

## ノート

## 高速液体クロマトグラフィーによる芳香族スルホン酸塩の分離\*

大城博伸, 佐藤宗衛, 大野幸雄\*\*

## 1 緒言

芳香族スルホン酸及びその塩は、界面活性剤の原料や各種染料の出発原料として広く用いられており、これらの物品は組成及び用途により関税率表上の取扱いが異なるため、その輸入に際しては成分並びに單一性の確認が必要となっている。

スルホン酸及びその塩は、その強いイオン性と難揮発性のため直接的分離が困難であり、これまでには、対応する親油基成分<sup>1)</sup>あるいは揮発性化合物<sup>2)</sup>への誘導化を必要とした。しかし、これらの方法は前処理に時間を要する他、親油基成分を対象としている分析法においては、スルホン基の数の違いからなる混合物の單一性の確認に応用できない欠点がある。

一般的にスルホン酸塩の直接的分離は、イオン交換法<sup>3)</sup>により行われている。しかし、この方法は溶離液の濃度やpHなどの分離条件を、試料の性質に応じて厳密に規定する必要があり、さらに分離やイオン交換樹脂の再生に長時間を要するなどの欠点を有している。

高速液体クロマト法は、分析の迅速性と高い分離能の面から各種の化合物の分離法として広く利用されている。特に、その分離手段の一つであるイオン対クロマト法は、スルホン酸塩や第4級アンモニウム塩のような水溶性で解離性に富む試料を、それぞれの反対電荷を持つ対イオンを添加することにより、非解離性の複合分子を形成させ、それを、主として分配クロマト法的に分離する手法として近年その応用例も拡大しつつある。この手法は、イオン交換法に比較して分離条件の設定が容易で迅速に行える特長があるため、これまでイオン交換法の対象になっていた化合物の分離に

有効に用いられている。既にスルホン酸塩の分離<sup>4)</sup>にも応用され、また著者らも第4級アンモニウム塩同族体の分離<sup>5), 6)</sup>に応用し、その有用性を報告した。

ここでは、高速液体クロマトグラフィーにより芳香族スルホン酸塩のスルホン基の数、芳香核の数、及び各異性体の分離を目的として、主に、イオン対クロマト法による分離方法を検討したので報告する。

## 2 実験方法

## 2・1 試料及び試薬

本実験に用いたスルホン酸塩は、ベンゼンモノスルホン酸ナトリウム、ベンゼン1,3-ジスルホン酸ナトリウム、-、-ナフタレンモノスルホン酸ナトリウム、ナフタレン1,5-, 2,6-, 2,7-ジスルホン酸ナトリウム、及びナフタレン1,3,5-トリスルホン酸ナトリウムで、これらは東京化成KK製の特級試薬を用いた。カウンターイオンには、C<sub>2</sub>~C<sub>4</sub>のテトラアルキルアンモニウムクロライド及びPIC-A試薬（テトラブチルアンモニウムオクタエートの酢酸溶液、ウォーターズ社製）を使用した。

## 2・2 装置及び測定条件

液体クロマトグラフには、ウォーターズ社製高速液体クロマトグラフ ALC/GPC244型を用い、検出は254nmのUV検出器によった。

カラムは内径4mm、長さ30cmのステンレス管に固定相としてμ-Bondapak NH<sub>2</sub>（球状シリカゲルにアミノプロピルシランを化学結合したもの）を充てんしたものを用いた。

移動相は、高速液体クロマト用メタノール及び水の混合溶媒にイオン対形成用カウンターイオンを1×10<sup>-2</sup>M~2.5×10<sup>-3</sup>M濃度になるように溶かし調製したものを用いた。

\* 本報を「イオン対クロマトグラフィーによる有機イオン性化合物の分離に関する研究」の第3報とする。

\*\* 大蔵省関税中央分析所 271 千葉県松戸市岩瀬531

pH 調製には酢酸を使用した。

移動相の流速は 1.0ml / min に規定した。

注入用試料溶液は試料濃度が約 5mg / ml になるように移動相と同じ溶媒で調製し、注入量は 1  $\mu$ l に規定した。また、移動相及び試料はすべて 0.45  $\mu$  フィルターでろ過し、そのろ液を用いた。

