

## Technical Review

## 逆相クロマトグラフィー用シリカ系カラム

\*須藤 良久、坂牧 寛

## Silica-Based Column for Reversed Phase Chromatography

Yoshihisa Sudo\*, Hiroshi Sakamaki

Chemicals Evaluation and Research Institute, Japan

1600 Shimotakano, Sugito-machi, Kitakatsushika-gun, Saitama 345-0043 Japan

**Abstract**

The column is the heart of the liquid chromatography system. The silica-based column for reversed phase chromatography is used most widely. We review this column concerning the characteristics of totally porous silica gel, the synthesis and the characteristics of octadecylsilylation of silica gel and the methods and the importance of end-capping of residual silanol groups. In particular, we introduce the end-capping using high-temperature silylation in detail.

**Keywords:** silica-based column, reversed phase chromatography, silica gel, residual silanol group, end-capping, high-temperature silylation

**1. 緒言**

カラムは液体クロマトグラフィーシステムの心臓部である。カラムの高性能化の要求にこたえてシステムの性能が向上してきた。現在、分析用カラムの長さは30 mm から250 mm、カラム内径は0.075 mm から6.0 mm が用いられている。カラム充填剤はシリカゲルの表面に疎水性修飾基を結合した逆相液体クロマトグラフィー用充填剤、特にオクタデシルシリル基を結合したもの（ODS）が主に用いられている。粒子径は1.5  $\mu\text{m}$  から5  $\mu\text{m}$  であり、近年、微粒子化が進んできた。シリカゲルはカラム効率が高い、表面積が広い、機械的強度が高い、表面に各種化学修飾基を導入できる、比較的安価である、などの他の基材より優れた特徴を有している。一方、アルカリ性で溶解するという短所もある。

本稿では全多孔性シリカゲルの特性及びODSの特徴とODSのエンドキャッピングについて紹介する。

**2. シリカゲル**

シリカゲルの物理的特性は、粒子径、細孔径、比表面積、細孔容積で規定される。強度を保つために、細孔容積はほぼ一定（約1 mL/g）であるため、細孔径と比表面積は反比例する。すなわち、細孔径が小さいほど比表面積は大きくなり、修飾基の導入量が多くなることにより、炭素含有量が多くなる。

シリカゲルはシロキサン結合（Si-O-Si）による無機高分子であり、末端はシラノール基（Si-OH）である。したがって、シリカゲル表面にはシラノール基が存在する。表面が十分加水分解されたシリカゲルのシラノール基の量は約8  $\mu\text{mol}/\text{m}^2$ とされている[1,2]。シラノール基には孤立シラノール基、ピシナルシラノール基、ジェミナルシラノール基がある（Figure 1）。さらに、細孔内に閉じ込められた内部シラノール基の存在も報告されている[3]。孤立シラノール基は

