

# イオン対クロマトグラフィーの基礎的検討

高 松 享  
松 原 健 一  
海 野 益 郎  
渡 辺 秀 夫

## Basic Studies on the Separation by Paired-Ion Chromatography

Tohru TAKAMATSU  
Kenichi MATSUBARA  
Masuo UMINO  
HiJeo WATANABE

Basic elution behavior of anionic and cationic samples in paired-ion chromatography (PIC) on TSK-GEL has been investigated. PIC has more parameters than conventional reverse phase chromatography and so is suited to the separation and analysis of biochemical substances. Examples of applications to the separation of bile acids and catecholamines are presented.

### 1. はじめに

最近、高速液クロ (HLC) は急速な進歩をみせている。装置に関しては多種の検出器が登場し、高感度化も進んでいる。定流量性の良好な送液系の開発も進み、全自動 HLC システムも開発されつつある。

カラム充填剤についても、疎水性の固定相の開発が進み、極性の異なる種々の固定相が得られるようになり、広範囲の分野における物質の分離・分析が可能となりつつある。

HLC による分離・分析法については、最近イオン対クロマトグラフィー (PIC) が確立され、注目されている。PIC は水溶性であり、かつ解離性の試料について分配・吸着クロマトグラフィーを用いて系統的に分離する目的で開発された分離分析法である。

TSK-GEL のこの手法への応用にあたり、基礎的な PIC 法の検討をする必要がある。ここでは PIC の基礎的性質についてカチオン性試料、アニオン性試料について検討した結果および応用例について報告する。

### 2. イオン対クロマトグラフィー (PIC) の原理

PIC とは電解質を含む試料を分配・吸着クロマトグラフィーで分析するため、移動相中に過剰の対イオンを添加することによって試料イオンとイオン対を形成させ、試料を非解離の複合分子とし、これを分離する分析法である。

一般に電解質は解離と非解離の平衡状態で存在し、pH を調節することによって平衡をいずれかの側へ移動させることができる。弱電解質ではこれによって非解離の状態が逆相クロマトグラフィーが可能である。強電解質では比較的大きい有機分子のイオンを対イオンとして加え、複合分子を形成させてイオン性を弱めることにより逆相クロマトグラフィーが可能となる。

### 3. 実 験

装 置：東洋曹達工業製、HLC-803 高速液体クロマトグラフ

充填剤：TSK-GEL LS 410-ODS-SIL

カラム：4 mm ID, 30 cm ステンレスカラム

検出器：多波長 UV モニター

試 薬：アセトニトリル(液体クロマトグラフィー用)

Table 1 に用いた試料化合物、および対イオン試薬を示した。

**Table 1** Cationic and anionic samples and pairing ions

Sample	Pairing ion
Naphtalene Sulfonic Acid Isomers	Tetra-n-butylammonium $[(C_4H_9)_4N]^+$
Phthalic Acid Isomers	Cethyltrimethylammonium $[CH_3(CH_2)_{15}N^+(CH_3)_3]$
Benzoic Acid	
Bile Acid	
Benzalkonium Chloride	Hexane Sulfonic Acid
Benzethonium Chloride	Octane Sulfonic Acid
Chlorhexidine	Decane Sulfonic Acid
Hydrochloride	Perchloric Acid

#### 4. 結果および考察

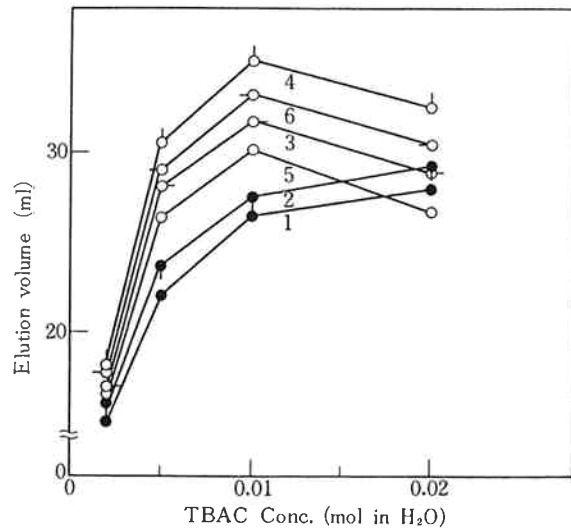
##### [1] PICによるアニオン性試料の分離

##### (1) アニオン性試料の溶出量のPIC試薬濃度依存性

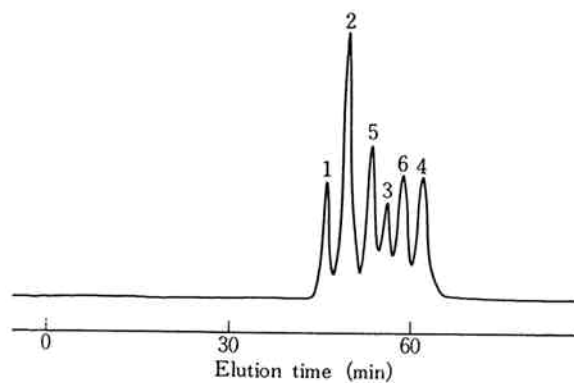
用いた試料はナフタレンスルホン酸ナトリウム異性体であり、Table 2 にそれぞれの構造式を示した。PIC試薬としてテトラブチルアンモニウムクロライド (TBAC) を用い、溶媒組成を一定にして TBAC 濃度を变化させた時の各異性体の溶出量の変化を Fig. 1 に示した。各異性体の溶出量は TBAC 濃度の増加とともに増加する。0.01M以上では試料によって溶出量の変化が異なっている。以上のことから、溶媒組成を変えずとも、