### 3 結果及び考察

#### 3・1 分離条件の検討

##### 3・1・1 固定相の選択

既に報告したように、長鎖アルキル基を有する第4級アンモニウム塩同族体の分離は、固定相として中極性の  $\mu$ -Bondapak CN(担体にシアノピロピルシランを化学結合したもの)を用いた場合には良好であった。

しかし、芳香族スルホン酸塩の分離に  $\mu$ -Bondapak CN を使用したところ良好な分離は得られなかった。そこで、試料の性質等を考慮して固定相に高極性の  $\mu$ -Bondapak NH<sub>2</sub>を用いた結果、以下の分離条件下で良好な分離が得られたので、このカラムを以後の実験に使用した。

イオン対クロマト法においては、移動相の溶媒組成、移動相中に添加するカウンターイオンの種類と濃度、及び移動相中の pH 等が、分離に対しての重要なファクターと考えられるので、以下の実験においてはこれらの諸条件を検討し、芳香族スルホン酸塩の最適分離条件を決定した。

##### 3・1・2 移動相

固定相に  $\mu$ -Bondapak NH<sub>2</sub>を用い、移動相にそれぞれ水、メタノール、又は水 : メタノール(80 : 20v/v)の混合溶媒等を用いて、ベンゼンモノスルホン酸ナトリウム、 $\alpha$ -ナフタレンスルホン酸ナトリウム塩、2.6-ナフタレンスルホン酸ナトリウム塩の相互分離を試みたが、これらスルホン酸塩のいずれも、これらの溶媒では溶出されなかった(Fig.1(A))。

しかし、水 : メタノール(80 : 20v/v)の混合溶媒にカウンターイオンとして PIC-A 試薬を加えると Fig.1(B) に示したように溶出分離された。このことは、スルホン酸塩が、添加された少量の第4級アンモニウム塩によって非解離性の複合分子を形成し、固定相に対する保持力が弱まることによるものと考えら

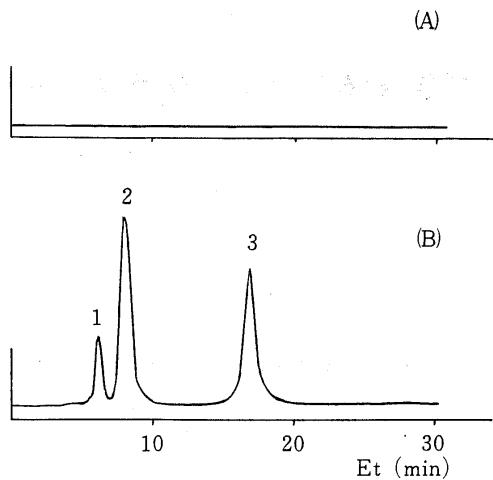


Fig. 1 H.P.L Chromatograms of aromatic sulfonates

1. Benzene monosulfonate (B.M.S)
  2. -naphthalene monosulfonate (-N.M.S)
  3. 2.6- naphthalene disulfonate (2.6-N.D.S)
- Stationary phase:  $\mu$ -Bondapak NH<sub>2</sub> 4mmID × 30cm  
Mobile phase : (A) : Water : Methanol=80:20(v/v)  
(B) : Water : Methanol=80:20(v/v)  
containing  $2.5 \times 10^{-3}$ M PIC - A  
reagent

pH of mobile phase : 7.0

Flow rate : 1.0ml/min

Sample concentration : 5 mg/ml

Injection volume : 1  $\mu$ l

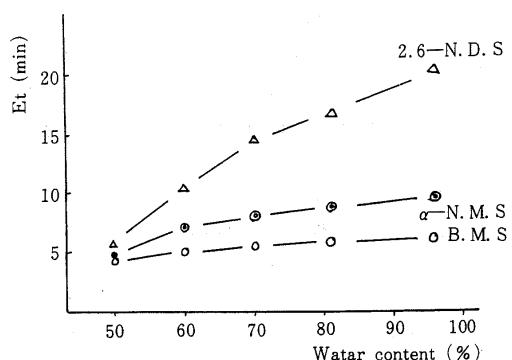


Fig. 2 Effect of Water contents on the separation of aromatic sulfonates

Statfonary phase:  $\mu$ -Bondapak NH<sub>2</sub>  
The concentration of PIC - A reagent in each  
Mobile phase is  $2.5 \times 10^{-3}$ M  
pH:7.0  
Flow rate:1.0ml/min

