

移動相中添加 HP- β -環糊精在 RPLC 上分離二氯酚異構物

廖麗芳¹ 楊朝成² 黃嘉慧¹ 張書文¹ 林振興^{1*}

¹輔英科技大學應用化學及材料科學系

²嘉南藥理科技大學化粧品科技研究所

摘 要

本研究在移動相中添加 HP- β -CD，利用 RP-C₁₈ 靜相以分離 6 種二氯酚異構物。結果顯示在移動相中，HP- β -環糊精的濃度及甲醇與水比例，會顯著影響二氯酚異構物的分離效果。經由層析圖得知，添加 1.25 mM HP- β -環糊精於甲醇與水比例為 50：50 的混合溶液當移動相，利用 RP-C₁₈ 靜相管柱可以有效分離 6 種二氯酚異構物。從二氯酚異構物的滯留行為可知，包藏錯合物在分離機轉上扮演重要的角色。

關鍵詞：逆相液相層析；HP- β -環糊精；二氯酚

*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@mail.fy.edu.tw

壹、前言

環糊精是 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，常見環糊精有 α -環糊精， β -環糊精， γ -環糊精， δ -環糊精四種。由於結構特殊，可以與各種不同的有機分子形成包藏錯合物(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，凡得瓦力、氫鍵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]。環糊精在液相層析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，用以分離異構物，此法已經成功分離許多對掌異構物、芳香族位置異構物[4-9]；另一種是將環糊精化學鍵結於矽膠擔體上，填充成靜相管柱，也可以成功地分離許多位置異構

物或對掌異構物 [10-19]。

氯酚類化合物毒性甚強，對人體健康有害，除了造成長期病變外，急性中毒症狀有嘔吐、抽筋、虛脫以及肝腎機能障礙等[20]。由於氯酚類毒性強，是主要環境致癌物，因此頗受研究人員重視。在有關氯酚類異構物的分離相關文獻資料中，得知利用毛細管電泳技術可以完全分離二氯酚異構物[21-22]。而在液相層析法分離氯酚類異構物的相關文獻中，環糊精鍵結靜相管柱常被用來分離氯酚類異構物[12-14]。但這些環糊精鍵結靜相管柱，無法有效分離氯酚類異構物[12-14]。本研究曾經在移動相中，添加 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 6 種二氯酚異構物，由層析結果得知，無法完全基線分離這些分析物[20]。故本論文嘗試在移動相中添加 HP- β -環糊精，然後利用 RP-C₁₈ 靜相管柱分離 6 種二氯酚異構物。並探討移動相中，HP- β -環

糊精的濃度及甲醇與水混合比例，對這些二氯酚異構物分離的影響。

貳、材料及方法

一、化學藥品

HP-β-環糊精 (Hydroxypropyl-β-cyclodextrin) 為美國 sigma 試藥級產品。2,3-二氯酚、2,4-二氯酚、2,5-二氯酚、2,6-二氯酚、3,4-二氯酚、3,5-二氯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。商業化的 RP-C₁₈ 靜相管柱是 Cogent HPLC Column RP-C₁₈，100 Å，5 μm，150×4.6 mm 的產品。水為蒸餾去離子二次水。

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 254 nm；流速控制在 2 mL/min。分析物溶解於甲醇溶劑，並取適當量進入注入器以收集層析資料。

三、移動相組成

本研究移動相組成配製計有兩類：(1)分別添加 1 mM、1.25 mM、2.5 mM、5 mM 以及 10 mM 的 HP-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 6 種二氯酚異構物；(2)分別添加 1.25 mM HP-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，然後利用 RP-C₁₈ 靜相管柱分離 6 種二氯酚異構物。圖 1 所示為 6 種二氯酚異構物的結構。

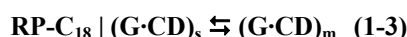
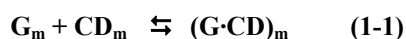
參、結果與討論

在移動相中添加 HP-β-環糊精，利用 RP-C₁₈ 靜相管柱以分離二氯酚異構物，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穩定常數大小；(4)HP-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穩定常數；k'_G 為客體分子的滯留因數；k'_{G·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穩定常數；(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 HP-β-環糊精濃度的影響