**Table 2** Isomers of Naphtalene Sulfonic Acid Sodium Salt

(1) 1-Naphtalene Sulfonic Acid Sodium Salt (1-NMSS)	
(2) 2-NMSS	
(3) 1,5-Naphtalene Sulfonic Acid Disodium Salt (1,5-NDSS)	
(4) 1,6-NDSS	
(5) 2,6-NDSS	
(6) 2,7-NDSS	
(7) 1,3,6-Naphtalene Sulfonic Acid Trisodium Salt	



Mobile Solvent :  $CH_3CN$  30 : 70 TBAC aq. soln.  
Flow Rate : 0.55 ml/min

**Fig. 1** Elution volume of Naphtalene sulfonic acid sodium salt isomers versus TBAC concentration

Mobile Solvent :  $CH_3CN$  30 : 70 0.01 M-TBAC aq. soln.

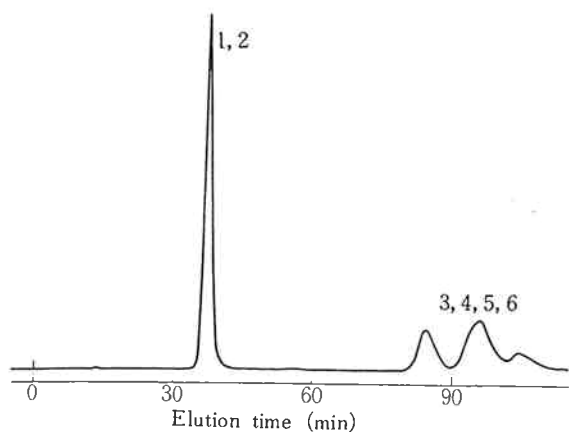
Flow Rate : 0.55 ml/min

**Fig. 2** Separation of a mixture of Naphtalene sulfonic acid sodium salt isomers by paired ion chromatography

少量の PIC 試薬を溶離液に添加することにより、試料の溶出位置を遅らせることが可能であり、各異性体の分離も可能であることがわかる。

##### (2) PIC におけるテトラブチルアンモニウムイオン (TBAC, $[C_4H_9)_4N^+$ ) とセチルトリメチルアンモニウムイオン (CTMAC, $[CH_3(CH_2)_{15}N^+(CH_3)_3]$ ) の分離上の相違

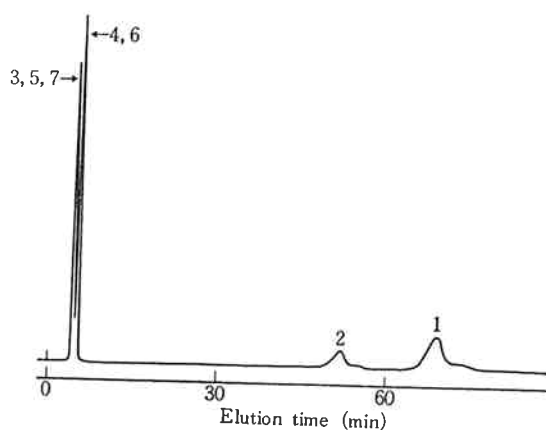
ナフタレンスルホン酸ナトリウム異性体の分離に、PIC試薬として TBAC, CTMAC を用いた時のそれぞれの分離パターンを Fig. 2, Fig. 3 に示した。TBAC を用いると、各異性体を良好に分離することができる。



Mobile Solvent :  $\text{CH}_3\text{CN}$  30 : 70 0.01 M-CTMAC aq. soln.

Flow Rate : 0.57 ml/min

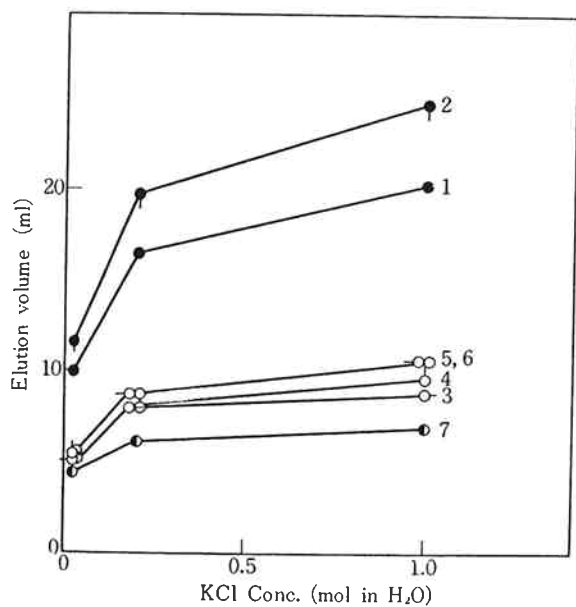
**Fig. 3** Separation of a mixture of Naphtalene sulfonic acid sodium salt isomers by paired ion chromatography



Mobile Solvent :  $\text{CH}_3\text{CN}$  1:9 0.2 M-KCl aq. soln.

