

報 文

高速液体クロマトグラフィーによる第4級ア ンモニウム塩の同族体の分離*

佐 藤 宗 衛 , 大 野 幸 雄**

イオン対クロマトグラフィーにより長鎖アルキル基を有する第4級アンモニウム塩の同族体の分離を新たに検討した。ベンザルコニウム塩及びアルキルピリジニウム塩はペンタンスルホン酸をカウンターイオンに用いてイオン対を形成させ、μ-Bondapak CN を固定相として分配的に分離すると同族体相互の分離が可能であり、本法が有機イオン性化合物の直接分離に応用できる有効な方法であることを示した。

1 緒 言

界面活性剤、殺菌剤、繊維処理剤などに広範な用途を有する第4級アンモニウム塩は組成及び用途で関税率表の取扱いが異なるため、これら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。

第4級アンモニウム塩の組成分析は一般に親油基分布を対象にするためスルホン酸塩や有機酸塩などのイオン性化合物と同様に直接分離が困難であり、これまで対応する親油基成分あるいは揮発性化合物への誘導化を必要とした。著者らが先に報告^{1), 2)}した熱分解GC-MS 法はこの親油基分布を直接行える利点を有するが、構造によっては分解条件などに問題のあるものも見られた。

第4級アンモニウム塩同族体の直接分離についても研究され、ペーパークロマト法³⁾、塩析クロマト法⁴⁾、あるいは高速液体クロマト法⁵⁾、を利用する報告が見られる。なかでも武藤らの開発したポーラスポリマーを固定相とする高速液体クロマト法⁵⁾は簡便さから有用な方法と考えられる。一方、高速液体クロマト法の分離方法の一つであるイオン対クロマト法はイオン対形成用カウンターイオンと試料イオンとの間にイオン対を形

成させ、非イオン性化合物として分配型で分離する手法であり、イオン交換分離法に比較して分離条件の設定が容易で迅速に行える特徴があるため、広範囲の試料に適用できる可能性を有する。既にスルホン酸塩^{6), 7)}、ジアゾニウム塩⁸⁾あるいは低級第4級アンモニウム塩⁹⁾の分離に応用され始めている。しかし、長鎖アルキル基を有する第4級アンモニウム塩の同族体の分離に応用された報告は未だみられない。

著者らはイオン対クロマトグラフィーによる各種イオン性化合物の分離方法の研究として第4級アンモニウム塩の同族体の分離を試み、その基礎的諸条件並びに熱分解 GC-MS 法との比較検討を行ったので報告する。

2 実験方法

2・1 試料及び試薬

アルキルベンジルジメチルアンモニウム塩の標準として東京化成 K.K. 製ベンザルコニウム塩 (C_{10} , C_{12} , C_{14} , C_{16} 等のアルキル基を有する)、テトラデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライド、ヘキサデシルジメチルベンジルアンモニウムクロライドを用いた。アルキルピリジニウム塩の標準には東京化成 K.K. 製ラウリルピリジニウムクロライド、ヘキサデシルピリジニウムクロライド及び和光純薬 K.K. 製ヘキサデシルピリジニウムプロマイドを用いた。これらの試料はす

* 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1報とする

** 大蔵省関税中央分析所 271 千葉県松戸市岩瀬 531

べて熱分解 GC - MS 法により組成を明らかにしたものである。このほか応用例として輸入品数種を用いた。また、イオン対形成用カウンターイオンとしてウォーターズ社製 PIC 試薬 B - 5(1 - ペンタンスルホン酸の氷酢酸溶液)及び PIC 試薬 B - 7(1 - ヘプタンスルホン酸の氷酢酸溶液)を用いた。

2・2 装置及び測定条件

液体クロマトグラフ装置：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、ピークの検出は 254nm の UV 検出器によった。

カラム: 30cm × 4.0mmI.D. のステンレスカラムに固定相として μ -Bondapak CN (粒径 10 μ) を充てんしたもの。

移動相：イオン対形成用カウンターイオンの濃度が 0.0025 ~ 0.01M になるように高速液体クロマト用メタノール及び水の混合溶媒で調製したものを用いた。移動相の pH は 3.8 ~ 4.1 である。

移動相の流速 : 0.8 ~ 1.0ml/min.