## ノート 高速液体クロマトグラフィーによる芳香族スルホン酸塩の分離\*

れる。

Fig. 2 は、カウンターイオンの濃度を一定にし、水とメタノールとの混合溶媒組成比を変えた場合の結果である。

水の量を増すに従って、ベンゼンモノスルホン酸ナトリウム及び 2,6-ナフタレンモノスルホン酸ナトリウムの溶出速度はそれほど大きく変化しないが、2,6-ナフタレンジスルホン酸ナトリウムの溶出速度は遅くなり、これらスルホン酸塩の相互分離は良好になることがわかる。

しかし、水の量が増すに従い溶出が遅くなるので、ここでは分析所要時間を考慮して、移動相の水、メタノール組成比を(80:20v/v)に規定し、以下の実験を行った。

## 3・1・3 カウンターイオンの種類及び濃度

固定相に  $\mu$ -Bondapak NH<sub>2</sub>、移動相として水:メタノール(80:20v/v)の混合溶媒にテトラアルキル(C<sub>2</sub>~C<sub>4</sub>)アンモニウムクロライド酢酸溶液及び PIC-A 試薬を添加し、さらに酢酸で pH 7.0 に調製したものを用いて、カウンターイオンの種類によるスルホン酸塩の分離に及ぼす影響を検討したのが Table 1 である。

Table 1 Effect of the type of counter ion on the separation of aromatic sulfonates

counter ion	Elution time (min) of compound			none
	B. M. S	N. M. S ( $\alpha$ -)	N. D. S (2,6-)	
Tetra ethyl ammonium chloride	5.3	7.2	14.8	
Tetra propyl ammonium chloride	5.8	7.6	15.2	
Tetra butyl ammonium chloride	6.2	7.8	15.8	
PIC-A reagent	6.2	8.0	16.2	

Stationary phase:  $\mu$ -Bondapak NH<sub>2</sub> 4mm × 30cm

Mobile phase: Water: Methanol=80:20 (v/v)

containing  $2.5 \times 10^{-3}$ M PIC-A reagent

pH:7.0

Flow rate: 1.0ml/min

Sample concentration: 5mg/ml

Injection volume: 1  $\mu$ l

スルホン酸塩は、カウンターイオンとして用いた第4級アンモニウム塩のアルキル基が長くなる程固定相に保持される傾向にあるが、各ピークの分離度に対しては、顕著な差異が認められなかった。そこで以下の実験には市販品として手軽に入手できる PIC-A 試薬をカウンターイオンとして用いた。

次に水とメタノールとの溶媒組成を一定にして、カウンターイオンの濃度変化による芳香族スルホン酸塩の分離効果について検討した結果を Fig. 3 に示した。

スルホン酸塩は、カウンターイオン濃度の増加に伴

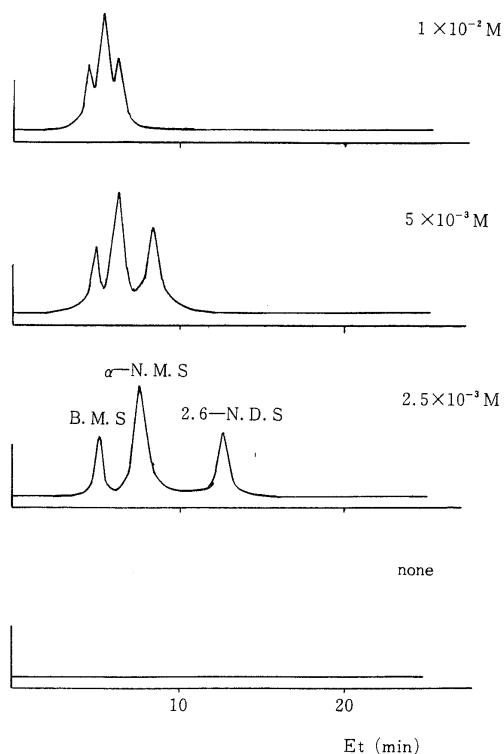


Fig. 3 Effect of molar concentration of counter ion in mobile phase on the separation of aromatic sulfonates

