

移動相中添加 S- β -環糊精在逆相液相層析上分離萘酚和萘甲醚位置異構物

俞仁渭^{*} 林宣慧^{**} 張書文^{***} 林振興^{****}

摘要

本研究在移動相中添加 S- β -環糊精於甲醇與水混合溶液，利用 RP-C18 靜相管柱分離萘酚和萘甲醚位置異構物，並探討移動相中甲醇含量對這些分析物分離的影響。經由層析圖可知，添加 1g/L S- β -環糊精於甲醇與水適當比例的移動相中，利用 RP-C18 靜相管柱可以基線分離萘酚和萘甲醚位置異構物。本研究利用理論計算得到萘酚和萘甲醚個別與 β -環糊精之錯合物結構，分析其中氫鍵作用力之差異，推測萘酚與 S- β -環糊精之間的氫鍵作用力在滯留次序上扮演重要角色。

關鍵詞：逆相液相層析、S- β -環糊精、分析物、位置異構物、理論計算

投稿日期：2019/03/25；接受日期：2019/09/24

* 國立高雄師範大學化學系教授

** 輔英科技大學應用化學及材料科學系大學部學生

*** 輔英科技大學應用化學及材料科學系助理教授

**** 輔英科技大學應用化學及材料科學系副教授(通訊作者)

Separation of Naphthol and Methoxynaphthalene isomers by RPLC Using S- β -cyclodextrin as Mobile Phase Additives

Jen-wei Yu^{*} Xuan-hui Lin^{**}
Shu-wen Chang^{***} Chen-hsing Lin^{****}

Abstract

The separation of naphthol and methoxynaphthalene isomers was investigated by high-performance liquid chromatography on a RP-C18 stationary phase using S- β -cyclodextrin (S- β -CD) as mobile phase additives. Effects of methanol content of mobile phase on the separation of analytes were examined. The Chromatograms of the naphthol and methoxynaphthalene isomers show that baseline separations were achieved on a commercial RP-C18 stationary phase using S- β -CD in the appropriate methanol content of mobile phase.

In this study, the structure of the complex of naphthol and methoxynaphthalene isomers with β -CD was calculated by theoretical calculation, and the difference of hydrogen bonding force was analyzed. The hydrogen bonding force between naphthol and S- β -CD plays an important role in the retention order.

Keywords: Reversed Phase Liquid Chromatography, S- β -cyclodextrin (S- β -CD), Theoretical Calculation, Analytes

Submitted: 2019/03/25 ; Accepted: 2019/09/24

^{*} Professor, Department of Chemistry, National Kaohsiung Normal University

^{**} Under-graduate, Department of Applied Chemistry and Material Science, Fooyin University

^{***} Assistant Professor, Department of Applied Chemistry and Material Science, Fooyin University

^{****} Associate Professor, Department of Applied Chemistry and Material Science, Fooyin University
(Corresponding Author)

壹、前言

環糊精是由 6 到 12 個葡萄糖單元以 α -(1,4) 鍵聯而成的環狀葡萄糖聚合物。一般常見的環糊精有 α -環糊精， β -環糊精， γ -環糊精三種，分別含有 6、7、8 個葡萄糖單元。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，因結構特殊，可以有選擇性的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]。環糊精在高效液相層析方面的應用有兩種方法，第一種方法是利用逆相液相層析方法，在移動相中添加環糊精或環糊精衍生物，利用 RP-C18 靜相管柱分離各類異構物，此種方法已經成功分離許多對掌異構物或芳香族位置異構物[4-10]；第二種方法是將環糊精或環糊精衍生物化學鍵結於矽膠擔體上，填充成靜相管柱，也可以成功的分離許多位置異構物或對掌異構物[11-21]。本研究採用第 1 種方法。

