สัญญาเลขที่ PDF/18/2543

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ สมบัติของเฟสคงที่ชนิดใหม่สำหรับการแยกอิแนนทิโอเมอร์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี

	คณะผู้วิจัย	สังกัด
1.	ดร.อรุณศิริ ชิตางกูร	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2.	นางสาวจิราวิทย์ ญาณจินดา	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3.	Professor Gyula Vigh	Department of Chemistry, Texas A&M University
4.	รศ.ดร.ยุวดี เชี่ยววัฒนา	ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ชุดโครงการ .....

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ : PDF/18/2543

ชื่อโครงการ : สมบัติของเฟสคงที่ชนิดใหม่สำหรับการแยกอิแนนทิโอเมอร์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี

ชื่อนักวิจัย :

อรุณศิริ ชิตางกูร	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
จิราวิทย์ ญาณจินดา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Gyula Vigh	Texas A&M University
ยุวดี เชี่ยววัฒนา	มหาวิทยาลัยมหิดล

คำสำคัญ : อิแนนทิโอเมอร์, แก๊สโครมาโทกราฟี, ไซโคลเดกซ์ทริน

ได้เตรียมอนุพันธ์ของเบตา-ไซโคลเดกซ์ทริน 3 ชนิด ได้แก่ heptakis(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltoheptaose (CD-2); heptakis(2,3-di-*O*-acetyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl) cyclomaltoheptaose (CD-3); และ heptakis(2-*O*-methyl-3,6-di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltohep taose (CD-5) อนุพันธ์ทั้งสามมีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง primary hydroxyls เหมือนกันคือ *tert*-butyldimethyl silyl แต่มีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง secondary hydroxyls ต่างกัน นำอนุพันธ์แต่ละชนิดไปเตรียมเป็นเฟสคงที่เพื่อแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี จากอนุพันธ์ทั้งสามชนิดที่ศึกษา อนุพันธ์ CD-2 ซึ่งมีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง secondary hydroxyls เป็นหมู่ methyl ขนาดเล็ก เป็นอนุพันธ์ที่ใช้งานได้กว้างที่สุด ทั้งในด้านช่วงอุณหภูมิใช้งาน ความสามารถในการแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ออกจากกัน และกลุ่มของสารที่สามารถแยกได้ อนุพันธ์ CD-3 สามารถใช้แยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ได้ดีเช่นกัน แต่ไม่เหมาะสำหรับการวิเคราะห์สารประเภทแอลกอฮอล์, เอมีน, และกรด เนื่องจากให้พีกที่ไม่สมมาตร ส่วนอนุพันธ์ CD-5 ซึ่งมีหมู่แทนที่ที่ตำแหน่ง secondary hydroxyls ขนาดใหญ่และเกะกะ สามารถใช้เป็นเฟสคงที่ได้ในช่วงอุณหภูมิที่จำกัด แต่ไม่สามารถแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ที่นำมาศึกษาได้เลย

Abstract

Project Code : PDF/18/2543

Project Title : Properties of New Gas Chromatographic Stationary Phases for Enantiomer Separations

Investigators :

Aroonsiri Shitangkoon	Chulalongkorn University
Jirawit Yanjinda	Chulalongkorn University
Gyula Vigh	Texas A&M University
Juwadee Shiowatana	Mahidol University

Keywords : enantiomer, gas chromatography, cyclodextrin

Three β-cyclodextrin derivatives were prepared: heptakis(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltoheptaose (CD-2); heptakis(2,3-di-*O*-acetyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl) cyclomaltoheptaose (CD-3); and heptakis(2-*O*-methyl-3,6-di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltohep taose (CD-5). All derivatives possess identical *tert*-butyldimethylsilyl substituents at the primary hydroxyls but different substituents at the secondary hydroxyls. Each derivative was used to prepare gas chromatographic stationary phases for enantiomer separations. Among the three derivatives studied, CD-2, containing small methyl substituents at the secondary hydroxyls, is the most versatile selector in terms of operating temperature range, enantioselectivity and compound classes that can be separated. CD-3 provides good enantioselectivity but is not suitable for alcohols, amines, and acids as peak tailing was observed. CD-5, with large and bulky substituents at the secondary hydroxyls, can be used in a limited temperature range but, unfortunately, shows no enantioselectivity towards any of tested solutes.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ที่ให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ และขอขอบคุณคณาจารย์และบุคลากรสังกัดภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ให้คำปรึกษา และอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานวิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	iii
Abstract	iv
กิตติกรรมประกาศ	v
หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)	1
เนื้อหางานวิจัย	3
บทนำ	3
วัตถุประสงค์	6
ขอบเขตของการวิจัย	6
การทดลอง	7
ผลการทดลอง	10
สรุปผลการทดลอง	18
เอกสารอ้างอิง	18
ผลงานที่ได้จากโครงการ	20
งานวิจัยเพิ่มเติม	21
ภาคผนวก	22
สำเนาบทความสำหรับการเผยแพร่	23

หน้าสรุปโครงการ (Executive Summary)

รหัสโครงการ : PDF/18/2543

ชื่อโครงการ : สมบัติของเฟสคงที่ชนิดใหม่สำหรับการแยกอิแนนทิโอเมอร์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี

ชื่อนักวิจัย :

อรุณศิริ ชิตางกูร	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
จิราวิทย์ ญาณจินดา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Gyula Vigh	Texas A&M University
ยุวดี เชี่ยววัฒนา	มหาวิทยาลัยมหิดล

วัตถุประสงค์ :

1. เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบดา-ไซโคลเดกซ์ทรินในรูปของไอโซเมอร์ที่บริสุทธิ์ ที่มีหมู่แทนที่ที่ secondary hydroxyls ต่างๆ กัน
2. เพื่อเตรียมแคปิลารีคอลัมน์สำหรับการวิเคราะห์อิแนนทิโอเมอร์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างหมู่แทนที่ชนิดต่างๆ กับความสามารถในการแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ของอนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทรินที่เตรียมได้

ระเบียบวิธีวิจัย :

1. สังเคราะห์อนุพันธ์ของเบดา-ไซโคลเดกซ์ทรินในรูปของไอโซเมอร์ที่บริสุทธิ์ ที่มีหมู่แทนที่ที่ primary hydroxyls เป็น *tert*-butyldimethylsilyl แต่มีหมู่แทนที่ที่ secondary hydroxyls เป็น methyl, acetyl, และ *tert*-butyldimethylsilyl และพิสูจน์ทราบโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ที่สังเคราะห์ได้
2. เตรียมแคปิลารีคอลัมน์ที่มีอนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทรินที่สังเคราะห์ได้เป็นเฟสคงที่
3. ทำการแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันต่างๆ กัน และ/หรือ ขนาดต่างๆ กัน ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี โดยใช้แคปิลารีคอลัมน์ที่เตรียมได้
4. ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างหมู่แทนที่ชนิดต่างๆ ของเบดา-ไซโคลเดกซ์ทริน กับความสามารถในการแยกอิแนนทิโอเมอร์ชนิดต่างๆ

ผลการทดลอง :

เตรียมอนุพันธ์ของเบดา-ไซโคลเดกซ์ทรินในรูปของไอโซเมอร์ที่บริสุทธิ์ 3 ชนิด ได้แก่

1. heptakis(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltoheptaose (CD-2)
2. heptakis(2,3-di-*O*-acetyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltoheptaose (CD-3)
3. heptakis(2-*O*-methyl-3,6-di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltoheptaose (CD-5)

และนำไปผสมกับ polysiloxane OV-1701 ก่อนนำไปเคลือบบนผนังแคปิลารีคอลัมน์ เพื่อใช้เป็นเฟสคงที่สำหรับการแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าคอลัมน์ทั้งสามมีประสิทธิภาพดี สามารถใช้งานได้ในช่วงอุณหภูมิ 40-240 °C ยกเว้นคอลัมน์ CD-5 ที่มีช่วงอุณหภูมิใช้งานแคบกว่า (~160-240 °C) อีกทั้งยังไม่สามารถแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ใดที่นำมาทดสอบได้ ส่วนคอลัมน์ CD-2 และ CD-3 สามารถแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ของสารหลายประเภท เช่น คีโทน เอสเทอร์ เอมีน เอมีด อีพอกไซด์ แอลกอฮอล์ เป็นต้น

สรุปผลการทดลอง :

ในการเตรียมอนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทรินเพื่อใช้แยกคู่อิแนนทิโอเมอร์นั้น พบว่าทั้งขนาดของไซโคลเดกซ์ทริน ขนาดและความมีขั้วของหมู่แทนที่ รวมทั้งตำแหน่งของหมู่แทนที่ มีผลต่อการแยกของคู่อิแนนทิโอเมอร์อย่างมาก อนุพันธ์ของเบตา-ไซโคลเดกซ์ทรินทั้งสามชนิดที่เตรียมได้ (CD-2, CD-3, และ CD-5) มีหมู่แทนที่ที่ primary hydroxyls เหมือนกันคือหมู่ *tert*-butyldimethylsilyl แต่มีหมู่แทนที่ที่ secondary hydroxyls แตกต่างกันทั้งขนาดและความมีขั้ว อนุพันธ์ทั้งสามชนิดแสดงความสามารถในการแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์แตกต่างกัน โดยที่ CD-2 ซึ่งมีหมู่แทนที่ที่ secondary hydroxyls เป็น methyl ซึ่งมีขนาดเล็กและมีขั้วน้อย สามารถใช้แยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ได้หลากหลายชนิด อีกทั้งให้พีกที่ค่อนข้างสมมาตร ส่วน CD-3 ซึ่งมีหมู่แทนที่ที่ secondary hydroxyls เป็น acetyl ซึ่งมีขั้วมากขึ้น สามารถใช้แยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ได้ดี แต่ไม่เหมาะกับสารที่มีขั้ว เช่น เอมีน แอลกอฮอล์ ส่วน CD-5 ซึ่งมีหมู่แทนที่ที่ secondary hydroxyls เป็น *tert*-butyldimethylsilyl ซึ่งมีขนาดใหญ่ พบว่าไม่เหมาะที่จะใช้เป็นเฟสคงที่สำหรับแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี เนื่องจากหมู่แทนที่ขนาดใหญ่ที่บริเวณปากโพรงด้านกว้างของเบตา-ไซโคลเดกซ์ทริน จะกีดขวางไม่ให้สารเข้าไปเกิดแรงกระทำกับไซโคลเดกซ์ทรินและไม่เกิดการแยก

เนื้อหางานวิจัย

บทนำ

Chirality นับเป็นสาขาหนึ่งที่มีความสำคัญและได้รับความสนใจมากในปัจจุบัน เนื่องจากสารอินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับมนุษย์หลายชนิดเป็นโมเลกุลอสมมาตร (asymmetric molecules) หรืออิแนนทิโอเมอร์ (enantiomer) แม้ว่าคู่อิแนนทิโอเมอร์จะมีองค์ประกอบทางเคมีเหมือนกัน แต่สมบัติทางชีวภาพรวมไปถึงความเป็นพิษ อาจแตกต่างกันมาก เท่าที่ผ่านมาพบว่ายาและสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดทั้งที่เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติและสารสังเคราะห์ ตลอดจนสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารดังกล่าวอยู่ในรูปของอิแนนทิโอเมอร์ และคู่อิแนนทิโอเมอร์ของสารเหล่านั้นหลายชนิดให้ฤทธิ์แตกต่างกัน เช่น ในการศึกษาเกี่ยวกับสารเคมีเพื่อการเกษตร ได้มีการใช้สารประเภท 2-aryloxypropanoic acids เป็นสารควบคุมการเจริญของพืช (plant growth regulators) พบว่าเฉพาะ *R*-isomer เท่านั้นที่แสดงฤทธิ์ในการควบคุมวัชพืช แต่ *S*-isomer จะไม่แสดงฤทธิ์นี้ [1] ส่วนในทางชีววิทยาและเภสัชวิทยา มีรายงานถึงเหตุร้ายแรงที่เกิดขึ้นในอดีต เมื่อหญิงตั้งครรภ์ใช้ racemic thalidomide เป็นยานอนหลับและระงับประสาท ส่งผลให้ทารกแรกเกิดมีรูปร่างไม่สมประกอบ ภายหลังจึงพบว่า (*S*)-(-)-thalidomide ไม่มีฤทธิ์เป็นยานอนหลับเลย แต่มีผลให้พัฒนาการของเด็กในครรภ์ผิดปกติอย่างรุนแรง [2] เป็นต้น ปัจจุบันหน่วยงานทางด้านสาธารณสุขได้ตระหนักถึงความสำคัญของ chirality จึงพยายามผลักดันให้มีการใช้ยาในรูปของอิแนนทิโอเมอร์ที่บริสุทธิ์ ดังนั้นการสังเคราะห์ที่ให้ผลิตภัณฑ์เป็นอิแนนทิโอเมอร์บริสุทธิ์ที่ต้องการเพียงตัวเดียว รวมไปถึงการวิเคราะห์สารผสมของอิแนนทิโอเมอร์ทั้งสอง จึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง [3-5]

เนื่องจากอิแนนทิโอเมอร์มีสมบัติทางกายภาพและทางเคมีเหมือนกัน จึงเป็นการยากที่จะแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ออกจากกัน ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา นักวิจัยได้พัฒนาเทคนิคทางโครมาโทกราฟีและอิเลคโทรโฟรีซิสที่ใช้เฟสคงที่ (stationary phase) หรือเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือตัวคัดเลือก (selector) ที่มีสมบัติไครัลเพื่อใช้แยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ [5] แก๊สโครมาโทกราฟีเป็นเทคนิคหนึ่งที่ง่าย สะดวก แม่นยำ และตรวจวัดสารปริมาณน้อยได้ดี จึงเหมาะที่จะใช้แยกอิแนนทิโอเมอร์อินทรีย์ที่มีมวลโมเลกุลต่ำ ระเหยได้ดี และไม่สลายตัวเมื่อได้รับความร้อน การแยกอิแนนทิโอเมอร์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีสามารถทำได้ 2 วิธี วิธีแรกโดยการทำปฏิกิริยาเพื่อเปลี่ยนอิแนนทิโอเมอร์ไปเป็นไดแอสเทอริโอเมอร์ (diastereomer) ด้วย enantiomerically pure derivatizing reagent ก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ด้วยเฟสคงที่ชนิดธรรมดาหรือ non-chiral แต่วิธีนี้จะต้องใช้ optically reagent ที่มีความบริสุทธิ์สูง ซึ่งมักมีราคาแพง นอกจากนี้อาจมีข้อผิดพลาดจากการที่อิแนนทิโอเมอร์แต่ละตัวมีอัตราการเกิดปฏิกิริยาต่างกัน อีกวิธีหนึ่งเป็นการวิเคราะห์อิแนนทิโอเมอร์โดยตรงโดยใช้เฟสคงที่ที่มีสมบัติไครัล โดยอาศัยสมบัติการเกิดสารเชิงซ้อนระหว่างเฟสคงที่และอิแนนทิโอเมอร์ที่ต้องการวิเคราะห์อย่างรวดเร็วและผันกลับได้

