シリカ系逆相固定相の本当の姿・状態・相互作用　今までと違う？その２

株式会社クロマニックテクノロジーズ　　長江徳和

1.　はじめに

1969 年にカークランドにより発表された HPLC (High Pressure Liquid Chromatography)[1]は半世紀以上の歳月が経過し，様々な改良がなされ高性能化が進み，医学・薬学，食品，環境，工業製品など多くの分野での分離分析の手法として欠かす事のできないものとなっている。HPLC の分離モードは順相クロマトグラフィー，逆相クロマトグラフィー，イオン交換クロマトグラフィー，サイズ排除クロマトグラフィーなどがあり，用途によって使い分けされている。これらの分離モードのなかでも逆相クロマトグラフィーは様々な分野で最も多用されており，逆相固定相も日々開発・改良され続けている。シリカ充填剤表面に逆相の代表的な固定相である C18 を結合した後でもシリカ表面には 2/3 程度のシラノール基が残っている。この残存シラノール基の影響による塩基性化合物のテーリングなどが問題視されてきた。1970 年代は移動相にトリエチルアミンを添加する事により残存シラノール基の影響を防ぐ事が主流であったが，1980 年代に入ると，残存シラノール基にトリメチルシラン(TMS)を結合させ，残存シラノール基の影響を少なくする（エンドキャッピングと言われる）事が多くのカラムメーカーで行われるようになった。このようにエンドキャッピングを施したとしてもシリカ表面のシラノール基は半分程度残っている [2]と言われていた。1990 年代以降エンドキャッピング技術は進化を遂げ，エンドキャッピングによるシリカ表面の疎水化により，pH10 程度のアルカリ性移動相条件でも，シリカ系逆相カラムは使用できるようになった [3] 。また C18 固定相（カラム）は水の割合が高い水系移動相条件では，保持時間が安定せず，時間の経過とともに C18 アルキル基がシリカ表面に倒れこみ，保持時間が減少する事が 1980 年に報告 [4]された。その後 2000 年までの 20 年間に多くの研究者はアルキル基が立ち上がって，移動相に濡れている状態から，アルキル基が倒れこみ，移動相に濡れなくなる事による保持時間の減少を報告した。この現象を Dewetting という言葉を用いて説明する論文も出てきた。筆者は 2000 年に水系移動相条件における保持時間の減少について，アルキル基の倒れこみは関係なく，充填剤細孔内からの移動相の抜け出しが原因である事を発表した [5]。その後アルキル基が倒れこむ事により固定相表面と移動相が濡れなくなり，その結果充填剤細孔内から移動相が抜け出すとする論文 [6]も出てきた。2000 年以前はアルキル基の倒れこみ論が盛んに議論されていたが，2005 年以降はコンピューターシミュレーションによるアルキル基の存在状態が考察され [7]，アルキル基は立ち上がっている事はなく固まった状態である事が示された。2000 年以前は，多くのクロマトグラファーはアルキル基が立ち上がって移動相に濡れた状態でないと，相互作用が起こらず，分離できないと考えていた。しかし分液ロートを用いてヘキサンと水との間で溶質を分配する場合には，ヘキサンと水は混ざり合うことなく，それぞれの界面が 0.2 から 0.3 nm 離れて接しているだけであるが，溶質は両溶媒に分配する事を考慮すれば，逆相クロマトグラフィーにおいても同様に固定相と移動相がある隙間を維持した界面で接していれば分配は問題なく起こる事になる。つまり，固定相と移動相は濡れる必要はなく，ヘキサンと水のように界面で接触していれば溶質は分配し，分離が達成される事になる。このように二十数年前に常識的に語られていた事柄が，実

はそうではない事は，科学の進歩に伴い多々出現すると考えられる。逆相クロマトグラフィーにおける固定相または移動相の状態や溶質との相互作用など，従来とは異なった観点からみれば，新しい発見，考え方や見方ができる可能性がある。逆相液体クロマトグラフィーの基礎講座 S1009 ではシリカ系逆相充填剤・逆相カラムに関わる事項として，「アルキル基の長さの分離への影響」，「水系移動相使用時の保持の変化」，「メタノール/水移動相の C18 固定相への濡れ性」，「アルキル基の有機溶媒和と分離特性」を考察したが，本テクニカルノートでは「その 2」として「C18，C8，C30，Phenyl-hexyl，Biphenyl，PFP&C18，PFP 固定相の分離特性」，「アルキル基シリル化試薬のモノ・ジ・トリ官能基による耐久性への影響」，「コアシェル粒子の特徴：摩擦熱・カラム外死容積の影響」を考察する。

2. C18，C30，C8，Phenyl-hexyl，Biphenyl，PFP&C18，PFP 固定相の分離特性

2.1 標準試料の分離による比較

図 1 には固定相の概略図を示す。それぞれの固定相は三官能性シリル化試薬を用いているので，シリル化試薬のケイ素原子は 3 個の酸素と一個の炭素が結合している。フェニル基系固定相はケイ素原子とフェニル基の間にスペーサーとしてアルキル基を入れる事が多いが，Biphenyl 固定相はケイ素原子に直にビフェニル基が結合している。図 2 にはコアシェルシリカに三官能性シリル化試薬を結合後エンドキャッピング処理を行った C18 固定相，C30 固定相，C8 固定相，Phenyl-hexyl 固定相，Biphenyl 固定相，PFP (Pentafluorophenyl)固定相及び PFP&C18 固定相の標準試料の分離と，それぞれの充填剤の炭素含有量，カフェインとフェノールの分離係数としての水素結合性，アミルベンゼンとブチルベンゼンの分離係数としての疎水性及びトリフェニレンと o-ターフェニルの分離係数としての立体選択性を示す。またウラシルの溶出時間をホールドアップタイムとした。C18，C30 及び C8 のアルキル基固定相は炭素含有量の多い順番で保持が大きく，逆相液体クロマトグラフィーの基礎講座 S1009 で述べた結果と同じであるが，フェニル基，ペンタフルオロフェニル基固定相では炭素含有量の保持への効果がアルキル基固定相より低い。C8 固定相と Biphenyl 固定相では C8 の方が炭素含有量は低いがアミルベンゼンの保持は大きい。水素結合性はフェノールを基準としたカフェインの保持割合であり，水素結合性が大きいと極性の高い（水素結合性が強い）化合物の保持が大きくなる。これは，エンドキャッピングを施していない C18 充填剤は残存シラノール基とカフェインの水素結合性による二次的相互作用が強く働くため，カフェインの保持は大きくなるが，フェノールは残存シラノール基による二次的相互作用を受けにくく，大きな保持の変化がない特性を利用したものである。さまざまなエンドキャッピングを施したアルキル基固定相の水素結合性に差があるのは，エンドキャッピング効率が異なることにより，シリカ表面上にまだ残るシラノール基量が変わるためであると考えられる。アルキル鎖長が長くなるほど立体障害で結合密度が低くなり，シリカ表面付近ではエンドキャッピング（例えばトリメチルシリル(TMS)化）の割合が増えてくる。TMS 化のみの固定相は水素結合性が他のアルキル基固定相より高く，TMS の疎水性の低さと TMS 固定相の嵩が小さいことが，水素結合性を高くしている要因になっていると考えられるため，3 種のアルキル基固定相の中で最も結合密度が高くなり，その結果としてエンドキャッピングの割合の少ない

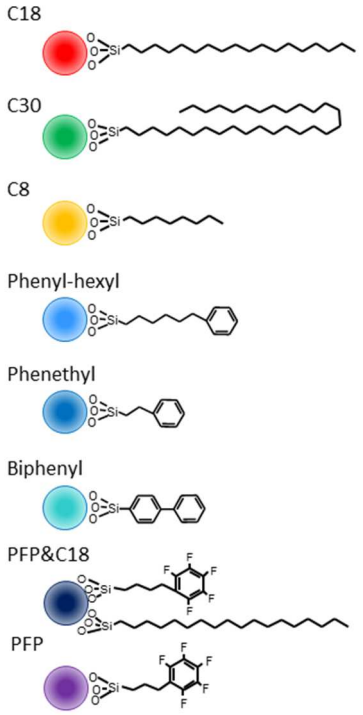
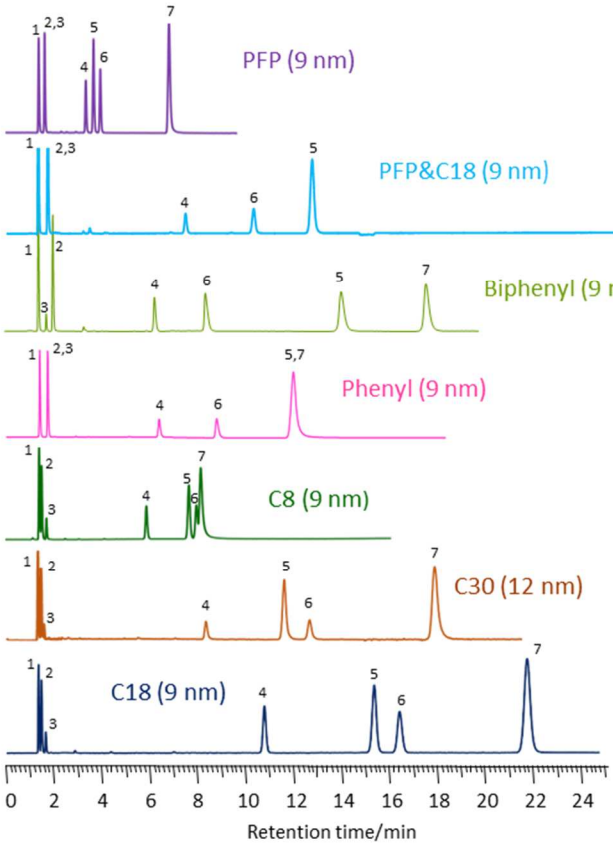
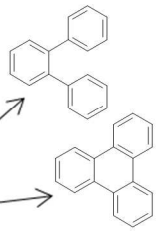


