

移動相中添加 β -環糊精在逆相液相層析上分離一些單取代 酚類位置異構物

李冠儀 張書文 賴鈺森 林振興*

輔英科技大學應用化學及材料科學系

摘要

本研究在移動相中添加 5 mM β -環糊精於甲醇與水的混合溶液，利用 RP-C₁₈ 靜相管柱分離一些單取代酚類位置異構物，並探討移動相中甲醇含量的影響。由層析結果顯示甲醇與水比例，會顯著影響單取代酚類位置異構物的分離效果。添加 5 mM β -環糊精於適當比例的甲醇與水的混合溶液當移動相，利用 RP-C₁₈ 靜相管柱可以有效分離硝基酚、甲酚、乙酚以及萘酚位置異構物，且硝基酚與乙酚可以達到基線分離。

關鍵詞：逆相液相層析； β -環糊精；硝基酚；甲酚；乙酚；萘酚

*通訊作者：輔英科技大學應用化學及材料科學系
Tel: +886-7-7811151ext5511
Fax: +886-7-7826732
E-mail: sc030@fy.edu.tw

壹、前言

環糊精是由 6 到 12 個葡萄糖單元以 α -(1,4) 鍵聯而成的巨環葡萄糖聚合物。環糊精的形狀為有孔洞的桶狀結構，孔洞內部具有疏水性，而外部則具有親水性，可以有選擇性地包藏各種不同的有機分子，而形成包藏錯合物(inclusion complex)[1]。包藏錯合物的穩定性與客體大小及形狀能否適合於環糊精孔洞有著密切的關係。除此之外，包藏錯合物形成時，環糊精與客體分子之間的作用力，如氫鍵或立體效應等亦扮演著極為重要的角色[1-3]。

環糊精與多種化合物所形成包藏錯合物的穩定性隨著客體分子之不同而異，因而可將此種特性應用於分離技術上[1-3]。環糊精在 HPLC 方面的應用有兩種方法，一種是利用逆相液相層析方法，在移動相中添加環糊精，利用 RP-C₁₈ 靜相管柱，以分離異構物，此法已經成功分離許多對掌異構物與芳

香族位置異構物[4-9]；第二種方法是將環糊精化學鍵結於矽膠擔體上，填裝成靜相管柱，以分離各種異構物 [10-19]，本研究採用第一種方法。

酚類毒性強，是已知主要環境致癌物[20]。若以高效液相層析技術，一般常用 RP-C₁₈ 靜相管柱對酚類化合物來檢測，得知能夠有效分離這些分析物，但遇上結構相似的酚類位置異構物，若移動相中未添加環糊精，則分離效果顯然不佳。將 β -環糊精化學鍵結於矽膠擔體上，填裝成靜相管柱，曾用以分離甲酚、乙酚、氯酚以及硝基酚位置異構物 [13]，從分離結果得知甲酚、氯酚以及硝基酚無法完全分離[13]。因本研究曾添加 5 mM β -環糊精於含甲醇與水混合液的移動相中，利用 RP-C₁₈ 靜相管柱，可以基線分離氯酚 3 種位置異構物[21]。故本研究嘗試再利用這種 RPLC 法，以分離硝基酚、甲

酚、乙酚以及萘酚位置異構物。本論文在移動相中添加 5 mM β -環糊精，改變甲醇與水的不同比例 (50:50 至 20:80)，以探討移動相中甲醇含量，對分析物分離的影響。

貳、材料及方法

一、化學藥品

β -環糊精(β -CD)為美國 sigma 試藥級產品。鄰-硝基酚、間-硝基酚、對-硝基酚、鄰-甲酚、間-甲酚、對-甲酚、鄰-乙酚、間-乙酚、對-乙酚、1-萘酚、2-萘酚係採用日本東京試藥級產品。層析使用的溶劑，如甲醇係採用美國 Mallinckrodt LC 級產品。水為去離子二次水。

二、儀器設備

高效液相層析儀使用 HITACHI 廠牌之 L-7100 型溶劑輸送系統、SPECTROFLOW 480 型注入器、L-7420 型 UV-VIS 吸收偵測器以及個人電腦組合而成。本研究的層析條件為偵測器之波長設定在 254nm；流速控制在 2mL/min。並採用 100 $^{\circ}$ A、5 μ m，150 \times 4.6 mm RP-C₁₈ 靜相管柱。分析物溶解於甲醇溶劑，並注射適當量進入注入器，以測試分析物的分離效果。