測定温度 : 25

注入用試料溶液：試料濃度 4 ~ 10mg/ml になるよう移動相と同じ溶媒で調製し、注入量は 2 μ l(8 μ g ~ 20 μ g) に規定した。また、移動相及び試料溶液はすべて 0.45 μ フィルターでろ過し、ろ液を用いた。

3 結果及び考察

3・1 分離条件の選択

3・1・1 固定相の選択と分離モード

長鎖アルキル基をもつ第 4 級アンモニウム塩をアルキル鎖に応じて分離するため固定相、移動相を含めた最適分離条件の検討を行った。すなわち、アルキル鎖による分離という点からみると分離モードとして逆相分配クロマト法が有効であると考えられるので、固定相として担体にオクタデシル基の結合した μ -Bondapak C₁₈(無極性)を用いて分離したが良好な分離は得られなかった。また、試料の性質を考慮し、担体にシアノプロピルシリラン基を結合させた中極性固定相 μ -Bondapak CN を用い、メタノールを移動相にして溶出したベンザルコニウム塩及びアルキルピリジニウム塩のクロマトグラムは Fig.1(A) に示すように、いずれ

も単一のピークを与え、この条件下ではこれらのアンモニウム塩は分離されなかった。さらに、移動相にメタノール及び水の混合溶媒を用いて分離するとこれらのアンモニウム塩はいずれも溶出されなかった (Fig.1(B))。しかし、これと同一の組成よりなるメタノール及び水の混合溶媒に 1 - ペンタンスルホン酸(氷酢酸溶液)を加えて調製したものを移動相として溶出すると、これら第 4 級アンモニウム塩は分離されることが判明した (Fig. 1(C))。これらの実験事実は第 4 級アンモニウム塩が水の存在下でイオン性を増し固定相に吸着、保持されるが、ペンタンスルホン酸の存在によってイオン対が生成され溶出分離され易くなることを示唆する。そこで、長鎖アルキル基をもつ第 4 級アンモニウム塩の同族体の分離法として、中極性固定相を用いたイオン対クロマト法が適當と考えられた。

イオン対クロマト法による分離は試料成分のイオン的性質との関連で、イオン対形成用のカウンターイオンの種類、カウンターイオンの濃度、イオン対形成時の pH 及び溶媒組成等により主に影響される¹⁰⁾ため、これらの条件を含めて分離条件を検討した。

3・1・2 カウンターイオンの種類及び濃度と分離効果

Fig.2 は固定相に μ -Bondapak CN、移動相としてメタノール : 水 = 60 : 40 の混合溶媒系に 1 - ペンタンスルホン酸または 1 - ヘプタンスルホン酸を添加して調製したものを用いてカウンターイオンの種類によるベンザルコニウム塩の分離に及ぼす影響を検討したものである。Fig.2 からわかるように、ベンザルコニウム塩の分離に対し C₅ 及び C₇ の炭素数よりなるアルカンスルホン酸をイオン対形成用のカウンターイオンとして用いた場合、1 - ペンタンスルホン酸を用いて分離したものは 1 - ヘプタンスルホン酸を用いて分離したものに比較してピークの溶出に僅かに大きな保持容量を要する傾向が認められるが、各ピークの分離能に対して顕著な差はないものと考えられる。このことは、アルキルピリジニウム塩について同様に検討した結果でも類似した傾向を示すことが認められた (Fig.3)。従って、これら第 4 級アンモニウム塩のイオン対形成用のカウンターイオンとして、1 - ペンタンスルホン酸及び 1 - ヘプタンスルホン酸のいずれも用いることができると言えられる。以下の実験は 1 - ペンタンス