งานวิจัยเกี่ยวกับการแยกอิแนนทิโอเมอร์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี จึงเน้นที่การสังเคราะห์เฟสคงที่ที่มีสมบัติไครัล (chiral stationary phase) ที่ใช้แยกอิแนนทิโอเมอร์ได้หลายประเภท และมีความสามารถในการแยกสูง นักวิจัยพบว่าเฟสคงที่หลายชนิดที่เตรียมได้ มีความสามารถในการแยกอิแนนทิโอเมอร์ต่างกันมาก แม้ว่าจะมีโครงสร้างหรือหมู่แทนที่ต่างกันเพียงเล็กน้อย [6,7] ความรู้เกี่ยวกับความสัมพันธ์

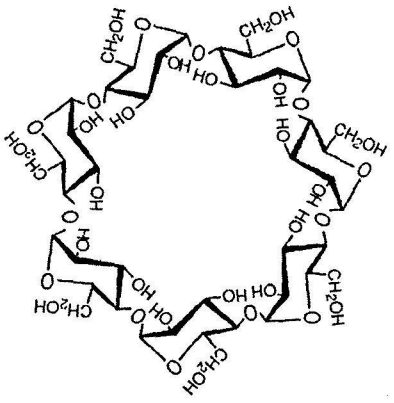
ระหว่างโครงสร้างของเฟสคงที่และความสามารถในการแยกอิแนนทิโอเมอร์จึงจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับงานวิจัยในสาขานี้ เพื่อที่จะพัฒนาเฟสคงที่สำหรับการแยกอิแนนทิโอเมอร์ให้มีสมบัติดีขึ้นต่อไป

การใช้เฟสคงที่ที่มีสมบัติไครัลเพื่อแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี มีที่มาจากงานวิจัยของ Gil-Av และคณะ [8] ในช่วงปี 1966 โดยใช้ trifluoroacetyl-L-isoleucine lauryl ester เป็นเฟสคงที่ และแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ของ *N*-trifluoroacetyl-α-amino acid esters การแยกด้วยเฟสคงที่ชนิดนี้เชื่อว่าเกิดจากความแตกต่างของพันธะไฮโดรเจนระหว่างคู่อิแนนทิโอเมอร์กับเฟสคงที่ อย่างไรก็ตาม ประสิทธิภาพและความเสถียรของเฟสคงที่ต่ออุณหภูมิยังค่อนข้างจำกัด จึงได้มีการพัฒนา chiral polysiloxane ขึ้น โดย Frank และคณะ [9] ได้เตรียม L-valine-*tert*-butylamide ในรูปของพอลิเมอร์ ที่รู้จักกันในชื่อว่า Chirasil-Val ส่วน König และคณะ [10] เตรียม XE-60-L-valine-(*S*)- หรือ (*R*)-α-phenylethylamide ในรูปของพอลิเมอร์ ซึ่งเฟสคงที่ที่เป็นพอลิเมอร์นี้มีความเสถียรต่ออุณหภูมิและประสิทธิภาพสูงขึ้น และใช้ในการแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ของอนุพันธ์ของกรดอะมิโนได้ดี

ต่อมา Schurig [11,12] ได้เตรียมเฟสคงที่ชนิดใหม่ที่มีส่วนผสมของ สารประกอบของโลหะทรานซิชันที่มีสมบัติไครัล (chiral transition metal complexes) เช่น dicarbonylrhodium(I)-3-trifluoroacetyl-(1*R*)-camphorate โลหะทรานซิชันอื่น ๆ เช่น Ni(II), Co(II) หรือ Mn(II) สามารถเตรียมเป็นสารประกอบที่มีสมบัติไครัลสำหรับการแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ได้เช่นเดียวกัน แม้ว่าเฟสคงที่ชนิดนี้สามารถแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ได้หลายประเภท เช่น วงแหวนอีเทอร์ (cyclic ethers) อัลดีไฮด์ คีโทน และแอลกอฮอล์ เป็นต้น แต่มีข้อจำกัดเรื่องความเสถียรต่ออุณหภูมิ จึงต้องทำการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิต่ำ (25-120 °C) ซึ่งส่งผลให้ใช้เวลานานในการวิเคราะห์

สารชนิดอื่นที่นำมาใช้เป็นเฟสคงที่ที่มีสมบัติไครัลสำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี มักเป็นอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรตชนิดสายตรงหรือชนิดวงแหวน ได้แก่ amylose [13], cellulose [14], oligosaccharides [15] และไซโคลเดกซ์ทริน (cyclodextrins) [7,16] ในจำนวนนี้อนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทรินได้รับความนิยมมากที่สุดในช่วงทศวรรษที่ผ่านมา

ไซโคลเดกซ์ทริน (cyclodextrin) เป็นอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรตที่เป็นวงแหวน ประกอบด้วย D-กลูโคส 6-8 หน่วย นิยมเรียก แอลฟา-, เบตา-, และแกมมา-ไซโคลเดกซ์ทริน ตามจำนวนของหน่วยกลูโคส 6, 7, และ 8 หน่วย ตามลำดับ (รูปที่ 1) ไซโคลเดกซ์ทรินมีลักษณะคล้ายถ้วยหรือโดนัท รอบนอกของโมเลกุลมีสมบัติไฮโดรฟิลิก ส่วนภายในโมเลกุลมีสมบัติไฮโดรโฟบิก จึงทำให้ไซโคลเดกซ์ทรินเกิดสารประกอบกับโมเลกุลอื่นได้หลายประเภท [17,18] และเนื่องจากโมเลกุลของไซโคลเดกซ์ทรินมีสมบัติไครัล จึงสามารถใช้ไซโคลเดกซ์ทรินในการแยกไอโซเมอร์และอิแนนทิโอเมอร์ต่างๆ ออกจากกันได้ [16,19]



รูปที่ 1 โครงสร้างของเบตา-ไซโคลเดกซ์ทริน ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 7 หน่วยต่อกันเป็นวง

ในปี 1982 Smolková และคณะ [20] ได้ศึกษาสมบัติของไซโคลเดกซ์ทรินในการใช้เป็นเฟสคงที่ชนิดของแข็ง (solid stationary phase) สำหรับการวิเคราะห์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟีเป็นครั้งแรก โดยละลายแอลฟา- หรือ เบตา-ไซโคลเดกซ์ทรินใน dimethylformamide แล้วนำไปเคลือบบน solid support และใช้กับแพคคอลัมน์ (packed column) เพื่อแยกสารประกอบที่มีสูตรโครงสร้างหรือการจัดวางตัวในสามมิติต่างกัน ส่วนการใช้ไซโคลเดกซ์ทรินเป็นเฟสคงที่ชนิดของเหลว (liquid stationary phase) นั้น มีรายงานครั้งแรกในปี 1983 โดย Koscielski, Sybilska, และ Jurczak [21] ใช้แอลฟา- หรือ เบตา-ไซโคลเดกซ์ทรินกับแพคคอลัมน์ เพื่อแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ของ α- และ β-pinene แม้ว่าจะแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ออกจากกันได้ แต่ประสิทธิภาพของคอลัมน์นี้ต่ำมาก จึงนำไปสู่การเตรียมอนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทรินที่เป็นของเหลวที่สามารถใช้ได้กับแคปิลารีคอลัมน์ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่า

เนื่องจากไซโคลเดกซ์ทรินประกอบด้วยหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyls) ทั้งชนิด primary และ secondary เป็นจำนวนมาก ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาเกิดเป็นอนุพันธ์ได้หลายชนิด อีกทั้งความว่องไวต่อปฏิกิริยา (reactivity) ของหมู่ไฮดรอกซิลทั้งสองชนิดแตกต่างกัน จึงสามารถเตรียมอนุพันธ์ที่มีหมู่แทนที่ที่ primary และ secondary hydroxyls ต่างกันได้ และมีรายงานถึงการเตรียมอนุพันธ์ที่มีหมู่แทนที่เป็น alkyl, acyl, deoxy and halogeno-, nitrogen containing, และ silyl เป็นต้น [22]

König และคณะ [7, 23] รายงานถึงการใช้หมู่แทนที่ที่เป็นโซ่อัลคิลสายยาว เช่น pentyl เพื่อเตรียมอนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทรินที่เป็นของเหลว พบว่า perpentyl α- และ β-cyclodextrins สามารถใช้เตรียมแคปิลารีคอลัมน์ได้ และใช้งานได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 200 °C นอกจากนี้ยังเลือกแทนที่ไฮดรอกซิลที่ตำแหน่ง C-2 และ C-6 ด้วยหมู่ pentyl และที่ตำแหน่ง C-3 ด้วยหมู่ acetyl ได้เป็น 2,6-di-O-pentyl-3-O-acetyl cyclodextrins ซึ่งอนุพันธ์ชนิดนี้สามารถแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ได้หลายชนิด ส่วน Armstrong และคณะ [24-26] เตรียมอนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทรินที่เป็นของเหลว ที่อยู่ในรูปของของผสมของอนุพันธ์ที่เป็นไอโซเมอร์หรือมีจำนวนหมู่แทนที่ต่าง ๆ กัน โดยเตรียมอนุพันธ์ที่มีหมู่แทนที่เป็น dipentyl, trifluoroacetyl dipentyl, และ methyl 2-hydroxypropyl และพบว่าความสามารถในการแยกของเฟสคงที่ขึ้นกับชนิดของหมู่แทนที่และจำนวนหมู่แทนที่ (degree of substitution) อย่างไรก็ตาม การเตรียมอนุพันธ์ในรูปของของผสมนี้ จะทำซ้ำได้ยาก และการศึกษาค่า thermodynamic parameters จะเป็นค่าเฉลี่ยของอนุพันธ์ทั้งหมดที่เป็นองค์ประกอบ

Schurig และ Nowotny [27] เสนอแนวทางใหม่ในการใช้อนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทรินที่เป็นของแข็งในการเตรียมเฟสคงที่ชนิดของเหลว โดยผสมอนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทรินกับ siloxane polymer ก่อนนำไปเตรียมเป็นคอลัมน์ รวมถึงการสังเคราะห์เฟสคงที่ที่มีอนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทรินเชื่อมติดกับ polysiloxane [28-30] แนวทางนี้สามารถขยายช่วงอุณหภูมิที่ใช้งานของคอลัมน์ได้ถึงอุณหภูมิที่ต่ำกว่าจุดหลอมเหลวของอนุพันธ์ อย่างไรก็ตาม อนุพันธ์ชนิดนี้จะมีความสามารถในการแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ต่ำกว่าอนุพันธ์ที่เป็นของเหลว เนื่องจากถูกเจือจางในพอลิเมอร์

จากการศึกษาความสามารถในการแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ของอนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทรินในช่วงหลายปีที่ผ่านมา พบว่าความสามารถในการแยก (enantioselectivity) ขึ้นกับขนาดของไซโคลเดกซ์ทรินรวมทั้งชนิดและตำแหน่งของหมู่แทนที่บนไซโคลเดกซ์ทริน หมู่แทนที่ที่นิยมใช้กัน ได้แก่ alkyl [27,31], acyl [32-34] และ silyl [35-36] แม้ว่าตำแหน่งไครัลของไซโคลเดกซ์ทรินจะอยู่ที่ C-2 และ C-3 (secondary hydroxyls) แต่นักวิจัยพบว่าการเปลี่ยนชนิดของหมู่แทนที่ที่ C-6 (primary hydroxyls) จะส่งผลต่อความสามารถในการแยกเช่นกัน [37-38]

ในโครงการวิจัยนี้ จะสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบตา-ไซโคลเดกซ์ทรินในรูปของไอโซเมอร์ที่บริสุทธิ์จำนวน 2-3 ชนิด โดยมีหมู่แทนที่ที่ primary hydroxyls เหมือนกัน แต่มีหมู่แทนที่ที่ secondary hydroxyls ต่างกัน โดยจะเลือกใช้หมู่ *tert*-butyldimethylsilyl เป็นหมู่แทนที่ที่ primary hydroxyls เนื่องจากมีรายงานถึงความสามารถในการแยกที่สูงกว่าหมู่แทนที่ชนิดอื่น [38] จากนั้นนำอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้เตรียมเป็นเฟสคงที่ในแคปิลารีคอลัมน์ สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี ทำการศึกษาและเปรียบเทียบความสามารถในการแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ชนิดต่างๆ เพื่อเป็นแนวทางในการออกแบบอนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทรินที่มีสมบัติดีขึ้นต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบตา-ไซโคลเดกซ์ทรินในรูปของไอโซเมอร์ที่บริสุทธิ์ ที่มีหมู่แทนที่ที่ secondary hydroxyls ต่างๆ กัน
2. เพื่อเตรียมแคปิลารีคอลัมน์สำหรับการวิเคราะห์อิแนนทิโอเมอร์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างหมู่แทนที่ชนิดต่างๆ กับความสามารถในการแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ของอนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทรินที่เตรียมได้

