

# 逆相液体クロマトグラフィーの分離機構に関する研究の現状と課題

The Current Status and Related Issues of Studies on Separation Mechanism of Reversed-Phase Liquid Chromatography

宮部 寛志\*・鈴木 基之\*\*

Kanji MIYABE and Motoyuki SUZUKI

逆相液体クロマトグラフィーは最も重要な分離技術の一つとして利用されており、その分離機構に関する基礎的研究も活発に行われている。本報では、逆相液体クロマト分離系での①保持挙動（吸着平衡）、②ピーク幅の拡がり（吸着速度）および③熱力学的特性の点から既往の研究を整理し、逆相液体クロマト分離系の分離機構の解明に関する研究の現状と課題を明らかにする。

## 1. 緒言

高速液体クロマトグラフィーは、混合物の分離と各成分の定性・定量分析を同時に行うことのできる優れた分離分析法の一つとして広く普及している。また目的物質の分離精製法としても実用化が検討されている。現在では、分析クロマト分離の約70～80%程度が逆相モードであるといわれ、逆相液体クロマト分離用の固定相としては、多孔性シリカゲル表面に炭素数18のn-アルキル基を化学修飾したオクタデシルシリル化シリカゲル(ODS)が最も一般的である<sup>8),25),34),37),42),43)</sup>。このため、固定相としてODSを用いる逆相液体クロマト分離の分離機構や、その実用化に関する数多くの研究がこれまでに報告されている。本報では、逆相液体クロマト分離の分離機構に関する既往の基礎的研究結果を次のようなクロマト分離特性の点から整理し、今後の研究課題について考察する。

- ①保持挙動（吸着平衡）
- ②ピーク幅の拡がり（吸着速度）
- ③熱力学的特性

## 2. 保持挙動の解析

逆相液体クロマト分離の分離機構に関する従来の研究は主に、クロマト分離の保持挙動に対する種々のパラメータの影響を実験的に検討し、その結果を解析するという方法で行われている。逆相液体クロマト分離の保持に影響を及ぼすパラメータとしては、移動相の種類や組成、固定相表面修飾基の種類やn-アルキル基の炭素数、分離対象物質の種類や構造などについて研究が行われて

おり、その結果に基づいて逆相液体クロマト分離の分離機構に関する考察が行われている。

逆相液体クロマト分離系での保持機構に対しては当初、吸着や分配のモデルが提案された。しかし、吸着と分配の両方が同時に作用している<sup>26),27)</sup>、あるいは両者の区別は重要ではないとも報告されている<sup>34),35)</sup>。

### 2.1 移動相組成の影響

移動相としてメタノール、アセトニトリルやテトラヒドロフランなどの有機溶媒と水との混合溶媒を主に用いる逆相液体クロマト分離では一般的に、キャパシティーファクター、 $k'$ （または吸着平衡定数）の対数値と有機溶媒の体積分率の間には直線関係が観測される<sup>2),10),18),39)</sup>。逆相液体クロマト分離の移動相条件の最適設定やグラジエント分離挙動の解析は、これらのさまざまな相関式に基づいて研究されている。しかしこの直線関係が観測される $k'$ の範囲や、その傾きと有機溶媒の種類などとの関係については、結論の異なるさまざまな実験結果が報告されている。これに対する理論的な解析も検討されているが、統一的な説明ができるまでには至っていない。

### 2.2 ソルボフォビック理論による解析

逆相液体クロマト分離系での保持挙動を理論的に解析する方法として、ソルボフォビック理論が提案されている<sup>9),40),41)</sup>。図1のようにソルボフォビック理論では、分離対象物質（吸着質）と固定相（吸着剤）との疎水性相互作用が逆相液体クロマト分離における保持挙動の本質であると考えられる。すなわち、吸着質の固定相への吸着により、吸着質分子やn-アルキル基の非極性部分と極性溶媒との接触面積が減少する。極性溶媒の構造

