对-叔丁基杯[4]芳烃键合固定相的制备及表征

李文智^{1,2},王 霞¹,张红丽¹,李永民¹,马春林¹,陈立仁¹

(1. 中国科学院兰州化学物理研究所,甘肃 兰州 730000; 2. 聊城大学 化学化工学院,山东 聊城 252059)

摘 要: 合成了对-叔丁基杯[4]芳烃高效液相色谱键合固定相,分离了多环芳烃、硝基苯胺位置异构体、苯 甲酸酯、邻苯二甲酸酯和苯的单官能团化合物;比较了在不同的流动相中分析物的保留行为,发现该键合相 具有明显的反相特征,对位置异构体的分离优于 C₁₈ 柱,并讨论了可能的分离机理。 关键词:固定相;高效液相色谱;杯[4]芳烃 **中图分类号**: O657.72 **文献标识码**: A **文章编号**: 1004 - 4957(2004)01 - 0019 - 04

Preparation and Characterization of p-tert-Butyl-calix[4]arene-bonded Silica Cel Stationary Phase by High Performance Liquid Chromatography

LI Wen-zhi^{1,2}, WANG Xia¹, ZHANG Hong-li¹, LI Yong-min¹, MA Chun-lin¹, CHEN Li-ren¹

(1. Lanzhou Institute of Chemical Physics, the Chinese Academy of Sciences, Lanzhou 730000, China;

2. School of Chemistry and Chemical Engineering, Liaocheng University, Liaocheng 252059, China)

Abstract: A new calix[4] arene-bonded silica gel stationary phase was prepared by modifying silica gel with 3-aminopropyltriethoxysilane and then coupling with p-tert-butyl-calix[4] arene ester. The chromator graphic behaviors of polycyclic aromatic hydrocarbons, positional isomers of nitroaniline, benzoic esters, phthalic esters and some monofunctional compounds of benzene were described. A comparison with converr tional reversed-phase C₁₈ columns showed that it possesses a predominant reversed-phase character and an obvious priority for separation of positional isomers. The possible separation mechanism was investigated. Key words: Stationary phase; Liquid chromatography; Calix[4]arene

杯芳烃是由苯酚单元通过亚甲基在羟基的邻位桥联而形成的一类环状低聚物,因其分子的形状 酷似希腊圣杯而得名[1]。 它具有圆锥形内腔, 与冠醚和环糊精一样可以作为分子接受体, 通过非共 价键与离子或中性分子形成可逆的配合物,所以它几乎是冠醚和环糊精的结合体,是超分子化学中 第三代主体分子的杰出代表^[2]。杯芳烃与冠醚和环糊精相比,不仅其毒性小,而且原料易得,分子 '空腔大小可调, 又具有多种构象, 对其上缘和下缘修饰后可得到种类繁多的超分子化合物。 因此增 加了人们把其共价键合到硅胶上用于色谱分离的兴趣。 把杯芳烃应用于色谱分离,已有文献报导。 Park 等^[3]以杯[6]芳烃-对-磺酸盐作为流动相添加剂,反相分离了单取代苯酚的位置异构体,并指明 分离是基于分离溶质和添加剂形成主 - 客体包结物的稳定性差异; 但添加剂本身在紫外区域的强烈 吸收降低了紫外检测的灵敏度、另外它较差的溶解性也阻碍了在水相洗脱剂中作为添加剂的应用。 因此,发展杯芳烃的化学键合固定相,其优势就在于分析物的紫外吸收不至于被杯芳烃的强吸收所 掩盖。 Genon 等^[4] 以功能化的杯[4] 芳烃键合硅胶固定相 HPLC 对碱金属离子的选择性分离进行了 ·研究,发现对 № ⁺有很高的分离选择性;他们^[5]还报导了1种官能化的杯[4]芳烃键合到巯丙基硅胶 上 , 对碱金属离子 、碱土金属离子以及氨基酸酯进行了很好的分离 。 Friebe 等 ^[6] 把对 - 叔丁基杯 [4] 芳烃键合到硅胶上,HPLC分离了二取代芳胺位置异构体及肽、核苷和二肽与脯氨酸的混合物,发现 位置异构体的分离结果与在 - CD 键合固定相 HPLC 分离结果不同。 Da S-L 等¹⁷把部分官能化的对-叔丁基杯[4]芳烃键合到 - (乙二氨基)丙基硅胶上, HPLC分离了多环芳烃、核苷及其碱。