研究者曾在移動相中添加 β -環糊精於甲醇與水混合溶液，利用 RP-C18 靜相管柱分離一些單取代萘環位置異構物，從層析結果得知 RP-C18 靜相管柱無法將萘酚與萘甲醚位置異構物基線分離，且萘酚位置異構物的滯留次序：2-<1-；萘甲醚、萘甲酸以及萘乙酸位置異構物的滯留次序皆為：1->2-。值得注意的，萘酚位置異構物的滯留次序與其它三種分析物滯留次序相反。研究者曾在移動相中添加 β -環糊精於甲醇與水混合溶液，利用 RP-C18 靜相管柱分離一些單取代酚類位置異構物，從層析結果得知 RP-C18 靜相管柱無法基線分離萘酚位置異構物[10]。因此本研究選擇萘酚與萘甲醚位置異構物當分析物，並尋找適合的 β -環糊精衍生物當移動相添加劑，期望利用 RP-C18 靜相管柱能夠將萘酚與萘甲醚位置異構物基線分離。分析物：萘酚位置異構物和萘甲醚位置異構物，其化學結構如圖 1 與圖 2 所示。

S- β -環糊精是有帶電荷硫酸鈉鹽衍生 β -環糊精，常運用在毛細管電泳上當對掌選擇試劑，文獻上已經證實可以有效分離多種對掌異構物與位置異構物[22-24]。從已發表在移動相中添加環糊精或環糊精衍生物的相關文獻[4-10]得知，尚未有文獻發表以 S- β -環糊精當移動相添加劑，利用 RP-C18 靜相管柱在 HPLC 上分離萘酚與萘甲醚位置異構物。因此，本研究嘗試選擇 S- β -環糊精當移動相添加劑，在 RPLC 方法上以 RP-C18 靜相管柱分離萘酚與萘甲醚位置異構物。本研究在移動相中添加 S- β -環糊，改變移動相中甲醇與水不同比例的混合溶液，以探討移動相中甲醇含量對萘酚與萘甲醚位置異構物分離的影響，並評估萘酚與萘甲醚位置異構物的分離效果。本研究也利用理論計算的方法來推測 S- β -環糊精與萘酚包藏錯合物內的氫鍵作用力，在滯留次序上是否扮演重要角色。

貳、材料及方法

一、化學藥品

S- β -環糊精(S- β -cyclodextrin)為美國 Sigma-Aldrich 試藥級產品。1-萘甲醚(1-methoxynaphthalene)、2-萘甲醚(2-methoxynaphthalene)、1-萘酚(1-naphthol)、2-萘酚(2-naphthol)係採用日本東京試藥級產品。層析使用的甲醇(methanol)係採用 HP LC 級產品。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 254nm；流速控制在 2mL/min。並採用 100Å、5 μ m，150×4.6mm 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。

因 S-環糊精沒有固定的結構，且在移動相中添加 β -環糊精於甲醇與水混合溶液，利用 RP-C18 靜相管柱分離分析物的滯留次序與添加 S- β -環糊精一樣，所以本研究選擇 β -環糊精作理論計算。本研究理論計算使用了 Discovery Studio version 2.5[25]中的 CDOCKER[26]程序以及 CHARMM 力場(force field)之 Momany-Rone 參數組[27]來進行分子結構的優化與對接(docking)之計算。在對接萘酚： β -環糊精以及萘甲醚： β -環糊精時，會有不同之姿態(poses)產生，本研究以 CDOCKER interaction 作為錯合物結合能，並以此結合能大小作為篩選條件。

三、移動相組成

本研究添加 1g/L S- β -環糊精濃度於甲醇與水不同比例(50：50 至 30：70)的混合溶液當移動相，利用 RP-C18 靜相管柱分離萘酚位置異構物；添加 1g/L S- β -環糊精濃度於甲醇與水不同比例(55：45 至 45：45)的混合溶液當移動相，利用 RP-C18 靜相管柱分離萘甲醚位置異構物。

參、結果與討論

在移動相中添加 S- β -環糊精，利用 RP-C18 靜相管柱以分離芳香族異構物，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)S- 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：

$$G_m + CD_m \rightleftharpoons (G \cdot CD)_m \quad (1-1)$$

$$RP-C_{18}|G_s \rightleftharpoons G_m \quad (1-2)$$

$$RP-C_{18} | (G \cdot CD)_s \rightleftharpoons (G \cdot CD)_m \quad (1-3)$$

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； $k'_{G \cdot CD}$ 為客體分子與環糊精形成之包藏錯合物的滯留因數。滯留因數之式(1-4)推導，可參見參考文獻(*Anal. Chem.*, 1985)。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。