\* 栗田工業(株)総合研究所

\*\* 東京大学生産技術研究所 第4部

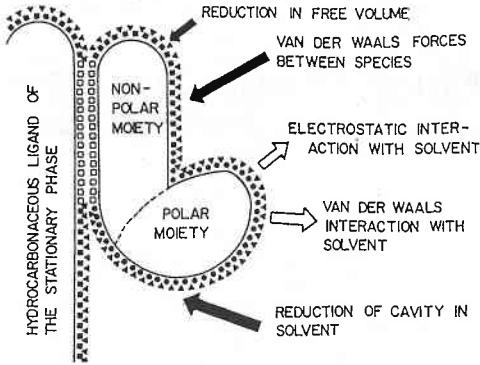


図1 逆相液体クロマト分離系における表面修飾アルキル基と疎水性溶質との会合モデル<sup>12)</sup>  
 □は会合による疎水性表面積の減少部分  
 矢印は会合の際に寄与する作用の種類と方向

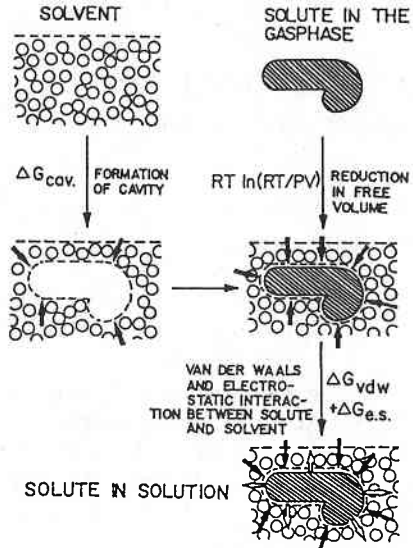


図3 化学種の溶解過程のモデル化<sup>12)</sup>

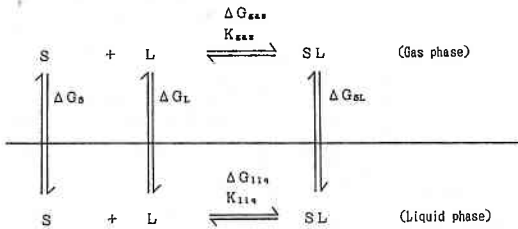


図2 ソルボフォビック理論による液相吸着現象の解析

形成された (ice-berg) 状態が崩れ、系のエントロピーが増加する。また吸着熱も放出され両方の効果によって系全体のエネルギーが減少する。ソルボフォビック理論では、疎水性相互作用に基づく自由エネルギーの減少により、逆相液体クロマト分離系における吸着質の吸着が推進されると仮定する。

ソルボフォビック理論では、液相中における吸着現象を2つの過程に分離して解析する。逆相液体クロマト分離系では、図2に示すように吸着質 *S* と表面修飾アルキル基 *L* との錯生成反応を仮定する。一つは溶媒の影響をまったく受けない気相中での仮想的な会合、他の一つは吸着に関与するすべての化学種の気相から液相中への溶解である。この溶解過程を図3のようにさらに2つの過程に区分して考察する。すなわち、ある化学種を溶媒内に溶解するために必要な空孔を形成する過程と、その空孔内に置かれた化学種が周囲の溶媒分子と相互作用する過程である。溶媒分子との相互作用としては、ファンデルワールス相互作用と静電的相互作用を考える。その結果、次式が得られる<sup>1), 13)</sup>。

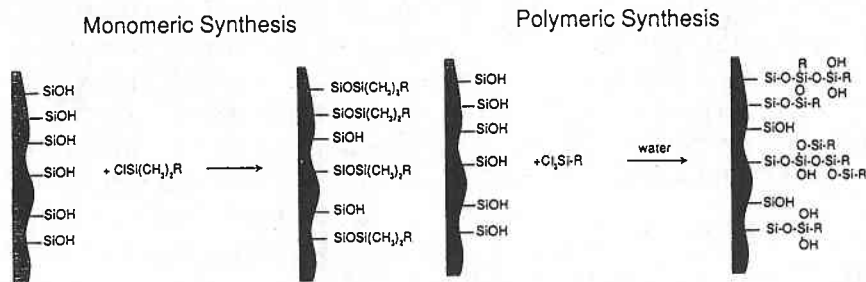
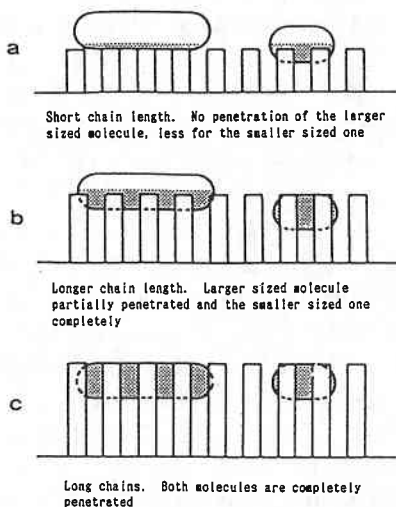
$$\begin{aligned} \Delta G_{liq} = & \Delta G_{gas} - \Delta G_{vdw, s} \\ & + N(\gamma-1)\mu_s^2 DP / 2\gamma v_s \\ & - N\Delta\gamma - NA_s(\kappa^e-1) V^{2/3}\gamma / V_s^{2/3} \\ & - R_g T \ln(R_g T / PoV) \end{aligned} \quad (1)$$