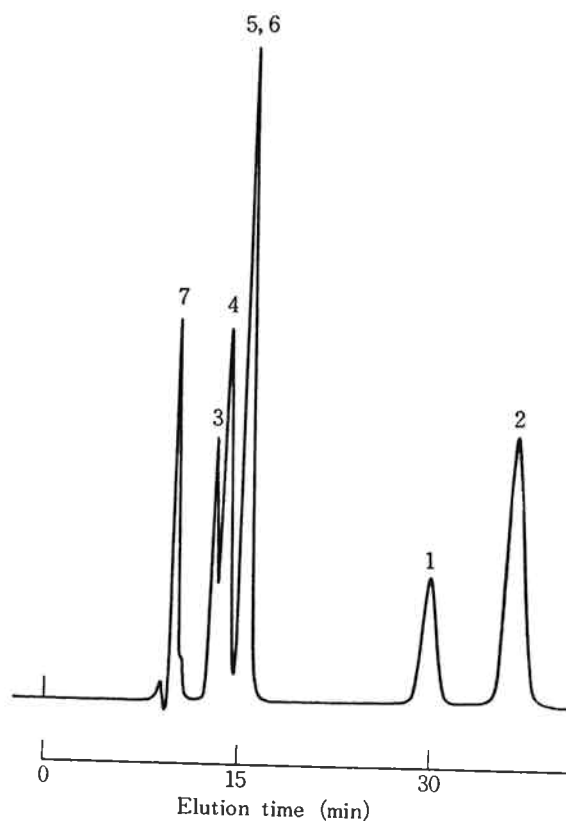
Flow Rate : 0.57 ml/min

**Fig. 4** Separation of a mixture of Naphtalene sulfonic acid sodium salt isomers by conventional reverse phase chromatography



Column : LS 170 STARCH, 4 mm ID, 60 cm  
Mobile Solvent :  $\text{CH}_3\text{CN}$  10 : 90 KCl aq. soln.  
Flow Rate : 0.68 ml/min

**Fig. 5** Elution volume of Naphtalene sulfonic acid sodium salt isomers versus KCl concentration in conventional reverse phase chromatography



Column : LS 170 STARCH, 4 mm ID, 60 cm  
Mobile Solvent :  $\text{CH}_3\text{CN}$  1:9 1.0 M-KCl aq. soln.  
Flow Rate : 0.68 ml/min

**Fig. 6** Separation of Naphtalene sulfonic acid sodium salt isomers by conventional reverse phase chromatography

(7は溶出しない。) CTMAC の場合, 試料のイオン基数が異なる場合に良好な分離を与えるが, 同数のイオン基を持つ異性体の分離には不適當であることがわかる。すなわち, CTMAC が TBAC に比べ, サイズ, 疎水性ともに大きく, 複合体の形成された異性体間にサイズ, 疎水性の差が小さくなるためである。(Fig. 3 でも7は溶出していない。) 以上のことから, PIC において分離すべき試料に適當な PIC 試薬の選択が必要である。

(3) 従来の逆相クロマトグラフィーとPICとの比較

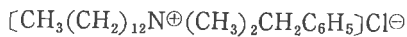
従来の逆相クロマトグラフィーでは, 溶離液の溶媒組成, 無機塩濃度を変えることによって分離を行っている。Fig. 4 に PIC 試薬のかわりに塩化カリウムを用いた時のナフタレンスルホン酸ソーダ異性体の分離例を示した。PIC が形成した複合体の疎水性の差で分離するのに対し, この場合は試料自体の疎水性の差で分離するため溶出順序が逆転している。PIC に比べ, 異性体の分離は悪い。

Fig. 5 にデンブングルカラム, LS 170-STARICH を用いた塩析クロマトグラフィーによる, 各ナフタレンスルホン酸ナトリウム異性体の溶出量の KCl 濃度依存性のプロットを示した。KCl 濃度を増加することにより, 異性体の溶出量に差が生じ, 分離が可能となってくる。Fig. 6 に分離例を示した。異性体5, 6が分離していない。溶出順序が Fig. 4 と少し異なっている。