本研究分析物的滯留因數(retention factor)可以下式表示之：

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (1-5)$$

式(1-5)滯留因數(k)，可由層析圖之 t_M 和 t_R 值計算求得。 t_M (dead time)為注入不被靜相所滯留之溶質(例如注入 NO_2 溶液)，由進入系統至檢測器呈現其最大訊號之時間； t_R (retention time)為分析物進入系統至檢測器，呈現其最大訊號之時間。由於式(1-5)中之分母與分子單位皆為時間，故約分後滯留因數沒有單位。

二、移動相中甲醇含量的影響

本研究使用的 S-β-環糊精結構沒有固定組成，大約是每莫耳β-環糊精之羥基被 7-11 莫耳硫酸鈉鹽取代。因此 S-β-環糊精的濃度用 g/L(w/v)代替 mM[24]。

本研究添加 1g/L S-β-環糊精濃度於甲醇與水不同比例(50：50 至 30：70)的混合溶液當移動相，利用 RP-C18 靜相管柱分離萘酚位置異構物，層析結果如圖 3 所示。所得到的層析結果得知萘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，可以增加移動相對萘酚位置異構物的溶解度，使得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。萘酚位置異構物的滯留次序：2-萘酚>1-萘酚。從圖 3 可知滯留次序不會隨著甲醇含量而改變。

本研究也添加 1g/L S-β-環糊精濃度於甲醇與水不同比例(55：45 至 45：45)的混合溶液當移動相，利用 RP-C18 靜相管柱分離萘甲醚位置異構物，層析結果如圖 4 所示，所得的層析結果類似圖 3。萘甲醚位置異構物的滯留因數會隨著甲醇含量增加而減少，滯留次序也不會隨著甲

醇含量而改變。萘甲醚位置異構物的滯留次序：1-萘甲醚>2-萘甲醚，若在相同的層析條件之下，萘甲醚位置異構物的滯留因數會比萘酚位置異構物大。

三、萘酚與萘甲醚位置異構物的分離

本研究選擇萘酚與萘甲醚位置異構物作為分析物。2種分析物的分離效果敘述如下：

(一) 萘酚位置異構物的分離

因在移動相中添加 β -環糊精於甲醇與水混合溶液，利用 RP-C18 靜相管柱無法基線分離萘酚 2 種位置異構物[10]。故本研究嘗試在移動相中添加 S- β -環糊精來分離分析物。圖 5 所示為移動相中添加 1g/L 的 S- β -環糊精濃度於甲醇與水比例為 40:60 的混合溶液，利用 RP-C18 靜相管柱分離萘酚 2 種位置異構物的層析圖。從圖 5 中可知萘酚 2 種位置異構物可以達到基線分離。萘酚位置異構物滯留次序大小依序：2-萘酚<1-萘酚。

(二) 萘甲醚位置異構物的分離

類似的情況，添加 β -環糊精於甲醇與水混合溶液，利用 RP-C18 靜相管柱也無法基線分離萘甲醚 2 種位置異構物。圖 6 所示為添加 1g/L S- 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 靜相管柱分離萘甲醚 2 種位置異構物的層析圖。從圖 6 中可知 2 種分析物可達到基線分離。萘甲醚位置異構物滯留次序大小依序：1-萘甲醚<2-萘甲醚。

四、氫鍵作用力對分析物之滯留次序的影響

假設式(1-4)中， $K_G[CD]_m \gg 1$ ，則 $k' \approx \frac{k'_G}{K_G[CD]_m} + k'_G \cdot CD$ 。由此可知 K_G 增加， k' 減少。

本研究結合能(binding energy, $\Delta G_{\text{結合}}$)可以下式表示之：

$$(-\Delta G_{\text{結合}}) \cong \Delta G^\circ = -RT \ln K_G \quad (1-6)$$

而由式(1-6)可知 $\Delta G_{\text{結合}}$ 增加會造成 K_G 增加意味著 $\Delta G_{\text{結合}}$ 亦與 k' 為反向關聯。因此，如果理論計算所得之結合能之趨勢符合上述推論，則可以用理論計算所得之結果作細部分析來了解實驗結果產生之緣由。