ここで、 $\Delta G_{liq}$ 、 $\Delta G_{gas}$  はおのおの液相、気相中における吸着の自由エネルギー変化、 $\Delta G_{vdw, s}$  は吸着質と溶媒とのファンデルワールス相互作用による自由エネルギー変化、 $N$  はアボガドロ数、 $\lambda$  は錯体と吸着質との分子サイズの比率、 $\mu$  は双極子モーメント、 $D$  と  $P$  は溶媒の物性から計算される係数、 $v$  は分子サイズ、 $A$  は表面積、 $\Delta A$  は極性溶媒と接触している疎水性表面の錯形成による表面積減少量、 $V$  は体積、 $R_g$  は気体定数、 $T$  は温度、 $P_0$  は大気圧、 $\gamma$  は溶媒の表面張力、そして  $\kappa^e$  はある表面張力の溶媒中にある表面積の平面を形成する場合と、同一表面積の曲面を形成する場合とのエンタルピーの差異を補正する係数である。下付の *S* は吸着質を表わし、表示のないものは溶媒についての値を示す。

ソルボフォビック理論は熱力学を基盤として構築されており、クロマト分離データを理論的に解析する上で有用な考え方を提示する。Horvath ら<sup>11)~14)</sup> は固定相として ODS、移動相としてメタノール/水やアセトニトリル/水混合溶媒を用い、*o*-トルイル酸の保持に対する移動相組成の影響を定量的に解析した。その結果、逆相液体クロマト分離系での保持挙動をほぼ説明することができ、ソルボフォビック理論の有効性が明らかになった。しかし実測値と計算値との一致は十分ではなく、ソルボフォビック理論の各パラメータの設定や推算に関してはさらに研究課題が残されている<sup>13)</sup>。

### 2.3 固定相表面修飾基の *n*-アルキル鎖長の影響

逆相液体クロマト分離に使用される固定相の表面修飾基の構造は図4に示すように、モノメリック相とポリメリック相に分類される。固定相としてモノメリック相を

図4 モノメリック固定相とポリメリック固定相<sup>34)</sup>図5 アルキル鎖長の異なる固定相への吸着現象の模式図<sup>2)</sup>

使用する逆相液体クロマト分離では、保持や分離係数がアルキル鎖長の増加と共に連続的に増大すると報告されている<sup>10), 16), 17), 29)</sup>。一方、アルキル鎖長の増加に伴う保持の増加の割合は一定ではなく、“臨界鎖長”より長い場合には保持は一定の値となるという結果も報告されている<sup>2), 26)</sup>。臨界鎖長の炭素数は6~14程度で、またこのような保持に対するアルキル鎖長の影響は移動相組成によらないと報告されている。この結果から図5に示すように、アルキル鎖長の長い固定相を用いる逆相液体クロマト分離では、アルキル基の外側の部分だけが吸着質の保持に寄与すると推定されている。これに対して、逆相液体クロマト分離系における $k'$ を担体シリカゲルの表面積で規格化した値とアルキル基の疎水性表面積との関係から、逆相液体クロマト分離ではアルキル基全体がその分離機構に関与しているというモデルも提案されている<sup>10), 36), 47)</sup>。

逆相液体クロマト分離の分離効率に対するアルキル鎖長の影響については、アルキル鎖長が分離効率に影響しないと報告されている<sup>10), 16)</sup>。その一方、粒子内の物質移動速度は表面修飾によって増大し、アルキル鎖長の短

い方が粒子内での拡散速度が速いという結果も報告されている<sup>19)</sup>。

このように、逆相液体クロマト分離の保持、分離係数や分離効率に対するアルキル鎖長の影響については数多くの研究が行われ、結論の異なるさまざまな実験結果がこれまでに報告されている。しかしこれらの研究結果を统一的に説明できる理論やモデルは報告されていない。クロマト分離特性に対するアルキル鎖長の影響についてより詳細に解析するためには、保持挙動だけではなく、ピークの拡がりや熱力学的特性などの点からもクロマト分離機構を研究する必要がある。

