyu; House, David W.; Oroskar, Priyanka A.; Oroskar, Anil; Oroskar, Asha; Jameson, Cynthia J.; Murad, Sohail (2019). Molecular dynamics simulations of the chiral recognition mechanism for a polysaccharide chiral stationary phase in enantiomeric chromatographic separations. *Molecular Physics*, 117 (23-24), 3569-3588
13. Wang, X., Jameson, C. J., & Murad, S. (2020). Modeling Enantiomeric Separations as an Interfacial Process Using Amylose Tris(3,5-dimethylphenyl carbamate) (ADMPC) Polymers Coated on Amorphous Silica. *Langmuir*, 36 (5), 1113-1124

14. Okamoto, Y., & Yashima, E. (1998). Polysaccharide Derivatives for Chromatographic Separation of Enantiomers. *Angewandte Chemie International Edition*, 37(8), 1020–1043
15. Ryoki, A., Kimura, Y., Kitamura, S., Maeda, K., & Terao, K. (2019). Does local chain conformation affect the chiral recognition ability of an amylose derivative? Comparison between linear and cyclic amylose tris(3,5-dimethylphenylcarbamate). *Journal of Chromatography A*, 1599, 144-151
16. Okada, Yuji; Yamamoto, Chiyo; Kamigaito, Masami; Gao, Yuan; Shen, Jun; Okamoto, Yoshio (2016). Enantioseparation Using Cellulose Tris(3,5-dimethylphenylcarbamate) as Chiral Stationary Phase for HPLC: Influence of Molecular Weight of Cellulose. *Molecules*, 21(11), 1484–1494
17. М. Рихтер, З. Аугустат, Ф. Ширбаум. (1975) Избранные методы исследования крахмала
18. K. G. Krishnaswamy A. Sreenivasan; Separation and determination of the amylose and amylopectin fractions of starch (1948), *Journal of Biological Chemistry*, 176 (3), 1253-1261
19. Klucinec Jeffrey D., Thompson Donald B.; Fractionation of high-amylose maize starches by differential alcohol precipitation and chromatography of the fractions. (1998) *Cereal Chemistry*, Volume 75(6), 887-896.
20. Ming-Hsuan Chen; Christine J. Bergman (2007). Method for determining the amylose content, molecular weights, and weight- and molar-based distributions of degree of polymerization of amylose and fine-structure of amylopectin. *Carbohydrate Polymers*, 69(3), 562–578