

反相高效液相色谱法分离 2-(氟苯基)-5-甲基苯并恶唑和 2-(氯苯基)-5-甲基苯并恶唑的位置异构体

王 敏*

(中国科学院福建物质结构研究所, 福建 福州 350002)

摘要: 基于商品化的普通色谱柱建立了 2-(氟苯基)-5-甲基苯并恶唑和 2-(氯苯基)-5-甲基苯并恶唑邻、间、对位置异构体的分离检测方法。色谱柱为 Inertsil ODS-SP C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm), 以乙腈(A)和水(B)为流动相, 在 60%A~80%A 间线性梯度洗脱 15 min, 流速为 1.5 mL/min, 柱温 40 °C, 检测波长为 310 nm。在质量浓度为 2~200 mg/L 范围内, 2-(氟苯基)-5-甲基苯并恶唑邻、间、对位的异构体、2-(氯苯基)-5-甲基苯并恶唑邻、间、对位的异构体具有良好的线性关系, 6 种化合物的检出限(S/N=3)依次为 0.030 7、0.029 3、0.031 5、0.022 6、0.023 7、0.022 6 mg/L。该法既为 5-甲基苯并恶唑与氟苯或氯苯碳氢活化偶联反应制备的异构体混合物提供了一个快速检测的方法, 又为 2-芳基苯并恶唑类异构体的分离检测提供了参考。

关键词: 高效液相色谱; 苯并恶唑; 位置异构体; C₁₈ 柱

中图分类号: O658 文献标识码: A 文章编号: 1000-8713(2013)08-0758-05

Reversed-phase high performance liquid chromatography separation of 2-(fluorophenyl)-5-methylbenzoxazole and 2-(chlorophenyl)-5-methylbenzoxazole positional isomers

WANG Min*

(Fujian Institute of Research on the Structure of Matter, Chinese Academy of Sciences, Fuzhou 350002, China)

Abstract: The analytical method of 2-(fluorophenyl)-5-methylbenzoxazole *ortho*-, *meta*-, *para*-positional isomers and 2-(chlorophenyl)-5-methylbenzoxazole *ortho*-, *meta*-, *para*-positional isomers was developed with a commercial common liquid chromatography column. The separation was performed on an Inertsil ODS-SP C₁₈ column (250 mm×4.6 mm, 5 μm) at 40 °C with a linear gradient elution by mobile phases of acetonitrile (A) (from 60% to 80% within 15 min) and water (B) at a flow rate of 1.5 mL/min. The samples were detected by a diode array detector at 310 nm. Good linearities were obtained in the range of 2–200 mg/L for the six isomers. The limits of detection (LODs) (S/N=3) of 2-(fluorophenyl)-5-methylbenzoxazole *ortho*-, *meta*-, *para*-isomers and 2-(chlorophenyl)-5-methylbenzoxazole *ortho*-, *meta*-, *para*-isomers were 0.030 7, 0.029 3, 0.031 5, 0.022 6, 0.023 7, 0.022 6 mg/L, respectively. The method provides not only a rapid detection method for the preparation of the isomers through hydrocarbon activation coupling reaction between the 5-methylbenzoxazole and fluorobenzene or chlorobenzene but also a reference for the separation and detection of 2-arylbenzoxazole isomers.

Key words: high performance liquid chromatography (HPLC); benzoxazole; positional isomers; C₁₈ column

2-芳基苯并恶唑类化合物大多具有独特的生理活性和强烈的荧光, 在杀菌防腐^[1-4]、抗肿瘤^[5]、染

料^[6]、荧光增白^[7-9]等领域有着广泛的应用, 因而对其合成方法有许多研究^[10-12], 其中 Pd 催化的苯并

* 通讯联系人. Tel: (0591) 83792585, E-mail: wangmin04@fjirsm.ac.cn.