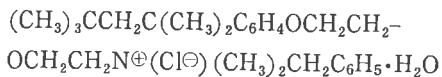
[2] PICによるカチオン性試料の分離

カチオン性試料として下記3試料 a, b, c を用いた。

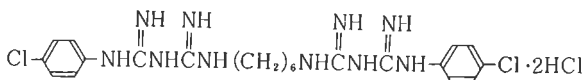
a) 塩化ベンザルコニウム



b) 塩化ベンゼトニウム

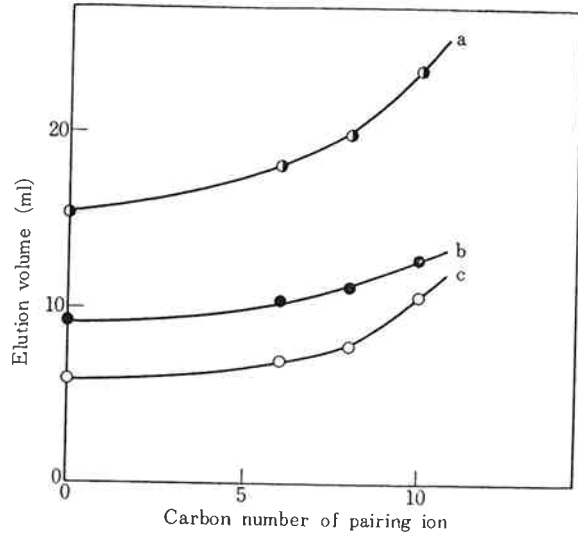


c) 塩酸クロルヘキシジン



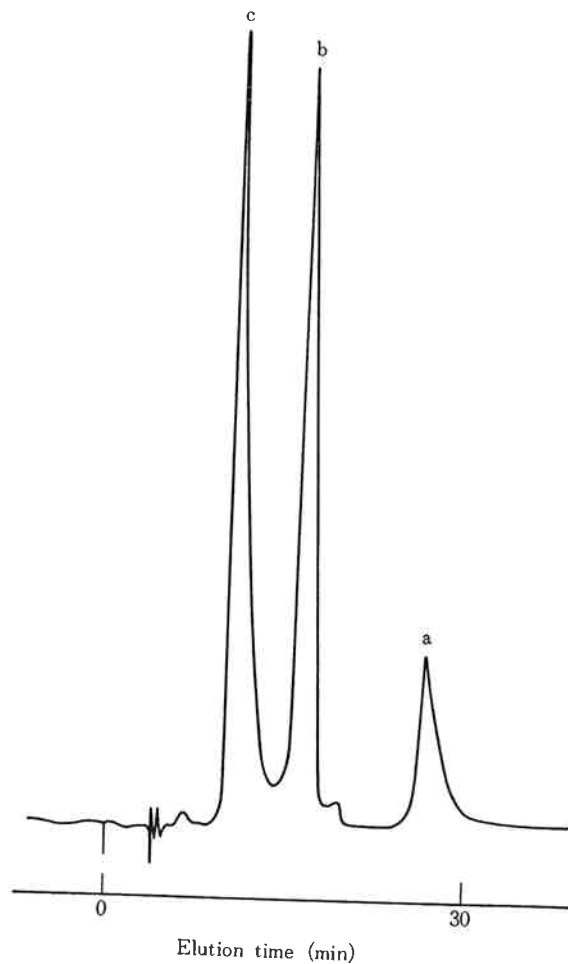
(1) カチオン性試料の溶出量とPIC試薬の炭素数の関係

PIC 試薬としてヘキサンスルホン酸, オクタンスルホン酸, デカンスルホン酸, 過塩素酸を用い, カチオン性試料の溶出量と PIC 試薬の炭素数の関係を検討した。Fig. 7 にその関係をプロットした。カチオン性試料 a, b, c とともに炭素数の増加とともに, 形成した複合体の疎水性が増加するため溶出量は増加する。参考のため,



Mobile Solvent : CH<sub>3</sub>CN 90 : 10 0.05% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> soln. (Pairing ion conc, 0.01 M)  
Flow Rate : 0.68 ml/min

Fig. 7 Effect of carbon number of pairing ion on elution volume of cationic sample in paired ion chromatography



Mobile Solvent : CH<sub>3</sub>CN 90 : 10 0.01 M-Hexane Sulfonic Acid (0.05% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>) aq. soln.  
Flow Rate : 0.68 ml/min

Fig. 8 Separation of a mixture of cationic samples a, b, c by paired ion chromatography

Fig. 8 に a, b, c の溶出パターンを示した。

(2) 過剰の過塩素酸ソーダを添加した溶離液系におけるカチオン性試料の溶出挙動

0.01M以上の過塩素酸ソーダを溶離液に添加すると、カチオン性試料は塩析効果を受けて水和水を奪われ、疎水性複合体を形成できない。そのため溶出量は減少し、0.1M以上では一定となっている。(Fig. 9)

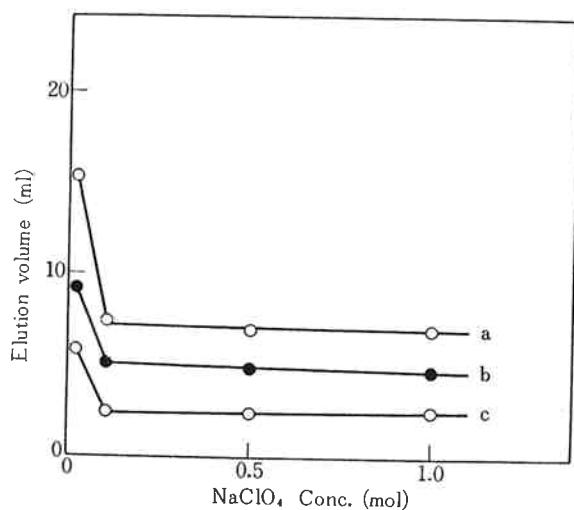
[3] PICにおける溶出量に対する無機塩添加効果

PIC 試薬として TBAC, CTMAC を用い、無機塩 KCl 添加濃度を変えてナフタレスルホン酸ソーダの溶出挙動を検討した。検討結果を Fig. 10, 11 に示した。溶出量は Fig. 10, 11 とともに KCl 濃度の増加とともに減少し、KCl 濃度0.05M以上では一定となっている。溶出量の減少の程度は 2-NMSS と 1, 5 NDSS とでは異なっており、特に CTMAC の溶離液では著しい。溶出量の減少理由は試料イオンが塩析効果を受けて疎水性複合体を形成しにくくなったことと考える。これまでの逆相クロマトグラフィーでは、試料の溶出位置を溶離液の溶媒組成、無機塩添加濃度を変えることによって変えていたが、これにさらに PIC 試薬の種類、濃度のパラメータが加わって、分離条件の幅が増したことになる。