報 文 高速液体クロマトグラフィーによる第4級アンモニウム塩の同族体の分離

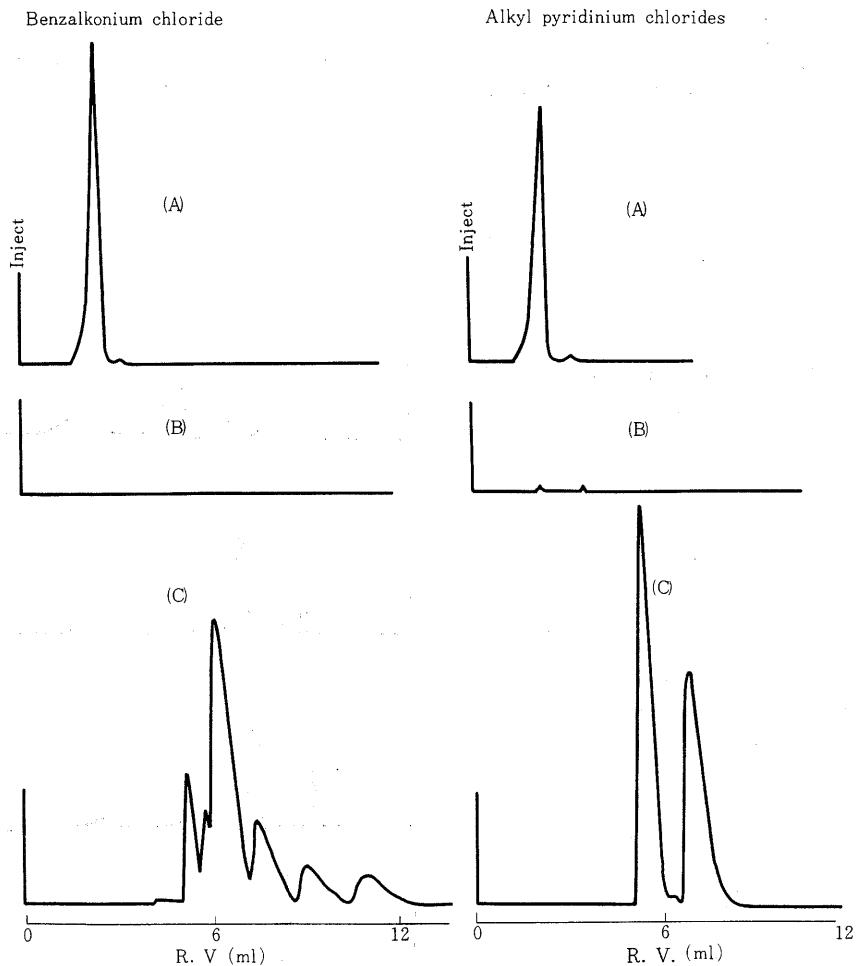


Fig. 1 H.P.L. Chromatograms of benzalkonium chloride and alkyl pyridinium chlorides

Stationary phase : μ -Bondapak CN, 30cm \times 4mm I.D.Mobile phase ; (A) : CH₃OH, (B) : CH₃OH : H₂O=70 : 30,(C) : CH₃OH : H₂O=70 : 30, containing 0.005M pentane sulfonic acid

Flow rate : 1.2ml/min .

ルホン酸をカウンターイオンとして用いて行った。

次に、メタノール：水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ベンザルコニウム塩の分離に及ぼす影響について検討し、その結果を Fig.4 に示した。ベンザルコニウム塩の各ピークはカウンターイオンの濃度の増加とともに固定相に対する保持力が低下し、短時間で溶出される。さらに、各ピーク間の相互分離も良好で、テーリング現象も低下し良好な分離能が得られることが判明した。これは水の存在

で解離した第4級アンモニウムカチオンがカウンターイオンの濃度の増加とともににより強くイオン対を形成し、固定相に対する保持能を低下させる結果によるものと推定される。しかし、必要以上のカウンターイオンの濃度の増加では各ピークの保持容量が著しく近接してくるため、逆にピーク間の相互分離が困難になることも示唆された。同じような傾向はアルキルピリジニウム塩の場合にも認められた (Fig.5)。従って、各ピークを良好に分離するには適当なカウンターイオン