收稿日期: 2013-01-14

恶唑和芳香化合物的碳氢活化偶联反应是制备该类化合物的新方法^[13]。该方法原料便宜易得、步骤简单、原子经济性高,具有广阔的应用前景。但当使用带有取代基的芳香化合物作底物时,反应会同时生成邻、间、对 3 种位置异构体,这些位置异构体既具有相似或相近的物理和化学性质,又时常具有不同的特性,这些特性可影响该类化合物在应用领域的实用价值、使用寿命以及稳定性。因此,为获取异构体化合物的单一特性,合成预期单一构型异构体尤为重要;建立一套快速高效的分析方法来指导合成优化过程、评估单一构型异构体的纯度具有重要意义。

目前,关于位置异构体的分离虽已有许多文献报道,但大多都是采用自制的性能独特的色谱柱来完成的^[14-17],基于商品化的普通色谱柱的报道较少^[18-22]。为此,我们研究了使用普通商品化的色谱柱分离检测 2-(氟苯基)-5-甲基苯并恶唑 3 种位置异构体和 2-(氯苯基)-5-甲基苯并恶唑 3 种位置异构体(结构式如图 1)的方法。

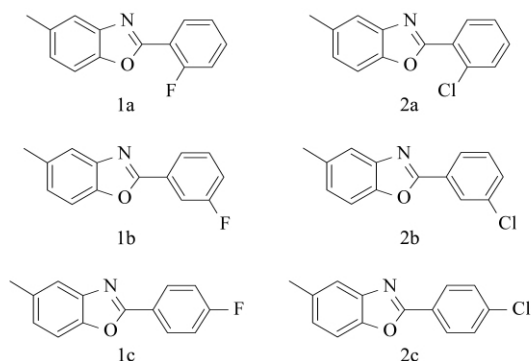


图 1 2-(氟苯基)-5-甲基苯并恶唑和 2-(氯苯基)-5-甲基苯并恶唑位置异构体的结构式

Fig. 1 Structures of 2-(fluorophenyl)-5-methylbenzoxazole and 2-(chlorophenyl)-5-methylbenzoxazole isomers

1 实验部分

1.1 仪器、试剂与材料

LC-20AD 高效液相色谱仪(日本岛津公司,包括二元高压梯度泵、20 μ L 手动进样器、二极管阵列检测器以及岛津公司的 LCsolution 色谱工作站);电子天平 ALC-110.4(赛多利斯科学仪器有限公司,精确度为万分之一)。

甲醇、乙腈、正己烷、异丙醇为 HPLC 纯(德国默克公司);水为二次蒸馏水;2-(氟苯基)-5-甲基苯并恶唑和 2-(氯苯基)-5-甲基苯并恶唑的位置异构体标准样品根据文献^[11]报道的方法合成,实测异构体样品由钯催化的 5-甲基苯并恶唑和氟苯或氯苯碳

氢活化偶联反应制备^[13]。

1.2 溶液的配制

标准溶液的配制:称取 2-(氟苯基)-5-甲基苯并恶唑的邻位、间位和对位的标准样品各 20 mg,分别用 10 mL 乙腈溶解后转移至 100 mL 的容量瓶中,用 60%(v/v)的乙腈水溶液稀释至刻度,摇匀,获取每个样品质量浓度均为 200 mg/L 的样品标准溶液。以此为标准储备液,分别取 1、5、10、50 mL 标准储备液,用 60%(v/v)的乙腈水溶液稀释后定容于 100 mL 的容量瓶制得 2、10、20、100 mg/L 的 2-(氟苯基)-5-甲基苯并恶唑异构体标准溶液;同样方法配制获得 2、10、20、100、200 mg/L 的 2-(氯苯基)-5-甲基苯并恶唑邻位、间位和对位异构体的标准溶液。

实测样品溶液的配制:取偶联反应制备的 2-(氟苯基)-5-甲基苯并恶唑和 2-(氯苯基)-5-甲基苯并恶唑异构体各 5 mg,分别用 10 mL 乙腈溶解后,摇匀,作为待测样品。

1.3 定量方法

将配制的样品溶液经孔径为 0.22 μ m 的微孔滤膜过滤,精密量取 20 μ L 注入液相色谱仪,记录色谱图。按外标法以峰面积计算各个异构体的浓度。

1.4 色谱条件

色谱柱:Inertsil ODS-SP C₁₈ 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m);流动相:乙腈(A)和水(B),60%A~80%A(v/v)间线性梯度洗脱 15 min;流速:1.5 mL/min;检测波长:310 nm;进样量:20 μ L;柱温:40 $^{\circ}$ C;数据采集和处理采用岛津公司的 LCsolution 工作站。