#### 2.4 吸着質の構造の影響

逆相液体クロマト分離の保持挙動は、先に示したような表面修飾条件や移動相条件の他、吸着質の種類や構造によっても影響を受ける。逆相液体クロマト分離における保持特性と吸着質の物性を関連づけるため、さまざまなパラメータが提案されている<sup>33), 34)</sup>。しかしこれらの多くは、数多くの実験データを説明するために導入された経験的なパラメータであり、それによる相関の物理的意味や正確さについては明らかではない。

Belfort ら<sup>1)</sup>は逆相液体クロマト分離系ではないが、活性炭による有機物の水溶液吸着についてソルボフォビック理論に基づく検討を行い、活性炭への吸着性が吸着質の疎水性表面積や、それらから計算される液相吸着の自由エネルギー変化に対する溶媒の影響によって良く相関できることを示した。

逆相液体クロマト分離の保持と吸着質の物性との相関についても、実験データに基づく経験的なパラメータを適用するだけでなく、ソルボフォビック理論などの物理的根拠の明確な理論に基づく解析が必要である。

#### 2.5 保持挙動の解析に関する研究のまとめと課題

これまでに述べたように、逆相液体クロマト分離の保持挙動、分離係数や分離効率に対する移動相組成やアルキル鎖長の影響については数多くの研究が行われ、結論の異なるさまざまな実験結果がこれまでに報告されてい

る。しかし現状では、これらを統一的に説明するには至っていない。今後の課題としては、ソルボフォビック理論などの物理的根拠の明確な理論に基づくさらに詳細な解析が必要である。また保持挙動だけではなく、ピークの拡がりや熱力学的特性などの点からの解析が、逆相液体クロマト分離機構を解明する上で重要である。

### 3. ピーク幅の拡がりの解析

逆相液体クロマト分離でのピーク幅の拡がりは、主に段理論や速度論によって解析が検討されている。

#### 3.1 段理論

クロマト分離におけるピークの拡がりを解析する方法として、最初に段理論が導入された。段理論では、カラムを複数の(理論)段が直列につながった槽列とみなし、各段における固定相-移動相間の物質移動速度は速く、各段において分離対象物質の吸着平衡が成立していると仮定する。この吸着平衡定数の吸着質濃度に対する濃度依存性は無視され、カラム軸方向の混合拡散の影響も無視される。そして、カラムやクロマト分離システムの分離効率、理論段数あるいは理論段相当高さ(一理論段当りのカラム長さ)によって表現される。

段理論による取り扱いが簡便であり、現在でも簡易法として利用されている。しかし、ピークの拡がりに対する種々のパラメータの影響を総括した理論段数という値を用いて分離効率を表現するため、移動相流速や粒径などのクロマト分離条件が、ピークの拡がりにどのように影響するかについての詳細な情報を得ることはできない。実験的に求めたある理論段数の値は、その実験条件に対応する値であり、クロマト分離パラメータが変化すれば理論段数も当然変化する。したがって、ある一つの条件において計算した理論段数の値を用いて、任意の条件下におけるクロマト分離効率を議論することはできない。クロマト分離プロセスの分離効率に影響を及ぼす各パラメータの影響を各々個別に評価できないことが段理論の欠点である。

#### 3.2 速度論

クロマト分離過程におけるピークの拡がり現象は、速度論によって段理論より詳細に研究されている<sup>25),34)</sup>。

van Deemterらはガスクロマト分離データを解析し、理論段相当高さ(HETP)と移動相流速との相関について次のような式を提案した。

$$\text{HETP} = 2\lambda Dm/u + 2\lambda d_p + qk' d_f^2 u / \{(1+k')^2 D_s\} + Wf(k') d_p^2 u / Dm \quad (2)$$