我们按 Gutsche CD 优化的方法^[8] 合成了对- 叔丁基杯 [4] 芳烃, 对其下缘全官能化修饰后共价键 合到氨丙基硅胶上, HPLC 分离了多环芳烃、苯甲酸酯、邻苯二甲酸酯、硝基苯胺的位置异构体及同碳 数的苯单官能团化合物, 发现该固定相具有明显的反相特征, 并对可能的分离机理进行了探讨。

收稿日期: 2003 - 01 - 14; 修回日期: 2003 - 11 - 05

作者简介:李文智(1963-),男,山东聊城人,博士研究生;陈立仁,联系人.

1 实验部分

20

1.1 试剂与样品

硅胶的粒径为 5 µm, 比表面积为 150 m²/g, 由本实验室合成; 氨丙基三乙氧基硅烷(购自武汉天 目公司); 对-叔丁基杯[4]芳烃由本实验室合成(未进一步纯化); 甲醇、乙腈(分析纯, 天津化学试剂 二厂); 磷酸二氢钠、多环芳烃及芳烃衍生物等均为分析纯, 试样用甲醇或乙腈溶解。

1.2 仪器

Waters 高效液相色谱系统包括 515 泵, 2487 双波长紫外检测器和 Millennium³² 色谱工作站等; 元素分析在 Vaivo Element 上进行; 红外光谱用 Bruker FT-IR 光谱仪测定。

1.3 **键合相的制备**

取干燥的硅胶 10 g, 加入 10 mL 氨丙基三乙氧基硅烷, 加入 50 mL 干燥的甲苯, N₂保护回流 24 h; 过滤, 用温热的甲苯、丙酮、甲醇和水依次洗涤, 60 真空干燥 12 h 得氨丙基硅胶。 对-叔丁基杯 [4]芳烃按 Gutsche^[8]优化的方法合成, 然后在 NaH的存在下, 以 THF 作溶剂与溴乙酸乙酯反应^[9], 水解^[10], 酰氯化^[11]再共价键合到氨丙基硅胶上(合成路线如图 1)。



Fig. 1 Synthesis of the *p- tent-* butyl-calix[4]arene-bonded silica gel stationary phase
() HCHO, NaOH, phenyl ether, reflux for 3 h; () BrCH₂COOC₂H₅, NaH, THF, reflux for 1 h;
() ethanol, NaOH, reflux for 24 h; () SOCl₂, reflux for 4 h; () N(C₂H₅)₃, -aminopropyl bonded silica gel, N₂, room temperature for 48 h

2 结果与讨论

2.1 对-叔丁基杯[4]芳烃键合固定相的表征

氨丙基硅胶及键合相的元素分析结果为:氨丙 基硅胶 C 6.00%, H 2.56%, N 2.15%; 杯芳烃键合 相 C 9.87%, H 2.83%, N 1.39%。图2和3分别为 它们的红外光谱图。

由图 2和 3 可以看出在 3 600~ 3 700 cm⁻¹几乎没有 硅羟基的特征吸收,而在 3 418 cm⁻¹处有 1 个宽的吸收 带,这是氨基的吸收。在 2 967 cm⁻¹处应为 C—H 键的 伸缩振动; 1 650 cm⁻¹处是苯环和羰基的混合峰,一般 羰基的强吸收往往会掩盖苯环的特征吸收峰; 在指纹 区,四取代的苯环的特征吸收峰较弱(因为苯环上仅 有两个不相邻的氢,在 900~ 800 cm⁻¹范围内呈现弱 的宽峰),但对比图 2和 3 仍可发现在 803 cm⁻¹左右 吸收峰得到加强。由此可以看出,在氨丙基硅胶上 键合了杯芳烃,成功地制备了对-叔丁基杯[4]芳烃 的键合固定相。



图 2 3- 氨丙基硅胶的红外光谱图





图 3 对-叔丁基杯[4]芳烃键合相的红外光谱图 Hg. 3 IR spectrum of the new *p-tent*-butyl-calix[4] arene-bonded silica gel stationary phase