2 结果与讨论

2.1 仪器分析条件的优化

配制一定浓度的 2-(氟苯基)-5-甲基苯并恶唑或 2-(氯苯基)-5-甲基苯并恶唑异构体混合溶液,通过优化色谱条件研究两组同分异构体的分离条件,实验结果见图 2。

首先选用硅胶正相柱(Hypersil silica 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m))来考察对两组同分异构体的分离效果,结果发现两组异构体的保留时间都很短(< 5 min),不能被分离(如图 2 中 F-I, CH-I 所示)。推测原因可能是异构体的极性小,与强极性的正相柱固定相作用力微弱,以致异构体结构上的细微差异不能被识别。因此需换用非极性固定相的色谱柱,增加固定相与分离物之间的作用力,延长保留时

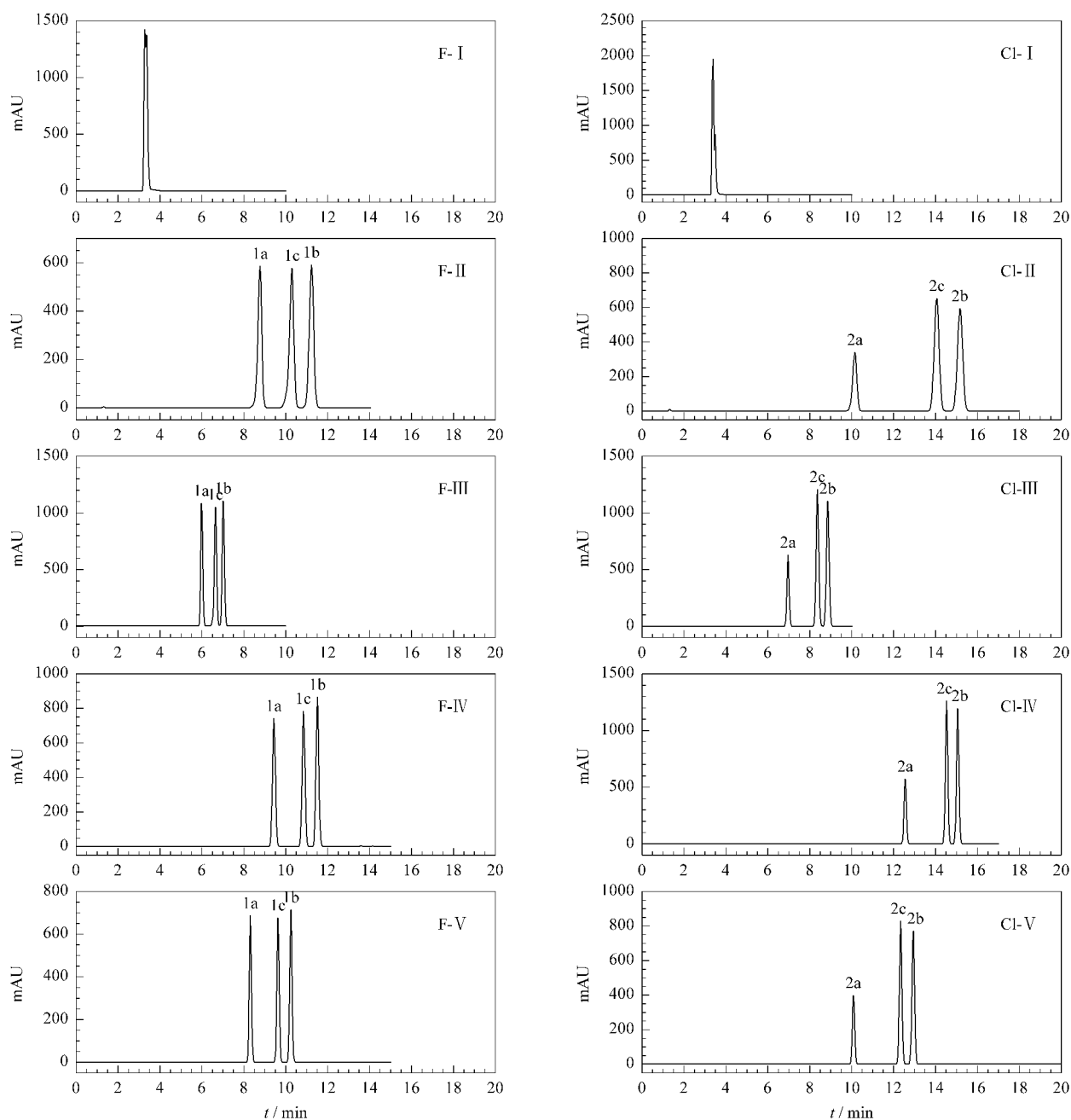


图 2 不同色谱条件下 2-(氟苯基)-5-甲基苯并恶唑和 2-(氯苯基)-5-甲基苯并恶唑位置异构体混合物的色谱图
 Fig. 2 Chromatograms of 2-(fluorophenyl)-5-methylbenzoxazole and 2-(chlorophenyl)-5-methylbenzoxazole isomers under different chromatographic conditions

Columns: F-I and Cl-I, Hypersil silica (250 mm×4.6 mm, 5 μm); F-II—F-V and Cl-II—Cl-V, Inertsil ODS-SP C₁₈ (250 mm×4.6 mm, 5 μm). Detection wavelength: 310 nm. Mobile phases were as follows: F-I and Cl-I, hexane/*i*-PrOH (volume ratio of 95/5) with a flow rate of 1.0 mL/min; F-II and Cl-II, methanol/water (volume ratio of 90/10) with a flow rate of 1.0 mL/min; F-III