化学物質評価研究機構

〒000-0000 埼玉県北葛飾郡杉戸町下高野1600番地

Tel: 0480-37-2601

Fax: 0480-37-2521

E-mail: sudo-yoshihisa@ceri.jp

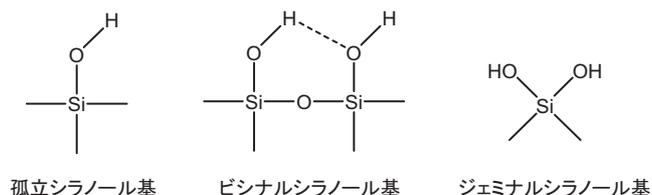


Figure 1. 各種シラノール基

吸着性が高く[4,5]、孤立シラノール基の多いシリカゲルから製造された ODS は塩基性化合物に対する吸着性が高いという報告がある[6]。

シラノール基は拡散反射フーリエ変換赤外分光法 (DRIFT) 及び $^{29}\text{Si}$  交差分極マジックアングルスピンニング核磁気共鳴法 ( $^{29}\text{Si}$  CP-MAS NMR) で分析できる。DRIFT では、 $3730-3750\text{ cm}^{-1}$  にシャープな吸収帯があり、 $3000\text{ cm}^{-1}-3600\text{ cm}^{-1}$  にブロードな吸収帯がある。 $3730\text{ cm}^{-1}-3750\text{ cm}^{-1}$  の吸収帯は孤立シラノール基であり、 $3000\text{ cm}^{-1}-3600\text{ cm}^{-1}$  の吸収帯はビシナルシラノール基である[7]。ジェミナルシラノール基と孤立シラノール基の吸収帯は重なっている[8]。内部シラノール基は $3650\text{ cm}^{-1}$  に吸収を持つ[3]。 $^{29}\text{Si}$  CP-MAS NMR ではジェミナルシラノールが単独で検出される。孤立シラノール基とビシナルシラノール基は区別できない上、これらのシグナルはシロキサンのシグナルと十分に分離していないため、少量の残存シラノール基の検出はできない。

高純度といわれるシリカゲル中にも微量の金属不純物が存在する。キレート剤はこの金属不純物と相互作用し、ピークテーリングを引き起こし、溶出しないこともある。また、金属不純物の存在によってシラノール基の酸性度が高くなるとされている[9-11]。

### 3. シリカゲルの化学修飾

シリカゲル表面の化学修飾はクロロシラン化合物あるいはアルコキシシラン化合物とシラノール基とのシリル化反応によって行われる。シリル基とは $-\text{SiH}_3$ であり、シリル化とは

対象化合物上の活性な水素を 3 置換シリル基 ( $-\text{Si}(\text{R}_1)(\text{R}_2)(\text{R}_3)$ ) で置換することである。オクタデシル基やフェニル基のような不活性な修飾基を結合させる場合にはクロロシラン化合物を用い、アミノ基やグリシドキシ基などの反応性の修飾基の場合には、アルコキシシラン化合物を用いる。シラノール基と反応する修飾剤の官能基 (クロロ基あるいはアルコキシ基) の数は 1 個 (一官能性) 及び 3 個 (三官能性) であり、二官能性修飾剤はあまり使われない。修飾剤の官能性 (functionality) は充填剤の物理的・化学的性質に影響を及ぼす。

#### (1) オクタデシルシリル化反応

クロロシラン化合物を用いた ODS 化反応では反応溶媒としてトルエンが一般的に用いられ[12,13]、*N,N*-ジメチルホルムアミド[14]や1,1,2-トリクロロエタン[15]なども用いられる。また、触媒としてピリジン[15-17]、モルホリン[18,19]、イミダゾール[14]などが用いられる。一官能性修飾剤の反応 (Figure 2) においては、モノメリック相が形成される。一方、三官能性修飾剤の反応 (Figure 3) においては、無水の反応系ではモノメリック相が形成されるが[20]、反応系に水が存在するとポリメリック相が形成される。三官能性修飾剤は一官能性修飾剤より反応性が高いため、ポリメリック相が形成されない場合でも、修飾基の導入量を多くできる。また、三官能性シリル化反応では、1 個あるいは 2 個のシラノール基と結合したオクタデシルシリル基が混在する。なお未反応の官能基 (クロロ基) は加水分解してシラノール基に変換する (Figure 3)。一般的な ODS の作り方は文献21など