図 1　固定相の概略図



Peaks: 1 = Uracil
2 = Caffeine
3 = Phenol
4 = Butylbenzene
5 = o-Terphenyl
6 = Amylbenzene
7 = Triphenylene



	炭素含有量	水素結合性 α(Caffeine/Phenol)	疎水性 α(Amylbenzene/Butylbenzene)	立体選択性 α(Triphenylene/o-Terphenyl)
PFP (9 nm)	4.5 %	1.00	1.31	2.38
PFP&C18 (9 nm)	6 %	1.00	1.47	2.64
Biphenyl (9 nm)	5 %	1.82	1.44	1.28
Phenyl (9 nm)	5 %	1.00	1.48	1.01
C8 (9 nm)	4.5 %	0.32	1.46	1.08
C30 (12 nm)	6.5 %	0.54	1.59	1.59
C18 (9 nm)	7 %	0.39	1.60	1.46

図２　標準試料の分離と水素結合性・疎水性・立体選択性 c

Column, SunShell PFP, SunShell PFP&C18, SunShell Biphenyl, SunShell Phenyl, SunShell C8, SunShell C30, SunShell C18, 2.6 µm 150 x 4.6 mm; mobile phase, methanol/water=75/25; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 40 °C; detection, UV250 nm; peaks, 1=uracil, 2=caffeine, 3=phenol, 4=butylbenzene, 5=o-terphenyl, 6=amylbenzene, 7=triphenylene.

C8 固定相が最も水素結合性が低くなった。また，ここでは示していないが，エンドキャッピング度合いをあえて低くし，残存シラノール基の影響を残した固定相も水素結合性は高くなる。PFP 固定相，PFP&C18 固定相，Phenyl-hexyl 固定相及び Biphenyl 固定相はアルキル基固定相よりも水素結合性が高い値となった [8]。特に Biphenyl 固定相は C18 固定相と同じエンドキャッピングを施しており，残存シラノール基の影響は少ないはずであるが，エンドキャッピングを施していない C18 固定相と同じか，それ以上の高い水素結合性を示した。フェノール基やビフェニル基の特性として，ベンゼン環に由来する π 電子の存在により環の中心部が最もマイナスに偏っていると考えられ，この電子の偏りが水素結合性を大きくしており，カフェインのような極性化合物をより強く保持するようになると推察される。Biphenyl 固定相はベンゼン環が 2 つ結合しており，固定相としては結晶状態になっておらず，液体に近い状態であると考えられ，二つのベンゼン環は約 45 度傾いて結合している。この隣接した 2 つのベンゼン環の相乗効果により水素結合性がより強くなっていると思われる。立体選択性の測定に用いられたトリフェニレンと o-ターフェニルは 3 つのベンゼン環が結合しており，トリフェニレンは 3 つのベンゼン環が平面的に配置しているのに対し，o-ターフェニルはそれぞのベンゼン環はねじれた状態になっている。この立体的な差の認識（分離）度合いを立体選択性としている。アルキル基固定相ではアルキル鎖長の長い固定相ほど立体選択性は高くなり，メチル基の位置異性体である β-トコフェロールと γ-トコフェロールは立体選択性の高い C30 固定相の方が C18 固定相より良い分離を示す [9]。ここで用いた C8 固定相は三官能性オクチルシリル化試薬を用いていたが，一官能性オクチルジメチルシリル化試薬を用いた C8 固定相はトリフェニレンが o-ターフェニルより先に溶出し，立体選択性は 1 未満の値になる。つまりトリフェニレンと o-ターフェニルの溶出順序は逆転する。一官能性と三官能性のシリル化試薬の

差であるジメチルがあるなしの違いによる選択性の差は決して小さくないので，一官能性，二官能性及び三官能性のシリル化試薬を用いたの固定相の区別は重要になる。ここで比較している固定相は前述されているように全て三官能性シリル化試薬を用いている。Biphenyl 固定相及び Phenyl-hexyl 固定相については立体的な差を認識すると言うよりも，π-π 相互作用が強く発揮されてトリフェニレンと o-ターフェニルは保持していると考えられる。アルキル基固定相では o-ターフェニルの溶出後にアミルベンゼンが溶出するが，フェニル基固定相では π-π 相互作用により o-ターフェニルの保持が大きくなり，アミルベンゼンとの溶出順序が逆転した。トリフェニレンの保持について，Phenyl-hexyl 固定相では o-ターフェニルとトリフェニレンは同じ時間に溶出したが，Biphenyl 固定相はアルキル基固定相と同様にトリフェニレンの保持が大きくなった。Phenyl-hexyl 固定相と Biphenyl 固定相は，共にフェニル基型の固定相として分類されるが，水素結合性と立体選択性の値が大きく異なった。PFP 固定相はフェニル基に 5 つのフッ素原子が結合し，疎水性相互作用，水素結合性，双極子相互作用，π-π 相互作用及び静電的相互作用が働いていると言われており，他の固定相と大きく異なる。PFP 固定相と PFP&C18 固定相については，ここで用いた立体選択性の値は 2 以上になった。これは他の固定相に比べ非常に大きな値であり，o-ターフェニルとトリフェニレンの保持についてはフェニル基型固定相と同様にアルキル基固定相とは異なる相互作用が働いていると推察される。また，PFP&C18 固定相は PFP 固定相に C18 固定相を加えたもので，疎水性の値は C18 固定相が加わった事で増加し，保持は大きくなったが，水素結合性や立体選択性の値は PFP 固定相とほぼ同じであり，PFP&C18 固定相も PFP 固定相と同様な分離特性を有していた。PFP 固定相は PFP ならではの分離挙動を示し，特にフッ素原子が電子を引っ張っており，電子の偏りが生じるため，カチオンの保持が大きくなる。図 3 に C18 固定相と PFP 固定相の塩基性化合物の分離を示す。移動相 pH は 7 であり，これらの塩基性化合物はプロトン化したカチオンとして存在する。移動相中のアセトニトリル濃度は 80%であり，C18 固定相では塩基性化合物をほとんど保持していないのに対し，PFP 固定相は 5 分から 8 分に溶出し，大きな保持を示した。これは静電的相互作用による保持の増大であると考えられる。このカチオンの保持を大きくしている相互作用を陽イオン交換相互作用であるとする報告[10]もあるが，PFP 固定相のフッ素原子はイオン化しておらず，イオン交換は起こりえないと考えられる。また，この静電的相互作用は移動相中有機溶媒濃度が高くなるほど大きく作用し，塩基性化合物の保持時間が長くなる。この現象をヒリックモードの分離挙動だと説明される事[11]もある。ヒリックモードは順相モードの一部であり，移動相に有機溶媒と緩衝液の混合溶媒を用いた場合を特にヒリックと表現している。順相とは移動相より固定相の方が極性が高く，極性の高い溶質ほど保持が大きくなり，逆相とは反対になる。しかし，PFP 固定相は有機溶媒と緩衝液の混合溶媒の移動相より疎水性が高く，図 3 の分離の塩基性化合物の保持は疎水性の高いものほど保持時間は長くなっており，逆相の分離挙動である。移動相中有機溶媒濃度の上昇とともにカチオンの保持が大きくなるのは静電的相互作用が，移動相中の有機溶媒濃度が高いほど相対的に強くなるからだと推察され，逆相分配相互作用に二次的に静電的相互作用が加味されていると考えられる。

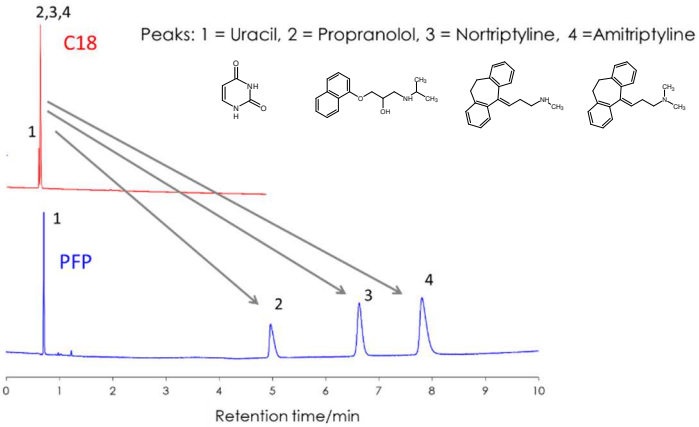


図３　C18 と PFP 固定相による塩基性化合物の分離

Column, SunShell C18, PFP 2.6 μm 140 x 4.6 mm; mobile phase, acetonitrile/10 mmol/L phosphate buffer pH 7.0=80/20; flow rate, 1.8 mL/min; temperature, 25 °C; Peaks, 1=uracil, 2=propranolol, 3=nortriptyline, 4=amitriptyline.