and Cl-III, acetonitrile/water (volume ratio of 80/20) with a flow rate of 1.0 mL/min; F-IV and Cl-IV, acetonitrile/water (volume ratio of 60/40→90/10) with a flow rate of 1.0 mL/min; F-V and Cl-V, acetonitrile/water (volume ratio of 60/40→80/20) with a flow rate of 1.5 mL/min.

The peaks are the same as the Nos. in Fig. 1.

间,于是选用经典的非极性反相色谱柱 Inertsil ODS-SP C₁₈柱。结果发现分离效果有明显的改善,继续通过改变流动相优化分离条件,发现 CH₃OH/H₂O 体系和 CH₃CN/H₂O 体系都可以达到分离的目的,但是 CH₃OH/H₂O 体系的保留时间较长,峰形变宽,对称性较差(如图 2 中 F-II、Cl-II 所示);而

CH₃CN/H₂O 体系的极性相对较小,保留时间短、峰形窄、对称性好(如图 2 中 F-III、Cl-III 所示)。选用 CH₃CN/H₂O 作流动相,进一步优化 CH₃CN/H₂O 体系中 CH₃CN 的比例,发现两组异构体在 60%A~90%A(v/v)梯度条件下比在 80%A(v/v)等度条件下的分离度有较大提升(如图 2 中 F-IV、Cl-IV 所

示)。为了进一步提高分离度,通过调大流动相的极性,同时调高流速来缩短出峰时间、减小峰宽,结果在 60%A~80%A(v/v)梯度洗脱 15 min,流速 1.5 mL/min 条件下得到更好的分离效果(如图 2 中 F-V、CF-V 所示)。在此条件下,Inertsil ODS-SP C₁₈ 柱对 2-(氟苯基)-5-甲基苯并恶唑和 2-(氯苯基)-5-甲基苯并恶唑异构体混合物在多个色谱条件下都能给出满意的分离结果(分离度均大于 1.5,最佳色谱条件下 1b 和 1c 的分离度达到最大 2.75,2b 和 2c 的分离度达到最大 2.46),非常适合两组异构体的分离,并且分析时间较短,效率高。