ขอบเขตของการวิจัย

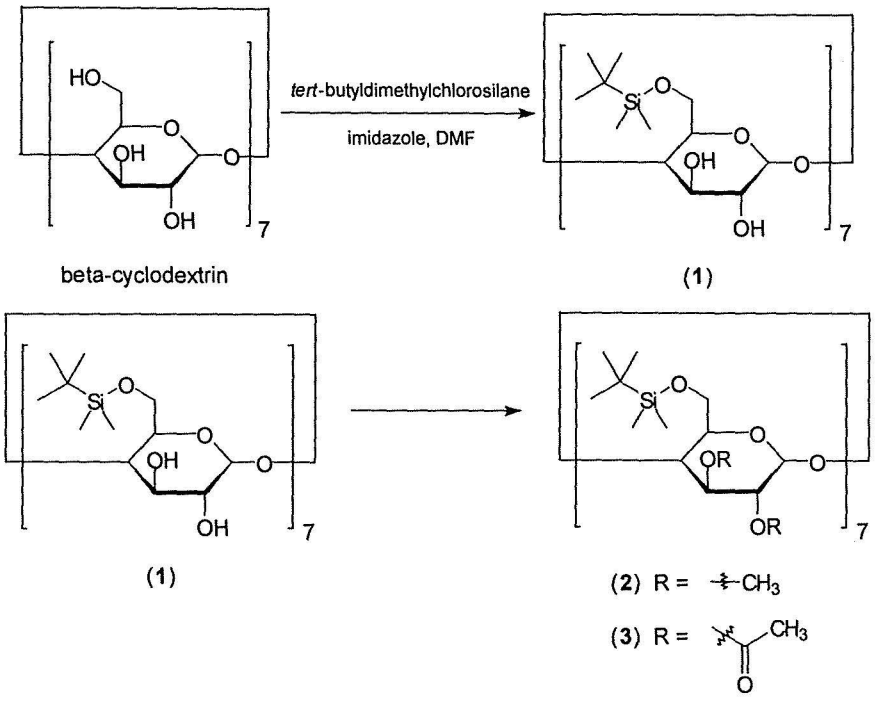
โครงการวิจัยนี้ จะสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบตา-ไซโคลเดกซ์ทรินในรูปของไอโซเมอร์ที่บริสุทธิ์ โดยมีหมู่แทนที่ที่ primary hydroxyls เป็นหมู่ *tert*-butyldimethylsilyl เหมือนกัน แต่มีหมู่แทนที่ที่ secondary hydroxyls ต่างกัน จำนวน 2-3 ชนิด เช่น หมู่แทนที่ขนาดเล็ก (methyl) หมู่แทนที่ที่มีความเกะกะสูง (*tert*-butyldimethylsilyl) หมู่แทนที่ที่ไม่มีขั้ว หรือหมู่แทนที่ที่มีขั้ว (acetyl) เป็นต้น จากนั้นนำอนุพันธ์ที่สังเคราะห์ได้ไปเตรียมเป็นเฟสคงที่ในแคปิลารีคอลัมน์ สำหรับการวิเคราะห์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี จะศึกษาและเปรียบเทียบความสามารถในการแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ชนิดต่าง ๆ อย่างน้อย 15 ชนิด เช่น

ไฮโดรคาร์บอน อะโรมาติค อีเทอร์ คีโทน แอลกอฮอล์ เอสเทอร์ เอมีด เอมีน กรดคาร์บอกซิลิก เป็นต้น

การทดลอง

การสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบตา-ไซโคลเดกซ์ทริน

ทำการสังเคราะห์อนุพันธ์ของเบตา-ไซโคลเดกซ์ทรินในรูปของไอโซเมอร์ที่บริสุทธิ์ โดยดัดแปลงวิธีการสังเคราะห์จากเอกสารอ้างอิง [39,40]



- heptakis(6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltoheptaose (**1**)

ละลายเบตา-ไซโคลเดกซ์ทรินที่ผ่านการอบแห้งแล้ว 1.00 g (0.88 mmol) และ imidazole (13.7 mmol) ด้วย dimethylformamide (DMF) 20 mL ในขวดก้นกลม ค่อยๆ หยดสารละลายของ *tert*-butyldimethylchlorosilane (13.8 mmol) ใน DMF ลงในสารละลายของเบตา-ไซโคลเดกซ์ทริน คนสารละลายที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง ตรวจการดำเนินไปของปฏิกิริยาด้วย TLC (chloroform-methanol-water 50:10:1) ซึ่งปรากฏจุดของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f ประมาณ 0.33-0.42 ตกตะกอนผลิตภัณฑ์ในน้ำ-น้ำแข็ง ละลายตะกอนด้วย dichloromethane และสกัดด้วย 10% HCl, $NaHCO_3$, และน้ำ dry ด้วย anhydrous Na_2SO_4 และระเหยตัวทำละลายออก ได้ของแข็งสีขาว 1.93 g ทำผลิตภัณฑ์ให้บริสุทธิ์ด้วย column chromatography (silica gel) โดยใช้ chloroform-methanol 8:1 → 1:1 เป็นตัวชะ ได้ผลิตภัณฑ์ที่บริสุทธิ์ (**1**) 0.65 g (43%) เป็นของแข็งสีขาว พิสูจน์ทราบโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ด้วย ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ 101.99 [C-1], 81.74 [C-4], 73.57, 73.40 และ 72.52 [C-2, C-3, C-5], 25.89 [$(CH_3)_3C$], 18.27 [$(CH_3)_3C$], และ -4.51, -4.62 [$(CH_3)_2Si$]

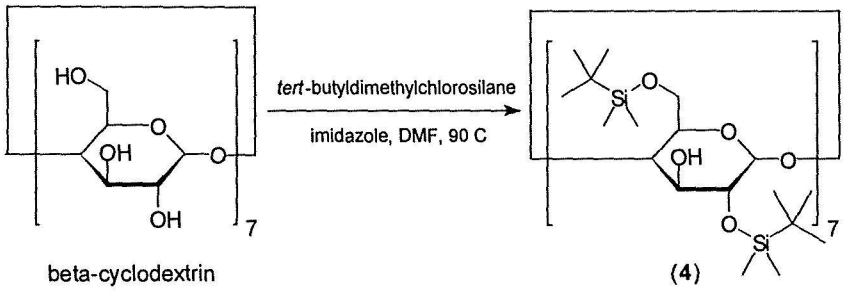
- heptakis(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltoheptaose (**2**)

ค่อยๆ หยดสารละลายของ (**1**) 0.30 g (0.15 mmol) ใน DMF ลงในขวดก้นกลมที่มี sodium hydride (7 mmol) ที่แช่ในอ่างน้ำแข็ง คนสารละลาย 1 ชั่วโมง ก่อนหยด methyl iodide (10 mmol) ลงในสารละลาย คนสารละลายต่ออีก 1-3 ชั่วโมง ตรวจการดำเนินไปของปฏิกิริยาด้วย TLC (toluene-ethanol 4:1) ซึ่งปรากฏจุดของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f ประมาณ 0.76 ตกตะกอนผลิตภัณฑ์ในน้ำ-น้ำแข็ง ละลายตะกอนด้วย dichloromethane และสกัดด้วยน้ำ เมื่อระเหยตัวทำละลายออก ได้ของแข็งสีขาว นำไปผ่าน column chromatography (dichloromethane-ethanol 100:0 → 80:20) ได้ผลิตภัณฑ์ที่บริสุทธิ์ (**2**) 0.16 g (50%) เป็นของแข็งสีขาว พิสูจน์ทราบโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ด้วย ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 5.18 [d, 7H, H-1], 3.65 และ 3.51 [2s, 2(21H), OCH_3], 0.85 [s, 63H, $(CH_3)_3C$], และ 0.00 [s, 42H, $(CH_3)_2Si$]

- heptakis(2,3-di-*O*-acetyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltoheptaose (**3**)

คนสารละลายของอนุพันธ์ (**1**) 0.30 g (0.15 mmol), acetyl chloride 3 mL และ pyridine 4 mL ที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ตรวจการดำเนินไปของปฏิกิริยาด้วย TLC (toluene-methanol 3:1) ซึ่งปรากฏจุดของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f ประมาณ 0.41 ตกตะกอนผลิตภัณฑ์ในน้ำ-น้ำแข็ง หลังผ่าน column chromatography ได้ผลิตภัณฑ์ที่บริสุทธิ์ (**3**) เป็นของแข็งสีขาว พิสูจน์ทราบโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ด้วย ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 5.12 [d, 7H, H-1], 4.66 [dd, 7H, H-2], 2.06, 2.02 [2s, 2(21H), OAc], 0.84 [s, 63H, $(CH_3)_3C$], และ 0.01 [s, 42H, $(CH_3)_2Si$]

- heptakis(2,6-di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltoheptaose (**4**)

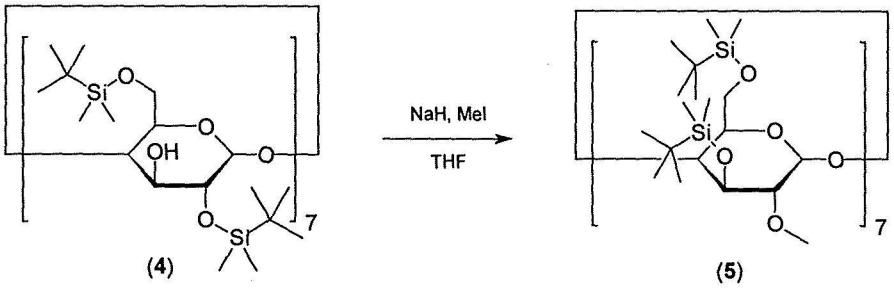


beta-cyclodextrin (**4**)

ละลายเบตา-ไซโคลเดกซ์ทรินที่ผ่านการอบแห้งแล้ว 0.50 g (0.44 mmol) และ imidazole (12 mmol) ด้วย dimethylformamide (DMF) 10 mL ในขวดก้นกลม ค่อยๆ หยดสารละลายของ *tert*-butyldimethylchlorosilane (11.5 mmol) ใน DMF ลงในสารละลายของเบตา-ไซโคลเดกซ์ทริน คนสารละลายที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจการดำเนินไปของปฏิกิริยาด้วย TLC (chloroform-hexane 3:2) ซึ่งปรากฏจุดของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f ประมาณ 0.33-0.37 ตกตะกอนผลิตภัณฑ์ในน้ำ-น้ำแข็ง หลังผ่าน column chromatography ได้ผลิตภัณฑ์ที่บริสุทธิ์ (**4**) เป็นของแข็งสีขาว พิสูจน์ทราบโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ด้วย ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 4.82 [d, 7H, H-1], 4.42 [s, 7H, OH], 0.92 และ 0.83 [2s, 2(63H), $(CH_3)_3C$], และ 0.13 และ 0.01 [2s, 2(42H), $(CH_3)_2Si$]; ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ 102.57 [C-1],

82.02 [C-4], 74.93, 72.10 และ 71.88 [C-2, C-3, C-5], 61.92 [C-6], 26.26 [2-O-Si-C($\underline{C}H_3)_3$], 25.84 [6-O-Si-C($\underline{C}H_3)_3$], 18.85 [2-O-Si-$\underline{C}(CH_3)_3$], 18.27 [6-O-Si-$\underline{C}(CH_3)_3$], -4.53, -4.65 [2-O-Si$(CH_3)_2$], และ -5.06, -5.26 [6-O-Si$(CH_3)_2$]

- heptakis(2-O-methyl-3,6-di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltoheptaose (**5**)



(4) (5)

คนสารละลายของอนุพันธ์ (**4**) 0.30 g (0.11 mmol) และ sodium hydride (3 mmol) ใน tetrahydrofuran (THF) ที่แช่ในอ่างน้ำแข็งประมาณ 1 ชั่วโมง ก่อนหยด methyl iodide (5 mmol) ลงในสารละลายอย่างช้าๆ คนสารละลายต่อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 2 วัน ตรวจการดำเนินไปของปฏิกิริยาด้วย TLC (hexane-toluene 1:8) ซึ่งปรากฏจุดของสารผลิตภัณฑ์ที่ค่า R_f ประมาณ 0.93 แช่สารละลายในอ่างน้ำแข็ง ก่อนเติม methanol ทีละหยดอย่างช้าๆ เพื่อกำจัด sodium hydride ที่มากเกินพอ จากนั้นระเหยตัวทำละลายออก ละลายของแข็งที่เหลือในของผสมน้ำ-hexane dry ชั้น hexane ด้วย anhydrous Na_2SO_4 และระเหยตัวทำละลายออก หลังผ่าน column chromatography ได้ผลิตภัณฑ์ที่บริสุทธิ์ (**5**) เป็นของแข็งสีขาว พิสูจน์ทราบโครงสร้างของผลิตภัณฑ์ด้วย ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 5.25 [d, 7H, H-1], 3.33 [s, 21H, 2-O-CH_3], 3.03 [dd, 7H, H-2], 0.87 [s, 2(63H), 3-O-Si-C$(CH_3)_3$, 6-O-Si-C$(CH_3)_3$], 0.07, 0.09 [2s, 42H, 3-O-Si$(CH_3)_2$], และ 0.03 [s, 42H, 6-O-Si$(CH_3)_2$] ^{13}C-NMR ($CDCl_3$): δ 96.16 [C-1], 81.12 [C-2], 78.05 [C-4], 73.07 [C-3], 72.15 [C-5], 62.83 [C-6], 57.29 [2-O-CH_3], 26.29, 26.00 [3-O-Si-C($\underline{C}H_3)_3$, 6-O-Si-C($\underline{C}H_3)_3$], 18.38, 18.29 [3-O-Si-$\underline{C}(CH_3)_3$, 6-O-Si-$\underline{C}(CH_3)_3$], และ -3.77, -3.84, -4.74, -5.07 [3-O-Si$(CH_3)_2$, 6-O-Si$(CH_3)_2$]

การเคลือบแคปิลารีคอลัมน์

ทำการเคลือบแคปิลารีคอลัมน์ความยาวประมาณ 30 m ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 mm ด้วยวิธี static [41] โดยใช้สารละลายของเฟสคงที่ ใน dichloromethane เข้มข้น 0.4% w/v บรรจุลงในคอลัมน์ (ซึ่งเฟสคงที่จะเป็นของผสมระหว่างอนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทรินกับ polysiloxane OV-1701 โดยเตรียมให้ทุกคอลัมน์มีความเข้มข้นของอนุพันธ์ไซโคลเดกซ์ทรินในพอลิเมอร์เท่ากัน คือ 0.12 Molar) ทำการระเหยตัวทำละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เมื่อระเหยตัวทำละลายหมดแล้วจะได้เฟสคงที่หนา 0.25 μm เคลือบที่ผนังด้านในของคอลัมน์

การทดสอบสมบัติของแคปิลารีคอลัมน์

ทำการ condition คอลัมน์ที่เตรียมได้ก่อนใช้งาน ที่อุณหภูมิ 180-200 °C จนกระทั่ง baseline คงที่ จากนั้นจึงทดสอบสมบัติของแคปิลารีคอลัมน์ที่เตรียมได้ด้วย Grob mixture [42,43] โดยใช้ไฮโดรเจนเป็นแก๊สพา ที่อัตราเร็ว 50 cm/s (ปรับที่อุณหภูมิ 40 °C) ใช้ split injector ที่มีค่า split ratio เป็น 1:100 อุณหภูมิของ injector และ flame ionization detector เป็น 250 °C และใช้ *n*-alkanes ทดสอบประสิทธิภาพทุกครั้งก่อนการใช้งาน

การวิเคราะห์อิแนนทิโอเมอร์

ทำการทดสอบคอลัมน์ CD-2, CD-3 และ CD-5 (ที่เตรียมจากอนุพันธ์ (**2**), (**3**) และ (**5**) ตามลำดับ) ในการแยกอิแนนทิโอเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิคงที่ โดยเปรียบเทียบค่า retention factor หรือ capacity factor (k′) และ selectivity (α) ของการแยก