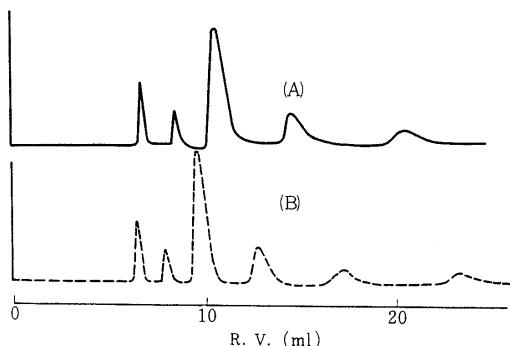


Fig.2 Influence of the type of counter ion on the

separation of benzalkonium chloride

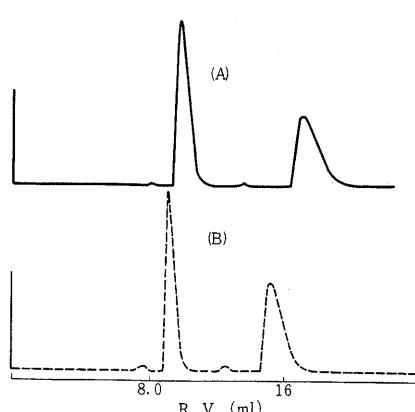
(A) : 1-pentane sulfonic acid,

(B) : 1-heptane sulfonic acid

Stationary phase; μ -Bondapak CN30cm \times 4mm I.D.Mobile phase; CH₃OH : H₂O = 60 : 40(V/V)containing 0.005M alkane
sulfonic acid(C₅ or C₇)

Flow rate: 1.0ml/min., Detector: UV 254nm,

Chart speed: 5mm/min., Sample concentration:

10mg/ml, Injection volume: 2 μ lFig.3 Influence of the type of counter ion on the
separation of alkyl pyridinium chlorides

(A) : 1-pentane sulfonic acid,

(B) : 1-heptane sulfonic acid

Stationary phase; μ -Bondapak CN,
30cm \times 4mm I.D.Mobile phase; CH₃OH : H₂O = 60 : 40(V/V),
containing 2.5×10^{-3} M alkanesulfonic acids(C₅ or C₇)

Flow rate: 0.8ml/min., Detector: UV 254nm,

Chart speed: 5mm/min., Sample concentrations

: Each 4mg/ml, Injection volume: 2 μ l

の濃度が必要となり、本実験では、ベンザルコニウム塩及びアルキルピリジニウム塩の場合、カウンターイオンの濃度が0.01Mのときに最もよい分離を示した。

Fig.4 Influence of the molar concentration of coun -
ter ion in mobile phase on the separation of
benzalkonium chloride

Counter ion: 1-pentane sulfonic acid.

(A) : 2.5×10^{-3} M (B) : 5×10^{-3} M(C) : 7.5×10^{-3} M (D) : 10^{-2} MStationary phase: μ -Bondapak CN,
30cm \times 4mm I.D.Solvent in mobile phase: CH₃OH : H₂O = 60
: 40(V/V), Flow rate: 1ml/min.Sample concentration: 10mg/ml, Injection
volume: 2 μ l

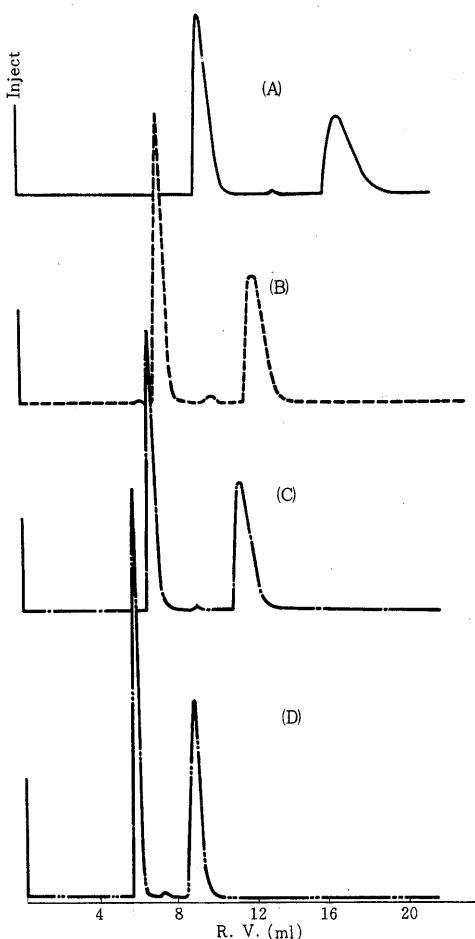


Fig. 5 Influence of the molar concentration of counter ion in mobile phase on the separation of alkyl pyridinium chlorides

Counter ion: 1-pentane sulfonic acid.