Stationary phase:  $\mu$ -Bondapak NH<sub>2</sub>

Mobile phase: Water: Methanol=(80:20 v/v)

adjusted to pH 7.5 with acetic acid

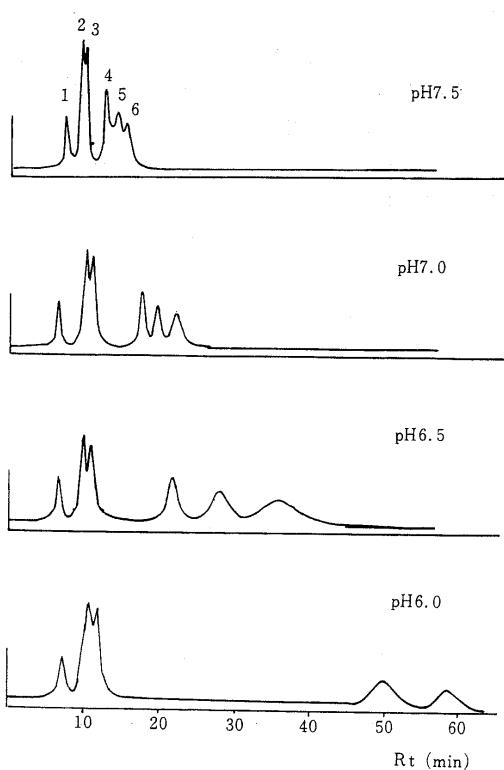


Fig. 4 Effect of pH of mobile phase on the separation of aromatic sulfonates

1. B.M.S
  2. -naphthalene sulfonate (-N.M.S)
  3. -N.M.S
  4. 2.6-N.D.S
  5. 1.5-naphthalene disulfonate (1.5-N.D.S)
  6. 2.7-naphthalene disulfonate (2.7-N.D.S)
- Stationary phase;  $\mu$ -Bondapak NH<sub>2</sub>  
Mobile phase; Water : Methanol = (80:20 v/v)  
containing  $2.5 \times 10^{-3}$ M  
PIC-A reagent

い固定相に対する保持力が低下し、各ピークの分離は悪くなる。これはカウンターイオン濃度の増加により、スルホン酸塩がより強くイオン対を形成し、そのため、固定相に対する保持力が低下する結果によるのではないかと考えられる。

本実験では、カウンターイオン濃度を  $2.5 \times 10^{-3}$ M に規定した場合に比較的良好な分離を得た。

Table 2 The recommended conditions for the separation of aromatic sulfonates.

Stationary phase	$\mu$ -Bondapak NH <sub>2</sub> , 4 mm × 30cm
Mobile phase	Water : Methanol = 80 : 20 (v/v) containing $2.5 \times 10^{-3}$ M PIC-A reagent
pH of mobile phase	7.0
Flow rate	1 mL/min
Sample concentra-tion	5 mg/mL
Injection volume	1 $\mu$ L
Detector	UV detector (254nm)
Temperature	Room temperature

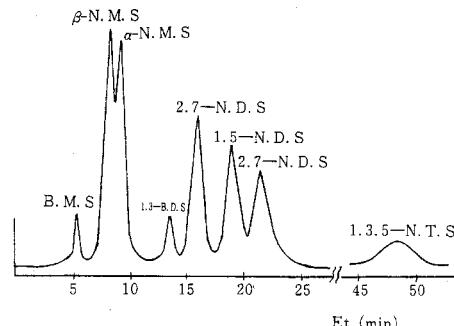


Fig. 5 H.P.L chromatogram of aromatic sulfonates

Stationary phase;  $\mu$ -Bondapak NH<sub>2</sub>  
4mmID 30cm  
Mobile phase; Water : Methanol = 80:20 (v/v)  
containing  $2.5 \times 10^{-3}$ M PIC-A  
reagent  
pH of mobile phase; 7.0  
Flow rate; 1.0 mL/min  
Sample concentration; 5 mg/ml  
Injection volume; 1  $\mu$ L