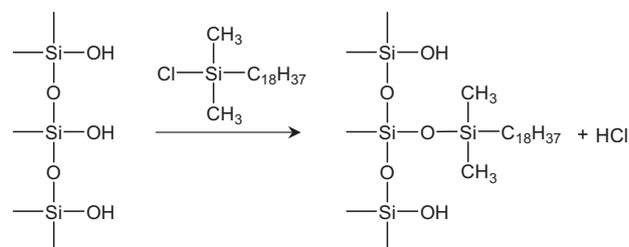


Figure 2. 一官能性オクタデシルシリル化剤の反応

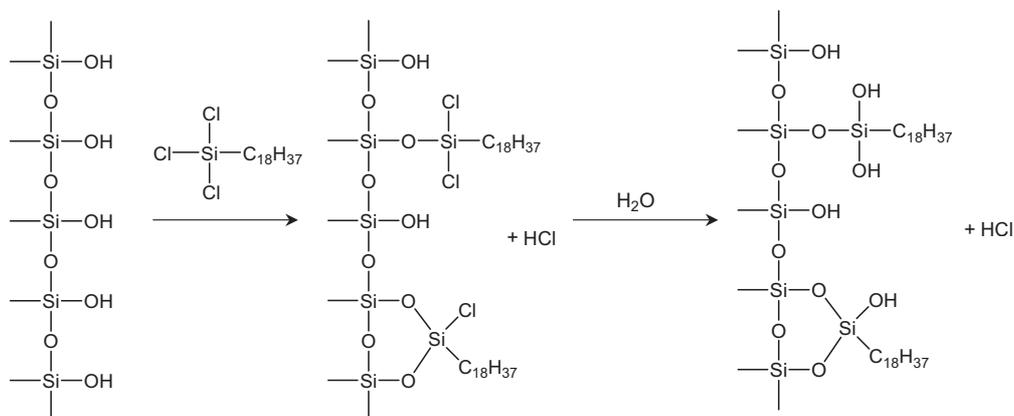


Figure 3. 三官能性オクタデシルシリル化剤の反応

に紹介されている。

(2) ODS の官能性による特性

三官能性オクタデシルシリル化剤を用いて密度高くオクタデシル基を導入した ODS では、平面で剛直な化合物はオクタデシル基の間に入り、強く保持されるが、立体的な化合物はオクタデシル基の間に入りにくく相対的に保持が弱くなる (Figure 4) [22]。

また、Figure 5 は一官能性 ODS 及び三官能性 ODS に酸性移動相を送液し、経時的にナフタレンの保持係数を測定した結果を示している。ナフタレンの保持係数の減少はオクタデ

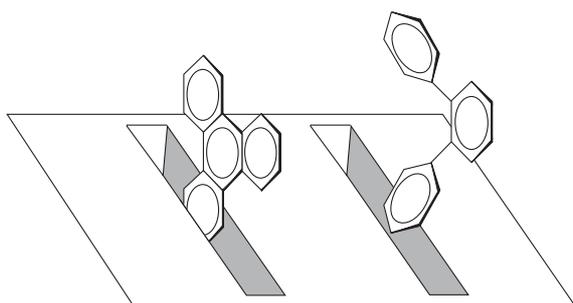


Figure 4. 三官能性 ODS の立体選択性の機構

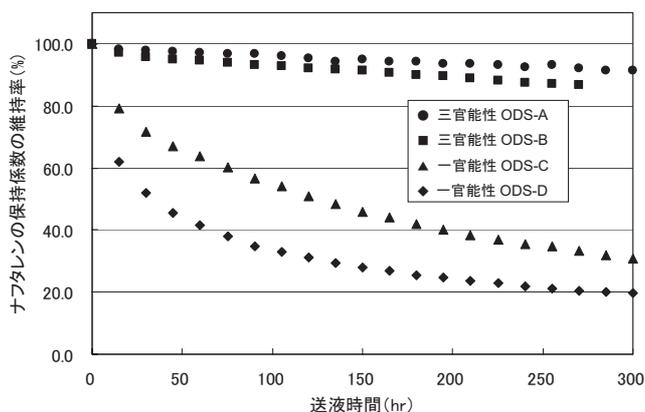


Figure 5. 一官能性 ODS 及び三官能性 ODS の耐酸性

試験条件：カラム, ODS (5  $\mu$ m, 4.6  $\times$  150 mm)；移動相, メタノール/水 (10/90, 含 2%TFA)；温度, 90  $^{\circ}$ C；流速, 1 mL/min