(A): 2.5×10^{-3} M (B): 5×10^{-3} M

(C): 7.5×10^{-3} M (D): 10^{-2} M

Stationary phase: μ -Bondapak CN.

30cm × 4mm I.D.

Solvent in mobile phase : $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}=60:40$

(V/V), Flow rate: 0.8ml/min.

Sample concentration : Each 4mg/ml, Injection

volume : 2 μ l

3・1・3 移動相の溶媒組成比と分離効果

移動相溶媒であるメタノール及び水の組成比がベンザルコニウム塩及びアルキルピリジニウム塩の同族体の分離に及ぼす影響について検討した。先ず、移動相中のカウンターイオンの濃度を一定にして水とメタノールの組成比を変え、ベンザルコニウム塩を溶出分離した結果を Fig.6 に示した。Fig.6 からわかるよう

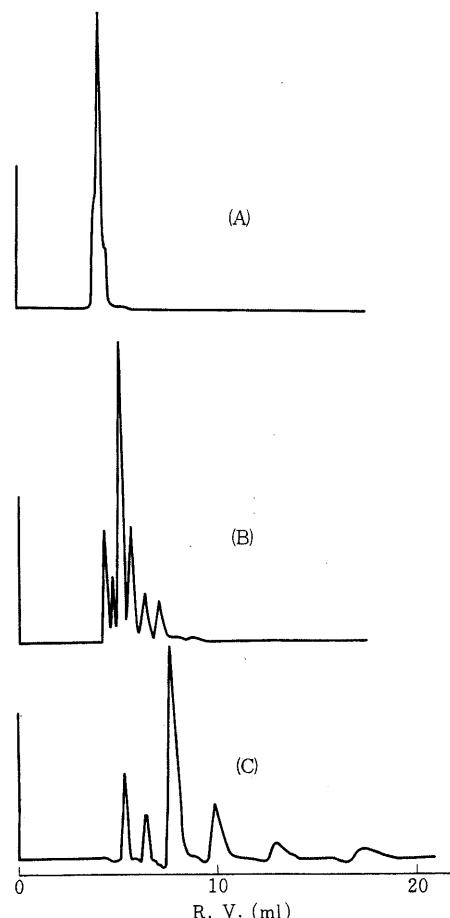


Fig. 6 Influence of amounts of water in mobile phase on the separation of benzalkonium chloride

(A): $\text{CH}_3\text{OH}: \text{H}_2\text{O}=80:20$ (V/V),

(B): $\text{CH}_3\text{OH}: \text{H}_2\text{O}=70:30$

(C): $\text{CH}_3\text{OH}: \text{H}_2\text{O}=60:40$

The concentration of 1-pentane sulfonic acid in each mobile phase is 10^{-2} M.

に、ベンザルコニウム塩は水の量が増加するに従い、各ピークの保持容量が増加し、各ピーク間の相互分離も良好となった。しかし、水の量が著しく多くなると各ピーク、とくにアルキル基の炭素数の増加とともにテーリング現象が顕著になる傾向も認められた。また、アルキルピリジニウム塩の溶媒組成による分離性状の違いは Fig.7 に示した。アルキルピリジニウム塩の場

合もベンザルコニウム塩と同様、水の量の増加とともに各ピークの保持容量が増し、ピーク間の相互分離も良好となった。しかし、水の量が著しく多くなると、テーリング現象が顕著になる傾向も見られた。従って、これら第4級アンモニウム塩の各ピーク間の相互分離を良好にし、テーリング現象の少ないピークを得るために溶媒組成を規定する必要があり、ベンザルコニウム塩及びアルキルピリジニウム塩の場合メタノールと水の割合は 60:40 が適当と考えられた。