2.2　オルト-，メタ-，パラ-メチル馬尿酸の分離による比較

4 種の固定相を用い得られたオルト-，メタ-，パラ-メチル馬尿酸のクロマトグラムを図 4 に示す。固定相として C18，C30，Phenyl-hexyl 及び Biphenyl を用い，また移動相中の有機溶媒としてメタノール，2-プロパノール，アセトニトリル及びテトラヒドロフラン(THF)を用いて，それぞれの固定相の分離を比較した。メチル馬尿酸はメタと

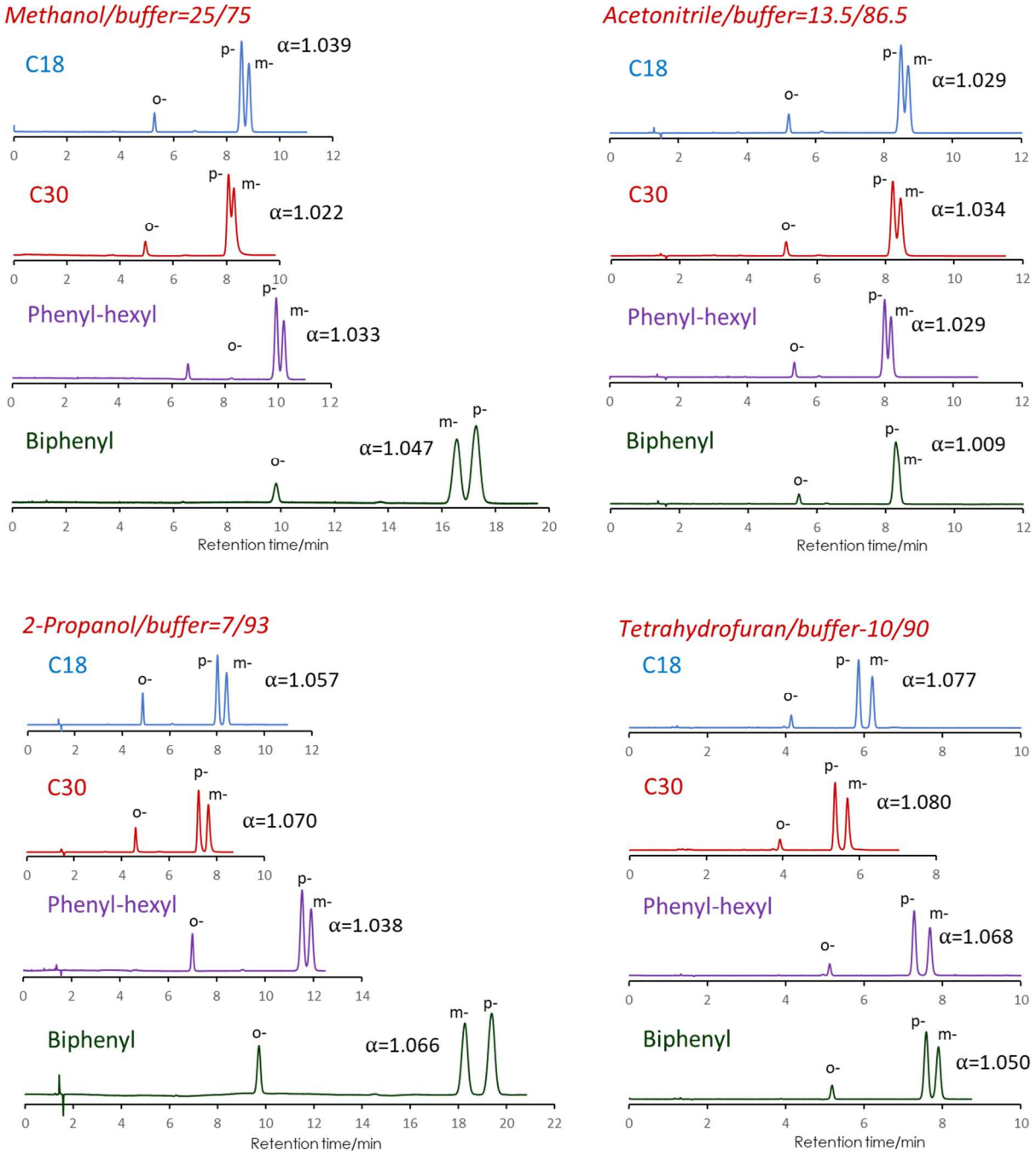


図４　*o*-，*m*-，*p*-メチル馬乳酸の分離

Column, SunShell C18, SunShell C30, SunShell Phenyl, SunShell Biphenyl 2.6 µm 150 x 4.6 mm; mobile phase,　organic solvent/25 mmol/L phosphate buffer pH3.0; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 40 °C; detection, UV230 nm; peaks, *o*-, *m*-, *p*-methylhippuric acid.

ortho　　*meta*　　*para*

パラの異性体の分離が難しく，近接して溶出される。それぞれのクロマトグラム上にメタとパラの異性体の分離係数 α を示した。移動相中の有機溶媒が 25%メタノールと 13.5%アセトニトリルの場合を比較すると，25%メタノールは固定相により保持時間が大きく異なり，Phenyl-hexyl 固定相は C18 固定相より保持時間は長くなり，Biphenyl 固定相はさらに保持時間が長く，C18 固定相と比較し約 2 倍の保持時間となった。しかし 13.5%アセトニトリルではすべての固定相でほぼ同じ保持時間となった。さらに Biphenyl 固定相におけるパラ-メチル馬尿酸とメタ-メチル馬尿酸の溶出順序に関しては，25%メタノールでは他の固定相とは溶出順序が逆転したが，13.5%アセトニトリルでは他の固定相と同じ溶出順序であった。25%メタノールで Phenyl-hexyl 固定相や Biphenyl 固定相においてメチル馬尿酸の保持が大きくなったのは π-π 相互作用によるものであると考えられる。アセトニトリルの CN の三重結合が固定相と溶質の間の π-π 相互作用を弱めるため，13.5%アセトニトリルではフェニル基の特徴が発揮されず，保持時間はそれぞれの固定相で大差なく，Biphenyl 固定相でのパラ・メタ-メチル馬尿酸の溶出順序は逆転しなかったと推察される。図 4 では示されていないが，ケイ素原子にアルキル基スペーサーがなく，直接フェニル基が結合している固定相でも 25%メタノール条件では Biphenyl 固定相と同様にパラ・メタ-メチル馬尿酸の溶出順序は逆転する。Phenyl-hexyl 固定相はヘキシル基を含んでおり，このヘキシル基の疎水性が固定相に加味され，フェニル基の π-π 相互作用や水素結合性が相対的に弱くなったと推察される。またスペーサーとしてエチル基を用いたフェネチル(Phenethyl)固定相においてもパラ・メタの順にメチル馬尿酸は溶出するが，パラ-メチル馬尿酸の保持が大きくなり，パラ-メチル馬尿酸とメタ-メチル馬尿酸の分離係数は 1 に近くなった。これらの事からパラ・メタの順にメチル馬尿酸が溶出するのは疎水性相互作用が強く働いているためであると考えられる。次に移動相中の有機溶媒が 25%メタノールと 7% 2-プロパノールを比較すると，それぞれの固定相間の保持時間や溶出順序などの溶出パターンはよく似ている。しかしパラ-メチル馬尿酸とメタ-メチル馬尿酸の分離係数はすべての固定相について 7% 2-プロパノールの方が大きくなった。25%メタノールと 7% 2-プロパノールでは C18 固定相のメタ-メチル馬尿酸の保持はほとんど同じであるが，Phenyl-hexyl 固定相や Biphenyl 固定相は 7% 2-プロパノールの方が保持は 10%以上大きくなっており，これは移動相中の有機溶媒としてはメタノールより 2-プロパノールの方が π-π 相互作用やフェニル基による水素結合性を強める働きがあると推察される。10% THF の場合には 13.5%アセトニトリルほどではないが，それぞれの固定相における保持時間の差は少なくなった。また Biphenyl 固定相以外の固定相についてパラ-メチル馬尿酸とメタ-メチル馬尿酸の分離係数は最も大きな値となった。Biphenyl 固定相は 13.5%アセトニトリルと同様に 10% THF でもメチル馬尿酸はパラ・メタの順に溶出した。この事により，10% THF でも 13.5%アセトニトリルと同様に π-π 相互作用やフェニル基による水素結合性を弱める働きあるものと推察される。THF に二重結合や三重結合は有していないので，アセトニトリルとは異なる相互作用が働いていると思われる。THF はオクタデカンを溶かす事ができ，C18 固定相や他の固定相を膨潤させる。つまり，C18 固定相，C30 固定相や C8 固定相はメタノール/水系移動相ではアルキル基が固まった状態で存在し，その固まった状態の上部に有機溶媒が溶媒和して存在し，溶質は固まっている固定相のみと相互作用するのに対し，THF/水系移動相では THF は固まった固定相内部に入り込む事ができ，THF と元の固定相と混在している状態で固定相として働いていると考えられる [9]。このように固定相自体が変化してるため，Biphenyl も Biphenyl 単独としてではなく，Biphenyl と THF の両方が固定相として働いたため，パラ-メチル馬尿酸とメタ-メチル馬尿酸の溶出順序も C18 固定相と同じになったと考えられる。図 4 には PFP 固定相は入っていないが，PFP 固定相はすべての有機溶媒条件においてメタ-メチル馬尿酸とパラ-メチル馬尿酸は分離せず，一本のピークとして検出された。以上述べてきたように，オルト-，メタ-，パラ-メチル馬尿酸の 3 種の位置異性体の分離を比べただけでも，固定相の違いや移動相中の有機溶媒の種類で分離自体が大きく変化する事が明らかとなった。