分析条件：移動相, アセトニトリル/水 (60/40)；温度, 25  $^{\circ}$ C；流速, 1 mL/min；検出, UV 254 nm

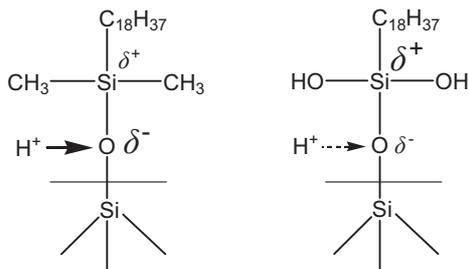


Figure 6. 一官能性 ODS (左) 及び三官能性 ODS (右) のシロキサン結合

シルシリル基の加水分解による減少を意味する。その結果、一官能性 ODS は三官能性 ODS に比べ酸性での加水分解が起こりやすいことが示された。一官能性のオクタデシルシリル基のケイ素には電気陰性度の低い炭素が 2 個結合しているのに対して、三官能性のオクタデシルシリル基のケイ素には電気陰性度の高い酸素が 2 個結合している。このため、このケイ素とシラノール基との間のシロキサン結合の酸素の電子密度は一官能性 ODS の方が高く、水素イオンの攻撃を受けやすい [23]。したがって、一官能性 ODS は酸による加水分解を受けやすい (Figure 6)。なお、電気陰性度は次の順で高くなる  $O > C > Si$ 。

4. エンドキャッピング

シリカゲル表面のシラノール基の密度は約 8  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>であるが、モノメリック相におけるオクタデシル基の導入密度は最大約 3  $\mu$ mol/m<sup>2</sup>であるといわれている[24]。未反応のシラノール基を残存シラノール基と呼ぶ。通常、残存シラノール基を減らすため再度修飾基の導入反応を行う。これをエンドキャッピングあるいは二次シリル化と呼ぶ。エンドキャッピングは立体障害を避けるため高の小さいトリメチルシリル化剤を用いる。トリメチルシリル化剤としてはトリメチルクロロシラン (TMCS) やヘキサメチルジシラザン (HMDS) [25,26]が主に用いられる。この他、N,O-ビス (トリメチルシリル) アセトアミド[26,27]、トリメチルホスフィン[28]、トリメチルイミダゾール[29]などもトリメチルシリル化剤として報告されている。また、2 回キャッピングすることも効果的であるとされている[30]。トリメチルシリル化によるエンドキャッピングでは、残存シラノール基の 20~30%しか削減できないとされていた[31]。しかし、高温シリル化反応[32-34]によるエンドキャッピングでは残存シラノール基の 94%が削減できること (エンドキャッピング率 94%) が DRIFT スペクトルにより示された[35]。ここではエンドキャッピングと ODS カラムの特性の関係を紹介する。

(1) 高温シリル化反応

高温シリル化反応は、ガスクロマトグラフィー用の熔融シリカキャピラリーカラムあるいはガラスキャピラリーカラムの製造工程において、カラム内壁に固定相を導入する前に、

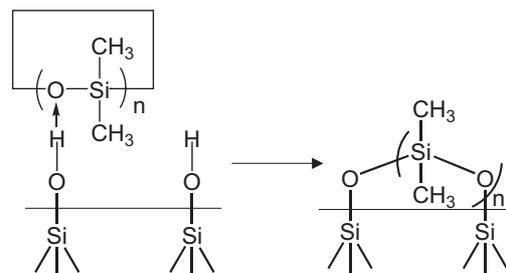


Figure 7. シクロシロキサンを用いたシラノール基のシリル化反応

カラム内壁を不活性化及び表面改質の目的で行われるシリル化反応である。反応溶媒は用いず、シリル化剤のみをカラム内に封入し、300℃以上の高温で反応させる。本反応では、シリル化剤は気体となり、速い拡散速度と速い衝突速度を持つため高い反応率が得られる。Welsch らにより最初の論文[32]が出されたが、彼らはシリル化剤として HMDS を用いて 300℃ で反応を行った。さらにシクロシロキサンが高温シリル化剤として有用であることが明らかになった。シクロシロキサンとシラノール基の反応を Figure 7 に示す[36]。高温での反応であるため各種の有機ケイ素化合物がシリル化剤として用いることができる。本反応は ODS のエンドキャッピングに応用できることが報告されている[37]。既に述べたように、高温シリル化エンドキャッピング ODS はエンドキャッピング率が極めて高いため、塩基性化合物の分析に最適であり、現在でも医薬品分析を中心に広く使用されている。