以上の検討結果から、ベンザルコニウム塩及びアルキルピリジニウム塩の最適分離条件は Table 1 に示す

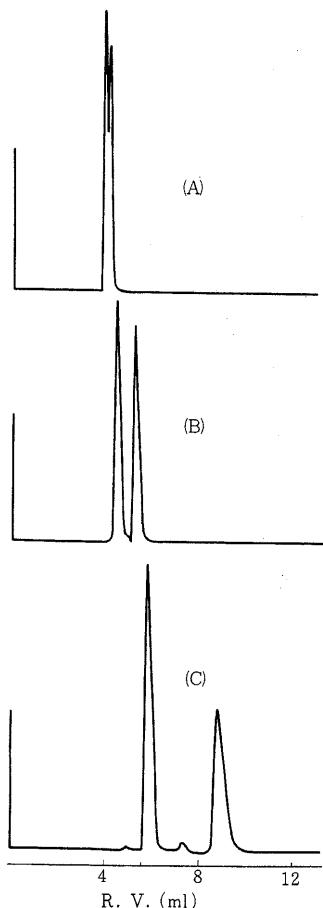


Fig.7 Influence of amounts of water in mobile phase on the separation of alkyl pyridinium chlorides
 (A) ; $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O} = 80 : 20 (\text{V/V})$,
 (B) ; $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O} = 70 : 30$,
 (C) ; $\text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O} = 60 : 40$
 The concentration of 1-pentane sulfonic acid in each mobile phase is 10^{-2}M .

Table 1 Optimum conditions for separation of homologous series of benzalkonium salts and alkyl pyridinium salts

Analytical condition	Benzalkonium Salts	Alkyl pyridinium Salts
Stationary phase	μ -Bondapak CN	$30\text{cm} \times 4\text{ mm I. D.}$
Mobile phase	Methanol : water = 60 : 40 containing 10^{-2}M 1-pentane sulfonic acid	
Flow rate	1 ml/min.	0.8 ml/min.
Detector	UV detector (254nm)	UV detector (254nm)
Sample concentration	10 mg/ml	4 mg/ml
Injection volume	2 μ l	2 μ l
Chart speed	5 mm/min.	5 mm/min.
Temperature	25°C	25°C

ようであった。この条件において分離したベンザルコニウム塩及びアルキルピリジニウム塩のクロマトグラムを Fig.8 に示した。各ピーク成分を標準品の保持容量及び標準追加法により同定した結果、ベンザルコニウム及びアルキルピリジニウム塩中の各成分は炭素数の順に溶出し、また、各ピークの炭素数と保持容量の対数値との間には直線関係が認められた(Fig.9)。

従って、本法により、これら第4級アンモニウム塩

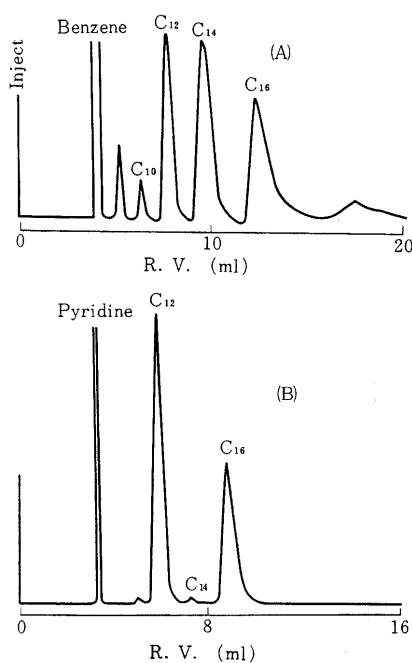


Fig. 8 H.P.L.Chromatograms of benzalkonium chloride and alkyl pyridinium chlorides under the optimum condition
(A) : benzalkonium chloride
(B) : alkyl pyridinium chlorides

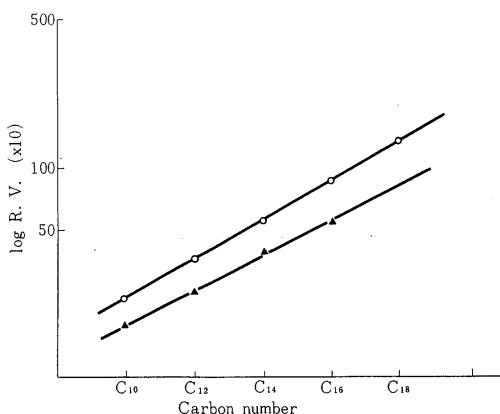


Fig. 9 Relationship between the log R.V. and carbon number of quaternary ammonium salts
- Benzalkonium chloride (R.V. from benzene)
- Alkyl pyridinium chlorides (R.V. from pyridine)