ピークの拡がりに影響を及ぼすカラム内の物質移動過程としては、渦巻拡散、カラム軸方向の分子拡散、移動相

および固定相中における物質移動が考慮され、理論段相当高さはこれらの各速度過程の寄与の総和として表わされる。ここで、 $\lambda$ は充填状態に関連した立体因子、 $Dm$ は移動相中の分子拡散係数、 $u$ は線流速、 $d_p$ は粒子径、 $q$ は充填剤の性質を考慮にいたした立体因子、 $k'$ はキャパシティーファクター、 $d_f$ は固定相の厚み、 $D_s$ は固定相中の吸着質の拡散係数、 $W$ は充填状態の立体効果による定数、そして $f(k')$ はキャパシティーファクターの関数である。

van Deemterの式以後、液体クロマト分離に対しても多くの相関式が提案されており<sup>7),20),28)</sup>、これらは液体クロマト分離の解析や最適分離条件の設定に応用されている<sup>34)</sup>。これらの相関式の妥当性は数多くの実験データによって確認されているが、その中のいくつかのパラメータや物性値、たとえば $\lambda$ 、 $q$ 、 $d_f$ 、 $D_s$ 、 $f(k')$ などについては物理的意味が十分に明確化されておらず、その推算や設定についても未検討の部分が残されている。

従来検討では、実験的に測定した理論段相当高さと移動相流速との関係を最もよく表現できるような関数型と、各係数の値が単に設定されているだけであり、各係数を構成する各パラメータについての詳細な検討は行われていない。たとえば、すべての相関式には固定相中の物質移動抵抗の寄与を表わす項が含まれている。その寄与の大きさは、保持の大きさ、移動相流速、固定相の厚さや固定相中の拡散係数によって決まるとされている。しかし、液体クロマト分離については、固定相の厚さや固定相中の拡散係数について定量的に議論している研究報告はなく、各パラメータの寄与を総括した係数の値だけを報告している場合が多い。これは、固定相粒子内における物質移動が詳細に研究されていないためである。一方、ガスクロマト分離については、固定相として用いる液相中における試料物質の拡散係数がいくつか報告されており、その値は、 $10^{-6} \sim 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$ のオーダーであった<sup>6),32)</sup>。

活性炭やゼオライトなどの吸着剤中における物質移動がきわめて詳しく研究されているのに対して<sup>45)</sup>、ガスクロマト分離や液体クロマト分離に用いる固定相粒子内での物質移動については、未研究の部分が多く残されている。

#### 3.3 モーメント解析法

クロマト分離挙動を厳密に取り扱う場合には、カラム内の物質収支や物質移動速度を表わす微分方程式を連立させて解析する方法の適用が必要である。この微分方程式には吸着平衡定数の他に、軸方向混合拡散係数、粒子-流体間物質移動係数、粒子内拡散係数や吸着サイトにおける真の吸着速度係数などのパラメータが含まれ、これらはカラム内の各速度過程における吸着速度を表わす。

これらのパラメータとクロマト分離ピークの溶出位置や形状を関係づける有効な方法の一つがモーメント解析法である。直線平衡系におけるクロマト分離ピークの一次絶対モーメント、 $\mu_1$ と二次中央モーメント、 $\mu_2$ は次のように表わされる<sup>44), 45)</sup>。

$$\begin{aligned}\mu_1 &= \int Ce(t) t dt / \int Ce(t) dt \\ &= (z/u_0) \delta_0\end{aligned}\quad (3)$$

$$\begin{aligned}\mu_2 &= \int Ce(t) (t-\mu_1)^2 dt / \int Ce(t) dt \\ &= (2z/u_0) (\delta_{ax} + \delta_f + \delta_d)\end{aligned}\quad (4)$$

$$\delta_0 = \varepsilon + (1-\varepsilon) (\varepsilon_p + \rho_p K) \quad (5)$$

$$\delta_{ax} = (Ez/u_0^2) \delta_0^2 \quad (6)$$

$$\delta_f = (1-\varepsilon) (R/3k_f) (\varepsilon_p + \rho_p K)^2 \quad (7)$$

$$\delta_d = (1-\varepsilon) (R^2/15De) (\varepsilon_p + \rho_p K)^2 \quad (8)$$

ここで、 $Ce(t)$  はカラム出口における吸着質濃度の時間関数、 $t$  は時間、 $z$  はカラム長さ、 $u_0$  は流速、 $\varepsilon$  は空隙率、 $\varepsilon_p$  は細孔率、 $\rho_p$  は吸着剤の見かけ密度、 $K$  は吸着平衡定数、 $\delta_{ax}$ 、 $\delta_f$ 、 $\delta_d$  はおのおの二次モーメントに対する軸方向混合拡散、粒子一流体間物質移動、粒子内拡散の寄与、 $Ez$  は軸方向混合拡散係数、 $R$  は粒子半径、 $k_f$  は粒子一流体間物質移動係数、 $De$  は粒子内拡散係数である。