三、移動相組成

本研究以分離氯酚位置異構物的移動相條件，添加 5 mM β -環糊精濃度於甲醇與水不同比例 (50:50 至 20:80) 的混合溶液當移動相，然後利用 RP-C₁₈ 靜相管柱分離硝基酚、甲酚、乙酚以及萘酚位置異構物。

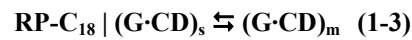
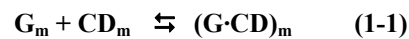
參、結果與討論

在高效液相層析方法上，若移動相中未添加 β -環糊精，以 RP-C₁₈ 靜相管柱分離單取代酚類位置異構物，則分離效果顯然不佳，無法將酚類位置異構物有效的分離[22]。在移動相中添加 β -環糊精，利用 RP-C₁₈ 靜相管柱以分離一些單取代酚類位置異構物，必須考慮下列幾種影響分離次序的因數。例如，(1)分析物本身與靜相之間作用力；(2)包藏錯合物與靜相之間作用力；(3)包藏錯合物在移動相中之結合常數大小；(4) β -環糊精在移動相中濃度的影

響。這些影響因數是相當複雜的，無法詳細討論，所以本研究僅對滯留原理作粗略的描述。

一、滯留原理

根據文獻資料[4]，若移動相中添加環糊精，再利用 RP-C₁₈ 管柱分離芳香族異構物。假設客體分子與環糊精是 1:1 化學計量錯合過程，且環糊精不影響 RP-C₁₈ 靜相的性質，那麼此系統的滯留因數 (apparent retention capacity factor)，可以用下列三個平衡式，描述其滯留行為：



下標 s, m 表示固相與移動相；G 為客體分子；CD 為環糊精；RP-C₁₈ 為靜相。

此系統滯留因數 (apparent retention factor) 可以下式表示之：

$$k' = \frac{k'_G + k'_{G \cdot CD} \cdot K_G [CD]_m}{1 + K_G [CD]_m} \quad (1-4)$$

K_G 為環糊精形成錯合物之結合常數； k'_G 為客體分子的滯留因數； $k'_{G \cdot CD}$ 為客體分子與環糊精形成之包藏錯合物的滯留因數，

由上式可以推測影響滯留因數有：(1)包藏錯合物在移動相中之結合常數；(2)包藏錯合物與靜相之間作用力；(3)溶質與靜相間的作用力；(4)移動相中環糊精濃度。

二、移動相中甲醇含量的影響

本研究曾經添加 1.25mM 至 5mM 的 β -環糊精濃度於甲醇與水比例為 50:50 的混合溶液當移動相，然後利用 RP-C₁₈ 靜相管柱分離 3 種氯酚位置異構物，所得到的層析結果得知分析物的滯留因數雖然會隨著 β -環糊精濃度增加而稍為增大，但相鄰兩種位置異構物的滯留因數差值會隨著 β -環糊精濃度增加而增大，此現象可推測 β -環糊精濃度增加，可以增加 3 種氯酚位置異構物的分離效果。因此本研究添加 5 mM β -環糊精於甲醇與水不同比例 (50:50 至 20:80) 的混合溶液當移動相，利用 RP-C₁₈ 靜相管柱分離甲酚與乙酚，結果如圖 1 及圖 2 所示。所得到的層析結果得知甲酚與乙酚位置異構物的滯留因數會隨著甲醇含量增加而減少。可能解釋

原因是甲醇含量增加，則移動相極性下降，可以增加移動相對酚類異構物的溶解度，使得這些分析物的滯留因數降低，此種層析結果顯現出逆相液相層析的特性。甲酚與乙酚的沖提次序不會隨著甲醇含量而改變，且乙酚的滯留因數比甲酚大。

本研究也添加 5 mM β -環糊精於甲醇與水不同比例(50:50 至 20:80)的混合溶液當移動相，利用 RP-C₁₈ 靜相管柱分離硝基酚與萘酚，所得的結果類似圖 1 及圖 2 所示。硝基酚與萘酚位置異構物的滯留因數都會隨著甲醇含量增加而減少。硝基酚與萘酚位置異構物的沖提次序也不會隨著甲醇含量而改變。