ผลการทดลอง

การทดสอบสมบัติของแคปิลารีคอลัมน์

Grob Test เป็นวิธีทดสอบแคปิลารีคอลัมน์ที่ให้ข้อมูลเกี่ยวกับ inertness, สมบัติความเป็นกรด/เบส, และประสิทธิภาพของคอลัมน์ โดยที่ Grob mixture ประกอบด้วยสาร 12 ชนิด ผสมกันในอัตราส่วนที่ให้พื้นที่ใต้พีกของสารแต่ละชนิดใกล้เคียงกันเมื่อใช้ FID เป็น detector สารทั้ง 12 ชนิด (พร้อมชื่อย่อ) ได้แก่

C10	decane	ol	1-octanol
C11	undecane	D	2,3-butanediol
E10	methyl decanoate	P	2,6-dimethylphenol
E11	methyl undecanoate	A	2,6-dimethylaniline
E12	methyl dodecanoate	S	2-ethylhexanoic acid
al	1-nonanal	am	dicyclohexylamine

สาร ol, D, และ al ใช้ทดสอบสมบัติ inertness ของคอลัมน์ โดยลักษณะของพีกที่ได้และพื้นที่ใต้พีกจะบอกว่าสารเหล่านี้สามารถเกิด adsorption กับคอลัมน์หรือเฟสคงที่ได้หรือไม่ ความเป็นกรด/เบสของคอลัมน์จะดูจากพีกของคู่กรด/เบสอ่อน (P และ A) และคู่กรด/เบสแก่ (S และ am) ส่วนประสิทธิภาพของคอลัมน์ที่เตรียมได้จะคำนวณจากค่า Trennzahl (TZ) เฉลี่ยระหว่างคู่พีก E10-E11 และ E11-E12 โดยที่

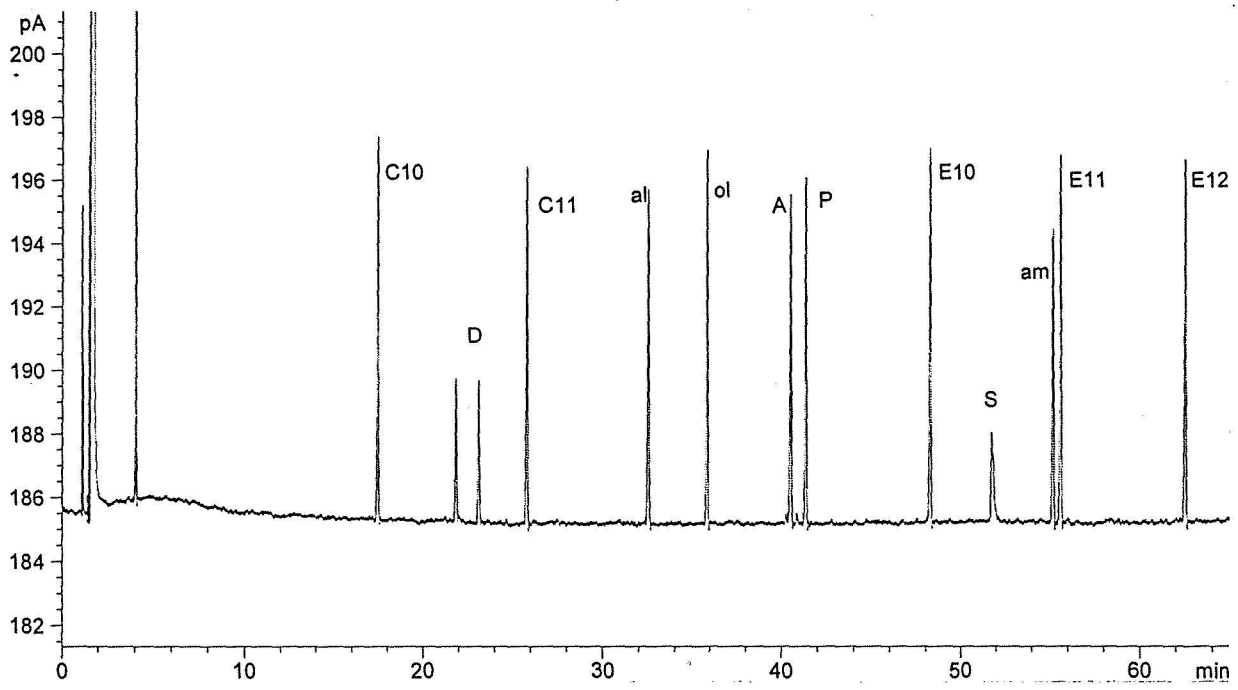
$$TZ = \left[\frac{t_{R,2} - t_{R,1}}{w_{h,1} + w_{h,2}}\right] - 1$$

t_R = retention time

w_h = peak width at half height

คอลัมน์ CD-2

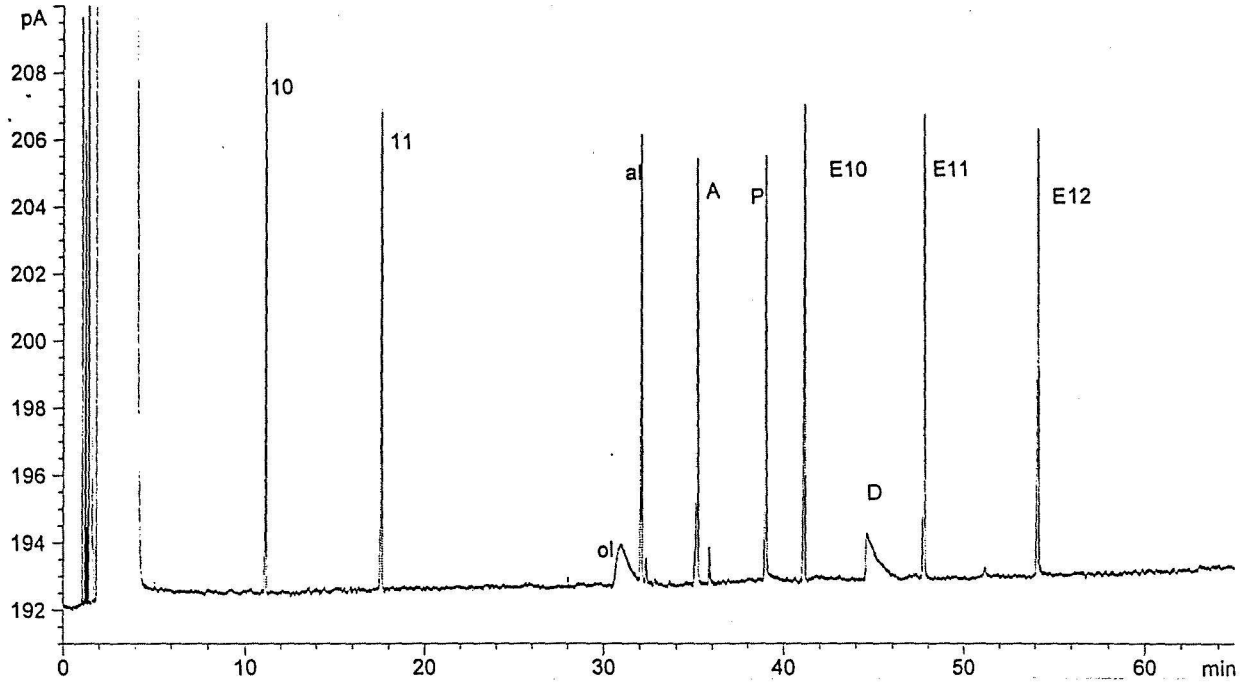
เฟสคงที่ในคอลัมน์ CD-2 ประกอบด้วย อนุพันธ์ (**2**) 25.5% ในpolysiloxane OV-1701 (คิดเป็นความเข้มข้น 0.12 M) เมื่อทดสอบคอลัมน์ที่เตรียมได้ด้วย Grob test (รูปที่ 2) พบว่าคอลัมน์ที่เตรียมได้มีประสิทธิภาพดี (ค่า TZ 43.7) พีกของสาร ol, al, และ am ไม่มีลักษณะ tailing และมีพื้นที่ใต้พีกเกือบจะใกล้เคียงกับพีกของแอลเคนหรือเอสเทอร์ แสดงว่าคอลัมน์นี้สามารถใช้วิเคราะห์สารได้หลายประเภท นอกจากนี้ยังสามารถแยกไอโซเมอร์และอิแนนทิโอเมอร์ของสาร D (อย่างสมบูรณ์) และ S (ยังไม่สมบูรณ์) ได้ด้วย



รูปที่ 2 โครมาโทแกรมของ Grob mixture ที่ได้จากคอลัมน์ CD-2 ยาว 31.80 m เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 mm เคลือบด้วยอนุพันธ์ (**2**) 25.5% ในpolysiloxane OV-1701 เป็นเฟสคงที่ หนา 0.25 μm condition: temperature program จาก 40 ถึง 160 °C ด้วยอัตรา 1.57 °C/min

<u>คอลัมน์ CD-3</u> :

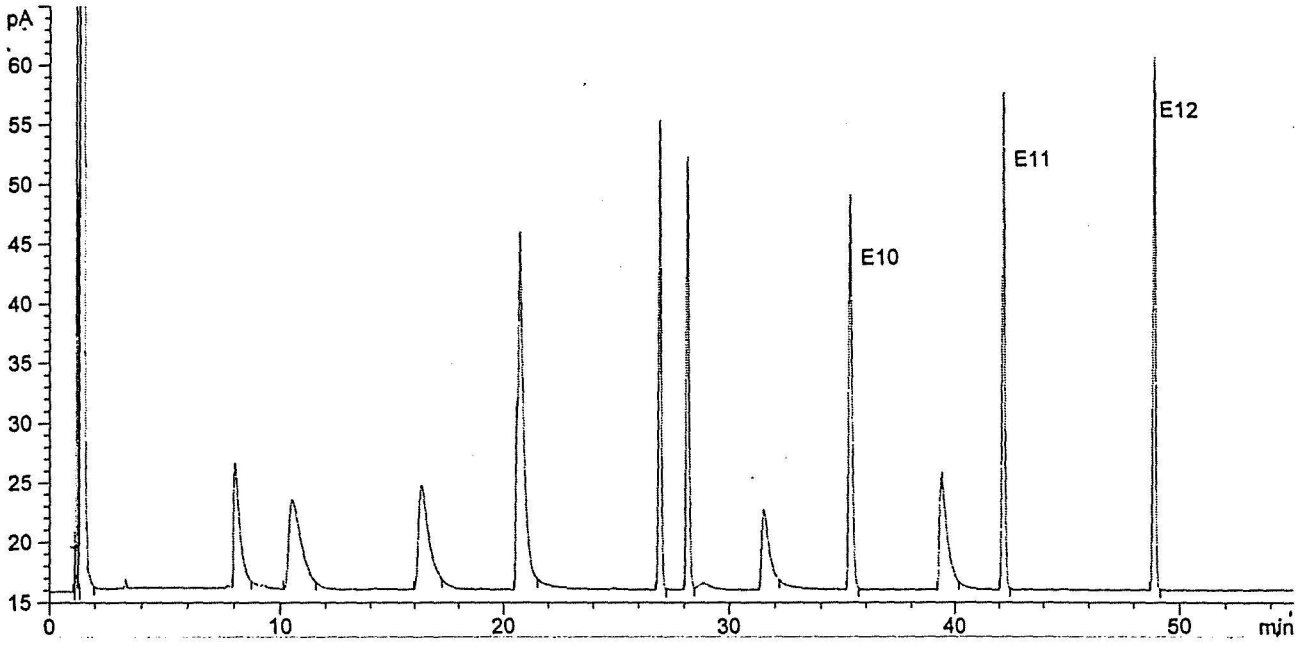
เฟสคงที่ในคอลัมน์ CD-3 ประกอบด้วย อนุพันธ์ (3) 30.3% ในpolysiloxane OV-1701 (คิดเป็นความเข้มข้น 0.12 M) เมื่อทดสอบคอลัมน์ที่เตรียมได้ด้วย Grob test (รูปที่ 3) พบว่าคอลัมน์ที่เตรียมได้มีประสิทธิภาพดี (ค่า TZ 38.6) แต่พีกของแอลกอฮอล์ ol และ D มีลักษณะ tailing อีกทั้งไม่ปรากฏพีกของกรดแก่ S และเบสแก่ am แสดงว่าคอลัมน์นี้ไม่เหมาะที่จะใช้วิเคราะห์สารกลุ่มแอลกอฮอล์, กรด และเอมีน เนื่องจากสารกลุ่มนี้เกิด adsorption กับเฟสคงที่ชนิดนี้ จึงไม่ปรากฏพีกหรือให้พีกที่ tailing



รูปที่ 3 โครมาโทแกรมของ Grob mixture ที่ได้จากคอลัมน์ CD-3 ยาว 30.23 m เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 mm เคลือบด้วยอนุพันธ์ (3) 30.3% ในpolysiloxane OV-1701 เป็นเฟสคงที่ หนา 0.25 μm condition: temperature program จาก 40 ถึง 160 °C ด้วยอัตรา 1.65 °C/min

<u>คอลัมน์ CD-5</u>

เฟสคงที่ในคอลัมน์ CD-5 ประกอบด้วย อนุพันธ์ (**5**) 34.0% ในpolysiloxane OV-1701 (คิดเป็นความเข้มข้น 0.12 M) เมื่อทดสอบคอลัมน์ที่เตรียมได้ด้วย Grob test (รูปที่ 4) พบว่าคอลัมน์ที่เตรียมได้มีประสิทธิภาพค่อนข้างดี (ค่า TZ 32.6) แต่พีกส่วนใหญ่มีลักษณะอ้วนและเตี้ยกว่าที่พบในคอลัมน์ CD-2 และ CD-3 ประกอบกับผลการทดสอบประสิทธิภาพด้วย *n*-alkane ที่อุณหภูมิต่างๆ พบว่าคอลัมน์มีประสิทธิภาพดีที่อุณหภูมิสูง (N หรือจำนวนชั้นสมมุติ มีค่า > 3000 plates/m ที่อุณหภูมิสูงกว่า 200 °C) และมีประสิทธิภาพลดลงเมื่ออุณหภูมิลดลง (N < 2000 plates/m ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 160 °C) แสดงว่าเฟสคงที่ชนิดนี้มีการแข็งตัวเมื่ออุณหภูมิต่ำลง จึงมีช่วงการใช้งานแคบกว่าอีก 2 คอลัมน์

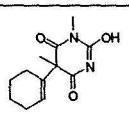
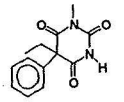
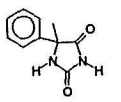
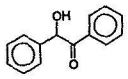
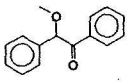
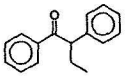
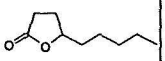
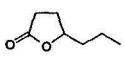
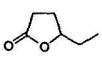
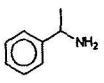