[4] 芳香族カルボン酸(弱酸性試料)のPICにおける溶出挙動

用いた試料は安息香酸、およびフタル酸異性体である。Table 3 にそれぞれの名称、構造式を示した。

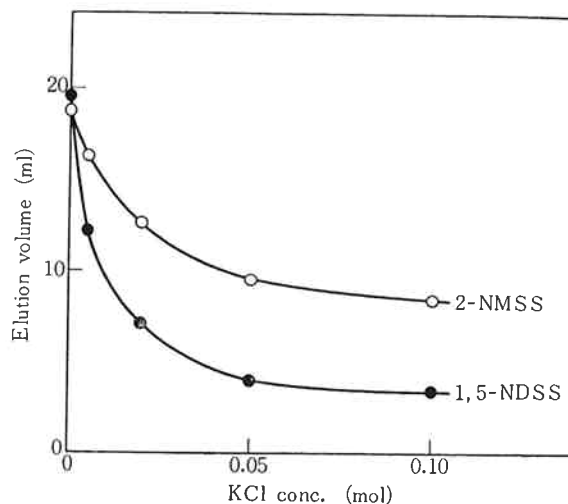
PIC 試料としてテトラブチルアンモニウムブロマイド(TBAB)を用い、リン酸緩衝液(0.01M, 0.05M)を用い



Mobile Solvent : CH<sub>3</sub>CN 90 : 10 NaClO<sub>4</sub> soln. (0.05% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>)

Flow Rate : 0.68 ml/min

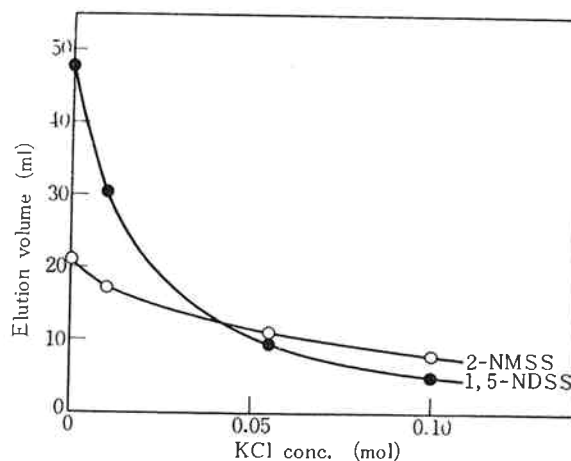
Fig. 9 Effect of NaClO<sub>4</sub> concentration on elution volume of cationic samples a, b, c in paired ion chromatography



Mobile Solvent : CH<sub>3</sub>CN 30 : 70 0.005 M-TBAB aq.+KCl

Flow Rate : 0.70 ml/min

Fig. 10 Effect of KCl concentration on elution volume in paired ion chromatography


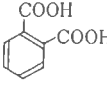
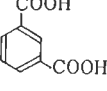
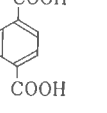


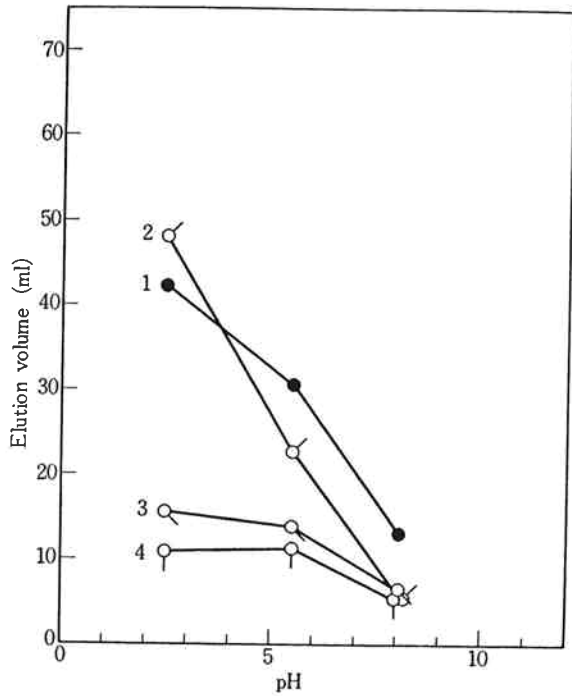
Mobile Solvent : CH<sub>3</sub>CN 55:45 0.01 M-CTMAC aq.+KCl

Flow Rate : 0.57 ml/min

Fig. 11 Effect of KCl concentration on elution volume in paired ion chromatography