2.3　核酸塩基の分離による比較

図 5 に C18，C30 及び Biphenyl 固定相の核酸塩基類の分離を示す。核酸塩基は極性が高いため，メタノールを 20%程度含む移動相では保持係数が 1 以下になる。有機溶媒を含まない緩衝液の移動相では，例えばチミンの保持係数は 3~5 程度に増大する。逆相カラムは有機溶媒濃度が 5%を下回るような移動相では保持時間の再現性が低くなる事が知られており，これは毛管作用による充填剤細孔内からの移動相の抜け出だしにより起こると報告されている[12]。原因が分かれば、対処方法も自ずと分かる。毛管作用により充填剤細孔内から移動相を抜けださせる圧力が働くが、この圧力以上の背圧をカラム出口以降にかければ移動相の抜け出しは起こらない。流速 1 mL/min で送液する場合には内径 0.1 mm・長さ 500 mm の配管をカラム出口以降に接続すれば，約 5 MPa の背圧がかかり，この状態で送液を停止しなければ一般的な細孔径 10 nm の逆相充填剤の細孔内から移動相は抜け出す事なく，保持時間の再現性のある分離が可能となる[13]。図 5 の C18 カラムの有機溶媒を含まない 10 mmol/L の酢酸アンモニウム水溶液を移動相とした分離は，カラム出口以降に 5 MPa の背圧をかけ，充填剤細孔内からの移動相が抜け出ないようにしている。3 種類の固定相を比較すると，最後に溶出する成分は Biphenyl 固定相が最も大きな保持を示した。また，5 番のチミンと 6 番のアデニンは Biphenyl 固定相のみ溶出順序が逆転した。さらにグアニンの相対的な保持は Biphenyl 固定相が特に小さく，ウラシルと近い保持時間となった。これらの現象は 20%のメタノールを移動相に加えた時も，100%水系移動相と同様であった。図 2 で示されている水素結合性が最も高い Biphenyl 固定相は，核酸塩基の保持や，溶出順序に水素結合性が大きく寄与していると考えられる。Biphenyl 固定相は π-π 相互作用や CH/π 相互作用[14]が働くと言われているが，これらの相互作用も加味され，カフェインの保持を大きくする水素結合性が増大したと考えられる。100%水系移動相を用いた場合のポンプ停止前後の保持時間の安定性は C30 と Biphenyl 両固定相とも高く，ポンプ停止後再度通液して得られた保持時間はポンプ停止前の 96%以上であった。しかし，C18 固定相ではポンプ停止後は 15%まで保持間は減少した。

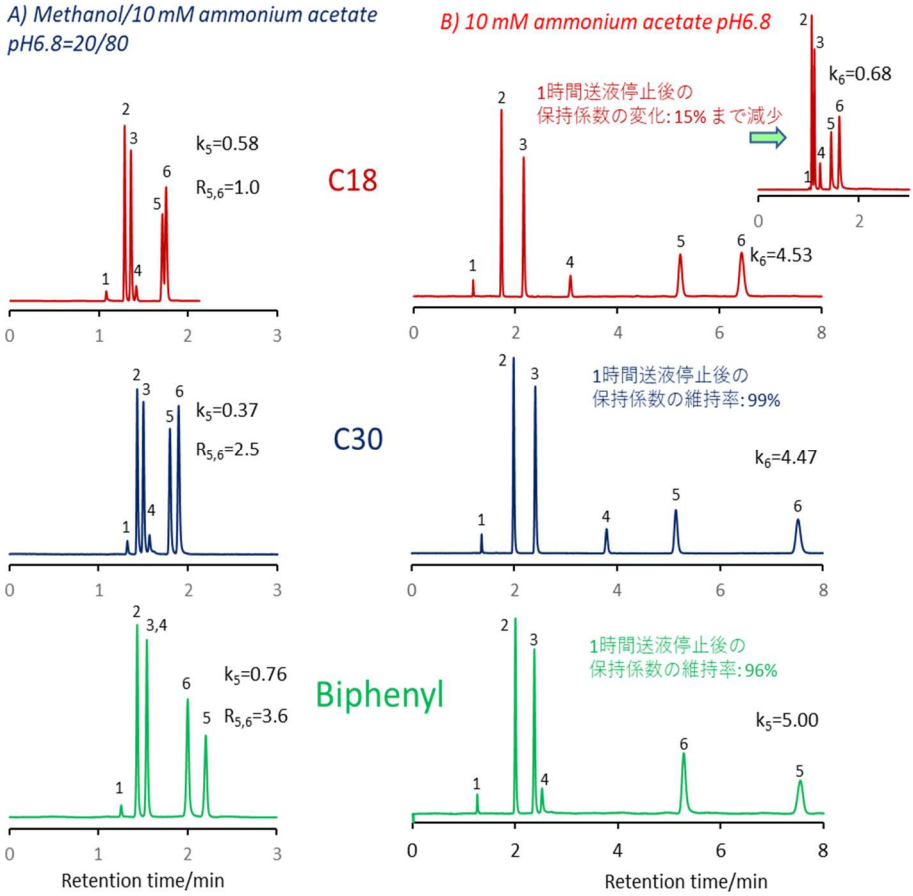


図５　核酸塩基の分離

Column, SunShell C18 (pore size, 9 nm), SunShell RP-AQUA (C30, pore size, 16 nm), SunShell Biphenyl (pore size, 9 nm), 2.6 µm, 150 x 4.6 mm; mobile phase, A) methanol/10 mmol/L ammonium acetate pH 6.8=20/80, B) 10 mmol/L ammonium acetate pH 6.8; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 40 °C; detection, UV250 nm; Peaks, 1 = Sodium nitrite, 2 = Cytosine, 3 = Uracil, 4 = Guanine, 5 = Thymine, 6 = Adenine.

2.4　スチルベンの分離による比較

図 6 にスチルベンの分離を示す。移動相はメタノール/水=75/25 とアセトニトリル/水=60/40 を用い，C18, C30, Phenyl-hexyl, Biphenyl, PFP&C18 及び PFP 固定相の比較を行った。*cis*-スチルベン *trans*-スチルベンの分離係数(α)と分離度(Rs)をクロマトグラム上に記載した。メタノール/水移動相ではすべての固定相で *cis*-スチルベンが *trans*-スチルベンより先に溶出したが，Phenyl-hexyl 固定相はほとんど分離できておらず，π-π 相互作用が強く働く Biphenyl 固定相はピークがテーリングした。PFP&C18 固定相が最も分離度が高く，次に高い分離度を示したのは C30 固定相であった。アセトニトリル/水移動相では C18, Phenyl-hexyl 及び Biphenyl 固定相は *cis*-スチルベンと *trans*-スチルベンの溶出順序が逆転し，*trans*-スチルベンが先に溶出した。これらの固定相での分離係数は 1.07 以下であり，分離度も高くなかった。溶出順序が変わらない C30，PFP&C18 及び PFP 固定相は図 2 で示された立体選択性の値の高い固定相であり，この三つの固定相では，図 2 の分離でトリフェニレンの保持がもっとも大きい PFP&C18 固定相がスチルベンの分離でも最も高い分離係数及び分離度を示した。*cis*-スチルベンと *trans*-スチルベンの分離では立体選択性と疎水性の両効果が分離に寄与していると推察される。

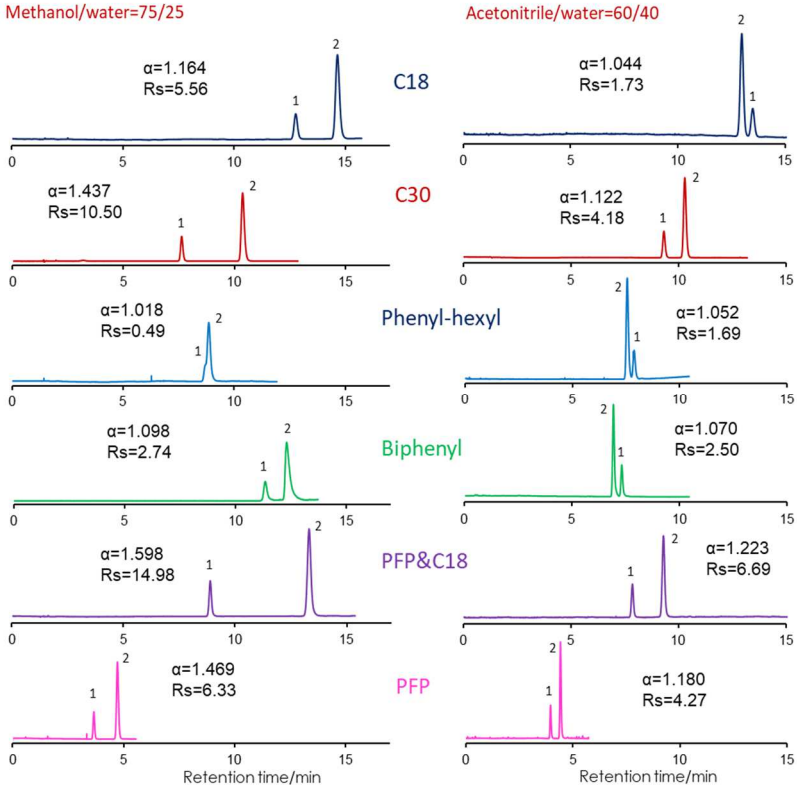
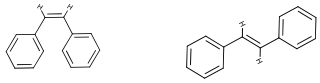


図６　スチルベンの分離

Column, SunShell C18, SunShell C30, SunShell Phenyl, SunShell Biphenyl, SunShell PFP&C18, SunShell PFP 2.6 µm 150 x 4.6 mm; mobile phase, methanol/water=75/25, acetonitrile/water=60/40; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 40 °C; detection, UV230 nm; peaks, 1 = *cis*-Stilbene, 2 = *trans*- Stilbene.