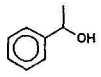
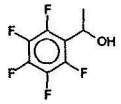
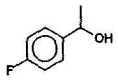
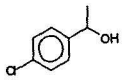
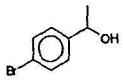
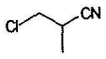
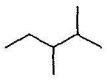
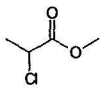
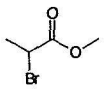
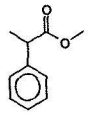
รูปที่ 4 โครมาโทแกรมของ Grob mixture ที่ได้จากคอลัมน์ CD-5 ยาว 30.24 m เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.25 mm เคลือบด้วยอนุพันธ์ (**5**) 34.0% ในpolysiloxane OV-1701 เป็นเฟสคงที่ หนา 0.25 μm condition: temperature program จาก 40 ถึง 160 °C ด้วยอัตรา 1.65 °C/min

การวิเคราะห์อิแนนทิโอเมอร์

ทำการทดสอบคอลัมน์ CD-2, CD-3 และ CD-5 ในการแยกอิแนนทิโอเมอร์ที่มีหมู่ฟังก์ชันชนิดต่างๆ ที่อุณหภูมิคงที่ โดยเปรียบเทียบค่า retention factor (k′) และ selectivity (α) ของการแยกที่อุณหภูมิเดียวกัน ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 . ค่า retention factor และ selectivity ของอิแนนทิโอเมอร์ที่วิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ CD-2, CD-3 และ CD-5

ลำดับ	สาร	อุณหภูมิ (°C)	คอลัมน์ CD-2		คอลัมน์ CD-3		คอลัมน์ CD-5	
			k_2'	α	k_2'	α	k_2'	α
1	hexobarbital 	220	4.16	1.030	4.02	1.000	2.75	1.000
2	mephobarbital 	220	4.91	1.026	4.85	1.000	3.23	1.000
3	5-methyl-5-phenylhydantoin 	220	8.14	1.014	7.66 *t*	1.000	-	-
4	benzoin 	180	12.03	1.021	a	a	-	-
5	benzoin methyl ether 	180	8.84	1.000	8.11	1.000	6.14	1.000
6	2-phenylbutyro phenone 	160	17.42	1.008	15.33	1.000	10.41	1.000
7	2-phenylcyclo heptanone	160	11.98	1.012	9.60	1.000	6.64	1.000
8	α-bromopropio phenone	160	3.78	1.044	3.12	1.006	2.03	1.000
9	4-nonanolide 	160	4.29	1.033	5.58	1.040	2.10	1.000
10	4-heptanolide 	160	1.67	1.038	2.41	1.040	-	-
11	γ-caprolactone 	160	1.06	1.032	2.15	1.136	0.54	
12	1-aminoindan	120	9.37	1.032	5.91 *t*	1.065	-	-
13	α-methylbenzyl amine 	120	2.93	1.023	2.19 *t*	1.000	1.05	1.000
14	styrene oxide	120	2.95	1.039	2.09	1.025	1.21	1.000

ลำดับ	สาร	อุณหภูมิ (°C)	คอลัมน์ CD-2		คอลัมน์ CD-3		คอลัมน์ CD-5	
			k_2'	α	k_2'	α	k_2'	α
15	1-phenylethanol 	160	1.10	1.018				
		120	6.33	1.061	3.85 *t*	1.039	1.39	1.000
16	1-(pentafluoro phenyl)ethanol 	160	0.78	1.040			-	-
		120	4.51	1.134	3.64 *t*	1.027		
17	4-fluoro-α-methylbenzyl alcohol 	160	1.29	1.012	-	-	-	-
18	1-(4-chlorophenyl) ethanol 	160	3.52	1.020	-	-	-	-
19	4-bromo-α-methylbenzyl alcohol 	160	5.77	1.018	-	-	-	-
20	1-cyclohexyl ethanol	160	0.774	1.000				
		120	4.03	1.012	1.88 *t*	1.000	1.02	1.000
21	3-chloro-2-methylpropio nitrile 	140			2.87	1.138	-	-
		50	23.27	1.007				
22	2,3-dimethyl pentane 	50	1.37	1.036	-	-	-	-
23	methyl 2-chloro propionate 	120	0.47	1.080	0.74	1.294	-	-
24	methyl 2-bromo propionate 	120	0.84	1.159	0.93	1.077	-	-
25	methyl 2-phenyl propionate 	120	5.01	1.016	3.91	1.009	-	-

หมายเหตุ k_2' retention factor of the second eluted enantiomer

t พีกมีลักษณะ tailing

a ไม่ปรากฏพีกสาร เนื่องจาก adsorption

- ไม่ได้ทำการวิเคราะห์

ค่า retention factor (k′) แสดงถึงแรงกระทำระหว่างสารแต่ละชนิดกับเฟสคงที่ หาก k′ มีค่ามาก แสดงว่ามีแรงกระทำที่แข็งแรง และสารจะใช้เวลาในคอลัมน์นาน ค่า k′ คำนวณจาก

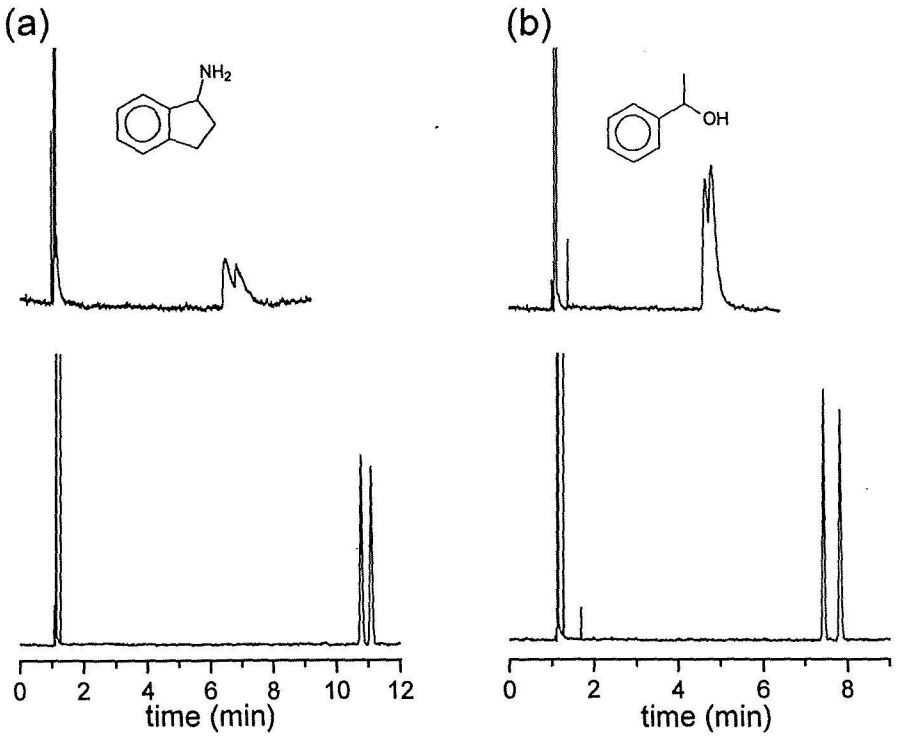
$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$ เมื่อ t_R = retention time of analyte

t_M = time of non-retained compound

ส่วนค่า selectivity (α) แสดงถึงความสามารถของเฟสคงที่ในการแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ออกจากกัน หาก α มีค่ามาก แสดงว่าคู่อิแนนทิโอเมอร์แยกจากกันได้ดี หาก α มีค่าเป็น 1 จะไม่เกิดการแยก ค่า α คำนวณจาก

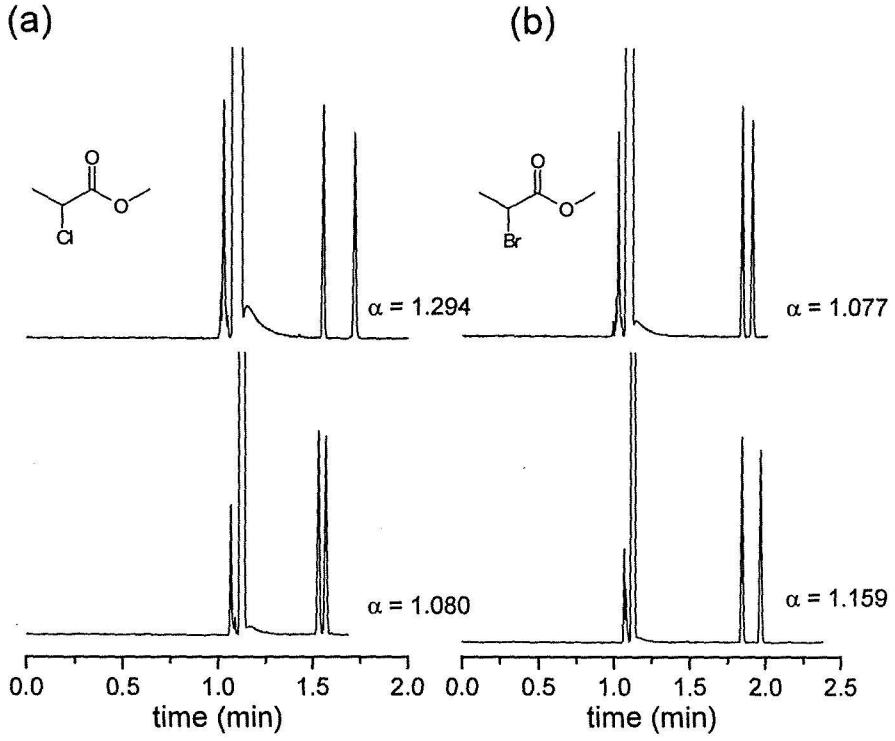
$$\alpha = \frac{t_{R,2} - t_M}{t_{R,1} - t_M} = \frac{k'_2}{k'_1}$$ เมื่อ $t_{R,2}$ มีค่า retention time มากกว่า $t_{R,1}$

ในการแยกอิแนนทิโอเมอร์ด้วยคอลัมน์ CD-2 และ CD-3 ที่มีอนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทรินเป็นเฟสคงที่ (CD-2 และ CD-3 ซึ่งมีหมู่ methyl และ acetyl เป็นหมู่แทนที่ที่ secondary hydroxyls ตามลำดับ) พบว่า ที่อุณหภูมิของการวิเคราะห์เท่ากัน สารส่วนใหญ่มีแรงกระทำกับอนุพันธ์ CD-2 และ CD-3 ใกล้เคียงกัน (ดูจากค่า k′ ที่ใกล้เคียงกัน) ยกเว้นสารในกลุ่มเอมีน (ลำดับที่ 12-13) และแอลกอฮอล์ (ลำดับที่ 15-20) ที่มีแรงกระทำกับอนุพันธ์ CD-2 แข็งแรงกว่า แต่กลับพบว่าเอมีนและแอลกอฮอล์ให้พีกที่มีลักษณะ tailing เมื่อแยกด้วยอนุพันธ์ CD-3 (รูปที่ 5) คาดว่าเป็นผลจาก adsorption ซึ่งปรากฏใน Grob test เช่นกัน



รูปที่ 5 โครมาโทแกรมของ (a) เอมีน #12 และ (b) แอลกอฮอล์ #15 ที่วิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ CD-2 (ภาพล่าง) และคอลัมน์ CD-3 (ภาพบน) ที่อุณหภูมิ120 °C

เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ของอนุพันธ์ทั้งสอง พบว่าอนุพันธ์ CD-2 สามารถแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ที่นำมาศึกษา ได้มากชนิดกว่าอนุพันธ์ CD-3 แต่เมื่อพิจารณาคู่อิแนนทิโอเมอร์ที่สามารถแยกได้ด้วยอนุพันธ์ทั้งสองชนิดแล้ว พบว่า อนุพันธ์ทั้งสองมี selectivity ของการแยกใกล้เคียงกัน ยกเว้นสารบางชนิดที่แยกได้ดีมากด้วยอนุพันธ์ CD-2 (ลำดับที่ 16 และ 24) และบางชนิดที่แยกได้ดีมากด้วยอนุพันธ์ CD-3 (ลำดับที่ 11 และ 23) (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 โครมาโทแกรมของ (a) เอสเทอร์ #23 และ (b) เอสเทอร์ #24 ที่วิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ CD-2 (ภาพล่าง) และคอลัมน์ CD-3 (ภาพบน) ที่อุณหภูมิ120 °C

ส่วนคอลัมน์ CD-5 ไม่สามารถแยกอิแนนทิโอเมอร์ที่นำมาทดสอบชนิดใดได้เลย (ค่า $\alpha = 1$) อีกทั้งไม่ได้ทำการทดสอบอิแนนทิโอเมอร์อีกหลายชนิด ทั้งนี้เนื่องจากคอลัมน์นี้สามารถใช้งานได้ดีในช่วงอุณหภูมิที่แคบกว่าคอลัมน์ CD-2 และ CD-3 (ช่วงอุณหภูมิใช้งาน ~160-240 °C) อีกทั้งค่า retention factor (k′) ที่อุณหภูมิเดียวกัน มีค่าต่ำที่สุดใน 3 คอลัมน์ แสดงถึงแรงกระทำที่อ่อนที่สุดระหว่างอนุพันธ์ CD-5 กับสารที่ทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบโครงสร้างของ CD-5 กับ CD-2 และ CD-3 พบว่า หมู่แทนที่ที่ secondary hydroxyls ของ CD-5 คือ *tert*-butyldimethylsilyl มีขนาดใหญ่และเกะกะกว่าหมู่แทนที่ของ CD-2 และ CD-3 ซึ่งเป็น methyl และ acetyl ตามลำดับ จึงอาจขัดขวางการเกิดแรงกระทำระหว่างสารที่นำมาวิเคราะห์กับอนุพันธ์ CD-5 ในบริเวณใกล้กับโพรงที่มีตำแหน่งไครัลอยู่เป็นจำนวนมาก สารส่วนใหญ่จึงมีค่า retention factor ต่ำและไม่เกิดการแยก

งานวิจัยก่อนหน้านี้ โดย Maas และคณะ [44] ซึ่งศึกษาสมบัติของอนุพันธ์ di-*O*-*tert*-butyldimethyl silyl ของ γ-cyclodextrin ในการแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี พบว่าสามารถใช้ octakis