2.2.1 多环芳烃的色谱行为 图 4 为 9 种芳烃以乙腈 -水作为洗脱剂,在对-叔丁基杯[4]芳烃键合固定相上的 分离色谱图。 它们的洗脱顺序与在反相 C18 柱上的基本 相同,可以推测分析物的疏水性作用在分离过程中扮演 了很重要的角色;分析物与固定相之间的 CH₃- 、 -作用也对它们的分离有关键的影响,也就是说杯芳烃"上 缘"对芳烃不同的识别,导致了分析物保留的不同而得以 分离。其中菲和蔥在该条件下未见分离;改用甲醇-水 作为流动相, 2-甲基萘与联苯未达基线分离, 菲和蒽仅有 部分分离,这反映了流动相对分析物的选择性差异。 2.2.2 对邻苯二甲酸酯的分离 首次采用对-叔丁基杯 [4]芳烃键合固定相,分离了邻苯二甲酸酯,在该条件下 达到了基线分离(见图 5)。 可从两方面进行推测^[12,13]: 如果杯[4]芳烃的上缘对分析物的苯环端产生包结作用, 因分析物分子酯基末端的烃氧基疏水性有明显的差异而 得以分离;另外,如果疏水性的内腔对分析物酯的烃基 端有识别作用,强弱顺序应为—CH₃<—CH₂CH₃<— CH₂CH₂CH₂CH₃ < — CH₂CH₂CH₂CH₂CH₃, 所以邻苯二甲酸 二甲酯先洗脱;对于环己基,其体积大于正戊基,杯[4] 芳烃对它的包结作用更强 , 其疏水性也大于其它 4 种烃 基,所以最后洗脱。同样的条件下,苯甲酸酯的洗脱顺 序与上述相似,保留值为甲酯 <乙酯 <(丙酯) <丁酯 <苯酯,分离色谱图见图 6。实验还发现如果用甲醇-水代替乙腈 - 水作为洗脱剂, 出峰顺序虽与之相同, 但 是峰变宽 , 尤其丁酯 、戊酯 、环己酯及苯酯特别严重 。 这种现象应是分析物和固定相的作用与洗脱剂和固定相 的作用相互竞争的结果。

2.2.3 对硝基苯胺位置异构体的分离 图 7 为邻、间和 对-硝基苯氨的分离色谱图,它们的保留为间 < 对 < 邻, 在对-叔丁基杯[6]芳烃和对-叔丁基杯[8]芳烃键合的 HPLC固定相上,实验发现其洗脱顺序均与之相同,仅仅 保留值不同而已。同样的条件下在 ODS 柱上的洗脱顺序 为对位、间位、邻位^[10]。这暗示着杯芳烃的疏水性内腔 对分析物的包结作用对洗脱产生了影响。 另外,如果改 用水(NaH₂PO₄, 0.02 mol/L, pH = 3.5) - 乙腈(体积比 70 30)作为流动相,邻与间位异构体则难以分离。

2.2.4 对单官能团取代苯的分离 选择甲苯同碳数的 化合物来考察杯芳烃键合固定相的选择性。 从图 8 中可 看出,键合相对分析物也表现出明显的反相特征,亲水 性强的分析物先被洗脱。按极性考虑,似乎苯甲酸应最 先被洗脱,但实际上是落后于苯甲醇,但先于苯甲醛和 苯甲醚洗脱。这可能是由于杯芳烃键合相中存在着 — NH⁻,与苯甲醇相比,苯甲酸与之有较强的氢键作用。

7



图 4 多环芳烃的分离色谱图

Fig. 4 Typical chromatogram of a mixture of PAHs
Mobile phase: acetonitrile - water(40 60 by volume);
flow rate: 1.0 mL/ min, 1. benzene, 2. toluene, 3. xy-lene, 4. naphthalene, 5. 2- methyl - naphthalene, 6. biphenyl, 7. phenanthrene, 8. anthracene, 9. pyrene





Hg. 5 Chromatogram of a mixture of phthalic esters Mobile phase: acetonitrile - water(40 60 by volume); flow rate: 1.0 mL/ min; 1. methyl phthalate, 2. ethyl phthalate, 3. *n*-butyl phthalate, 4. *n*-amyl phthalate, 5. cyclohexyl phthalate



图 6 苯甲酸酯的分离色谱图

Hg. 6 Chromatogram of a mixture of benzoic esters
Mbbile phase: acetonitrile - water(40 60 by volume); flow
rate: 1.0 mL/min; 1. methyl benzoate, 2. ethyl benzoate,
3. *n*-butyl benzoate, 4. phenyl benzoate