### 3・1・4 移動相のpHと分離効果

移動相の溶媒組成及びカウンターイオン濃度を一定にし、pH を変えることにより、スルホン酸塩の分離に及ぼす pH の影響を検討したのが Fig. 4 である。

### ノート 高速液体クロマトグラフィーによる芳香族スルホン酸塩の分離\*

Fig. 4 からわかるように pH が低くなるに従い、各ピークの保持容量が増加し、各ピークの相互分離が良好になった。しかし、pH が著しく低くなると分離に時間を使い、さらに、テーリング現象が顕著になる傾向にある。

なお、pH が低くなるに従い溶出が遅くなるのは、pH が低くなるとスルホン酸塩の解離性が増し、その結果、固定相に保持され易くなることによると考えられる。

芳香族スルホン酸塩の分離においては、クロマトグラムの全体的な分離度と分析所要時間の面から、移動相の pH を 7.0 に設定するのが適当であった。

以上の結果から、イオン対クロマトグラフィーにおける芳香族スルホン酸塩の分離には、Table 2 に示すような条件が適当であることが併明した。この条件で分離した芳香族スルホン酸塩のクロマトグラムを Fig. 5 に示した。Fig. 5 に示すように、スルホン基の数によ

る分離、ベンゼン核、ナフタレン核及びナフタレン異性体間の相互分離が比較的良好であった。

### 4 要 約

高速液体クロマトグラフィーにより芳香族スルホン酸塩の分離条件を検討した。

固定相に  $\mu$ -Bondapak NH<sub>2</sub>、移動相としてテトラブチルアンモニウムホスフェート、 $2.5 \times 10^{-3}$  M を含む、水：メタノール = 80 : 20 v/v (pH = 7.0) を用いたイオン対クロマト法により、芳香族スルホン酸塩のスルホン基の数、芳香核の種類、及びナフタレンスルホン酸異性体間の相互分離が可能であった。

本法は、これら化合物の单一性の確認に応用できることが併明した。

### 文 献

- 1) J. D. NIGHT, R. House : *J. Am. oil, chem. soc.*, **36**, 195 (1959)
- 2) J. J. KIRKLAND : *Anal. chem.*, **32**, 1388 (1960)
- 3) Hitachi Technical Date LC, 21, 11
- 4) H-U EHMCKE, K-H KONIG und ULLNER : *Fresenius z., Anal. Chem.*, **254**, 251 (1979).
- 5) 佐藤宗衛, 大野幸雄 : 本誌, **18**, 67 (1977).
- 6) 佐藤宗衛, 大野幸雄 : 本誌, **19**, 43 (1978).

**Separation of Aromatic Sulfonates by High performance Liquid Chromatography  
Organooionic Compounds by Ion - pair Chromatographic Techniques ( 3 )****Separation of**

Hironobu OSHIRO , Soei SATO and yukio OHNO\*

\*Central Customs Laboratory , Ministry of Finance ,

531 , Iwase , Matsudo - Shi , Chiba - Ken , 271 Japan

The conditions for the separation of benzene monosulfonate , 1,3-disulfonate , 1,5-disulfonate and naphthalene monosulfonates , three isomers of naphthalene disulfonate were investigated.

The retention and separability of aromatic sulfonates were drastically affected with pH , amount of water and molar concentration of counter ion in mobil phase

The aromatic sulfonates were separated by following conditions.

Column : μ - Bondapak NH<sub>2</sub> (10 μ of amino propyl silan)

packed in 4mmID×30cm stainless column

Mobile phase : Water : Methanol ( 80:20v/v )

adjusted to pH 7.0 with acetic acid ,

containing  $2.5 \times 10^{-3}$ M PIC - A reagent

Detector : UV ( 254nm )

Sample concentration : 5mg/ml

Flow rate : 1ml/min

Injection volume : 1 μl ( 5 μg )

- Received Sep . 16 , 1980 -