(2,6-di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl) γ-cyclodextrin ซึ่งมีหมู่แทนที่ขนาดใหญ่ (*tert*-butyldimethylsilyl) บริเวณตำแหน่งไครัล ในการแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ได้ดีและหลากหลายชนิด แต่เมื่อเตรียมเป็นอนุพันธ์ octakis(*O*-methyl-di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl) γ-cyclodextrin พบว่า ความสามารถในการแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ลดลง และจากงานวิจัยล่าสุดโดย Beck และคณะ [45] พบว่าอนุพันธ์ของ β-cyclodextrin ที่มีหมู่ *tert*-butyl dimethylsilyl อยู่ที่บริเวณตำแหน่งไครัล ทั้งที่เป็นอนุพันธ์ heptakis(2,6-di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl) β-cyclodextrin หรือ heptakis(*O*-methyl-di-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl) β-cyclodextrin ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นเฟสคงที่สำหรับการแยกอิแนนทิโอเมอร์ด้วยแก๊สโครมาโทกราฟี ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากงานวิจัยนี้ ทั้งนี้คาดว่าเกิดจากขนาดโพรงของแกมมา-ไซโคลเดกซ์ทรินที่ใหญ่กว่าเบตา-ไซโคลเดกซ์ทริน แม้ว่าจะมีหมู่ *tert*-butyldimethylsilyl ที่มีขนาดใหญ่และเกะกะอยู่บริเวณรอบโพรง สารส่วนใหญ่ก็ยังสามารถเข้าไปเกิดแรงกระทำกับแกมมา-ไซโคลเดกซ์ทรินได้ จึงให้การแยกระหว่างคู่อิแนนทิโอเมอร์ที่ดีกว่า

สรุปผลการทดลอง

ในการเตรียมอนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทรินเพื่อใช้แยกคู่อิแนนทิโอเมอร์นั้น พบว่าทั้งขนาดของไซโคลเดกซ์ทริน ขนาดและความมีขั้วของหมู่แทนที่ รวมทั้งตำแหน่งของหมู่แทนที่ มีผลต่อการแยกของคู่อิแนนทิโอเมอร์อย่างมาก อนุพันธ์ของเบตา-ไซโคลเดกซ์ทรินทั้งสามชนิดที่เตรียมได้ (CD-2, CD-3, และ CD-5) มีหมู่แทนที่ที่ primary hydroxyls เหมือนกันคือหมู่ *tert*-butyldimethylsilyl แต่มีหมู่แทนที่ที่ secondary hydroxyls แตกต่างกันทั้งขนาดและความมีขั้ว อนุพันธ์ทั้งสามชนิดแสดงความสามารถในการแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์แตกต่างกัน โดยที่ CD-2 ซึ่งมีหมู่แทนที่ที่ secondary hydroxyls เป็น methyl ซึ่งมีขนาดเล็กและมีขั้วน้อย สามารถใช้แยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ได้หลากหลายชนิด อีกทั้งให้พีกที่ค่อนข้างสมมาตร ส่วน CD-3 ซึ่งมีหมู่แทนที่ที่ secondary hydroxyls เป็น acetyl ซึ่งมีขั้วมากขึ้น สามารถใช้แยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ได้ดี แต่ไม่เหมาะกับสารที่มีขั้ว เช่น เอมีน แอลกอฮอล์ ส่วน CD-5 ซึ่งมีหมู่แทนที่ที่ secondary hydroxyls เป็น *tert*-butyldimethylsilyl ซึ่งมีขนาดใหญ่ พบว่าไม่เหมาะที่จะใช้เป็นเฟสคงที่สำหรับแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี เนื่องจากหมู่แทนที่ขนาดใหญ่ที่บริเวณปากโพรงด้านกว้างของเบตา-ไซโคลเดกซ์ทริน จะกีดขวางไม่ให้สารเข้าไปเกิดแรงกระทำกับไซโคลเดกซ์ทรินและไม่เกิดการแยก

เอกสารอ้างอิง

1. N. Kurihara and J. Miyamoto, *Chirality in Agrochemicals*, John Wiley & Sons, 1998.
2. S. Allenmark, *Chromatographic Enantioseparation: Methods and Applications*, second edition, Ellis Horwood, 1991.
3. S. C. Stinson, *Chem. Eng. News*, 76(38) (1998) 83.
4. S. C. Stinson, *Chem. Eng. News*, 77(41) (1999) 101.
5. N. M. Maier, P. Franco and W. Lindner, *J. Chromatogr. A*, 906 (2001) 3.
6. B. Maas, A. Dietrich and A. Mosandl, *J. Microcol. Sep.*, 8(1) (1996) 47.

7. W. A. König, *The Practice of Enantiomer Separation by Capillary Gas Chromatography*, Hüthig, 1987.
8. E. Gil-Av, B. Feibush and R. Charles-Sigler, *Tetrahedron Lett.*, (1966) 1009.
9. H. Frank, G. J. Nicholson and E. Bayer, *J. Chromatogr. Sci.*, 15 (1977) 174.
10. W. A. König and K. Ernst, *J. Chromatogr.*, 280 (1983) 135.
11. V. Schurig, *J. Chromatogr.*, 441 (1988) 135.
12. V. Schurig, *J. Chromatogr. A*, 666 (1994) 111.
13. V. Schurig, H.-P. Nowotny, M. Schleimer and D. Schmalzing, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 12(8) (1989) 549.
14. Z. Juvancz, K. Grolimund and E. Francotte, *Chirality*, 4 (1992) 459.
15. A. Shitangkoon and Gy. Vigh, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 16 (1993) 504.
16. J. Szejtli, *Chem. Rev.*, 98 (1998) 1743.
17. J. Meinwald, W. R. Thompson, D. L. Pearson, W. A. König, T. Runge and W. Francke, *Science*, 251 (1991) 560.
18. N. P. Franks and W. R. Lieb, *Science*, 254 (1991) 427.
19. S. Li and W. C. Purdy, *Chem. Rev.*, 92 (1992) 1457.
20. E. Smolková, H. Králová, S. Krýsl and L. Feltl, *J. Chromatogr.*, 241 (1982) 3.
21. T. Koscielski, D. Sybilska and J. Jurczak, *J. Chromatogr.*, 280 (1983) 131.
22. G. Wenz, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33 (1994) 803.
23. W. A. König, S. Lutz, P. Mischnick-Lübbecke, B. Brassat and G. Wenz, *J. Chromatogr.*, 447 (1988) 193.
24. W.-Y. Li, H. L. Jin and D. W. Armstrong, *J. Chromatogr.*, 509 (1990) 303.
25. D. W. Armstrong, W. Li, C.-D. Chang and J. Pitha, *Anal. Chem.*, 62 (1990) 914.
26. D. W. Armstrong and H. L. Jin, *J. Chromatogr.*, 502 (1990) 154.
27. V. Schurig and H.-P. Nowotny, *J. Chromatogr.*, 441 (1988) 155.
28. V. Schurig, D. Schmalzing, U. Mühleck, M. Jung, M. Schleimer, P. Mussche, C. Duvekot and J. C. Buyten, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 13 (1990) 713.
29. P. Fischer, R. Aichholz, U. Bölz, M. Juza and S. Krimmer, *Angew. Chem.*, 102 (1990) 439.
30. M. Jung and V. Schurig, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 16 (1993) 289.
31. W. A. König, S. Lutz, M. Hagen, R. Krebber, G. Wenz, K. Baldenius, J. Ehlers and H. tom Dieck, *J. High Resolut. Chromatogr.*,12(1) (1989) 35.
32. A. Dietrich, B. Maas, V. Karl, P. Kreis, D. Lehmann, B. Weber and A. Mosandl, *J. High Resolut. Chromatogr.*,15(3) (1992) 176.
33. W. A. König, S. Lutz, G. Wenz and E. von der Bey, *J. High Resolut. Chromatogr.*,11(7) (1988) 506.

34. W. A. König, R. Krebber and P. Mischnick, *J. High Resolut. Chromatogr.*,12(11) (1989) 732.
35. W. Blum and R. Aichholz. *J. High Resolut. Chromatogr.*,13(7) (1990) 515.
36. H.-G. Schmarr, A. Mosandl and A. Kaunzinger, *J. Microcol. Sep.*, 3 (1991) 395.
37. W. A. König, D. Icheln, T. Runge, I. Pforr and A. Krebs, *J. High Resolut. Chromatogr.*, 13(10) (1990) 702.
38. A. Shitangkoon and Gy. Vigh, *J. Chromatogr. A*, 738 (1996) 31.
39. K. Takeo, H. Mitoh, and K. Uemura, *Carbohydr. Res.*, 187 (1989) 203.
40. D. Icheln, B. Gehrcke, Y. Piprek, P. Mischnick, W. A. König, M. A. Dessoy, and A. F. Morel, *Carbohydr. Res.*, 280 (1996) 237.
41. K. Grob, *Making and Manipulating Capillary Columns for Gas Chromatography*, Hüthig, Heidelberg, 1986.
42. K. Grob, Jr., G. Grob and K. Grob, *J. Chromatogr.*, 156 (1978) 1.
43. K. Grob, G. Grob and K. Grob, Jr., *J. Chromatogr.*, 219 (1981) 13.
44. B. Maas, A. Dietrich, T. Beck, S. Börner and A. Mosandl, *J. Microcol. Sep.*, 7 (1995) 65.
45. T. Beck, J.-M. Liepe, J. Nandzik, S. Rohn and A. Mosandl, *J. High Resol. Chromatogr.*, 23(10) (2000) 569.

ผลงานที่ได้จากโครงการ

ผู้วิจัยสามารถเตรียมอนุพันธ์ของเบตา-ไซโคลเดกซ์ทรินในรูปของไอโซเมอร์ที่บริสุทธิ์ ที่มีหมู่แทนที่ที่ secondary hydroxyls ต่างๆ กัน และสามารถเตรียมแคปิลารีคอลัมน์ชนิดไครัลที่สามารถใช้แยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟีได้มีประสิทธิภาพดี และสามารถใช้วิเคราะห์สารได้หลากหลายชนิด

งานวิจัยเพิ่มเติม

งานวิจัยที่ได้เสนอไปนั้น ได้ทำการทดลองบรรลุตามวัตถุประสงค์ที่ตั้งไว้เรียบร้อยแล้ว แต่ผลงานวิจัยโดยรวมไม่เป็นที่น่าพอใจนัก เนื่องจากอนุพันธ์ของไซโคลเดกซ์ทรินชนิดใหม่ คือ CD-5 ไม่สามารถแยกคู่อิแนนทิโอเมอร์ที่นำมาทดสอบได้เลย และมีช่วงอุณหภูมิใช้งานที่แคบ อย่างไรก็ตาม จากผลการทดสอบสารที่มีหมู่ฟังก์ชันแตกต่างกันในทั้ง 3 คอลัมน์ ผู้วิจัยพบว่าอิแนนทิโอเมอร์ของสารในกลุ่มแอลกอฮอล์ (สารลำดับที่ 15-20) แยกได้ดีด้วยคอลัมน์ CD-2 และให้ผลการทดลองที่น่าสนใจ จึงได้ทำการวิจัยเพิ่มเติม (นอกเหนือจากเดิมที่ระบุไว้ในวัตถุประสงค์เดิม) โดยคัดเลือกแอลกอฮอล์ที่มีชนิดของหมู่แทนที่และตำแหน่งของ chiral center แตกต่างกัน แล้วนำมาวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ CD-2 เพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของชนิดของหมู่แทนที่และตำแหน่งของ chiral center ที่มีต่อการแยกของอิแนนทิโอเมอร์เมื่อใช้อนุพันธ์ CD-2 เป็นเฟสคงที่

วัตถุประสงค์

ศึกษาอิทธิพลของชนิดของหมู่แทนที่และตำแหน่งของ chiral center ของแอลกอฮอล์ที่มีต่อการแยกของอิแนนทิโอเมอร์เมื่อใช้อนุพันธ์ CD-2 เป็นเฟสคงที่

การทดลอง

ทำการแยกอิแนนทิโอเมอร์ของแอลกอฮอล์ชนิดต่างๆ ด้วยคอลัมน์ CD-2 ที่อุณหภูมิคงที่ โดยเปรียบเทียบค่า retention factor (k′) และ selectivity (α) ของการแยก และคำนวณค่าทางเทอร์โมไดนามิกส์

ผลการทดลอง และสรุปผลการทดลอง

รายละเอียดดังแสดงในเอกสารสำหรับการเผยแพร่ (ภาคผนวก) ซึ่งจะนำส่งเพื่อตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติต่อไป

ภาคผนวก

Thermodynamic Study on Enantiomeric Separation of Alcohols by Gas Chromatography Using Derivatized Beta-Cyclodextrin as a Stationary Phase

Aroonsiri Shitangkoon*[1], Jirawit Yanchinda[1], Gyula Vigh[2], and Juwadee Shiowatana[3]

[1] Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330 Thailand; [2] Department of Chemistry, Texas A&M University, College Station, TX 77842-3012 USA; [3] Department of Chemistry, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400 Thailand

* Corresponding author.

Abstract

Enantiomer separation of nineteen structurally related alcohols were investigated as a function of temperature by capillary gas chromatography using heptakis(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltoheptaose (BSMe) as a selector. Thermodynamic parameters were determined and compared with a reference, nonchiral stationary phase. The $-\Delta(\Delta H)$ and $-\Delta(\Delta S)$ values of all alcohols are considerably different despite the fact that their corresponding $-\Delta H$ and $-\Delta S$ values of more retained enantiomers are comparable on the chiral stationary phase used. Of all tested solutes, the greatest enantiomer discrimination could be achieved with 2,6-difluoro-α-methylbenzyl alcohol.

Keywords: gas chromatography, cyclodextrin, enantiomer, thermodynamic parameter, alcohol

1. Introduction

Cyclodextrins (CDs) and their derivatives are among the most commonly used chiral selectors in chromatography and electrophoresis [1-2] due to their inherent chirality and ability to form inclusion complexes with several types of compounds. In gas chromatography, a large number of CD derivatives have been prepared and employed extensively as chiral stationary phases [3-4]. As various types of CD derivatives have been synthesized, the alkyl and acyl derivatives of (6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)-CD are proven to be versatile chiral gas chromatographic selectors [5-9]. However, the separation mechanisms involving modified cyclodextrins have not been clearly realized and chiral separation of new compounds on CD columns are still

performed mostly by trial and error. Therefore, more studies on the relationship between the structure of analytes and enantioselectivity of derivatized cyclodextrins are still needed in order to gain a better understanding on the mechanism of chiral recognition.

In this work, nineteen 1-phenylethanol derivatives of different type and position of substitution were investigated on two capillary GC columns: a reference OV-1701 column and a chiral column containing heptakis(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomaltoheptaose (BSMe) in OV-1701. The retention factors and enantioselectivities as well as thermodynamic parameters were determined to reveal the relationship between the structure of analyte and the chiral recognition mechanism of BSMe.