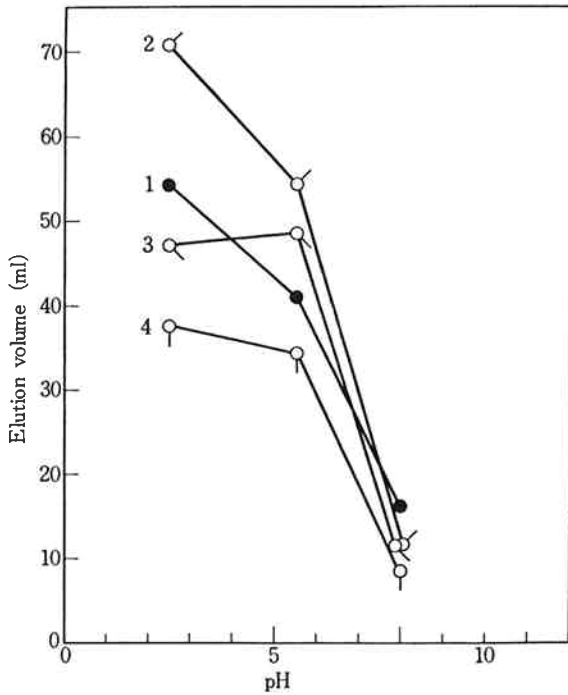
**Table 3** Benzoic acid and Phthalic acid isomers

(1) Benzoic Acid	
(2) Phthalic Acid	
(3) Isophthalic Acid	
(4) Terephthalic Acid	



Mobile Solvent : CH<sub>3</sub>CN 15 : 85 0.01 M-TBAB  
+0.05 M-phosphate buffer

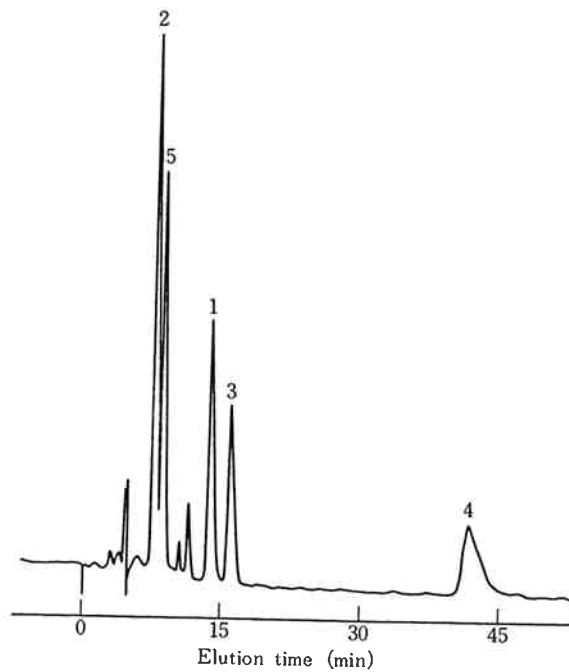
**Fig. 13** Effect of pH on elution volume of weak acid samples in paired ion chromatography



Mobile Solvent : CH<sub>3</sub>CN 15 : 85 0.01 M-TBAB  
+0.01 M-phosphate buffer

Flow Rate : 1.2 ml/min

**Fig. 12** Effect of pH on elution volume of weak acid samples in paired ion chromatography



Mobile Solvent : CH<sub>3</sub>CN 45 : 55 0.01 M-TBAC  
aq. soln.

Flow Rate : 0.70 ml/min

**Fig. 14** Separation of Taurine-conjugated Bile Acids by paired ion chromatography

て溶離液の pH を調節し、各芳香族カルボン酸の pH に対する溶出挙動を検討した。検討結果を Fig. 12, 13 に示した。pH の低いほど試料の溶出が遅く、それぞれの試料の分離も可能となっている。pH が高い領域では、試料のカルボン酸基は解離していると考えられるが、各試料の溶出量の関係から TBA イオンとの疎水性複合体は形成されにくいと考えられる。適当な対イオン (TBA イオン以外の) の検討も必要である。pH の低い領域では、カルボン酸基は解離しないので疎水性複合体は形成されず、イオン対クロマトグラフィーというよりも、むしろ通常の逆相クロマトグラフィーによる分離となっている。緩衝溶液濃度が高くなると、各試料の溶出が早くなっているが、これは試料の塩溶効果によるものと考えられる。

[5] 応用例 1 胆汁酸15成分中、Tauro成分のPICによる分離

Table 4 に Tauro 成分の名称、構造式を示した。分離例を Fig. 14 に示した。

[6] 応用例 2 カテコールアミンのPICによる分離

カテコールアミン (各成分の名称、構造式を Table 5 に示す) は一般に逆相クロマトグラフィーでは保持されにくく、実際の尿、血清中の測定では困難を伴う場合が多い。添加塩濃度の効果も少なく、 $K'$  の変化は少ない (Fig. 15) ため分離パターンをコントロールすることが難しいが、酸性溶離液条件下でアミノ基に注目し、PIC を行うことによってより大きな  $k'$  を得ることができる。