三、4 種單取代酚類位置異構物的分離

本研究選擇 4 種單取代酚類位置異構物作為分析物。4 種單取代酚類位置異構物的分離分別敘述如下：

(一)硝基酚位置異構物的分離

若選用 β -環糊精鍵結靜相管柱，則無法將鄰-硝基酚與間-硝基酚兩種異構物完全分離[13]。圖 3 所示為添加 5 mM 的 β -環糊精濃度於甲醇與水比例為 30:70 的混合溶液當移動相，然後利用 RP-C₁₈ 靜相管柱分離硝基酚 3 種位置異構物的層析圖。從圖中可知 3 種分析物可達到基線分離。硝基酚位置異構物沖提次序大小依序：對-硝基酚<鄰-硝基酚<間-硝基酚。此結果與 K. Fujimura 等人(Anal. Chem. 1986, 58, 2668-2674) 發表的文章之沖提次序不一樣，在該篇文章中硝基酚的沖提次序依序：對-硝基酚<間-硝基酚<鄰-硝基酚，經由再次比對層析結果，硝基酚位置異構物沖提次序依序：對-硝基酚<鄰-硝基酚<間-硝基酚，可能解釋原因是，雖同是 RP-C₁₈ 管柱，但靜相結構可能不一樣，而改變了硝基酚的沖提次序。

(二) 甲酚位置異構物的分離

若選用 β -環糊精鍵結靜相管柱，則無法將鄰-甲基酚與間-甲基酚兩種異構物完全分離[13]。圖 4 所示為添加 5mM 的 β -環糊精濃度於甲醇與水比例為 20:80 的混合溶液當移動相，然後利用 RP-C₁₈ 靜相管柱分離甲酚 3 種位置異構物的層析圖。從圖 4 中可知 3 種分析物可達到接近基線分離。甲酚位

置異構物沖提次序大小依序：對-甲酚<間-甲酚<鄰-甲酚。

(三) 乙酚位置異構物的分離

本研究添加 β -環糊精濃度於甲醇與水的混合溶液當移動相，然後利用 RP-C₁₈ 靜相管柱分離乙酚 3 種位置異構物。圖 5 所示為添加 5mM 的 β -環糊精濃度於甲醇與水比例為 20:80 的混合溶液當移動相，然後利用 RP-C₁₈ 靜相管柱分離乙酚 3 種位置異構物的層析圖。從圖 5 中可知 3 種分析物可達到接近基線分離。乙酚位置異構物沖提次序大小依序為：對-乙酚<間-乙酚<鄰-乙酚。對-乙酚因分子較伸入 β -環糊精孔洞內所產生包藏錯合物最穩定，最快沖提出來之外，其它二種位置異構物之沖提次序大小，依序為間-乙酚<鄰-乙酚。因乙酚的結構比甲酚多一個甲基而已，結構非常相似，故沖提順序與甲酚一樣，且分離效果比甲酚好，主要原因可能是乙酚之乙基部分與 β -環糊精的疏水性作用力較大。從文獻資料[4]得知影響滯留因數是相當複雜的。一般而言，對位-酚類與 β -環糊精所形成的錯合物之結合常數>間位-酚類與 β -環糊精所形成的錯合物之結合常數>鄰位-酚類與 β -環糊精所形成的錯合物之結合常數。比較甲酚、乙酚以及硝基酚的滯留因數及沖提次序的結果，無法得知酚類與 β -環糊精所形成的錯合物之結合常數對滯留因數的影響較佔優勢。因從層析資料無法找出有力數據來說明何種因數影響較大，所以本研究僅對滯留原理作粗略的描述。

4. 萘酚位置異構物的分離

圖 6 所示為添加 5 mM β -環糊精於甲醇與水比例為 50:50 的混合溶液當移動相，然後利用 RP-C₁₈ 靜相管柱分離萘酚位置異構物的層析圖。從圖中得知分離效果很好，沖提次序大小依序為：2-萘酚 < 1-萘酚。這種滯留行為推測原因是 1-萘酚與鍵結靜相之 β -環糊精中的-OH 基產生氫鍵，大於 2-萘酚與鍵結靜相之 β -環糊精中的-OH 基產生的氫鍵，致使 1-萘酚的滯留因數大於 2-萘酚的滯留因數。因此沖提次序大小依序為：2-萘酚 < 1-萘酚。