一次モーメントには吸着平衡定数だけがパラメータとして含まれる。また二次モーメントは軸方向混合拡散、粒子一流体間物質移動、粒子内拡散や吸着サイトにおける吸着速度の寄与の総和として表現される。実験的には、吸着剤粒子の粒径、移動相流速やカラム温度などの実験条件を変化させて直線平衡系におけるパルス応答曲線を測定し、これをモーメント解析する。クロマト分離ピークの拡がりに対するカラム内の各速度過程の寄与をおおの分離し、定量的に解析することができる。

軸方向混合拡散に対する分子拡散と流体混合の寄与を考慮し、粒子一流体間の物質移動と真の吸着速度の寄与を無視すると、理論段相当高さ HETP はモーメント式を用いて次のように表わされる<sup>45)</sup>。

$$\begin{aligned}\text{HETP} &= z(\mu_2' / \mu_1^2) \\ &= 2\eta(\varepsilon) Dv / u_0 + 2\lambda + 2u_0 R^2 / 15(1-\varepsilon) De\end{aligned}\quad (9)$$

ここで、 $\eta(\varepsilon)$  と  $\lambda$  は軸方向混合拡散に対する分子拡散および分散の寄与を表わす係数、 $Dv$  は分子拡散係数である。これは先に示した van Deemter 式に対応している。

### 3.4 ピークの拡がりの解析に関する研究のまとめと課題

ピーク幅の拡がりに対しては、カラム内の各速度過程での物質移動速度が影響を及ぼす。クロマト分離現象を

速度論的に解明することが必要であり、そのためには各過程における物質移動の特徴や物質移動速度に対するクロマト分離条件の影響を定量的に解析する必要がある。

この場合、各速度過程の寄与を総括的に表現する段理論は有効な手段とは成り得ない。また、van Deemter 式を基本とする速度論的取り扱いについても、相関式中の各パラメータの測定や物理的意味に関する議論が十分行われておらず、多くの経験的パラメータが相関式中に導入されていることから、クロマト分離現象を厳密に解析できるとは言い難い。これに対して微分方程式を用いるクロマト分離現象の解析方法はその取り扱いが厳密で物理的意味も明確であり、クロマト分離過程を詳細に研究し議論する場合には有用な方法である。そして各パラメータを実験的に推定する場合には、モーメント解析法の適用が有効である。

## 4. 熱力学的特性の解析

### 4.1 逆相液体クロマト分離に対する温度の影響

逆相液体クロマト分離では、保持や分離度に対する温度の影響が主に検討されている。多くの場合、 $k'$  の対数値と温度の逆数との間に直線関係が観測され、このファントホッフ・プロットの傾きから吸着のエンタルピー変化、切片からエントロピー変化が計算されている<sup>24)</sup>。

逆相液体クロマト分離における吸着のエンタルピー変化（等量吸着熱）は約 10~25 kJ/mol 程度であると報告されており<sup>3)~5), 11), 15), 24), 46)</sup>、その値と固定相のアルキル鎖長や吸着質の分子サイズと相関についても研究されている<sup>15)</sup>。しかしこれらの値は吸着質の蒸発熱に比べて著しく小さな数値であり、気相吸着における等量吸着熱が蒸発熱の 1.2~1.6 倍程度であるという既往の研究結果と相反する。これは吸着現象の熱力学的特性に対する溶媒の影響によるものと考えられるが、この点に関しては従来詳細な研究が行われていない。

カラム温度の上昇は保持を小さくする一方、送液圧を低減しカラム効率を向上させる。また、ピーク形状が改善されることも報告されており、一般的には温度の高い条件においてクロマト分離を行う方がよいといわれている<sup>4), 34)</sup>。これは、温度の上昇による移動相溶媒の粘度の減少と、それに伴う吸着質分子の拡散係数の増加によるものと考えられている<sup>22), 38)</sup>。

逆相液体クロマト分離では、固定相-移動相間における吸着現象についてエンタルピー-エントロピー補償効果が確認されている<sup>21), 30), 31), 48)</sup>。固定相、移動相や吸着質の組み合わせによらず補償温度が約 500~700 K ではほぼ一定であったことから、逆相液体クロマト分離における固有の保持機構は、吸着質の種類や移動相中の有機溶媒組成によらず同一であると推定されている<sup>30), 48)</sup>。