2. Experimental

Gas chromatographic separations were achieved on an Agilent 6890 equipped with a split/splitless injector and a flame ionization detector. The injector and detector were maintained at 250 °C. Hydrogen was used as a carrier gas at an average linear velocity of 50 cm/sec. Two deactivated 30 m × 0.25 mm I.D. fused-silica capillary columns (Agilent Technologies, Wilmington, DE, USA) were statically coated with the dichloromethane solutions of stationary phases, an OV-1701-vi (Supelco, Bellefonte, PA, USA) and a 25% BSMe in OV-1701-vi, to obtain identical film thickness of 0.25 μm. The BSMe was prepared as described by Takeo et al. [10]. Both columns were characterized by Grob test [11-12]. Efficiency was also determined at 80 and 160 °C with *n*-alkanes which gave N of 3700-4200 plates/m ($k' > 4$). All separations were performed isothermally in duplicate in the temperature range of 80-190 °C at 10 °C interval. Most chiral analytes were purchased from Aldrich (Milwaukee, WI, USA) and Fluka (Buchs, Switzerland) and used as received. Some compounds were prepared by reduction of the corresponding acetophenones. The synthesized compounds were characterized by ^{1}H-NMR. The structures of all chiral analytes used in this study are shown in Fig. 1.

3. Results and discussion

Thermodynamic parameters ($-\Delta H$ and $-\Delta S$ values) associated to the interaction between alcohol analytes and gas chromatographic stationary phases were acquired from the relationship between retention factor (k') and separation temperature according

to $$\ln k' = -\frac{\Delta H}{RT} + \frac{\Delta S}{R} - \ln \beta \quad (1)$$

where R is the universal gas constant and β is the phase ratio (ratio of mobile phase volume to stationary phase volume). All ln k′ versus 1/T plots obtained from both columns are linear with the regression coefficient (R^2) greater than 0.998 (Fig. 2).

Enthalpy (-ΔH) and entropy (-ΔS) values acquired from both columns are compared in Fig. 3. On the reference OV-1701 column, it can be seen that all analytes interact with the stationary phase in a similar manner (similar -ΔH and -ΔS values), which indicated that the major contribution towards the interaction is probably from the hydroxyl group. On the chiral BSMe column, the more retained enantiomer of analytes interact more strongly with the modified cyclodextrin than with the polysiloxane as indicated by higher -ΔH and -ΔS values. However, comparable thermodynamic values of all analytes are still observed.

All nineteen alcohols used in this study can be resolved into their enantiomers with BSMe and the difference in their thermodynamic values (-Δ(ΔH) and -Δ(ΔS)) can be calculated from their corresponding -ΔH and -ΔS values of each enantiomer. Alternatively, the -Δ(ΔH) and -Δ(ΔS) values were determined from ln α versus 1/T plots

according to $$\ln \alpha = -\frac{\Delta(\Delta H)}{RT} + \frac{\Delta(\Delta S)}{R} \quad (2)$$

The differences in thermodynamic values for enantiomeric pairs obtained from both methods were in good agreement and the values were shown in Fig. 4. All ln α versus 1/T plots are linear except for solutes **14** and **16** where curvatures were observed (Fig. 5). In spite of this, the corresponding ln k′ versus 1/T plots of compounds **14** and **16** were strictly linear. From Figs. 4 and 5, it can be seen that the two solutes (**14** and **16**) that displayed the ln α versus 1/T curves also possessed the lowest -Δ(ΔH) and -Δ(ΔS) values. It is possible that there are multiple interaction mechanisms governing the enantiomer separation of these two compounds [13] and no single mechanism dominated.

Although all alcohol analytes could be separated into their enantiomers, they exhibit significantly different degree of enantioseparation (Fig. 4). Using alcohol **1** as a reference compound, substituting methyl group at the chiral carbon with longer (**3**, **4**) or bulkier (**13**) alkyl group or ester functionality (**14**) makes the separation less favorable. It is surprising to discover that the α-trifluoromethyl substitution at the chiral carbon (**16**) greatly deteriorates the enantiomer discrimination on BSMe. This evidence supports

that the electronegativity of substituent can play a major role on chiral resolution as well. Comparing the ln α versus 1/T plots of alcohols **1** and **16**, it can be concluded that temperature had a strong influence on the enantiomer separation of **1** but showed a minor effect on **16**. Nevertheless, at temperature above 150 °C, the enantioselectivity of **16** is better than that of **1**, but below 150 °C the reversal was observed (Fig. 5). On the contrary, substituting methyl at the *para*-position of aromatic ring with trifluoromethyl (compounds **6** versus **17**) has no effect on the separation and their thermodynamic values are indistinguishable.

The effect of electronegativity of substituent on enantiomer separation was additionally demonstrated in Fig. 6. It was clearly seen that by replacing all hydrogen atoms on the aromatic ring with fluorine atoms, the chiral discrimination was improved (Fig. 6b). The number and position of substitution are absolutely important factors for chiral recognition. In this study, 2,6-difluoro-α-methylbenzyl alcohol (**12**) exhibited the greatest -$\Delta(\Delta H)$ and -$\Delta(\Delta S)$ values and best separation (Fig. 6c) among all compounds tested.

Several *para*-substituted alcohols (**6**, **7**, **10**, **11**, **17**, and **18**) were examined as well. On all three halogen-substituted alcohols, the results revealed that there is a small decreased trend for the -$\Delta(\Delta H)$ and -$\Delta(\Delta S)$ values when the substituent size increased from F→ Cl → Br, however, the difference in the thermodynamic quantities was not significant (Fig. 4). This indicates that the size of halogen at the *para*-position has little influence on chiral discrimination. Among all *para*-substituted alcohols, compound **10** showed lowest -$\Delta(\Delta H)$ and -$\Delta(\Delta S)$ values. This is likely due to the increased dipole-dipole interactions, which may lessen the discrimination ability of derivatized cyclodextrin. Therefore, the strong interaction between solute and stationary phase does not necessarily lead to a better separation.

Comparing the enantiomeric separation of compounds **1**, **2** and **15**, it was found that alcohols with an aromatic structure (**1**, **15**) provide better enantioseparation and higher enantioselectivity values on BSMe column than cyclic aliphatic alcohol such as **2**. This is possibly due to the shape difference between aliphatic and aromatic molecules and; thus, have an impact on their ability to form complexes with cyclodextrin molecule.

For compounds that are isomers (**3**-**6** and **8**-**9**), changes in substituent position can also create a substantial change in enantiodifferentiation. As seen in Fig. 7, all solutes could be separated at 140 °C except for solute **3** where both enantiomers coelute. The thermodynamic values, on the other hand, point out that the discrimination

between enantiomers of **3** is better than that of **4** and **5**. Although, solute **3** showed higher $-\Delta(\Delta H)$ and $-\Delta(\Delta S)$ values, it could only be separated at lower temperature and, unavoidably, require more analysis time. Therefore, several aspects must be considered simultaneously.

4. Conclusions

A thermodynamic investigation of enantiomer separation of 1-phenylethanol derivatives using heptakis(2,3-di-*O*-methyl-6-*O*-*tert*-butyldimethylsilyl)cyclomalto-heptaose (BSMe) as chiral selector indicates that hydroxyl group of alcohols is mainly responsible for the interaction with the stationary phases, both polysiloxane and a cyclodextrin derivative. Nonetheless, there are several parameters related to analyte structure, e.g. size, polarity, and position of substituent, which can contribute to chiral recognition. It was often found that only a slight change in solute structure could lead to a large difference in enantioselectivity. In this study, substitution on the aromatic ring of alcohol tends to promote enantiodifferentiation, whereas substitution on the side chain of molecule is likely to reduce chiral recognition. More compounds of related structure should be tested in order to bring about the insight of separation mechanisms of cyclodextrin and, ultimately, be able to predict the degree of separation of tested solutes without several trial and errors.

Acknowledgements

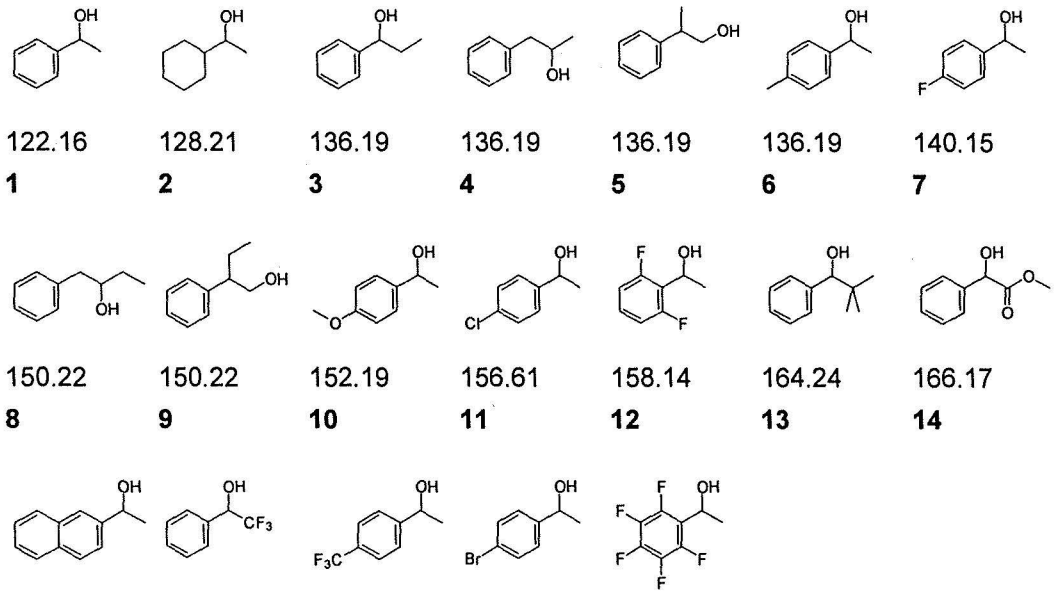
Financial support from the Thailand Research Fund (PDF/18/2543) is gratefully acknowledged.

References

1. N. M. Maier, P. Franco, W. Lindner, J. Chromatogr. A 906 (2001) 3-33.
2. J. Szejtli, Chem. Rev. 98 (1998) 1743-1753.
3. V. Schurig, J. Chromatogr. A 906 (2001) 275-299.
4. W. A. König, Gas Chromatographic Enantiomer Separation with Modified Cyclodextrins, Hüthig, Heidelberg, 1992.
5. A. Dietrich, B. Maas, V. Karl, P. Kreis, D. Lehmann, B. Weber, A. Mosandl, J. High Resolut. Chromatogr. 15 (1992) 176-179.
6. A. Dietrich, B. Maas, W. Messer, G. Bruche, V. Karl, A. Kaunzinger, A. Mosandl, J. High Resolut. Chromatogr. 15 (1992) 590-593.
7. B. Maas, A. Dietrich, V. Karl, A. Kaunzinger, D. Lehmann, T. Köpke, A. Mosandl, J.

Microcol. Sep. 5 (1993) 421-427.

8. F. Kobor, G. Schomburg, J. High Resolut. Chromatogr. 16 (1993) 693-699.
9. A. Shitangkoon, Gy. Vigh, J. Chromatogr. A 738 (1996) 31-42.
10. K. Takeo, H. Mitoh, K. Uemura, Carbohydr. Res. 187 (1989) 203-221.
11. K. Grob, G. Grob, K. Grob, Jr., J. Chromatogr. 219 (1981) 13-20.
12. K. Grob, Jr., G. Grob, K. Grob, J. Chromatogr. 156 (1978) 1-20.
13. B. Maas, A. Dietrich, T. Beck, S. Börner, A. Mosandl, J. Microcol. Sep. 7 (1995) 65-73.



MW	122.16	128.21	136.19	136.19	136.19	136.19	140.15
cpd #	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**
MW	150.22	150.22	152.19	156.61	158.14	164.24	166.17
cpd #	**8**	**9**	**10**	**11**	**12**	**13**	**14**
MW	172.22	176.13	190.16	201.06	212.11		
cpd #	**15**	**16**	**17**	**18**	**19**		

Fig. 1. Structure and molecular weight of tested compounds

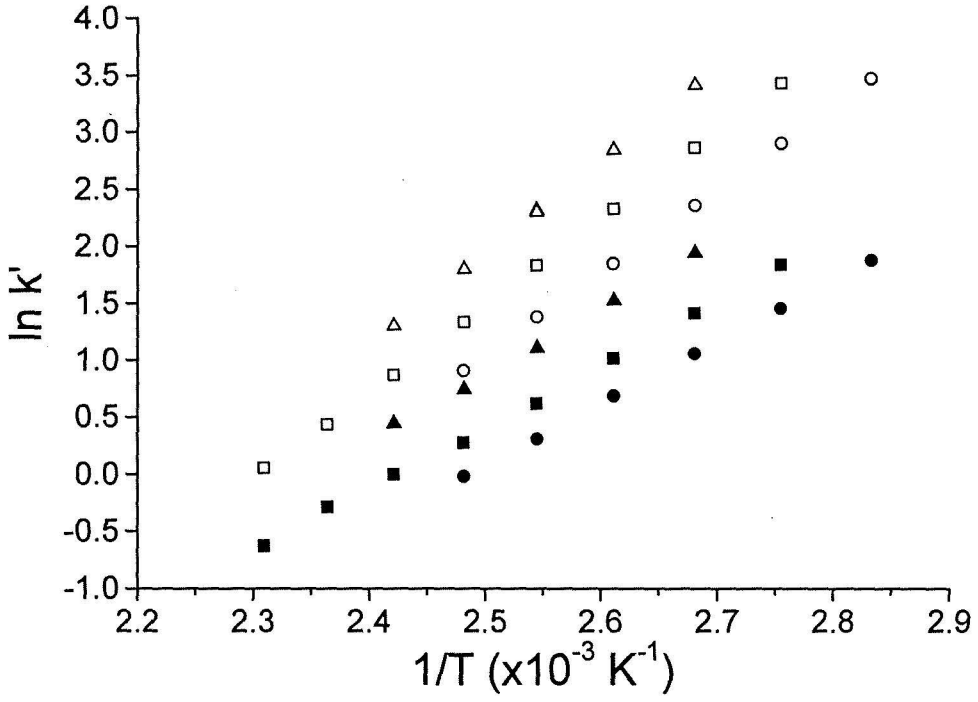


Fig. 2. Ln k′ versus 1/T plots of alcohols **1-3** obtained with a nonchiral OV-1701 column (solid symbols) and of the more retained enantiomer of alcohols **1-3** obtained with a chiral BSMe column (open symbols): compounds **1** (■/□), 2 (●/○) and **3** (▲/△)