肆、結論

添加 5mM β-環糊精濃度於適當的甲醇與水混合比例當移動相，然後利用 RP-C₁₈ 靜相管柱可以有效分離硝基酚、甲酚、乙酚以及萘酚位置異構物，且硝基酚與乙酚可以達到基線分離。硝基酚、甲酚、乙酚以及萘酚位置異構物的滯留因數會隨著甲醇含量增加而減少，其沖提次序不隨著甲醇含量而改變，此種層析結果顯現出其逆相層析的特性。本研究硝基酚的沖提次序與文獻資料之硝基酚的沖提次序不一樣的可能原因是，所使用的 RPC₁₈ 管柱靜相結構可能不一樣。

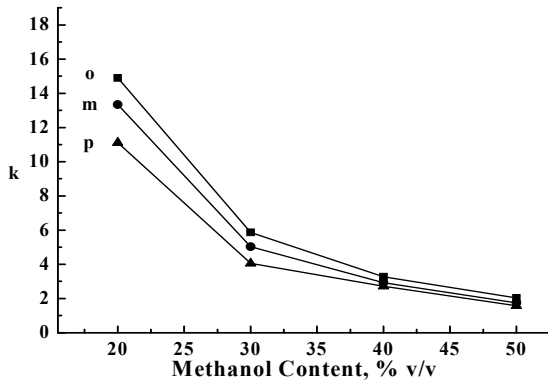


圖 1 在 5mM β-環糊精的移動相中，甲醇與水不同比例 (50 : 50 至 20 : 80) 的混合溶液與甲酚滯留因數的關係圖。o : 鄰- ; m : 間- ; p : 對-。

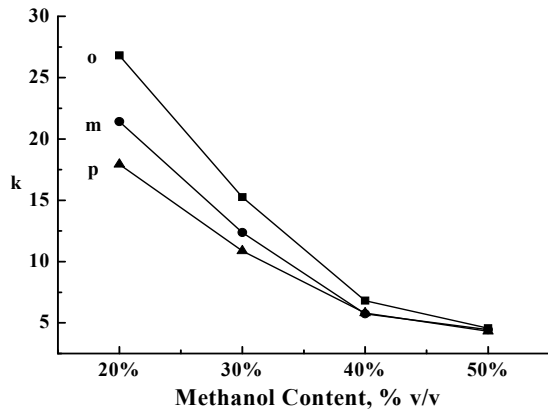


圖 2 在 5mM β-環糊精於移動相中，甲醇與水不同比例 (50 : 50 至 20 : 80) 的混合溶液與乙酚滯留因數的關係圖。o、m 及 p 與圖 1 一樣。

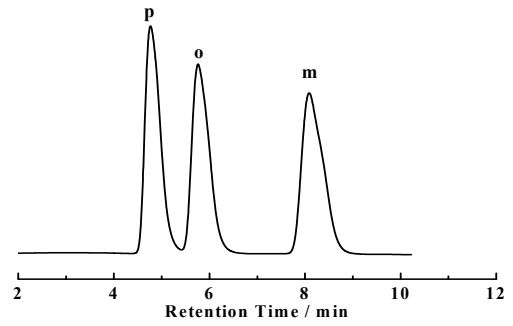


圖 3 添加 5 mM β-環糊精濃度於甲醇與水比例為 30 : 70 的混合溶液當移動相，利用 RP-C₁₈ 靜相管柱分離硝基酚 3 種位置異構物。流速：2mL/min；波長設定在 254nm。

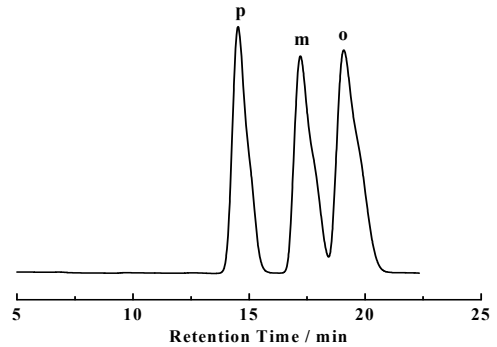


圖 4 添加 5 mM β-環糊精濃度於甲醇與水比例為 20 : 80 的混合溶液當移動相，利用 RP-C₁₈ 靜相管柱分離甲酚 3 種位置異構物。層析條件與圖 3 一樣。