萘酚： β -環糊精以及萘甲醚： β -環糊精對接錯合物對接計算所得之結合能列於表 1，最佳對接之萘酚： β -環糊精以及萘甲醚： β -環糊精結構分別如圖 7 與圖 8 所示。表 1 中 2-萘酚： β -環糊精之結合能(17.59 kcal/mol)大於 1-萘酚： β -環糊精之結合能(16.48 kcal/mol)，與實驗所得之萘酚滯留因數大小為反向關聯，可知較大之結合能意味著 β -環糊精可以較快的帶出分析物。1-萘甲醚： β -環糊精之結合能(17.79 kcal/mol)大於 2-萘甲醚： β -環糊精之結合能(17.23 kcal/mol)，依照前述推論 1-萘甲醚之滯留因數應小於 2-萘甲醚之滯留因數，而此推論亦符合實驗結果。

仔細分析圖 8 中之萘甲醚： β -環糊精對接結構，可以看出對接結構中的 O...H 距離相當遠(圖

8(A) 3.276Å，圖 8(B) 3.981Å)，如果以氫鍵之 O...H 鍵長要小於 2.5Å 來判斷，應該沒有氫鍵的存在。1-萘甲醚與 2-萘甲醚之-OCH₃ 皆在β-環糊精之“碗”外，如此則可以降低-OCH₃ 與環糊精因空間效應所產生之排斥作用。

分析圖 7(A)中之 1-萘酚：β-環糊精對接結構，發現其中之 O...H 距離(2.882Å)比萘甲醚：β-環糊精中之 O...H 距離短很多，但是可能也不是氫鍵；圖 7(B)之 2-萘酚：β-環糊精對接結構中之 O...H 距離 2.233Å，可以認為是氫鍵。圖 7(A)中之結構與圖 7(B)、圖 8 中之結構有很大的差異—2-萘酚之-OH 端是倒插入β-環糊精之“碗”中。從圖 7(A)中可以看出以此種方式對接是有助於形成氫鍵，同時因為萘酚之雙苯與β-環糊精“碗”內之接觸增加亦有利於增加其非鍵結(nonbonding)結合能。

1-萘甲醚：β-環糊精與 2-萘甲醚：β-環糊精之結合能差異為 0.56 kcal/mol，可以說是單純由非鍵結結合能之不同而產生，其滯留次序為 1-萘甲醚<2-萘甲醚。而造成萘酚之滯留次序為 2-萘酚<1-萘酚之原因可以說是起因於 2-萘酚：β-環糊精中具有氫鍵以及較強之非鍵結結合能，這二種因素之組合也表現於此 2 種萘酚：β-環糊精之結合能差異為 1.11 kcal/mol，大於萘甲醚系統只有非鍵結結合能之因素所造成之差異。因此推測強氫鍵作用力以及較大之非鍵結結合能在分析物的滯留次序上扮演重要角色。

肆、結論

添加 1g/L S-β-環糊精量於適當的甲醇與水混合比例當移動相，利用 RP-C18 靜相管柱可以基線分離萘酚與萘甲醚位置異構物。這兩種位置異構物的滯留因數皆會隨著甲醇含量增加而減少，其滯留次序不會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。比較萘酚與萘甲醚兩種位置異構物的結構，推測 S-β-環糊精與 2-萘酚之羥基在包藏錯合物內產生較強氫鍵作用力以及較大之非鍵結結合能，這些作用力在分析物的滯留次序上扮演重要角色。

表 1 萘酚：β-環糊精和萘甲醚：β-環糊精對接錯合物之結合能

錯合物	結合能(kcal/mol)	錯合物	結合能(kcal/mol)
1-萘酚：β-環糊精	16.48	1-萘甲醚：β-環糊精	17.79
2-萘酚：β-環糊精	17.59	2-萘甲醚：β-環糊精	17.23