## (2) DRIFT スペクトルによる残存シラノール基の量の評価

ODS の DRIFT スペクトルに  $3140\text{ cm}^{-1}$ – $3800\text{ cm}^{-1}$  にシラノール基の吸収帯があり、 $2710\text{ cm}^{-1}$ – $3140\text{ cm}^{-1}$  にアルキル基の吸収帯がある。DRIFT スペクトルの吸収帯の面積によりシリカゲル表面の修飾基の定量が可能であることが報告されている[38]。したがって、エンドキャッピング前後のシラノール基の吸収帯面積とアルキル基の吸収帯面積の比を比較することにより、残存シラノール基の減少率が求められる。Figure 8 はエンドキャッピング前の ODS、トルエン還流下で HMDS によりエンドキャッピングした ODS、及び高温シリル化エンドキャッピングした ODS の DRIFT スペクトルであ

る。トルエン還流下でエンドキャッピングした ODS の残存シラノール基の減少率は、この DRIFT スペクトルによる測定では 26% である[35]。この値は文献 31 と一致する。一方、高温シリル化エンドキャッピングにより大幅に残存シラノール基が減少すること、すなわち非常に高いエンドキャッピング率が得られることが示されている。わずかに残った吸収帯は  $3650\text{ cm}^{-1}$  であり内部シラノール基の吸収帯と一致する。

## (3) 塩基性化合物に対する吸着

従来、ODS を用いて塩基性物質を分析すると ODS 表面の残存シラノール基との相互作用によりピークがテーリングしていた[39,40]。Figure 8 で用いた 2 種類のエンドキャッピング ODS によって、塩基性化合物であるピリジンと酸性化合物であるフェノールを分析して得られたクロマトグラムを Figure 9 に示す。前者の ODS ではピリジンが大きくテーリングし、保持時間が遅くなっていることから、残存シラノール基と相互作用していることがわかる。一方、後者ではピリジンはテーリングしておらず、保持時間の遅延もないことから、残存シラノール基との相互作用していないことが判断される。これらの結果は、高温シリル化エンドキャッピングにより非常に高いエンドキャッピング率が得られることを示しており、DRIFT スペクトルの結果とよく整合する。

これまで、ODS による塩基性化合物分析でのピークテーリングの防止策として次のような方法がとられてきた。①移動相にアミン類を添加して、残存シラノール基を遮蔽する、②移動相を酸性にして残存シラノール基の解離を抑え、イオン交換相互作用を阻害する、③移動相有機溶媒にメタノールを使用することにより、メタノールが残存シラノール基と水