图 7 间, 对和邻-硝基苯胺的色谱图 Fig. 7 Chromatogram of *m*, *p* and *o*-nitroanilies

所以,该洗脱顺序应该是包结作用、疏水性作用和氢键 作用相互竞争总的结果。这种现象在杯[6]芳烃键合相 上也有发现(苯甲酸后于苯甲醇和苯甲醛洗脱),有待作 进一步的研究。

3 结 论

22

本文利用自制的对-叔丁基杯[4]芳烃键合固定相考 察了多种类型分析物的保留行为,首次在该固定相上分 离了邻苯二甲酸酯类和甲苯的同碳数芳香化合物,并对 分析物在甲醇-水与乙腈-水流动相中的洗脱行为进行 了比较。发现该固定相具有显著的反相特征,分析物 的保留主要受杯芳烃上缘对其包结识别的强弱所控制, 甲醇与乙腈对分析物有明显不同的选择性。另外,固 定相的键合量和柱效不高,是今后需要解决的问题,以 便用于其它分析物的分离研究。



图 8 苯的单官能团取代物的分离色谱图 Fig. 8 Chromatogram of derivatives of toluene Mobile phase: 0.02 mol/L NaHePO4(pH 3.5) water acetonitrile(70 30 by volume); flow rate: 1 mL/min; 1. benzoic alcohol, 2. benzoic acid, 3. benzaldehyde, 4. methyl phenate

参考文献:

- GUTSCHE C D, MUTHUKRISHNAN R. Calixarenes. 1. Analysis of the product mixtures produced by the base- catalyzed condensation of formaldehyde with para-substituted phenols[J]. J Org Chem, 1978, 43: 4905 - 4906.
- [2] SHINKAI S. Calixarenes the third generation of supermolecules[J]. Tetrahedron, 1993, 49(40): 8933 8968.
- [3] PARKJ H, LEE Y K, CHEONG N Y, *et al.* Reversed phase liquid chromatographic separation of some mono- substituted phenols with calix[6]arene- *p*-sulfonate- modified eluents[J]. Chromatographia, 1993, 37(3 4): 221 223.
- [4] CLENNON J D, HORNE E, HALL K, et al. Chromatographic selectivity for amino acid ester and alkali metal ions on a silica bonded calix[4]arene tetraester stationary phase[J]. Anal Proc Incl Anal Commun, 1994, 31(1): 33 - 35.
- [5] GLENNON J D, HONNE E, HALL K, et al. Silica-bonded calixarenes in chromatography . Chromatographic retention of metal ions and amino acid ester hydrochlorides[J]. J Chromatogr, A, 1996, 731: 47 - 55.
- [6] FRIEBES, GEBAUERS, KRAUSS GJ, et al. HPLC on calixarene bonded silica gels. Characterization and applications of the p- ten-butyl-calix[4] arene bonded material [J]. J Chromatographic Science, 1995, 33: 281 284.
- [7] XU W, LIJ S, DA S L, et al. Preparation and characterization of p-tent-butyl-calix[6] arene-bonded silica gel stationary phase for high-performance liquid chromatography[J]. Chromatographia, 1998, 48(3 - 4): 245 - 250.
- [8] GUTSCHE C D, DHAWAN B, NO K H, et al. Calixarenes. 4. The synthesis, characterization, and properties of the calixarenes from p- tert-butylphenol[J]. J Am Chem Soc, 1981, 103: 3782 - 3792.
- [9] IWAMOTO K, SHINKAI S. Synthesis and ion selectivity of all conformational isomers of tetra kis((et hoxycarbony1) met hoxy) calix[4]arene[J]. J Org Chem, 1992, 57(26): 7066 7073.
- [10] GEBARER S, FRIEBE S, GÜBITZ G, et al. High performance liquid chromatography on calixarene-bonded silica gels. Separations of region - and stereoisomers on p- ten-butyl-calix[n] arene phases[J]. J Chromatogr Sci, 1998, 36: 383 - 387.
- [11] XIAO Y X, XIAO X Z, FENG Y Q, et al. HPLC of some nuclesides and bases on p- ten-butyl-calix[6]arene-bonded silica gel stationary phase[J]. J Liq Chrom & Rel Technol, 2001, 24(19): 2925 - 2942.
- [12] MANDOLINIL, UNGARO R. Calixarenes in Action[B]. London: Imperial College Press, 2000. 37 61.
- [13] 刘 育, 尤长城, 张衡益. 超分子化学[B]. 天津: 南开大学出版社, 2001. 333 338.