通过 PDA 检测器全波段扫描发现该系列化合物在 310 nm 有最大吸收,故选用 310 nm 作为检测波长。

由此得到分离 5-甲基苯并恶唑与氟苯或氯苯偶联反应所得异构体混合物的最佳色谱条件(见 1.4 节)。

2.2 线性范围与检出限

用标准样品测得两组共 6 种异构体在质量浓度为 2~200 mg/L 时峰面积与质量浓度的线性关系;以流动相为空白,信噪比为 3:1 时求出各自的检出限,结果见表 1。

表 1 2-(氟苯基)-5-甲基苯并恶唑和 2-(氯苯基)-5-甲基苯并恶唑 6 种异构体的线性回归方程、相关系数 (r) 与检出限 (LOD)

Table 1 Regression equations, correlation coefficients (r) and detection limits (LOD) of 2-(fluorophenyl)-5-methylbenzoxazole and 2-(chlorophenyl)-5-methylbenzoxazole isomers

Compound	Regression equation	r	LOD/(mg/L)
1a	S=48290.8C+49900.6	0.9999	0.0307
1b	S=54992.4C+53688.6	0.9999	0.0293
1c	S=50269.1C+57203.0	0.9998	0.0315
2a	S=30155.1C+37552.3	0.9997	0.0226
2b	S=63836.0C+94233.4	0.9996	0.0237
2c	S=66956.2C+99632.1	0.9996	0.0226

The compounds are the same as the Nos. in Fig. 1. S: peak area; C: mass concentration, mg/L.

表 2 实测样品中 2-(氟苯基)-5-甲基苯并恶唑和 2-(氯苯基)-5-甲基苯并恶唑异构体的含量测定结果

Table 2 Results of the content determination of 2-(fluorophenyl)-5-methylbenzoxazole and 2-(chlorophenyl)-5-methylbenzoxazole isomers in real reaction systems

Compound	Mass concentration/(mg/L)	Percentage in isomers/%	Ratio of isomers/%	Ratio of isomers in Ref ^[13]
1a	41.11	16.5	1	1
1b	45.11	18.1	1.10	1.15
1c	162.80	65.4	3.96	4
2a	0	0	0	0
2b	31.07	58.9	1.43	1.4
2c	21.72	41.1	1	1

The peaks are the same as the Nos. in Fig. 1.

2.3 实测样品分析结果

在 1.4 节色谱条件下,对 1.2 节所制备的实测样品溶液用 60% 的乙腈水溶液稀释至 2~200 mg/L 质量浓度范围内,进样测定,结果见图 3 和图 4。测试结果得出,合成的样品中并未检测出有 5-甲基苯并恶唑与氯苯偶联反应所得的邻位异构体产物(2a),5-甲基苯并恶唑与氟苯或氯苯偶联反应所得的产物中邻、间、对位异构体的比例(1a:1b:1c=1:1.1:3.96,2b:2c=1.43:1)与文献^[13]中利用核磁测试的结果(1a:1b:1c=1:1.15:4,2b:2c=1.4:1)基本一致(见表 2)。

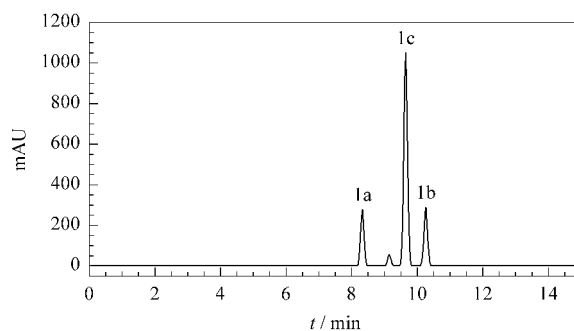


图 3 2-(氟苯基)-5-甲基苯并恶唑异构体实测样品的色谱图
Fig. 3 Chromatogram of 2-(fluorophenyl)-5-methylbenzoxazole isomers in real reaction system

The peaks are the same as the Nos. in Fig. 1.