2.5　副腎皮質ステロイド類の分離による比較

図 7 には副腎皮質ステロイドであるプレドニゾン，コルチゾン，プレドニゾロン及びヒドロコルチゾンの分離を C18，C30，Phenyl-hexyl，Biphenyl，PFP&C18 及び PFP 固定相を用いて比較した。移動相は THF 水=20/80 とメタノール/水=50/50 を用いた。THF/水=20/80 移動相では，PFP&C18 固定相はコルチゾンとプレドニゾロンを分離できなかったが，C18，C30，Phenyl-hexyl 及び Biphenyl 固定相は 4 本のピークとも十分な分離が達成された。この 4 種の固定相はよく似た分離パターンで，固定相による分離の差があまり認められなかった。これは前述のメチル馬尿酸の THF/緩衝液移動相を用いた分離比較の時と同様であった。メタノール/水=50/50 移動相では，PFP 以外の固定相では 4 成分の分離ができす，特にプレドニゾロンとヒドロコルチゾンピークが重なる事が多かった。4 成

分の溶出順序は固定相により大きく異なり，アルキル基固定相(C18，C30)は分離出来てないピークを含めて，プレドニゾン，コルチゾン，プレドニゾロン，ヒドロコルチゾンの順に溶出した。フェニル基系の固定相(Phenyl-hexyl，Biphenyl)では1番・2番ピークのプレドニゾン，コルチゾンが遅く溶出するようになり，Biphenyl固定相では3番・4番ピークより遅く溶出した。PFP固定相のみ4本のピークは分離されたが，溶出順序はアルキル基固定相と逆になった。さらに，PFP&C18固定相はPFP固定相とC18固定相の両特性を有しており，それぞれの固定相で溶出順序が逆になっているため，4本のピークは分離する事なく重なったと推察される。スチルベンの分離ではPFP固定相とC18固定相の相乗効果で分離は向上したが，副腎皮質ステロイド類ではその逆であった。副腎皮質ステロイド類をメタノール/水移動相で分離した場合には，固定相の種類により分離が大きく異なった。これはメタノール/水移動相ではそれぞれの固定相の特徴が強く発揮される事を意味している。アセトニトリルはπ-π相互作用を弱め，THFは固定相の一部となり，それぞれの固定相の特性を弱めると考えられる。副腎皮質ステロイド類は，THFを移動相の有機溶媒として用いる事により，多くの固定相で分離できる事が確認された。

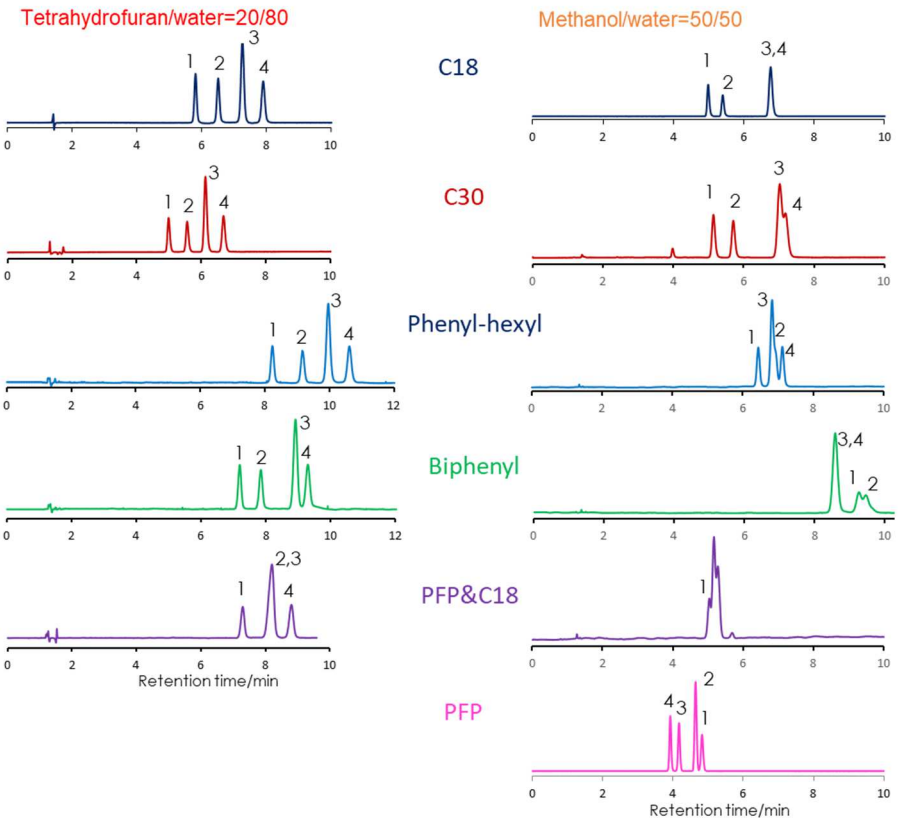
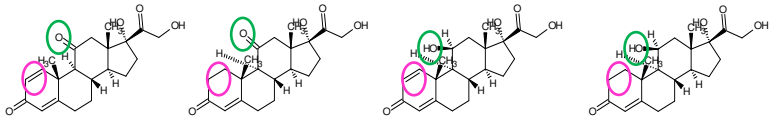


図7　副腎皮質ステロイド類の分離

Column, SunShell C18, SunShell C30, SunShell Phenyl, SunShell Biphenyl, SunShell PFP&C18, SunShell PFP 2.6 μm 150 x 4.6 mm; mobile phase, A) THF/water = 20/80, B) methanol/water = 50/50; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 25 °C; detection, UV250nm;

Peaks, 1= Prednisone,　2 = Cortisone,　3 = Prednisolone,　4 = Hydrocortisone.



3.　アルキル基シリル化試薬のモノ・ジ・トリ官能基による耐久性への影響

シリカ系充填剤の劣化は，酸性条件でもアルカリ性条件でも加水分解により起こる。図8には酸性条件下とアルカリ性条件下の加水分解過程の概略図を示す。酸性条件下ではプロトン(H^+)が求電子試薬として働き，電子密度の高い酸素原子に対して，求電子反応が起こる。シリル化試薬がシリカ表面にシロキサン結合しているが、このシロキサンの酸素原子を起点とした加水分解によりシロキサン結合が切れ，アルキル基などがシリカ表面から脱離する。シリカゲルの最も安定なpHは1.7であり，酸性条件ではシリカゲル基材は安定であるが，結合しているアルキル基などが加水分解で脱離する。またアルカリ性条件下では水酸化物イオン(OH^-)が求核試薬として働き，電子密度の低いケイ素原子に対して，求核反応が起こる。シリカ（二酸化ケイ素）骨格の表面のシラノール基の根元のケイ素

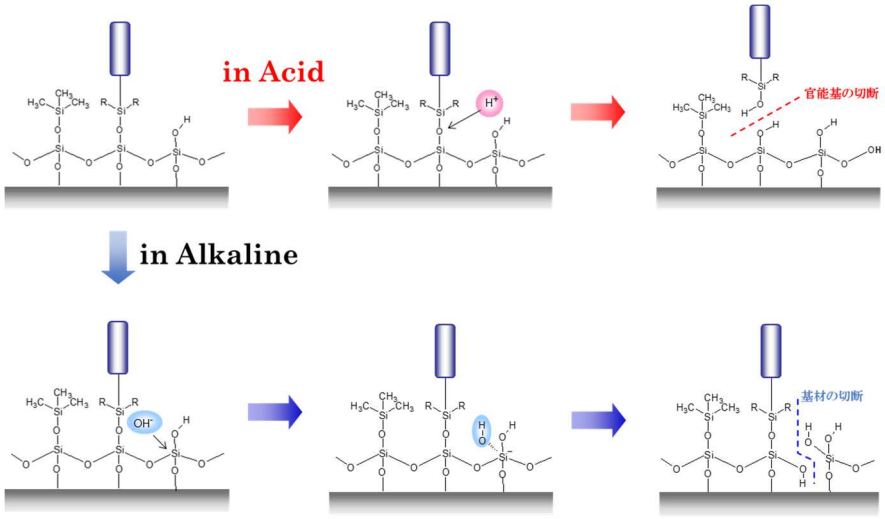


図８　酸性/アルカリ性下でのシリカゲルの分解

原子に対して求核反応が起こり，結果として加水分解が起こりシロキサン結合が切れる事によりシリカが溶け出す。

図９にはシリル化試薬とシリカ表面の結合状態の模式図を示す。モノ，ジ及びトリクロロシラン試薬がシリカ表面に一か所のシロキサン結合をした場合の結合状態である。結合後，水を含む溶媒で洗浄する事によりクロロシランの塩素はシラノール基に変換される。図中に示したデルタマイナス(δ-)は電子の偏りを示している。モノ（一官能性）の試薬の場合シリル化試薬のケイ素原子には三つの炭素原子と一つの酸素原子が結合しており，電気陰性度の関係から，炭素原子よりも酸素原子の方がケイ素原子から強く電子を引っ張る。シリル化試薬のケイ素原子に結合している酸素の数が最も少ないモノシリル化試薬のケイ素にシロキサン結合している酸素は最も電子が偏っており，酸性条件で起こる求電子反応が起こりやすく，加水分解しやすい。逆にトリ（三官能性）試薬は酸素三つがシリル化試薬のケイ素に結合しており，三つの酸素が一つのケイ素原子から電子を引っ張るため，シロキサン結合している酸素原子への電子の偏りは，モノやジ（二官能性）試薬の場合に比べ小さくなり，求電子反応が起こりにくく，加水分解も起こりにくくなる。図 9 ではクロロシリル化試薬を示しているが，トリクロロシリル化試薬の結合がたとえ一か所のシロキサン結合だけでも，酸性条件では最も切れにくく，酸性条件下での耐久性は最も高くなる。もちろんシリカ基材とのシロキサン結合の数が増える事により耐久性は向上する。またエンドキャッピングを強化して，シリカ表面近くの疎水性を上げ，水分子の接近を妨ぐ事でも，加水分解そのものが起こりにくくなるため耐久性は向上する。図 9 では 3 種類の官能性のシリル化試薬は 1 か所のシロキサン結合しかしていないように記されているが，実際にはジまたはトリのシリル化試薬は全てではないが 2 か所以上シロキサン結合をしている。^{29}Si CP-MAS NMR 法を用いて，C18 充填剤の結合状態を測定した結果[3)]からも 2 か所以上のシロキサン結合が確認され，さらにエンドキャッピングを施す事により，シリル化試薬のケイ素原子のシラノール基へもエンドキャッピングシリル化剤（トリメチルシラン，TMS）が結合し，シロキサン結合が生成している事も確認されている。