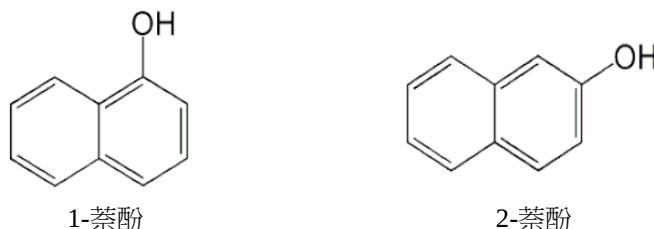


圖 1 萘酚位置異構物的結構

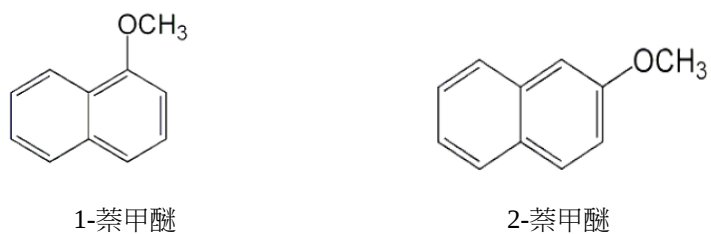


圖 2 萘甲醚位置異構物的結構

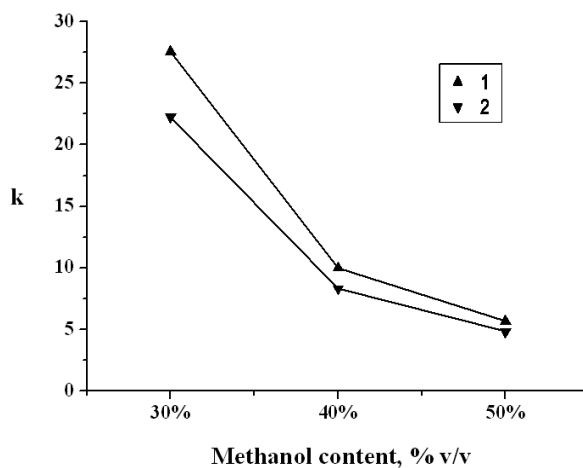


圖 3 在 1g/L S-β-環糊精的移動相中，甲醇含量與萘酚滯留因數的關係圖。

1：1-萘酚；2：2-萘酚

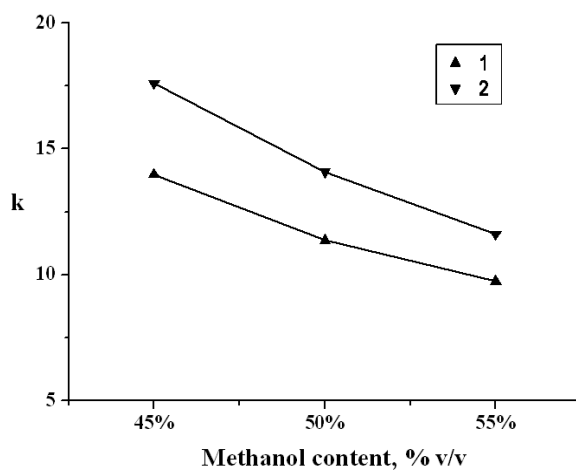


圖 4 在 1g/L S-β-環糊精的移動相中，甲醇含量與萘甲醚滯留因數的關係圖。

1：1-萘甲醚；2：2-萘甲醚

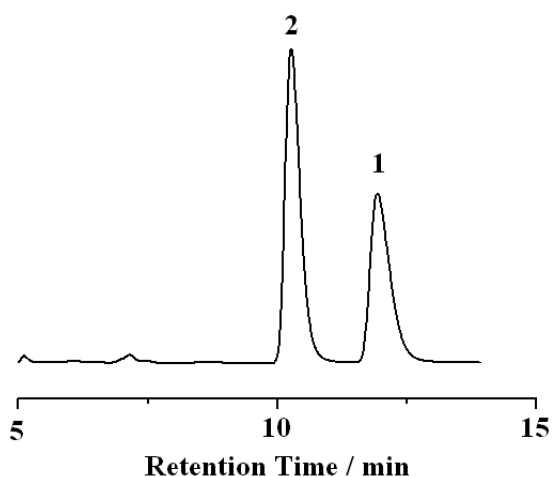


圖 5 添加 1g/L S- β -環糊精濃度於甲醇與水比例為 40 : 60 的混合溶液當移動相，利用 RP-C18 靜相管柱分離萘酚位置異構物的層析圖。
流速：2mL/min；波峰指認：1：1-萘酚；2：2-萘酚