本研究分別添加 1 mM、1.25 mM、2.5 mM、5 mM 以及 10 mM 的 HP-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 6 種二氯酚異構物，所得到的層析結果如圖 2 所示。從圖 2 可知隨著 HP-β-環糊精濃度增加對 6 種分析物的滯留因數漸漸減小，由圖 2 得知添加 HP-β-環糊精濃度在 1 mM 至 1.25 mM 之間的分離效果最好，但當 HP-β-環糊精濃度增加至 2.5 mM 時，2,4-二氯酚與 3,4-二氯酚波峰重疊。所以分離 6 種二氯酚異構物時，添加 HP-β-環糊精濃度不宜太高。從圖 2 可知除了 2,4-二氯酚與 3,4-二氯酚異構物的沖提次序會隨著 HP-β-環糊精濃度而改變，其它二氯酚異構物沖提次序不變。從圖 2 中得知 3,5-二氯酚的滯留因數最大，2,6-二氯酚的滯留因數最小。

三、移動相中甲醇含量的影響

本研究分別添加 1.25 mM HP-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 6 種二氯酚異構物。所得到的層析結果類似添加 β-環糊精於甲醇與水不同比例(50 : 50 至 20 : 80)的混合溶液的層析結果。6 種分析物的滯留因數會隨著甲醇含量增加而減少，而 6 種分析物的沖提次序不會隨著甲醇含量而改變，此種層析結果顯現出逆相液相層析的特性。

四、6 種二氯酚異構物的分離

本研究選擇 6 種二氯酚異構物作為分析物。圖 3 所示為添加 1.25 mM HP-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 6 種二氯酚異構物的層析圖。從圖 3 中，可看出除了 2,4-二氯酚與 3,4-二氯酚無法基線分離之外，其它二氯酚異構物皆可達到基線分離；比較圖 3 與添加 1.25 mM β-環糊精濃度，在相同層析條件之下，分離 6 種二氯酚異構物的層析圖[20]。比較結果發現，圖 3 之 2,4-二氯酚與 3,4-二氯酚之間波峰的解析度比添加 β-環糊精之相同波峰的解析度差。值得注意的，添加 1.25 mM HP-β-環糊精濃度對 6 種二氯酚異構物進行分離，大約 16 分鐘內全部沖提出來；而添加相同濃度的 β-環糊精，在相同的層析條件，卻需要約 18 分鐘才能全部沖提出來。由此可知，添加 HP-β-環糊精，比添加 β-環糊精更節省滯留時間。又由圖 3 得知 6 種二氯酚異構物的沖提次序為：2,6-二氯酚 < 2,3-二氯酚 < 2,5-二氯酚 < 2,4-二氯酚 < 3,4-二氯酚 < 3,5-二氯酚。由滯留原理推測，3,5-二氯酚於幾種影響因數中，作用力總和最大，其次為 3,4-二氯酚，而 2,6-二氯酚作用力總和最小。

肆、結論

從添加 HP-β-環糊精濃度對分析物的層析結果得知，隨著 HP-β-環糊精濃度增加，則 6 種二氯酚異構物的滯留因數會漸漸減小；由改變移動相中甲醇含量的層析結果得知，6 種二氯酚異構物的滯留因數會隨著甲醇含量增加而減少，且沖提次序不會

隨著甲醇含量而改變，此層析結果顯現出逆相液相層析的特性。比較添加 1.25 mM HP-β-環糊精濃度與相同濃度之 β-環糊精於甲醇於相同層析條件，利用 RP-C₁₈ 靜相管柱分離 6 種二氯酚異構物之層析圖。從層析圖可知，兩者層析結果相似，除了 2,4-二氯酚與 3,4-二氯酚無法基線分離之外，其它二氯酚異構物皆可達到基線分離；值得注意的，添加 1.25 mM HP-β-環糊精濃度對 6 種二氯酚異構物進行分離，大約 16 分鐘內全部沖提出來；而添加相同濃度的 β-環糊精在相同的層析條件，卻需要大約 18 分鐘才能全部沖提出來。由此可知，添加 HP-β-環糊精濃度，比添加相同濃度 β-環糊精更節省滯留時間。