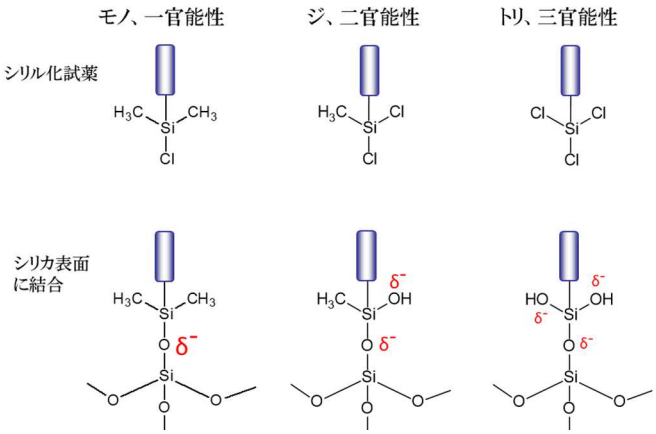


図９　シリル化試薬とシリカ表面の結合

前述のように，アルカリ性条件下では水酸化物イオン(OH^-)が求核試薬として働き，電子密度の低いケイ素原子に対して，求核反応が起こり加水分解によりシロキサン結合が切れるが，ケイ素原子の電子の偏りによりどのように結合しているケイ素原子に求核反応が起こるかを説明する事ができる。ケイ素原子は電子を引っ張る酸素原子が多く結合しているほど強くプラスに偏り，求核反応・加水分解が起こりやすくなる。シリカ骨格内のケイ素は四つの酸素原子と結合しているが，

シリル化剤のケイ素原子は一つから三つの酸素原子と結合している。シリカ骨格内部には求核試薬（水酸化物イオン）や水分子は入り込む事ができなと考えられるため，シリカ表面に存在するシラノール基の根元のケイ素原子に対して求核反応・水分解が起こると考えられる。1990 年代までのエンドキャッピングでは，シリル化試薬のケイ素原子にメチル基が二つ結合しているモノ（一官能性）の試薬を結合し，その後 TMS でエンドキャッピングを施した固定相の方が，ジ・トリ（二・三官能性）の試薬を用いてエンドキャッピングを施した固定相よりシリカ表面の残存シラノール基が少なくなる事が多く，アルカリ性条件下では酸性条件下と逆にモノ（一官能性）の試薬の方が耐久性は高くなると言われていた。また，モノ・ジ・トリ官能基のシリル化試薬のケイ素原子は一つから三つの酸素が結合しており，このケイ素原子の電子の δ+への偏りは，一つの酸素が結合したモノ（一官能性）のシリル化試薬が最も少ないことから，耐アルカリ性はモノ・ジ・トリの中ではモノ（一官能性）シリル化試薬を結合した固定相が最も高いと考えられていた。しかしこれは 2000 年以降 200 ℃以上の高温条件での高効率なエンドキャッピングが行われるようになり，高温反応でも安定なトリ（三官能性）のシリル化試薬を用いたものが，それまでのモノ・ジ（一・二官能性）のシリル化試薬を用い，エンドキャッピングを施した固定相よりアルカリ性条件での耐久性が高くなった事から，アルカリ性条件での劣化はシリル化試薬のケイ素原子ではなく，シリカ表面のケイ素原子が起点となり，加水分解が起こると推察される。さらにシリカ基材の骨格内部にメチル基を組み込んだハイブリッドタイプのシリカ基材がアルカリ性条件下での耐久性が大きく改善した事 [15,16]からも，シリカ表面のケイ素原子が起点となり，加水分解が起こる事が裏付けられる。

4. コアシェル粒子の特徴：摩擦熱・カラム外死容積の影響

4.1 摩擦熱の影響

HPLC は命名初期には High Pressure Liquid Chromatography と言われており，文字通り高圧化での LC であった。2000 年以降サブ 2 µm 粒子の登場と共に，さらなる高耐圧の装置が開発され，100 MPa 以上の高圧下でも使用できるようになった。1980 年以降粒子径 5 µm の充填剤が一般的になると，耐久性を上げるため，50 MPa 以上の圧力をかけ充填されるようになった。充填時に 50 MPa 以上の圧をかけると，カラム内で摩擦熱が発生し，カラム管の温度が上がる事は知られていたが，通常の分離分析時には 20 MPa 以下での使用が推奨されており、20 MPa 以下ではカラム自体の発熱も少なく，問題になる事はなかった。図 10 には摩擦熱によるカラムの温度上昇を示す。粒子径 2.6 µm の充填剤を充填した内径 4.6 mm，長さ 150 mm カラムにメタノールを 5 mL/min の流速で通液した時のカラム出口の表面温度を温度センサーを接触させて測定した。この時のカラム背圧は 70 MPa

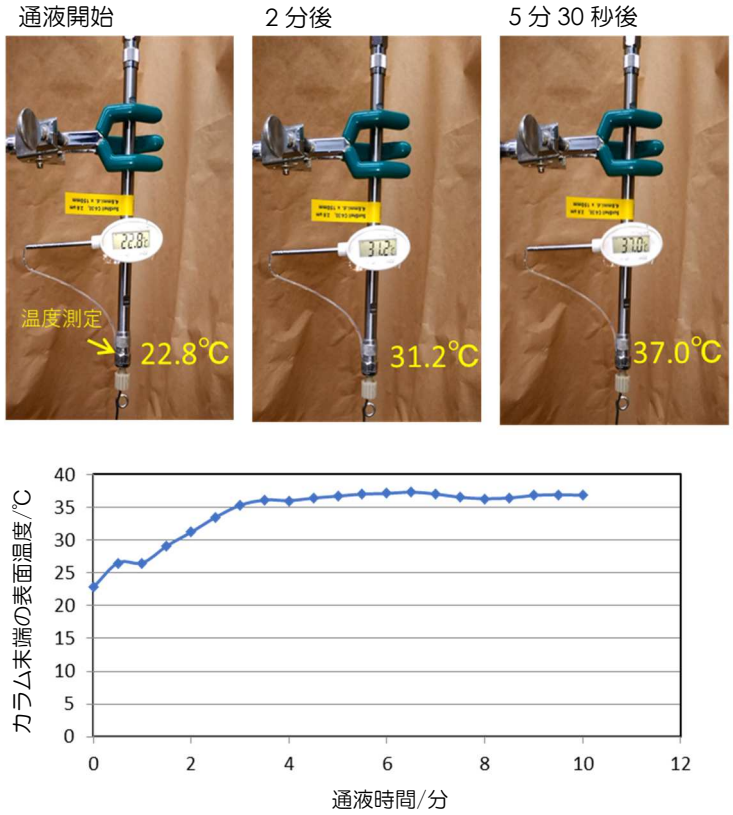


図 10　摩擦熱によるカラムの温度上昇

Column, SunShell C18 2.6 µm, 150 x 4.6 mm; mobile phase, methanol; flow rate, 5 mL/min; back pressure, 70 MPa; temperature, room temperature, 22.8 ℃.

であった。通液前は室温と同じ 22.8 ℃であり，5 分 30 秒後には 37 ℃まで上昇し，その後は 37 ℃を維持した。70 MPa の背圧で送液する事により発生した摩擦熱で 14 ℃以上温度が上がる事が確認された。サブ 2 µm 粒子カラムは 50 MPa を超える高圧で使用される事も珍しくなく，摩擦熱の影響でピーク幅が広がり，段数が低下する。ピーク幅が広がるメカニズムについて以下に述べる。摩擦熱によりカラム内充填剤及び移動相の温度がカラム出口に向け徐々に上昇する。またカラム管表面はカラムオーブン中で一定温度に保たれている。従って，カラム管内部の温度が上昇するとカラム管外との温度差ができ，カラム管外部からカラム管内部に向け温度勾配ができる。カラム管内部の中心部の温度は高く，カラム管外部に向け温度は徐々に下がった状態になる。カラム管中心部の移動相は温度が高い分粘度が下がるため移動速度が上がり，カラム管内部の移動相の移動速度が中止部と外側では異なる事によりピーク幅は広がる。Gritti ら[17]は，炭素鎖をシリカ骨格に入れたハイブリッドタイプの全多孔性 C18 カラムと内部にフーズドシリカの核を持った表面多孔性（Superficially porous，コアシェル，Core shell）C18 の 2 種類のカラムについて，摩擦熱の影響がどのように異なるかを考察した。両カラムは粒子径が同じで，同条件での送液では摩擦熱は同じように発生するが，ピークの広がり方はコアシェル C18 カラムの方がハイブリッド全多孔性 C18 より少なく，その結果コアシェル C18 カラムの方が高い段数を示した。また充填剤の熱伝導率を測定し，コアシェル C18 充填剤はハイブリッド全多孔性 C18 充填剤の 3 倍の熱伝導率を有している事が確認された。この高い熱伝導率により，コアシェル C18 充填剤は摩擦熱により発生するカラム中心部から外側への温度勾配がなだらかになり，ピークの広がりが抑えられたと説明された。図 11 は筆者の実験データであるが，内径 2.1 mm 長さ 100 mm カラムを用いたコアシェル C18，粒子径分布の狭い全多孔性 C18 及び全多孔性ハイブリッド C18 の流速と理論段数の関係を示す。用いたカラムは全てシリカ系充填剤であり，移動相としてアセトニトリル/水=60/40 を用いた。カラム長さは 100 mm であるため，カラム背圧は多用される長さ 50 mm カラムの 2 倍になり，摩擦熱の影響は大きくなる。粒子径 2 µm 以下で内径 2.1 mm，長さ 50 mm カラムの場合，流速は 0.5 mL/min から 0.6 mL/min で理論段数は極大値となる事が多い。図 11 の結果では，コアシェル C18 カラムは 0.5 mL/min の流速で理論段数は極大値となり，この時のカラム背圧は 49 MPa であった。同様に全多孔性 C18 カラムと全多孔性ハイブリッド C18 カラムではそれぞれ 0.4 mL/min と 0.25 mL/min で理論段数は極大値になり，その時のカラム背圧はそれぞれ，35 MPa と 27 MPa となった。カラム背圧が高い程発生する摩擦熱量が多くなるため，コアシェル C18 カラムは最も摩擦熱の影響を受けにくく，逆に全多孔性ハイブリッド C18 カラムは最も摩擦熱の影響を受けやすい事が確認された。全多孔性ハイブリッド C18 カラムでも，カラム長さが半分の 50 mm であれば，摩擦熱の影響が顕著になり始める 27 MPa 背圧では流速は 0.5 mL/min となるため，あまり摩擦熱の事を意識する事はない。しかしメタノール/水移動相を用いるとアセトニトリル/水移動相の約 2