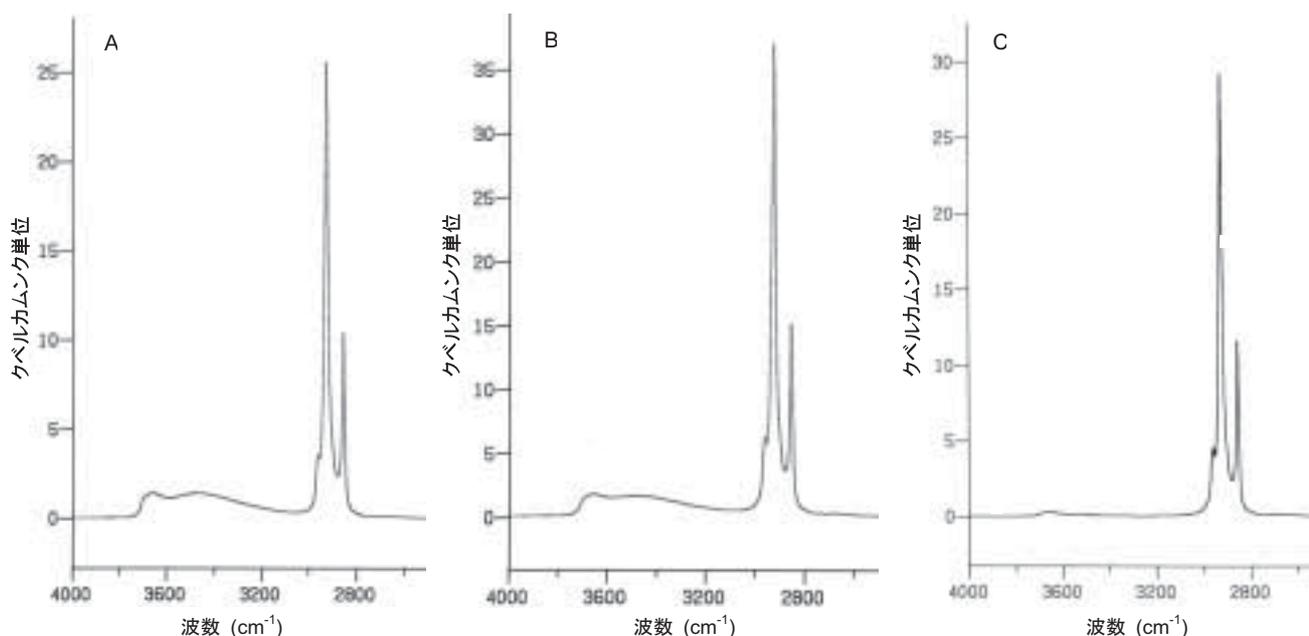
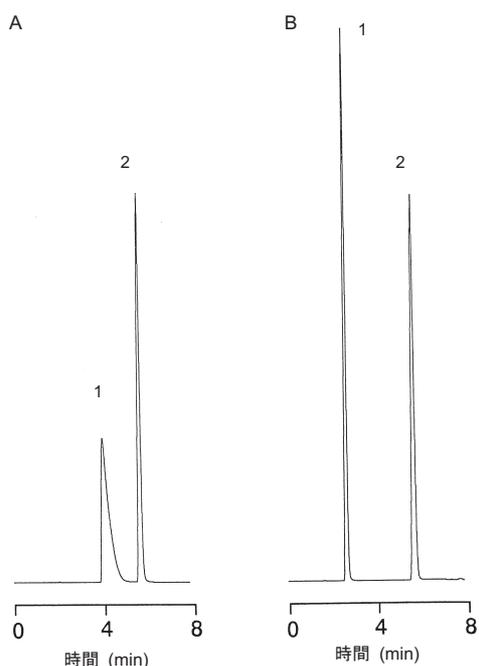


Figure 8. ODS の DRIFT スペクトル

A, エンドキャッピングしていない ODS ; B, トルエン還流下でのトリメチルシリル化エンドキャッピング ODS ; C, 高温シリル化エンドキャッピング ODS



**Figure 9.** トリメチルトリル化エンドキャッピング ODS と高温シリル化エンドキャッピング ODS によるピリジン (塩基性物質) の分析

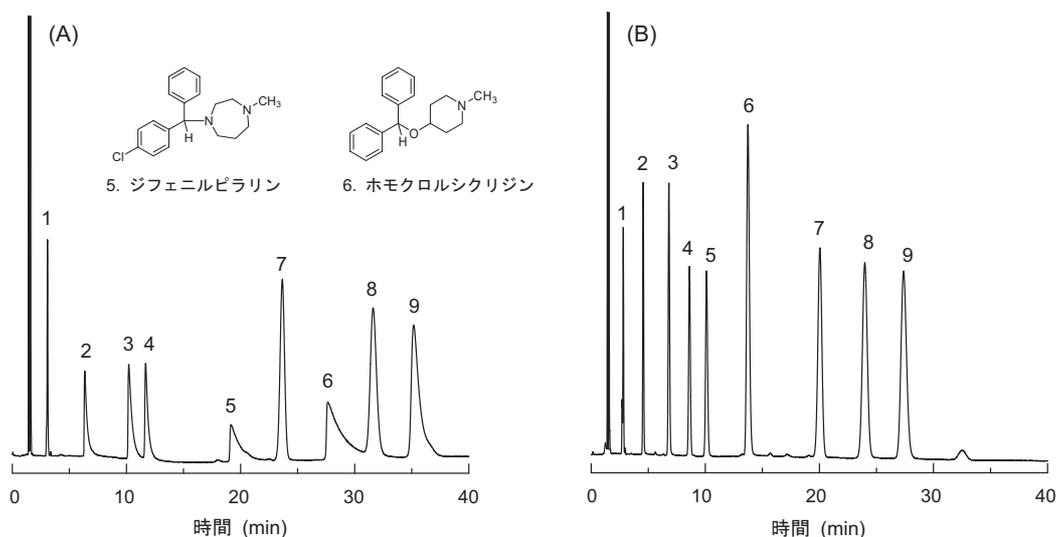
分析条件：カラム, (A)トルエン還流下でのトリメチルシリル化エンドキャッピング ODS (B)高温シリル化エンドキャッピング ODS；移動相, アセトニトリル/水 (30/70)；温度, 室温；流速, 1 mL/min；検出, UV 254 nm；ピーク, 1 = ピリジン；2 = フェノール