逆相液体クロマト分離の分離機構を考察する上でカラム内の各速度過程における物質移動速度の解析が重要であり、その機構解明に関連して熱力学的特性の点からの研究が必要である。

#### 4.2 熱力学的特性の解析に関する研究のまとめと課題

逆相液体クロマト分離に対する温度の影響については、これまで保持挙動に関する検討が行われているだけであり、カラム内や固定相粒子内における物質移動の熱力学的な研究は行われていない。さらに、吸着平衡や吸着熱に対する溶媒の影響については詳細に研究されておらず、液相吸着系での総合的な実測値が報告されているだけである。液相吸着系における吸着剤-吸着質間の相互作用に対する溶媒の影響を熱力学的な面から解析することは、液体クロマト分離の分離機構を解明する上で重要であり、多くの有用な情報を与えると考えられる。

### 5. 結 言

本報では、逆相液体クロマト分離の分離機構の解明に関する既往の研究結果をまとめ、今後の研究課題について考察した。

液体クロマトグラフィーは分離の場に溶媒という第三成分を取り入れることによって分離法としての自由度を高め、その適用範囲を広げている。高速液体クロマトグラフィーの分離機構を考察する上で、分離対象物質と固定相との相互作用およびそれに対する移動相溶媒の影響を明らかにすることは本質的な課題である。この点については従来主に保持挙動の解析による基礎的研究が活発に行われ、数多くの実験結果が報告されている。これらを統一的に解析する理論的な取り扱いについても研究されており、たとえばソルボフォビク理論による詳細な解析方法が提案されている。これまでに集積された数多くの実験結果をより厳密に、定量的に解析できるようになりつつある。しかし、そこで利用するパラメータの設定や推算についてはさらに研究が必要である。

これまでの逆相液体クロマト分離に関する研究の多くは、主にピークの保持挙動を指標とし、それに対するさまざまなクロマト分離条件の影響を理論的、実験的に解析するという方法で行われている。しかし、逆相液体クロマト分離系における吸着剤表面での吸着現象をより詳細に解析しその分離機構を解明するためには、吸着平衡だけではなく、吸着速度や熱力学的な特性についての研究が必要である。これらの従来とは異なる視点からの研究は逆相液体クロマト分離機構に関する新たな情報を提示すると考えられる。その場合には、液相吸着系を構成する吸着剤、溶媒と吸着質の物性や特徴が、これらの液相吸着特性に対して及ぼす影響を定量的に解析することが重要である。

(1993年2月8日受理)