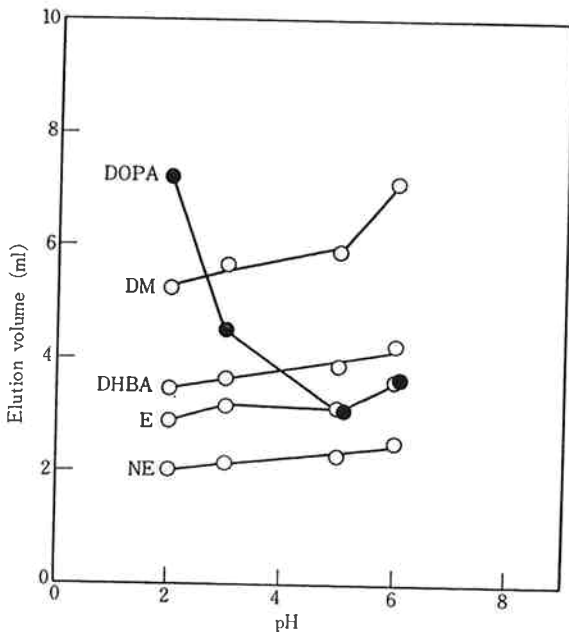
Fig. 16 は PIC 試薬としてヘキサンスルホン酸、オクタンスルホン酸を用いた場合のカテコールアミン、および前駆物質である DOPA の溶出挙動を示している。大きな対イオンであるオクタンスルホン酸を用いた場合

Table 4 Taurine-conjugated Bile Acids

(1) Tauro-Chenodeoxycholic Acid	
(2) Tauro-Cholic Acid	
(3) Tauro-Deoxycholic Acid	
(4) Tauro-Lithocholic Acid	
(5) Tauro-Ursodeoxycholic Acid	

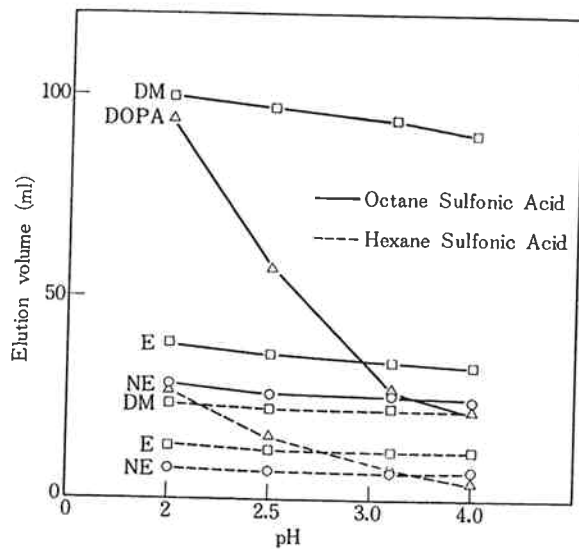
Table 5 Catechol amine

DOPA	{3- (3, 4-Dihydroxyphenyl) L-Alanine}	<chem>N[C@@H](Cc1ccc(O)c(O)c1)C(=O)O</chem>
D M	Dopamine {4- (2-Aminoethyl) pyrocatechol}	<chem>NCCc1ccc(O)c(O)c1</chem>
N E	Norepinephrine {6-Hydroxy dopamine}	<chem>NCC(O)c1ccc(O)c(O)c1</chem>
E	Epinephrine {Methyl aminoethanolcatcchol}	<chem>CNCC(O)c1ccc(O)c(O)c1</chem>
N M	Normetanephrine { $\alpha$ - (Aminomethyl) vanillyl alcohol}	<chem>NCC(O)c1ccc(O)c(OC)c1</chem>
M	Metanephrine { $\alpha$ - (Methyl aminomethyl) vanillyl alcohol}	<chem>CNCC(O)c1ccc(O)c(OC)c1</chem>



Mobile Solvent : CH<sub>3</sub>CN 2 : 98 0.1 M-Phosphate Buffer

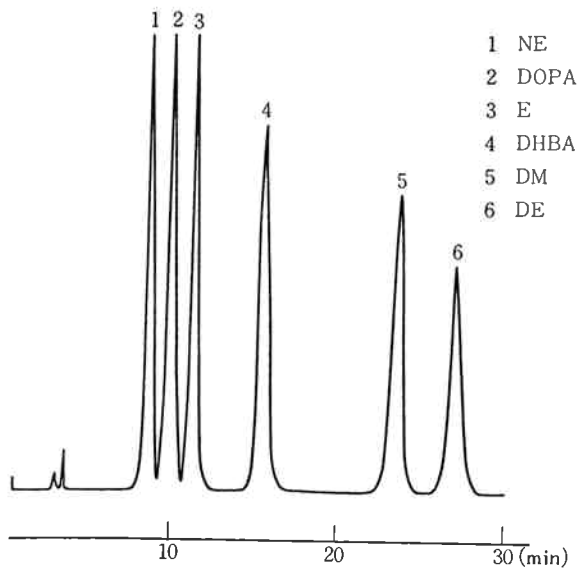
Fig. 15 Elution volume of Catechol amines versus pH in conventional reverse chromatography



Mobile Solvent : CH<sub>3</sub>OH 10 : 90 0.05 M Phosphate Buffer + 0.01 M Hexane Sulfonic Acid (Octane)