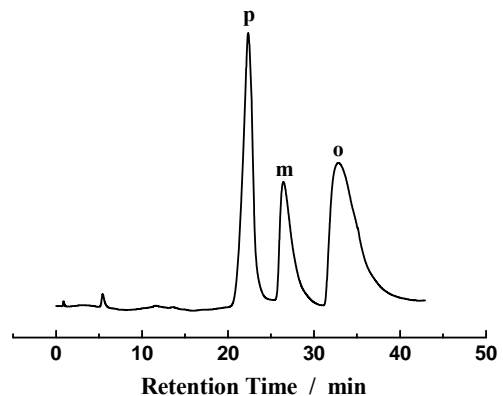


圖 5 添加 5 mM β-環糊精濃度於甲醇與水比例為 20 : 80 的混合溶液當移動相，利用 RP-C₁₈ 靜相管柱分離乙酚 3 種位置異構物。層析條件與圖 3 一樣。

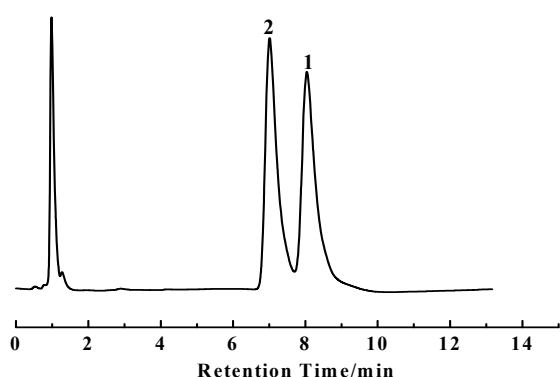


圖 6 添加 5 mM β -環糊精濃度於甲醇與水比例為 50 : 50 的混合溶液當移動相，利用 RP-C₁₈ 靜相管柱分離萘酚 2 種位置異構物。層析條件與圖 3 一樣。波峰指認：1：1-萘酚；2：2-萘酚。

謝辭

感謝輔英科技大學環境與生命學院與應用化學及材料科學系提供儀器設備及研究相關的協助。

參考文獻

- Saenger, W. (1980). Cyclodextrin Inclusion Compounds in Research and Industry. *Int. Ed. Engl.*, 19, 344-362.
- Smolkova-Keulemansova, E., & Krysl, S. (1980). Inclusion Compounds in Chromatography. *J. Chromatogr.*, 184, 347-361.
- Hinze, W. L. (1981). Applications of Cyclodextrins in Chromatography. *Sep. Purif. Methods*, 10, 159-237.
- Zukowski, J., Sybilska, D., & Jurczak, J. (1985). Resolution of Ortho, Meta, and Para Isomers of Some Disubstituted Benzene Derivatives Via α - and β -Cyclodextrin Inclusion Complex, Using Reversed Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, 57, 2215-2219.
- Tanaka, M., Miki, T., & Shono, T. (1985). Methylated Cyclodextrins as Mobile Phase Additives in Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.*, 330, 253-261.
- Bazant, L., Wurst, M., & Smolkova-Keulemansova, E. (1988). β -Cyclodextrin as a Selective Agent for Separation of Aromatic Acids by High-performance Liquid Chromatography. *J. Chromatogr.*, 445, 337-352.
- Bielejewska, A., Nowakowski, R., Duszczak, K., & Sybilska, D. (1999). Joint Use of Cyclodextrin Additives in Chiral Discrimination by Reversed-Phase High-performance Liquid Chromatography: Temperature Effects. *J. Chromatogr. A*, 840, 159-170.
- Claude, B., Morin, P., Lafosse, M., & Andre, P. (2004). Evaluation of Apparent Formation Constants of Pentacyclic Triterpene Acids Complex with Derivatized β - and γ -Cyclodextrins by Reversed Phase Liquid Chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1049, 37-42.
- Morin, N., Cornet, S., Guinchard, C., Rouland, J. C. Y., & Guillaume, C. (2000). HPLC Retention and Inclusion of Imidazole Derivatives Using Hydroxypropyl- β -cyclodextrin as a Mobile Phase Additive. *J. Liq. Chrom. & Rel. Technol.*, 23, 727-739.
- Fujimura, K., Ueda, T., & Ando, T. (1983). Retention behavior of Some Aromatic Compounds on Chemically Bonded Cyclodextrin Silica Stationary Phases in Liquid Chromatography. *Anal. Chem.*, 55, 446-450.
- Kawaguchi, Y., Tanaka, M., Nakae, M., Funazo, K., & Shono, T. (1983). Chemically Bonded Cyclodextrin Stationary Phases for Liquid Chromatographic Separation of Aromatic Compounds. *Anal. Chem.*, 55, 1852-1857.
- Chang C. A., Wu, Q., & Armstrong, D. W. (1986). Reversed-phase High-performance Liquid Chromatographic Separation of Substituted Phenolic Compounds with a β -Cyclodextrin Bonded Phase Column. *J. Chromatogr.*, 354, 454-458.
- Lin, C. E., Chen, C. H., Lin, C. H., Yang, M. H. &