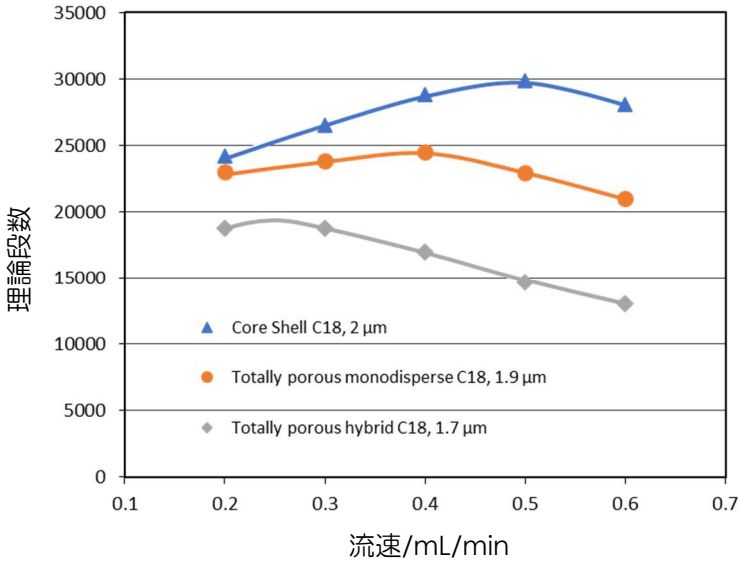


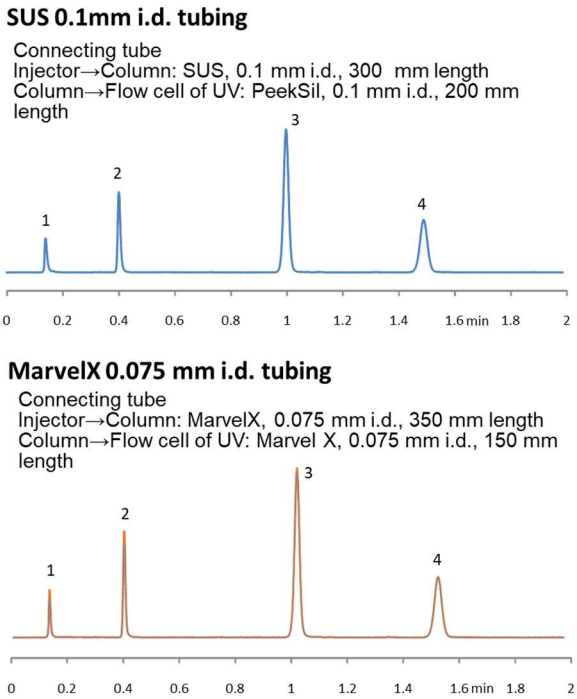
図 11　流速と理論段数の関係

Column, core shell C18, 2 µm, totally porous monodisperse C18, 1.9 µm, totally porous hybrid C18, 1.7 µm; column dimension, 100 x 2.1 mm; mobile phase, acetonitrile/water=60/40; temperature, 40 ºC; sample, acenaphthene; flow rate is described in the figure.

倍の背圧がかかるため，長さ 50 mm でも摩擦熱の影響を考慮すべきである。コアシェル C18 充填剤の熱伝導率が高く，摩擦熱の影響が少ない理由は，移動相や固定相よりも充填剤基材としてのシリカの方が熱伝導率が高く，充填剤中心部が無孔性のシリカ（フーズドシリカ）であり，全多孔性シリカに比べカラム中に存在するシリカの割合が高くなるためであると考えられる。逆に全多孔性ハイブリッド C18 充填剤はシリカ骨格中に炭素鎖が埋め込まれており，炭素はシリカに比べ熱伝導率が低いため，全多孔性シリカ充填剤より熱伝導率が低く，摩擦熱の影響が大きくなる。コアシェル充填剤は内部にフーズドシリカの核があるため，全多孔性充填剤に比べ理論段数が 50%程度高くなる [18,19]だけでなく，今まで述べてきたように摩擦熱の影響も少なく，高背圧下での理論段数低下も起こりにくい。

4.2　カラム外死容積の影響

コアシェルカラムは全多孔性カラムより理論段数が高くなり，ピーク容量（幅）が小さくなるため，カラム以外の配管やフローセルなどの容量が理論段数に大きく影響する。図 12 にはインジェクター以降の配管の内径を細くする事によるピーク形状の変化を示す。粒子径 2 µm コアシェル C18（SunShell C18）を充填した内径 2.1 mm，長さ 50 mm のカラムを用いた。上段は内径 0.1 mm のステンレススチール（SUS）及び内面フューズドシリカ（PEEKsil）の配管を，下段は内径 0.075 mm の内面 PEEK（MarvelX）の配管を用いた。配管の全長は両配管とも同じ 500 mm である。配管の内径が 0.1 mm から 0.075 mm に細くなる事により，最初に溶出するウラシルピークの理論段数は 1208 段から 3593 段に向上した。ピーク高さの 1/2 の位置の幅は 0.0094 分から 0.0051 分へと 0.0045 分狭くなった。また，3 本目のアセナフテンピークも同様に理論段数は 13589 段から 15153 段へと 12%向上した。4 本のピークとも理論段数は上昇し，テーリングファクターは減少した。特に早く溶出するピーク容量の小さいピークほど顕著であった。カラム外の配管の死容積が減少する事により，この配管内での成分の拡散が抑えられ，ピーク幅が狭くなると同時に尾を引くようなテーリングも抑えられたと考えられる。内径 2.1 mm のカラムは通常は内径 0.1 mm の配管が使用されるが，カラム長さ 50 mm で 15000 段近い理論段数を発揮するカラムでは内径 0.1 mm の配管でも大きすぎ，内径 0.075 mm 配管を使用する事でそのカラムの持つ本来の性能に近づく。ここで用いた内径 0.075 mm の MarvelX 配管は内径 0.025 mm まで利用で



Peaks,　1=Uracil
2=Ethylbenzene
3=Acenaphthene
4=Butylbenzene

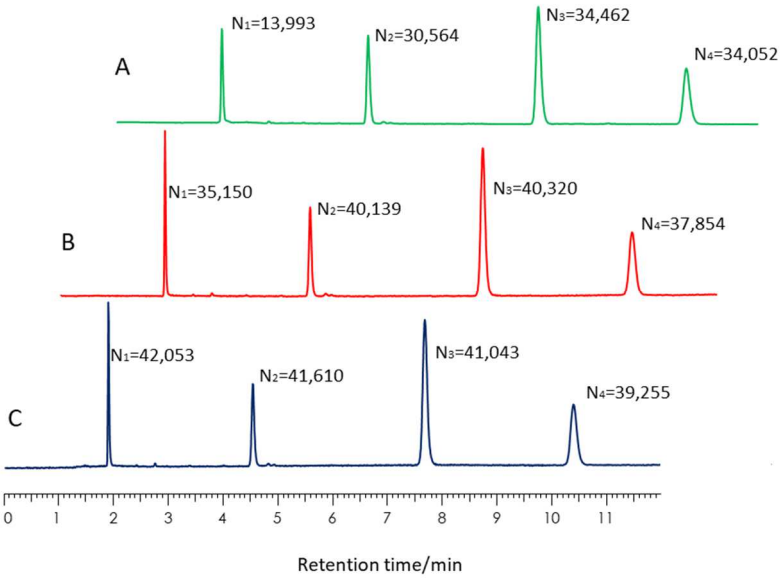
SunShell C18 2 µm, 50 x 2.1 mm

	Peak No.	SUS	MarvelX	
Theoretical plate	1	1208	3593	197% up
	2	7720	12625	64% up
	3	13589	15153	12% up
	4	13936	14733	6% up
Tailing factor	1	2.326	1.445	
	2	1.401	1.286	
	3	1.048	1.006	
	4	0.997	0.972	
Peak width, $h_{0.5}$ (min)	1	0.0094	0.0051	
	2	0.0107	0.0083	
	3	0.0201	0.0194	
	4	0.0297	0.0295	

図 12　配管の内径と段数の関係

Column, SunShell C18, 2 µm 50 x 2.1 mm; mobile phase, acetonitrile/water=60/40; flow rate, 0.6 mL/min; temperature, room temperature; detection, UV250 nm; injection volume, 0.4 µL; Peaks, 1=uracil, 2=ethylbenzene, 3=acenaphthene, 4=butylbenzene.