の親油基分布を知ることが可能になり、組成分析に直接利用できることが判明した。

3・2 輸入品分析への応用

3・2・1 アルキルピリジニウム塩のアルキル基分布

試料はシャンプーの原料として輸入された西ドイツ産ラウリルピリジニウムクロライドであり、このもののIR及びNMRスペクトルは標準スペクトルとほとんど一致していた。单一か否かを確認するため、Table 1に示した分離条件を用いて測定したクロマトグラムは、Fig. 10に示したように主成分は標準のラウリルピリ

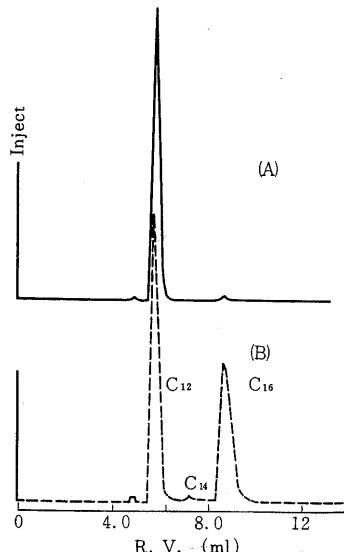


Fig. 10 H.P.L.Chromatograms of imported goods and alkyl pyridinium chlorides
(A) : Imported good, (B) : Standard Alkyl pyridinium chlorides
Conditions of separation are the same as cited in Table 1.

ジニウムクロライドの保持容量と一致する位置に溶出され、極く少量成分が、ヘキサデシルピリジニウムクロライドの位置に溶出された。このパターンは熱分解GC-MS法²⁾で得たアルキルハライドのパターンとも一致した。従って、本品はラウリルピリジニウムクロライドと認められた。

3・2・2 繊維処理剤の分析

繊維処理剤として輸入された Fixanol は既報¹⁾のように C₁₂, C₁₄ 及び C₁₆ の炭素数よりなるアルキルビリジニウムプロマイドであるが、これを Table 1 に示した分離条件で測定したクロマトグラムは Fig.11 に示すように主要成分 2 種と微量成分 2 種が検出される。各ピークを標準アルキルビリジニウムプロマイドによる追加法並びに炭素数と保持容量の対数値との関係より同定した結果、主要ピークはそれぞれ C₁₂ と C₁₄ で、微量成分は C₁₀ と C₁₆ のものであった。この親油基組成は熱分

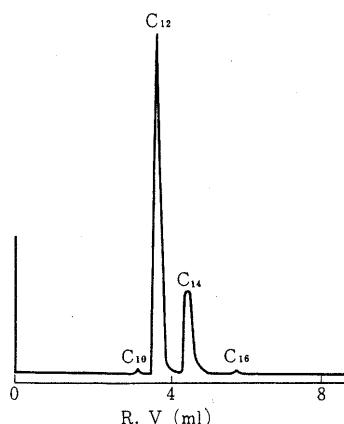


Fig. 11 H. P. L. Chromatogram of Fixanol
(imported good)

Conditions of separation are the same as cited in Table 1.

解 GC - MS 法¹⁾で得られたものと一致していた。

3・2・3 均染剤の分析

カチオン染料によるポリアクリロニトリル纖維染色用均染剤として輸入された第 4 級アンモニウム塩の水溶液は IR, NMR スペクトル及び熱分解 GC - MS 法²⁾でジベンジルジメチルアンモニウム塩と同定されたものである。Table 1 の条件で測定して得られたクロマトグラムは Fig.12 に示すように単一のピークを示し、親油基分布をもたないため短時間で溶出され、その保持容量はベンゼンの保持容量に相当した。このことは本法の分離の成否が主に親油基の鎖長の分配に基因することになるためこのような親油基分布のない第 4 級アンモニウム塩相互の分離には分離条件を更に検討する必要があるものと考えられる。