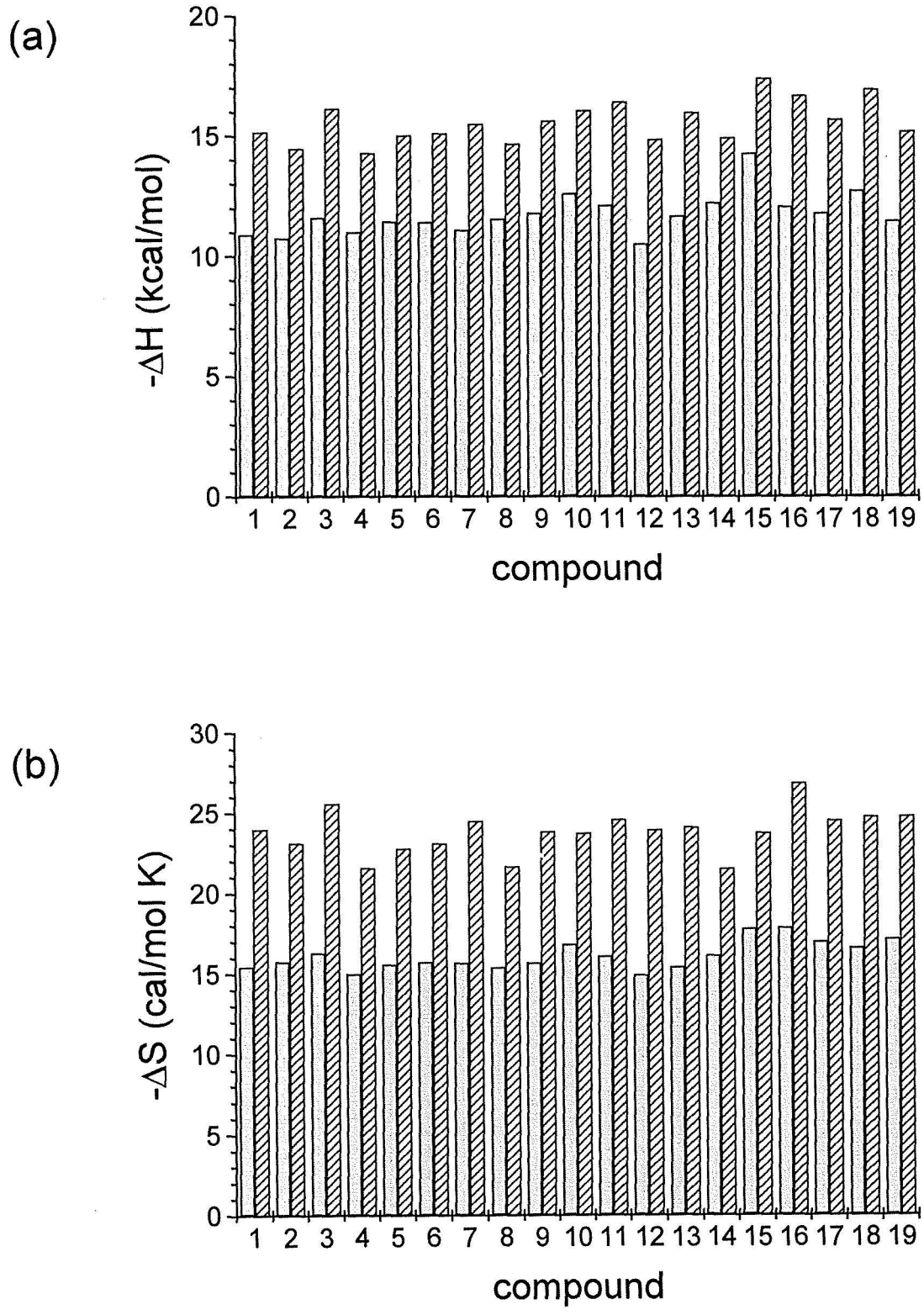


Fig. 3. Enthalpy (a) and entropy (b) values of all alcohols on a nonchiral OV-1701 column (solid color) and of more retained enantiomers on a chiral BSMe column (hatch)

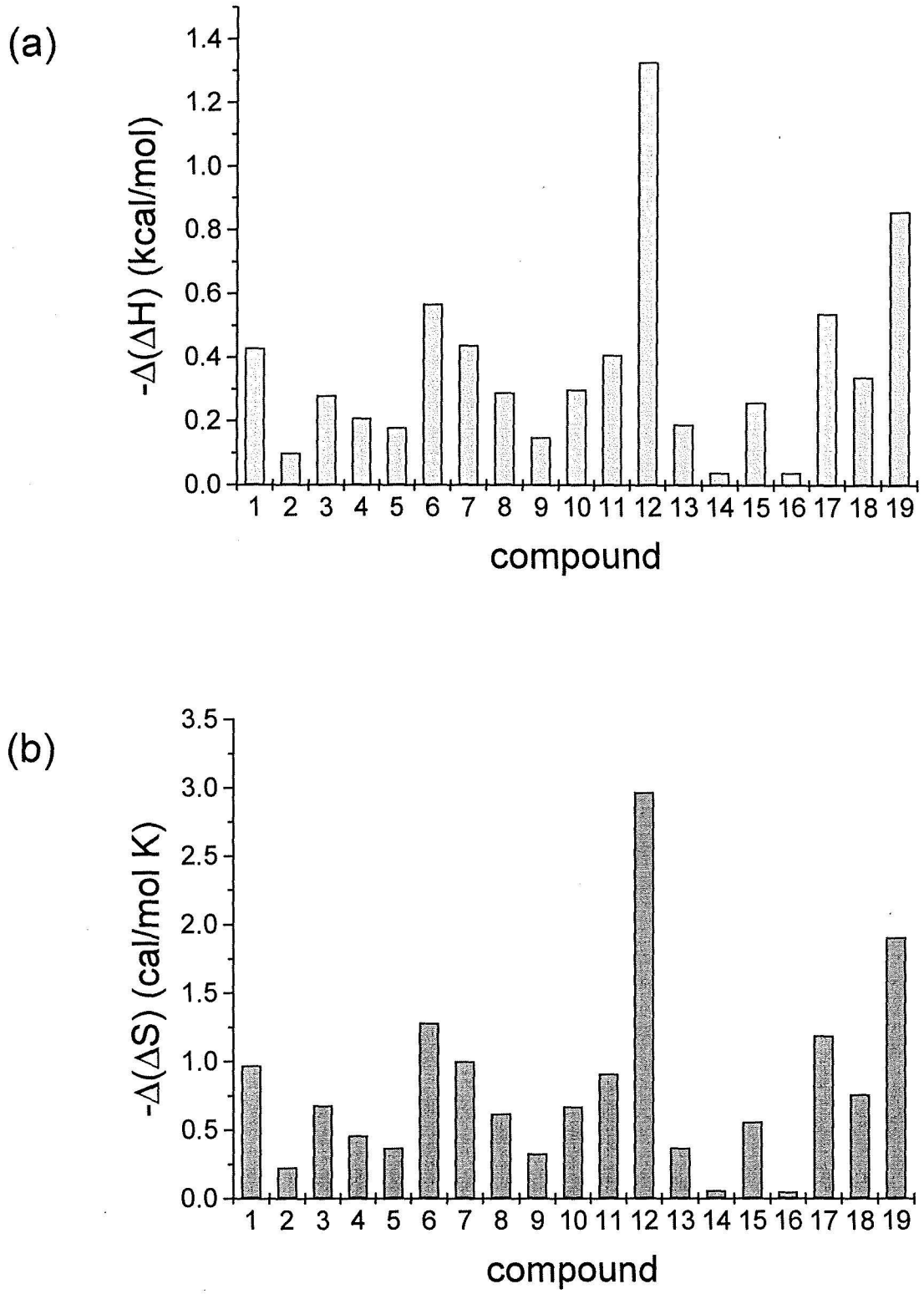


Fig. 4. Difference in enthalpy (a) and entropy (b) values for enantiomeric pair of alcohols on a chiral BSMe column

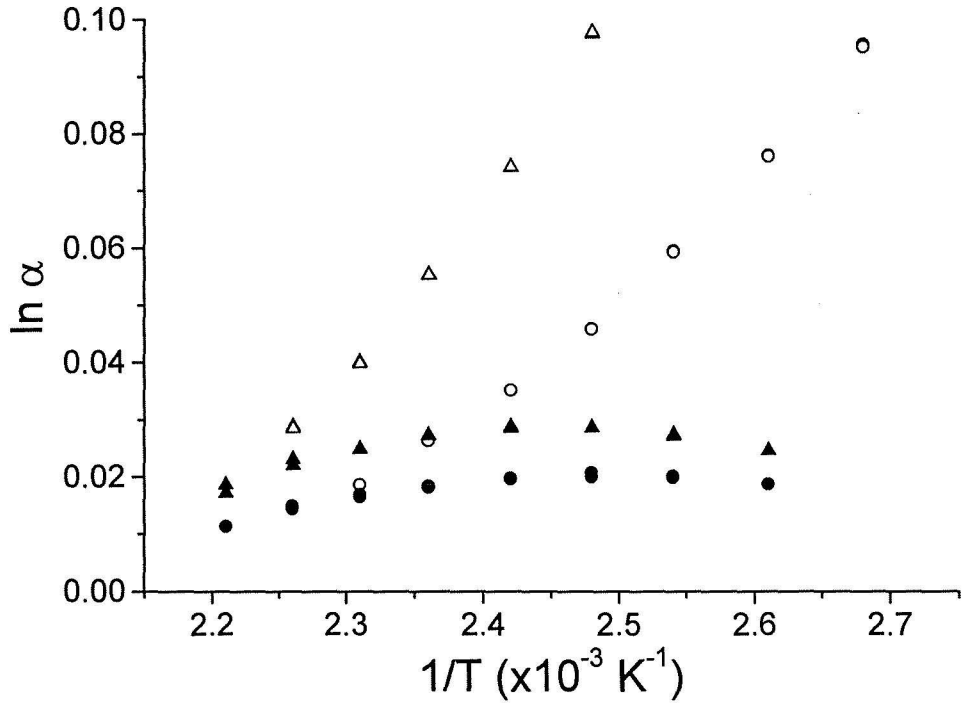
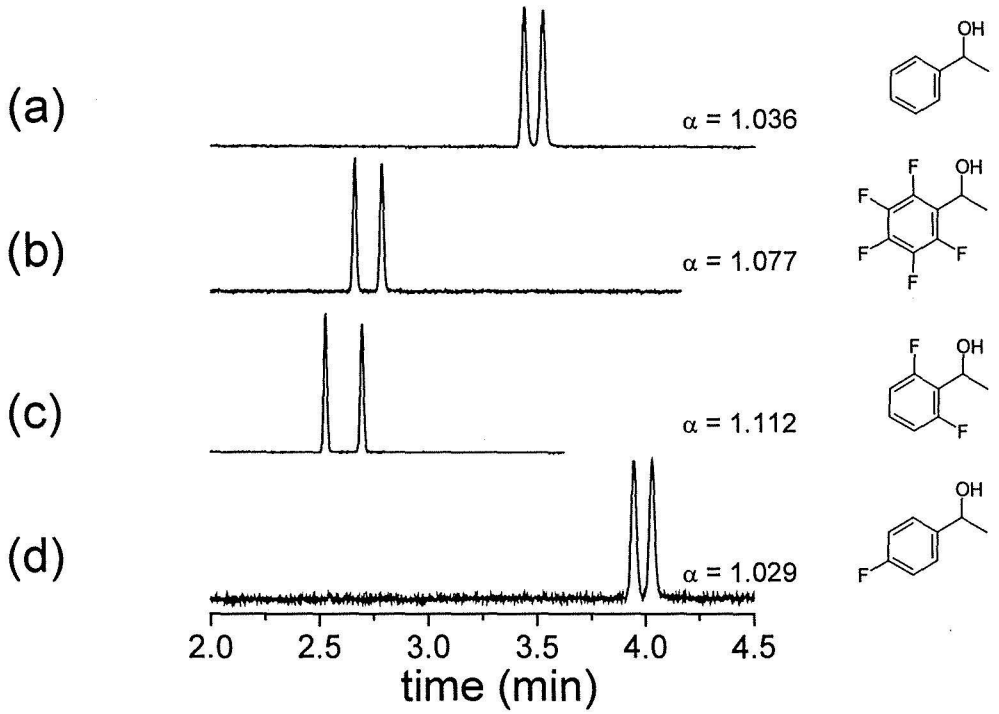


Fig. 5. Ln α versus 1/T plots of alcohols **1** (○), **14** (●), **16** (▲), and **19** (△) obtained with a chiral BSMe column



6. Enantiomer separation of alcohols **1** (a), **19** (b), **12** (c), and **7** (d) on a BSMe column at 140 °C isothermal

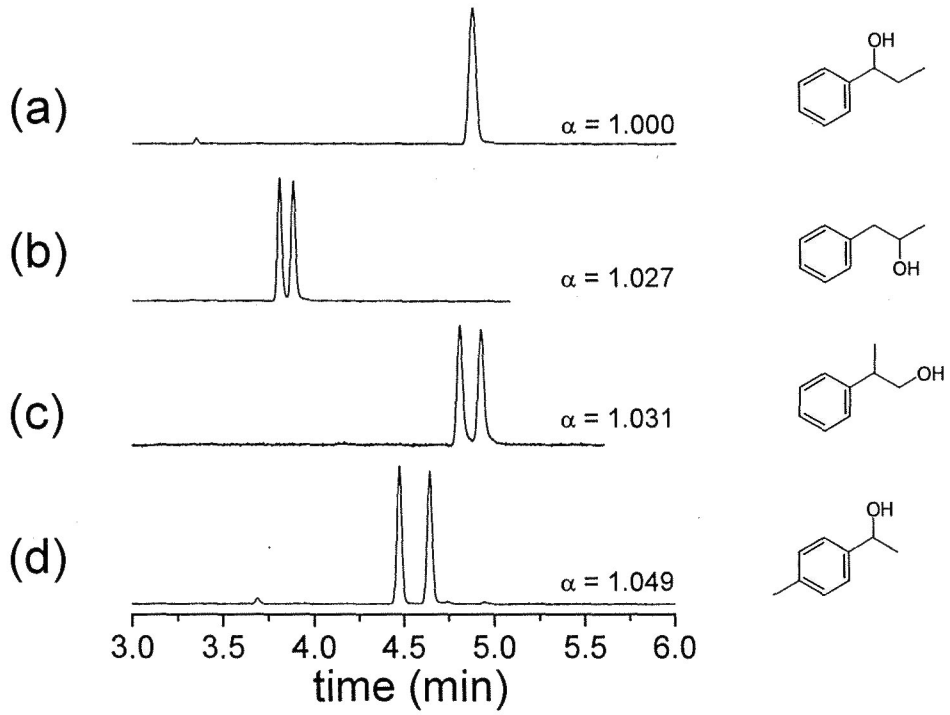


Fig. 7. Enantiomer separation of alcohol isomers **3** (a), **4** (b), **5** (c), and **6** (d) on a BSMe column at 140 °C isothermal