### 参 考 文 献

- 1) Belfort, G., G. L. Altshuler, K. K. Thallam, C. P. Feerick, Jr., and K. L. Woodfield, *AIChE J.*, 30, 197 (1984)
- 2) Berendsen, G. E., and L. de Galan, *J. Chromatogr.*, 196, 21 (1980)
- 3) Colin, H., J. C. Diez-Masa, G. Guiochon, T. Czajkowska, and I. Miedzak, *J. Chromatogr.*, 167, 41 (1978)
- 4) Colin, H., and G. Guiochon, *J. Chromatogr.*, 141, 289 (1977)
- 5) Colin, H., and G. Guiochon, *J. Chromatogr.*, 158, 183 (1978)
- 6) Cramers, C. A., C. E. Van Tilburg, C. P. M. Schutjes, J. A. Rijks, G. A. Rutten, and R. De Nijs, *J. Chromatogr.*, 279, 83 (1983)
- 7) Done, J. N., and J. H. Knox, *J. Chromatogr. Sci.*, 10, 606 (1972)
- 8) Dorsey, J. G., and K. A. Dill, *Chem. Rev.*, 89, 331 (1989)
- 9) Halicioglu, T., and O. Sinanoglu, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 158, 308 (1969)
- 10) Hennion, M. C., C. Picard, and M. Caude, *J. Chromatogr.*, 166, 21 (1978)
- 11) Horvath, C., and W. Melander, *J. Chromatogr. Sci.*, 15, 393 (1977)
- 12) Horvath, C., and W. Melander, *Am. Lab.*, 10, 17 (1978)
- 13) Horvath, C., W. Melander, and I. Molnar, *J. Chromatogr.*, 125, 129 (1976)
- 14) Horvath, C., W. Melander, and I. Molnar, *Anal. Chem.*, 49, 142 (1977)
- 15) Issaq, H. J., and M. Jaroniec, *J. Liquid Chromatogr.*, 12, 2067 (1989)
- 16) Karch, K., I. Sebastian, and I. Halasz, *J. Chromatogr.*, 122, 3 (1976)
- 17) Karch, K., I. Sebastian, I. Halasz, and H. Engelhardt, *J. Chromatogr.*, 122, 171 (1976)
- 18) Karger, B. L., J. R. Gant, A. Hartkopf, and P. H. Weiner, *J. Chromatogr.*, 128, 65 (1976)
- 19) Karger, B. L., and R. W. Giese, *Anal. Chem.*, 50, 1048A (1978)
- 20) Kennedy, G. J., and J. H. Knox, *J. Chromatogr. Sci.*, 10, 549 (1972)
- 21) Kikta, E. J., and E. Grushka, *Anal. Chem.*, 48, 1098 (1976)
- 22) Kirkland, J. J., *J. Chromatogr. Sci.*, 9, 206 (1971)
- 23) Knox, J. H., and A. Pryde, *J. Chromatogr.*, 112, 171 (1975)
- 24) Knox, J. H., and G. Vasvari, *J. Chromatogr.*, 83, 181 (1973)
- 25) Krstulovic, A. M., and P. R. Brown, "Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography", John Wiley and Sons, New York (1982)
- 26) Lochmuller, C. H., and D. R. Wilder, *J. Chromatogr. Sci.*, 17, 574 (1979)
- 27) Lock, D. C., J. J. Schermud, and B. Banner, *Anal. Chem.*, 44, 90 (1972)
- 28) Magnico, P., and M. Martin, *J. Chromatogr.*, 517, 31

- (1990)
- 29) Majors, R. E., and M. J. Hopper, *J. Chromatogr. Sci.*, 12, 767 (1974)
- 30) Melander, W. R., D. E. Campbell, and C. Horvath, *J. Chromatogr.*, 158, 215 (1978)
- 31) Melander, W. R., B. K. Chen, and C. Horvath, *J. Chromatogr.*, 185, 99 (1979)
- 32) Millen, W., and S. Hawkes, *J. Chromatogr. Sci.*, 15, 148 (1977)
- 33) Mockel, H. J., G. Welter, and H. Melzer, *J. Chromatogr.*, 388, 255 (1987)
- 34) Poole, C. F. and S. K. Poole, "Chromatography Today", Elsevier, Amsterdam (1991)
- 35) Pryde, A., *J. Chromatogr. Sci.*, 12, 486 (1974)
- 36) Roumeliotis, P., and K. K. Unger, *J. Chromatogr.*, 149, 211 (1978)
- 37) Sander, L. C., and S. A. Wise, *CRC Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 18, 299 (1987)
- 38) Schmitt, J. A., R. A. Henry, R. C. Williams, and J. F. Dickman, *J. Chromatogr. Sci.*, 9, 645 (1971)
- 39) Schoenmakers, P. J., H. A. H. Billiet, and L. de Galan, *J. Chromatogr.*, 185, 179 (1979)
- 40) Sinanoglu, O., "Intermolecular Forces in Liquids", J. O. Hirshfelder, Ed., Wiley-Interscience, New York, 283 (1967)
- 41) Sinanoglu, O., "Solvent Effects on Molecular Associations", *Molecular Associations in Biology*, B. Pullman, Ed., Academic Press, New York, 427 (1968)
- 42) Smith, R. M., "Gas and Liquid Chromatography in Analytical Chemistry", John Wiley and Sons, New York (1988)
- 43) Snyder, L. R., J. L. Glajch, and J. J. Kirkland, "Practical HPLC Method Development", John Wiley and Sons, New York (1988)
- 44) Suzuki, M., *化学装置*, 15 (NO. 6), 21 (1973)
- 45) Suzuki, M., "Adsorption Engineering", Elsevier / Kodansha, Tokyo (1990)
- 46) Unger, K. K., "Porous Silica", Elsevier, Amsterdam (1979)
- 47) Unger, K. K., N. Becker, and P. Roumeliotis, *J. Chromatogr.*, 125, 115 (1976)
- 48) Woodburn, K. B., L. S. Lee, P. S. C. Rao, and J. J. Delfino, *Environ. Sci. Technol.* 23, 407 (1989)