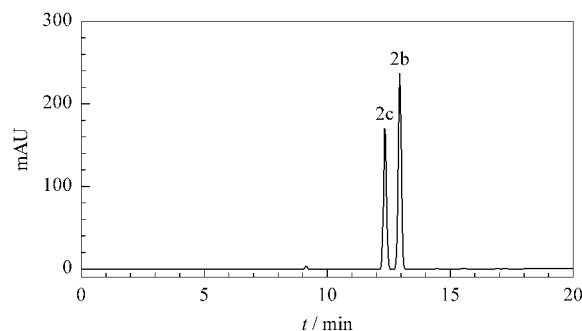


图 4 2-(氯苯基)-5-甲基苯并恶唑异构体实测样品的色谱图
Fig. 4 Chromatogram of 2-(chlorophenyl)-5-methylbenzoxazole isomers in real reaction system

The peaks are the same as the Nos. in Fig. 1.

3 结论

本研究探索了 2-(氟苯基)-5-甲基苯并恶唑和 2-(氯苯基)-5-甲基苯并恶唑位置异构体在普通商品化色谱柱上的分配行为,建立了有效的分离检测方法。方法简单可靠、准确可行,既为通过碳氢活化偶联反应制备 2-芳基苯并恶唑类化合物提供了一个快速检测同分异构体的方法,又为具有广泛应用的 2-芳基苯并恶唑类异构体的分离检测提供了参考。

参考文献:

- [1] Vinsova J, Cermakova K, Tomeckova A, et al. *Bioorg Med Chem*, 2006, 14(17): 5850
- [2] Lokwani P, Nagori B P, Batra N, et al. *J Chem Pharm Res*, 2011, 3(3): 302
- [3] Prajapat R P, Soni B, Bhandari A, et al. *Pharm Lett*, 2011, 3(3): 161
- [4] Shrivastava B, Sharma V, Lokwani P. *Pharmacologyonline*, 2011, 1: 236
- [5] Kumar D, Jacob M R, Reynolds M B, et al. *Bioorg Med Chem*, 2002, 10(12): 3997
- [6] Xia T, Meng Q H, Geng Y C, et al. *Dyestuffs and Coloration* (夏天, 孟庆华, 耿彦朝, 等. 染料与染色), 2007, 44(6): 37
- [7] Xiao J P, Zhu B J, Shi Z Q, et al. *Dyestuffs and Coloration* (肖锦平, 竹百均, 石赵泉, 等. 染料与染色), 2008, 45(5): 20
- [8] Ge G Z. *Textile Auxiliaries* (葛广周. 印染助剂), 2010, 27(1): 4
- [9] Ge G Z, Zhou Y. *Dyestuffs and Coloration* (葛广周, 周贇. 染料与染色), 2011, 48(1): 39
- [10] Kumar R V. *Asian J Chem*, 2004, 16(3/4): 1241
- [11] Kumar A, Maurya R A, Saxena D. *Mol Divers*, 2010, 14(2): 331
- [12] Bala S, Saini M, Kamboj S. *Int J ChemTech Res*, 2011, 3(3): 1102
- [13] Wu G, Zhou J, Zhang M, et al. *Chem Commun*, 2012, 48(71): 8964
- [14] Pino V, Afonso A M, Gonzalez V, et al. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2003, 26(1): 1
- [15] Mauri-Aucejo A R, Llobat-Estelles M, Escarti-Carrasco M, et al. *Anal Lett*, 2006, 39(1): 183
- [16] Schurenkamp J, Beike J, Pfeiffer H, et al. *Int J Legal Med*, 2011, 125(1): 95
- [17] Qiu H D, Mallik A K, Takafuji M, et al. *Anal Chim Acta*, 2012, 738: 95
- [18] Chen P R, Zhang M J. *J Chromatogr A*, 1997, 773(1/2): 365
- [19] Liang Y C, Yi Z Z, Cai Z H, et al. *Chinese Journal of Chromatography* (梁奕昌, 义志忠, 蔡志虹, 等. 色谱), 1999, 17(4): 397
- [20] Narvekar M S, Srivastava A K. *J Liq Chromatogr Relat Technol*, 2003, 26(1): 85
- [21] Nunes I L, Mercadante A Z. *Rev Bras Cienc Farm*, 2006, 42(4): 539
- [22] Suzuki Y, Miseki K, Shimma S, et al. *Bunseki Kagaku*, 2007, 56(3): 191