素結合して、残存シラノール基を遮蔽する、④イオン対クロマトグラフィーを用い、イオン対形成によりシラノール基との相互作用を阻害する、⑤カラム温度を高くすることなどである。しかし、これらの防止策には低波長の UV 検出や LC/MS では使用できない場合も少なくないなどの欠点がある。Figure10に低エンドキャッピング率の ODS (A) と高エンドキャッピング率の ODS (B) による塩基性化合物の分析例を示す。高エンドキャッピング率 ODS (B) では、前述の移動相に対するテーリング防止策はとられていないが、塩基性化合物のテーリングはない。テーリング防止策が不要であることは、分離及び検出において大変有利である。

(4) キレート剤に対する吸着性

エンドキャッピング率が異なる 2 種類の ODS を用いて、キレート剤であるヒノキチオールを分析して得られたクロマトグラムを Figure11に示す。低エンドキャッピング率の ODS ではヒノキチオールが充填剤表面に存在する微量金属不純物と相互作用しピークがテーリングする。一方、高エンドキャッピング率の ODS ではこのテーリングがない。これは、エンドキャッピングにより導入された修飾基が充填剤表面を高密度に覆っているため、ヒノキチオールが金属不純物と接触できないことによると考えられる。従来、キレート剤はステンレス製のクロマトグラフィー管内壁やエンドフィッティングの焼結フィルターに吸着すると考えられてきた。しかし、高エンドキャッピング率の ODS は、この吸着の主な原因が充填剤にあったことを明らかにした。

通常、ODS を用いたキレート剤の分析では、移動相に金属イオンのマスキング剤であるエチレンジアミン四酢酸



**Figure 10.** エンドキャッピング率が異なる ODS による塩基性物質の分析

分析条件：カラム, (A)低エンドキャッピング率 ODS (5 μm, 4.6×150 mm), (B)高エンドキャッピング率 ODS (5 mm, 4.6×150 mm)；移動相, アセトニトリル/25 mmol/L リン酸緩衝液 pH 7 (40/60)；流量, 1 mL/min；温度, 40℃；検出, UV 220 nm；試料, 抗ヒスタミン剤 [(1)フェキソフェナジン (2)クロルフェニラミン (3)トリプロリジン (4)ジフェンヒドラミン (5)ジフェニルピラリン (6)ホモクロルシクリジン (7)ヒドロキシジン (8)アステミゾール (9)プロメタジン]

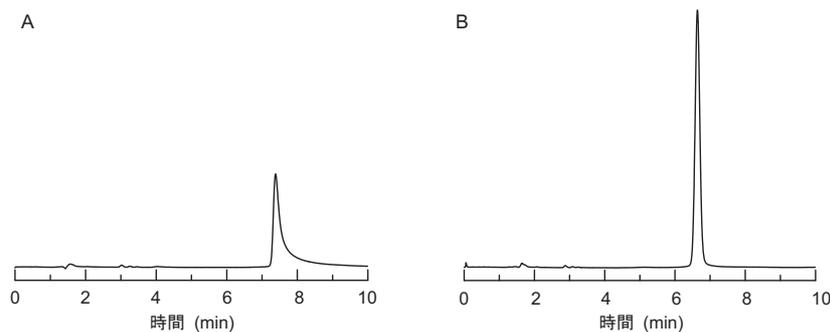


Figure 11. エンドキャッピング率が異なる ODS によるキレート剤の分析

分析条件：カラム，(A)低エンドキャッピング率 ODS (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 $\times$ 150 mm)，(B)高エンドキャッピング率 ODS (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 $\times$ 150 mm)；移動相，アセトニトリル/20 mmol/L リン酸 (40/60)；温度，40 $^{\circ}\text{C}$ ；流速，1 mL/min；検出，UV 254 nm；ピーク，1 = ヒノキチオール；2 = ベンゼン