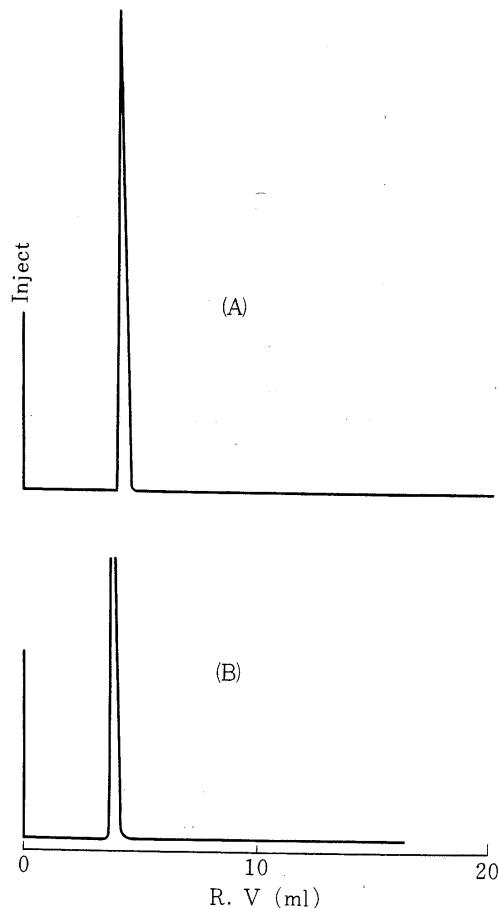


Fig. 12 H. P. L. Chromatograms of imported good and benzene

(A) : Imported good (Dibenzyl dimethyl ammonium chloride)

(B) : Benzene

Conditions of separation are the same as cited in Table 1.

文 献

- 1) 大野幸雄, 葉山良子, 田中誠之: 分析化学, 25, 736 (1976).
- 2) 大野幸雄, 葉山良子, 三輪三郎: 本誌, 17, 23 (1976).
- 3) H. Hoiness and W. R. Stone: *Analyst*, 83, 71 (1958).
- 4) S. Fudano and, K. Konishi: *J. chromatogr.*, 87, 117 (1973).
- 5) G. Muto and, A. Nakae: *Chemistry Letters*, 6, 549 (1974).
- 6) K. G. Wahlund: *J. chromatogr.*, 115, 411 (1975).
- 7) C. P. T. Groen and, J. C. Kraak: *J. chromatogr.*, 138, 245 (1977).
- 8) E. Fitzgerald: *Anal. Chem.*, 48, 1734 (1976).
- 9) S. Eksborg and, G. Schill: *Anal. Chem.*, 45, 2092 (1973).
- 10) 中山力, 高橋考行, 佐藤通昌: フレグランスジャーナル, 18, 58 (1976).

Separation of Organoionic Compounds by Ion-pair Chromatographic Techniques (1)**Separation of Homologous Series of Quaternary Ammonium Salts by High Performance
Liquid Chromatography**

Soei SATO, Yukio OHNO*

* Central Customs Laboratory, Ministry of Finance, 531, Iwase, Matsudo - shi, Chiba - ken, 271 Japan

The separation of homologous series of benzalkonium salts and alkyl pyridinium salts having long chain alkyl groups was studied by high performance liquid chromatography using ion-pair chromatographic techniques. Influences of the type and molar concentration of counter ion, and water-methanol composition in mobile phase on the retention and separability of quaternary ammonium salts were investigated. The retention and separability of homologous series of quaternary ammonium salts in ion-pair partition system was mainly influenced by the amounts of water and molar concentration of counter ion in mobile phase.

Optimum conditions for separation of homologous series are as follows :

Stationary phase : μ -Bondapak CN

Mobile phase : Methanol : water=60 : 40, containing 0.01M 1-pentane sulfonic acid

Flow rate : Benzalkonium salts ; 1 ml/min., Alkyl pyridinium salts ; 0.8ml/min.

Detector : UV detector(254nm)

Sample concentration : Benzalkonium salts : 10mg/ml, Alkyl pyridinium salts : 4mg/ml.

Injection volume : 2 μ l(8 ~ 20 μ g)

The separation profiles of these compounds were identical with that of pyrolysis GC-MS method. It was found that the ion-pair chromatography was an effective method for the separation of organoionic compounds.

Received Oct. 6, 1977