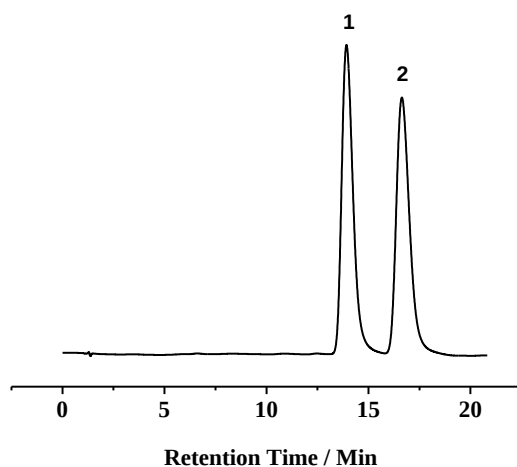


圖 6 添加 1g/L S- β -環糊精濃度於甲醇與水比例為 50 : 50 的混合溶液當移動相，利用 RP-C18 靜相管柱分離萘甲醚位置異構物的層析圖。
流速：2mL/min；波峰指認：1：1-萘甲醚；2：2-萘甲醚。

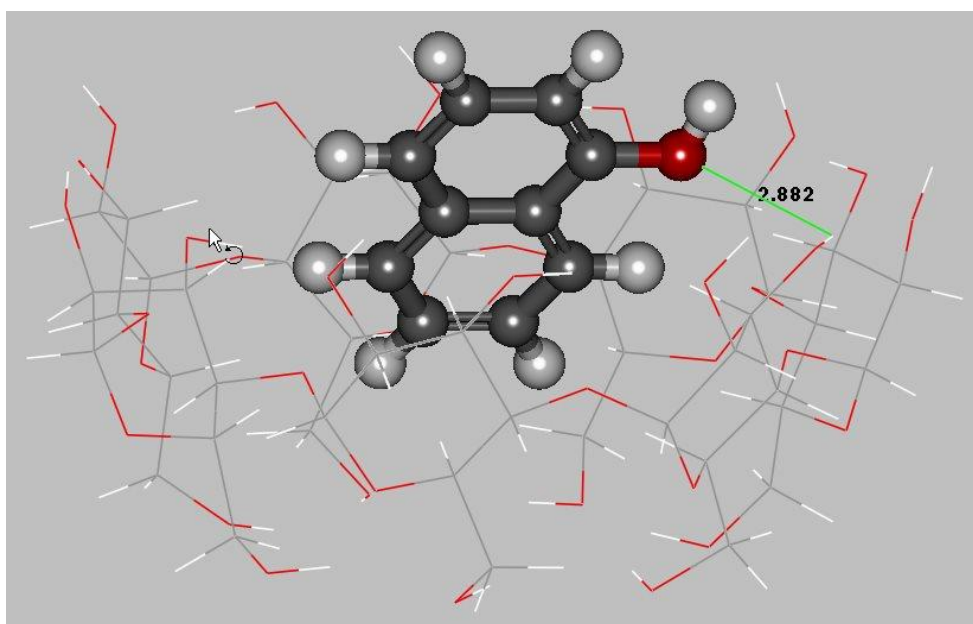


圖 7(A)