- Jiang, J. C.(1989), Chemically Bonded Cyclodextrin Silica Stationary Phases for liquid Chromatographic Separation of Some Disubstituted Benzene Derivatives. *J. Chromatogr. Sci.*, 27, 665-671..
14. Araki, T., Chiba, M. Tsunoi, S. & Tanaka, M.(2000), Separation of Chlorophenols by HPLC and Capillary Electrochromatography Using β -cyclodextrin Bonded Stationary Phase. *Anal. Sci.*, 16, 421-424.
15. Han, X., Yao, T., Liu Y., Liu R., Larock, C. & Armstrong D. W.(2005), Separation of Chiral Furan Derivatives by Liquid Chromatography Using Cyclodextrin-based Chiral Stationary Phases. *J. Chromatogr.*, 1063, 111-120.
16. Zakaria, P., Macka, M. & Haddad, P. R. (2004), Selectivity Control in the Separation of Aromatic Amino Acid Enantiomers with Sulfated β -cyclodextrin. *J. Chromatogr. A*, 1031, 179-186.
17. Liu, M., Li, L. S., Da, S. L. & Feng, Y. Q. (2005), High Performance Liquid Chromatography with Cyclodextrin and Calixarene Macrocyclic Bonded Silica Stationary Phases for Separation of Steroids. *Talanta*, 66, 479-486.
18. Lin, C. H., Chen, C. Y., Chang, S. W., Wu, J. C. & Lin, C. E.(2006), Use of β -Cyclodextrin Bonded Phase with s-Triazine Moiety in the Spacer for Separation of Aromatic Carboxylic Acid Isomers by High-performance Liquid Chromatography. *Anal. Chim. Acta*, 576, 84-90.
19. Lin, C. H., Chen, C. Y., Chang, S. W., Wu, J. C. & Lin, C. E.(2008), Separation of Aromatic Carboxylic Acid Isomers by HPLC Using β -Cyclodextrin Bonded Phase with Diamino-s-triazine Moiety, *J. Chin. Chem. Soc.* 55, 1367-1372
20. Lin, C. E., Lin, W. C., & Chiou, W. C. (1995). Migration Behaviour and Optimization of Selectivity of Dichlorophenols in Capillary Zone Electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 705,325-333.
21. Liao, L. F., Huang, C. H., Yang C. C., Chang, S. W., & Lin, C. H. (2010). Separation of Chlorophenols Isomers by Reversed-Phase Liquid Chromatography Using β -Cyclodextrin as Mobile Phase Additives. *CHIA-NAN ANNUAL BULLETIN*, 36, 104-110.
22. Chang, C. A., Wu, Q., & Armstrong, D. W. (1986). Reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of substituted phenolic compounds with a β -cyclodextrin bonded phase column. *J. Chromatogr.* 354, 454-458.

Separation of Some Isomeric Monosubstituted Phenols by RPLC Using β -cyclodextrin as Mobile Phase Additives

Guan Yi Li Shu Wen Chang Yu Sen Lai Chen Hsing Lin *

Department of Applied Chemistry and Material Science,
Fooyin University, Ta-Liao, Kaohsiung, Taiwan 83102, R.O.C.

Abstract

The retention behavior of some isomeric mono-substituted phenols was investigated by high-performance liquid chromatography on a RP-C₁₈ stationary phase using β -cyclodextrin as mobile phase additives. Effects of methanol content of mobile phase were examined. Effective separations of some isomeric mono-substituted phenols were achieved on a RP-C₁₈ stationary phase using β -cyclodextrin as mobile phase additives. Moreover, baseline separations of isomeric nitrophenol and ethylphenol were achieved.

Keywords: Reversed Phase Liquid Chromatography, β -Cyclodextrin, Nitrophenol, Cresol, Ethylphenol, naphthol.

* Correspondence: Department of Applied Chemistry and Material Science, Fooyin University,
Ta-Liao, Kaohsiung, Taiwan 83102, R.O.C.
Tel: +886-7-7811151ext5511
Fax: +886-7-7826732
E-mail: sc030@fy.edu.tw