きるが，配管のみにかかる背圧は内径の 4 乗に反比例するため，内径を 0.075 mm から 0.025 mm に 1/3 のサイズに変更すると配管にかかる背圧は 81 倍になる。死容積を減らそうとして配管の内径を細くしすぎると，配管にかかる背圧が大きくなりすぎる事があるので注意が必要である。図 12 の下段の内径 0.075 mm の条件では合計 500 mm の長さの配管のみで 7.8 MPa の背圧がかかっており，仮に内径 0.025 mm の配管にすると，81 倍の 631 MPa の背圧が配管のみにかかる事になる。図 13 には通常仕様とセミミクロ仕様の HPLC を用いた時の理論段数の比較を示す。内径 4.6 mm，長さ 250 mm のカラム管に粒子径 5 µm のコアシェル C18 を充填したカラムを用い，アセトニトリル/水=70/30 を移動相として通液した。通常仕様として内径 0.25 mm 配管と容量 13 µL のフローセルを用い，検出器のレスポンスタイムとサンプリングタイムをそれぞれ 0.1 秒と 0.4 秒に設定した条件を A，セミミクロ仕様として内径 0.13 mm 配管と容量 3.2 µL のフローセルを用い，検出器のレスポンスタイムとサンプリングタイムをそれぞれ 0.1 秒と 0.4 秒に設定した条件を B，セミミクロ仕様でレスポンスタイムとサンプリングタイムをそれぞれ 0.05 秒と 0.05 秒に設定した条件を C とした。これらの条件で得られたクロマトグラムの各ピークの横に理論段数を示した。また，各条件での保持係数と理論段数の関係をグラフにした。保持係数はウラシルの溶出時間をホールドアップタイムとして計算した。図 12 で得られた結果とほぼ同じであり，カラム外のフローセルを含めた死容積を減らす事により理論段数は 10%から 150%上昇した。さらに B の条件と C の条件は検出条件のみ異なるが，最初に溶出するウラシルピークは 35150 段から 42053 段に理論段数が上昇した。このピークはフローセルへ流れ込むピーク容量は同じであるが，ピーク検出するときの応答速度や波形として出力するときの出力間隔の違いから，B の条件では実際のピークより幅広いピークになっている。



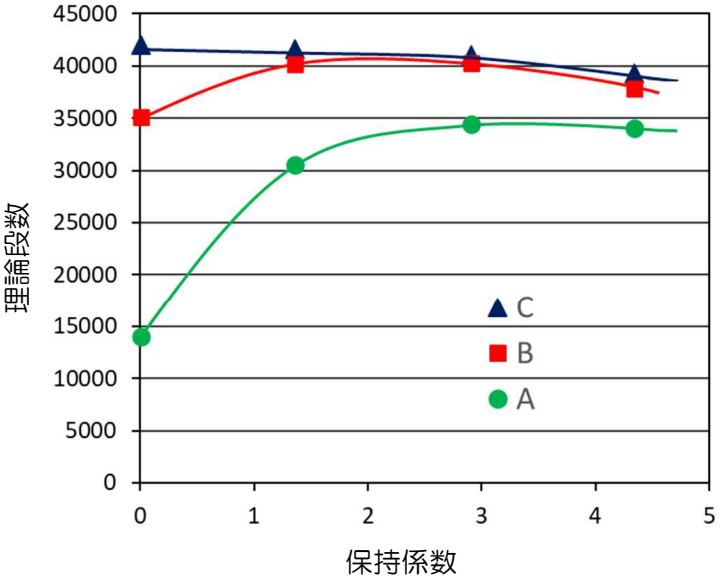


図 13　通常仕様とセミミクロ仕様の HPLC を用いた時の理論段数の比較

Column. SunShell C18, 5 µm, 250 x 4.6 mm; mobile phase, acetonitrile/water= 70/30; flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 40 ºC; pressure, 6.7 MPa; detection, UV250 nm; peaks, 1 = Uracil, 2 = Toluene, 3 = Acenaphthene, 4 = Butylbenzene; HPLC, Hitachi LaChrom ELITE.

	Flow cell	Response	Sampling	Tubing ID
A	Normal 13 µL	0.1 sec	0.4 sec	0.25 mm
B	Semi-micro 3.2 µL	0.1 sec	0.4 sec	0.13 mm
C	Semi-micro 3.2 µL	0.05 sec	0.05 sec	0.13 mm

C の条件の様にレスポンスタイムとサンプリングタイムを短くする事のデメリットとして，ベースラインのノイズの増大が挙げられる。保持係数と理論段数の関係で，通常仕様の HPLC を用いた場合の A のグラフでは保持係数が 3 付近で理論段数の極大値を示している。従来はある程度保持があるピークの方が理論段数は高くなり，保持係数が 3 から 5 で極大値となると言われていたが，この A のグラフはこの説を肯定する結果となった。しかし，カラム外死容積を減らすことによりピークの拡散を減らし，さらに検出条件のレスポンスタイムとサンプリングタイムを短くし，本来のピークに近い状態を検出する事により，C のグラフの様に早く溶出するピーク程理論算数は高くなった。Van Deemter の式[20]の B 項はカラム軸方向への拡散の項であり，理論段高さの B 項は移動相の線流速に反比例する。つまり B 項は線流速が低いと理論段高さは高くなり，理論段数は下がる。これはカラム内に留まっている時間が長いと，ピーク成分はカラム軸方向への拡散が大きくなり，その結果ピーク幅が広がり，理論段数は低くなる事を意味している。逆にカラム内に留まっている時間が短いと，ピーク成分のカラム軸方向への拡散は小さくなり，ピーク幅の広がりが少なく，理論段数の低下が少ない事になる。図 13 の C の条件の理論段数は早く溶出するピーク程高く，これは上述のように Van Deemter の式の B 項より説明できる。

5. まとめ

この逆相液体クロマトグラフィーの基礎講座では，C18，C8，C30，Phenyl-hexyl，Biphenyl，PFP&C18，PFP 固定相の分離特性として，水素結合性，疎水性，立体選択性を比較した。さらにオルト-，メタ-，パラ-メチル馬尿酸，核酸塩基，スチルベン及び副腎皮質ステロイド類の分離比較をし，各固定相の特徴を考察した。またアルキル基シリル化試薬のモノ・ジ・トリ官能基による耐久性への影響や摩擦熱・カラム外死容積の影響も考察した。摩擦熱の影響は 27 MPa 以上で顕著になったが，コアシェル充塡剤は構造上この摩擦熱の影響が受けにくい事が明らかとなった。逆相液体クロマトグラフィーの基礎講座 S1009 と S1010 でタイトルの「シリカ系逆相固定相の姿・状態・相互作用　今までと違う？」を完了するが，基礎的ではあるものの，LC の実務ではあまり考えた事のない事柄を中心に考察しており，これらの内容がクロマトグラファーの一助になれば幸いである。

引用文献

1) J.J Kirkland, *J. Chromatogr. Sci.*, **7** , 13-16 (1969).

2) G. E.Berendsen, L. Galan, *J. Chromatogr. A,* **196**, 21-37 (1980).

3) N. Nagae, D. Ishii, *American Laboratory,* **27**, 20-30 (1995).

4) R. P. W. Scott, C. F. Simpson, *J. Chromatogr.* **197**, 11-20 (1980).

5) 長江徳和，榎並敏行，*分析化学*，**49,** 887 (2000).

6) M. Przybyciel, R. E. Majors, *LCGC NORTH AMERICA*, **20**, NUMBER 6 (2002).

7) K. A. Lippa, L. C. Sander, R. D. Mountain, *Anal. Chem.*, **77**, 7852-7861 (2005).

8) H. Cramer, D. S. Bell, D. Shollenberger, *LCGC Europe*, **30**, 6, 314-320 (2017).

9) 長江徳和，*LC と LC/MS の知恵*，第 **1** 号，8-27 (2020).

10) J. Nichthauser, P. Stepnowski, *J. Chromatogr. Sci.*, **47**, 247-253 (2009).

11) D. S. Bell, A. D. Jones, *J. Chromatogr. A*, **1073**, 99-109 (2005).

12) 榎並敏行，長江徳和，*分析化学*，**53**, 1309-1313 (2004).

13) 長江徳和，*分析化学* ，**59**, 195-205 (2010).

14) A. Fujii, H. Hayashi, J. W. Park, T. Kazama, N. Mikami, S. Tsuzuki, Phys. *Chem. Chem. Phys.*, **13,** 14131-

14141 (2011).
15) U. D. Neue, T. H. Walter, L. Ziling, R. J. Crowey, B. A. Alden, J. Zhipng, R. P. Fisk, J. T. Cook, K. H. Glosk, J. L. Carmody, J. M. Grassi, Y. F. Cheng, *American laboratory*, **31**, 36-39 (1999).
16) Y. F. Cheng, T. H. Walter, R. P. Fisk, L. Ziling, P. Iraneta, B. A. Alden, C. Gendreau, U. D. Neue, J. M. Grassi, J. L. Carmody, J. E. O'Gara, *LC GC North America*. **18**. 1162-1172 (2000).
17) F. Gritti, G. Guiochon, *J. Chromatogr. A*, **1217** 5069 (2010).
18) J. J. Kirkland, F. A. Truszkowski, C. H. Dilks, G. S. Engel, *J. Chromatogr. A*, **890**, 3-13 (2000).
19) J. J. Kirkland, T. J. Langlois, J. J. DeStefano, *American Laboratory*, **39**, 18-21 (2007).
20) J. J. van Deemter, F. J. Zuiderweg, A. Klinkenberg, *Chem. Eng. Sci.*, **5**, 271-289 (1956).

株式会社 クロマニック テクノロジーズ
552-0001 大阪府大阪市港区波除 6-3-1
TEL: 06-6581-0885　FAX: 06-6581-0890
E-mail: info@chromanik.co.jp
Website: http://chromanik.co.jp

202101