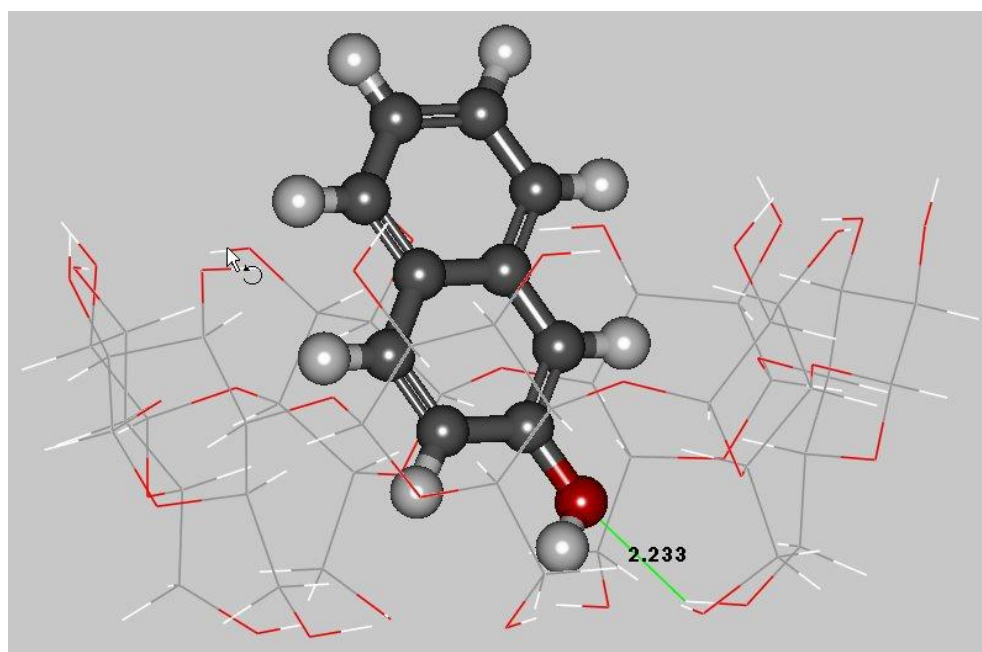


圖 7(B)

圖 7 萘酚：β-環糊精之對接結構，圖中之數值為結構中可能型成氫鍵之 O...H 距離(Å)。

(A) 1-萘酚：β-環糊精之結構；(B) 2-萘酚：β-環糊精之結構

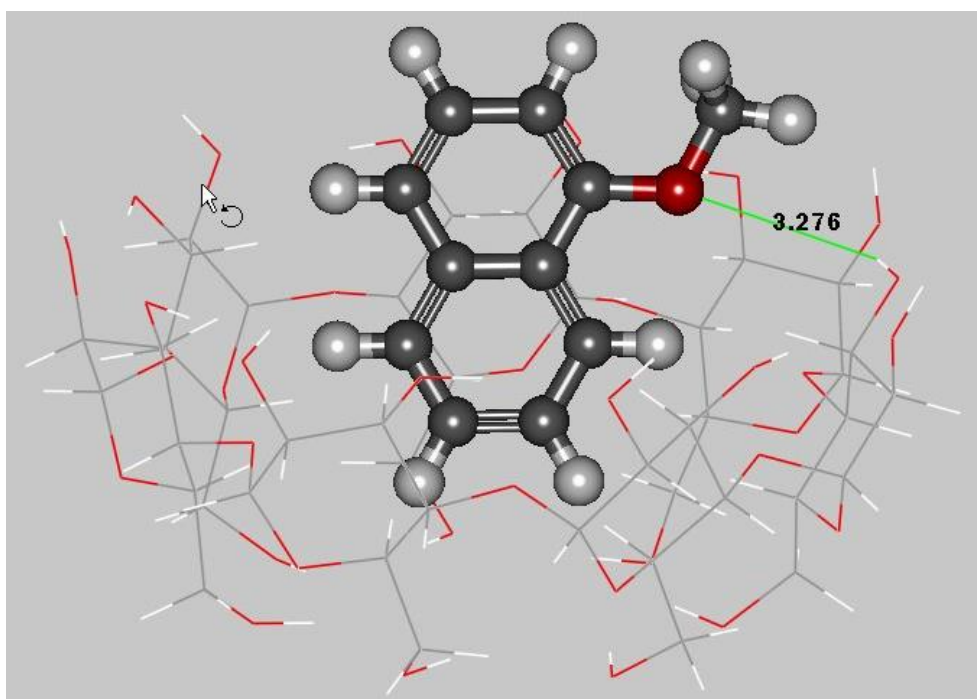


圖 8(A)