Fig. 16 Elution volume of Catechol Amines versus pH in paired ion chromatography





Mobile Solvent : CH<sub>3</sub>OH 10 : 90 0.1 M-Phosphate Buffer (pH 3.0)+0.01 M Hexane Sulfonic Acid

Fig. 17 Separation of Catechol amines by paired ion chromatography

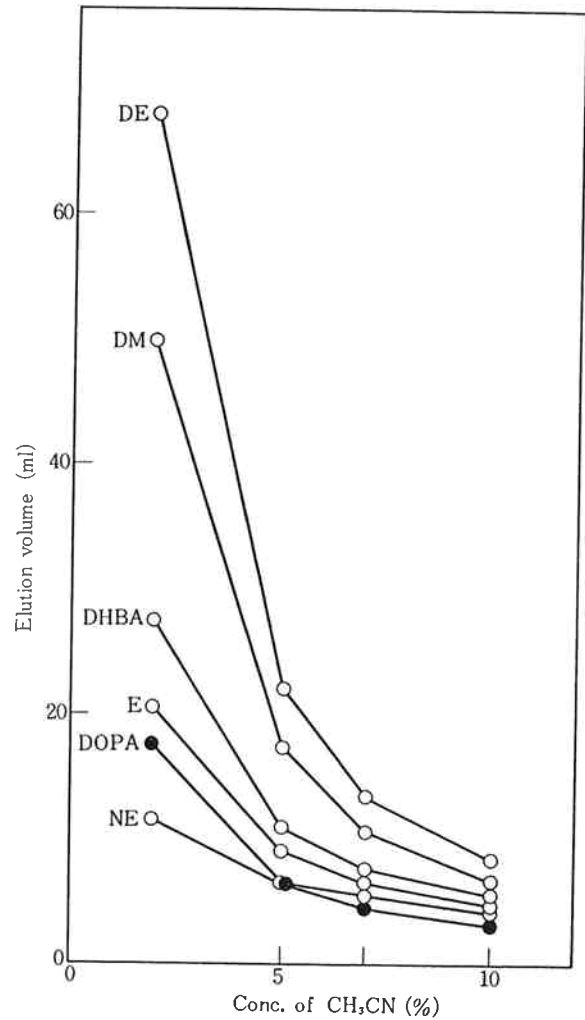
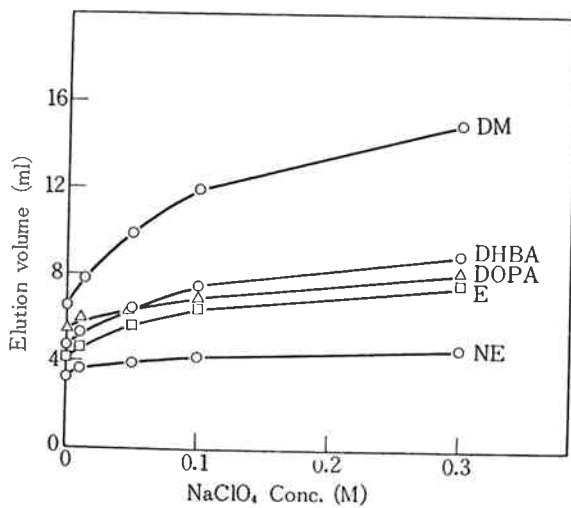


Fig. 18 Elution volume versus concentration of CH<sub>3</sub>CN in Mobile Solvent (0.1 M Phosphate Buffer+0.01 M Hexane Sulfonic Acid)



Mobile Solvent : 2% CH<sub>3</sub>CN 0.1 M Phosphate Buffer (pH 3.0)+NaClO<sub>4</sub>

Fig. 19 Elution volume versus NaClO<sub>4</sub> concentration

の方がヘキサンスルホン酸に比較し、より強く保持され、かつ分離も向上している。アミン類が pH 2~3.5 の酸性領域では pH の影響を受けないのに対し、アミノ酸である DOPA は PK をこの付近にもつカルボン酸基の存在により pH の影響を大きく受けるため、適当な pH を選択して分離条件を決定する必要がある。

Fig. 17 は定量の際、内標準として一般的によく使用されているジヒドロキシベンジルアミン (DHBA)、デオキシエピネフリン (DE) も含め pH 3 で分離した例である。さらに、通常逆相クロマトグラフィーと同様に溶離液の有機溶媒比率はその溶出量に大きな影響を及ぼす。この時の挙動もアミノ酸である DOPA は他のアミン類と異なっている。(Fig. 18)

さらに、無機系の対イオンを使った場合の挙動を Fig.

19 に示す。この場合は塩濃度の高いところでも溶出量に変化しているのが特徴的であるが、イオン対の効果だけでなく、塩析的な効果なども受けているのであると思われる。

## 5. む す び

以上述べてきたように、イオン対クロマトグラフィー (PIC) を用いることにより、解離性が強く、カラムに保持されにくい試料も比較的容易に  $k'$  を大きくすることが可能である。これに加えて、溶離液組成、無機添加濃度、pH 等のパラメータを用いることにより種々の水溶性物質の分離、分析が可能であると思われる。臨床関係、医薬品関係の物質の分離、分析において PIC の重要性は高い。