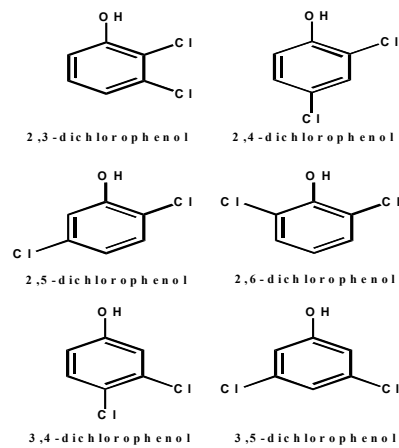


圖 1 是 6 種二氯酚異構物的結構。

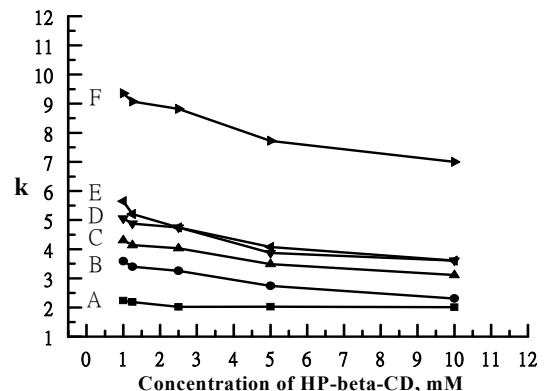


圖 2 甲醇與水比例為 50 : 50 的混合溶液移動相中，HP-β-環糊精濃度與滯留因數的關係圖。A : 2,6-二氯酚；B : 2,3-二氯酚；C : 2,5-二氯酚；D : 2,4-二氯酚；E : 3,4-二氯酚；F : 3,5-二氯酚。

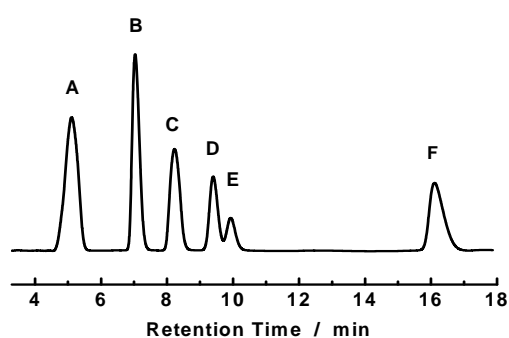


圖3 添加 1.25 mM HP-β-環糊精濃度於甲醇與水比例為 50:50 的混合溶液當移動相，利用 RP-C₁₈ 靜相管柱分離 6 種二氯酚異構物。流速：2 mL/min；波長設定在 254 nm；波峰指認：A：2,6-二氯酚；B：2,3-二氯酚；C：2,5-二氯酚；D：2,4-二氯酚；E：3,4-二氯酚；F：3,5-二氯酚。

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., Duszczyk, 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.

13. 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 Sulphated 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 Macrocycle 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. 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.
21. 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.
22. Lin, C. E., Lin, W. C., & Chiou, W. C. (1996). Migration Behaviour and Selectivity of Dichlorophenols in Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography Influence of Micelle Concentration and Buffer pH. *J. Chromatogr. A*, 722, 333-343.

Separation of Isomeric Dichlorophenols by RPLC Using HP- β -cyclodextrin as Mobile Phase Additives

Li Fang Liao¹ Chau Chen Yang² Chia Hui Huang¹ Shu Wen Chang¹ Chen Hsing Lin^{1*}

¹Department of Applied Chemistry and Material Science, Fooyin University,
Ta-Liao, Kaohsiung, Taiwan 83102, R.O.C.

²Institute of Cosmetic Science,
Chia-Nan University of Pharmacy and Science, Tainan, Taiwan 71710, R.O.C.

Abstract

The isomeric dichlorophenols were separated by high-performance liquid chromatography using HP- β -cyclodextrin as mobile phase additives. Effects of HP- β -CD concentration and methanol content of mobile phase on the separation of isomeric dichlorophenols were investigated. Chromatogram of six isomeric dichlorophenols shows that the effective separations were achieved on a RPC₁₈ stationary phase using 1.25mM HP- β -cyclodextrin as mobile phase additives. The chromatographic results indicate that inclusion complexes play a dominant role in the retention mechanism.

Key words: Reversed-Phase Liquid Chromatography (RPLC) ; HP- β -cyclodextrin; dichlorophenol

*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@mail.fy.edu.tw