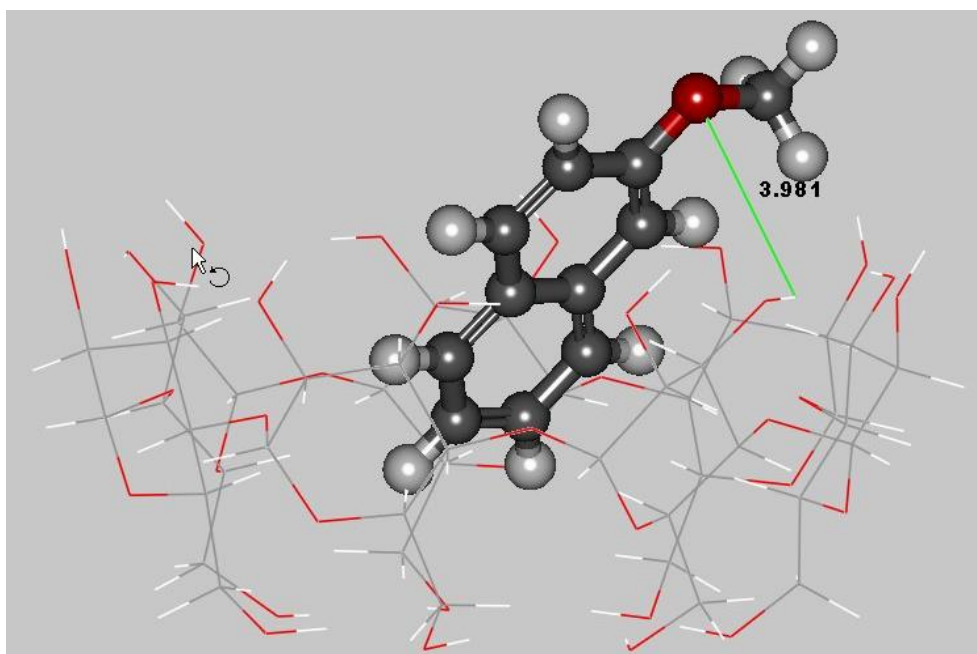


圖 8(B)

圖 8 萘甲醚： β -環糊精之對接結構，圖中之數值為結構中之 O...H 距離(Å)。

(A) 1-萘甲醚： β -環糊精之結構；(B) 2-萘甲醚： β -環糊精之結構

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

- [1] Saenger, W. (1980). Cyclodextrin inclusion compounds in research and industry. *Int. Ed. Engl*, 19, 344-362.
- [2] Smolkova-Keulemansova, E., & Krysl, S. (1980). Inclusion compounds in chromatography. *J. Chromatogr*, 184, 347-361.
- [3] Hinze, W. L. (1981). Applications of cyclodextrins in chromatography. *Sep. Purif. Methods*, 10, 159-237.
- [4] 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.
- [5] Tanaka, M., Miki, T., & Shono, T. (1985). Methylated cyclodextrins as mobile phase additives in liquid chromatography. *J. Chromatogr*, 330, 253-261.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Claude, B., Morin, P., Lafosse, M., & Andre, P. (2004). Evaluation of apparent formation constants of pentacyclic triterpene acids complexes with derivatized β - and γ -cyclodextrins by reversed phase liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1049, 37-42.
- [9] 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.
- [10] Li, G. Y., Chang, S. W., Lai, Y. S. & Lin, C. H. (2013). Separation of some isomeric monosubstituted phenols by RPLC using β -cyclodextrin as mobile phase additives. *Chia-Nan Annual Bulletin*, 39, 56-62.
- [11] 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.
- [12] 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.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] 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.
- [20] 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
- [21] 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.
- [22] Evans, C. E., Staleup, A. M. (2003). Comprehensive strategy for chiral separations using sulfated cyclodextrins in capillary electrophoresis. *Chirality*, 15, 709
- [23] Estrada, R.; Vigh, G. J. (2012). Comparison of charge state distribution in commercially available sulfated cyclodextrins used as chiral resolving agents in capillary electrophoresis. *J. Chromatogr., A*, 1226, 24.
- [24] Yu-Chih Liu, Shu-Wen Chang, Chih-Yu Chen, I-Chin Chien and Chen-Hsing Lin. (2015). Separation and determination of cold medicine ingredients by capillary zone electrophoresis using sulfated β-cyclodextrin as an electrolyte modifier and chiral selector. *J. Chin. Chem. Soc.*

62, 191-196.

[25] Dassault Systèmes BIOVIA, Discovery Studio 2.5, San Diego: Dassault Systèmes, 2005.

[26] G. Wu, D. H. Robertson, C. L. (2003). Brooks III, M. Vieth, *J. Comput. Chem*, 24, 1549-1562.

[27] B. R. Brooks, R. E. Bruccoleri, B. D. Olafson, D. J. States, S. Swaminathan, M. Karplus *J. Comput. Chem*. 1983, 4, 187-217.