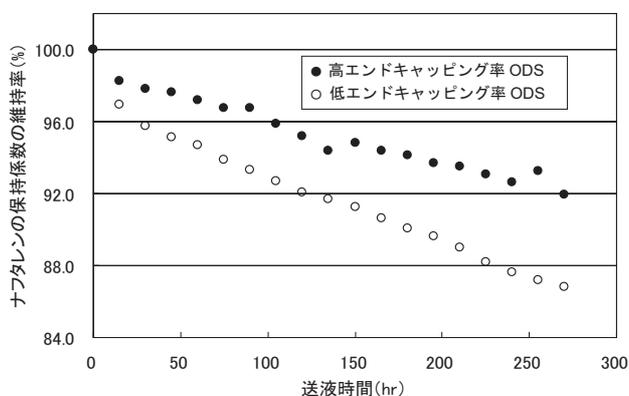


Figure 12. ODS のエンドキャッピング率と耐酸性の関係

試験条件：カラム，ODS (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 $\times$ 150 mm)；移動相，メタノール/水 (10/90，含 2% TFA)；温度，90 $^{\circ}\text{C}$ ；流速，1 mL/min

分析条件：移動相，アセトニトリル/水 (60/40)；温度，25 $^{\circ}\text{C}$ ；流速，1 mL/min；検出，UV 254 nm

(EDTA) 塩を添加しなければならなかった。しかし、EDTA は UV 吸収を持ち、不揮発性であるため、高感度 UV 検出や LC/MS による分析ができないなどの欠点があった。これに対して、Figure 11 に示すように高エンドキャッピング率の ODS では、移動相に EDTA を添加する必要がないため、これらの分析が可能となる。キレート化剤の分析においても高エンドキャッピング率の ODS は大きな優位性がある。

##### (5) オクタデシルシリル基の耐酸性

前にも述べたように、ODS は酸性移動相によりシロキサン結合が加水分解し、カラムが劣化する。三官能性 ODS では加水分解しにくい、エンドキャッピングによりオクタデシルシリル基近傍の修飾基の密度が増せば、より加水分解しにくくなると考えられる。Figure 12 はナフタレンの保持時間の減少により耐酸性を表したものである。同じ三官能性 ODS でもエンドキャッピング率の高い方が耐酸性は高い。ODS は酸性移動相で使用されることが多いため、エンドキャッピング率はカラム寿命に影響する。

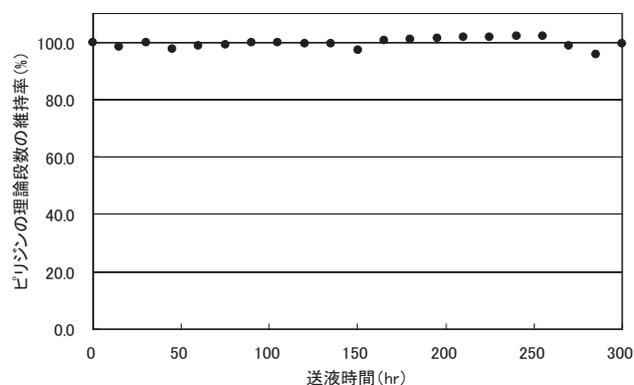


Figure 13. 高エンドキャッピング率 ODS のエンドキャッピング修飾基の耐酸性

試験条件：カラム，高エンドキャッピング率 ODS (5  $\mu\text{m}$ , 4.6 $\times$ 150 mm)；移動相，メタノール/水 (10/90，含 2% TFA)；温度，90 $^{\circ}\text{C}$ ；流速，1 mL/min

分析条件：移動相，アセトニトリル/20 mmol/L リン酸緩衝液 pH 7 (30/70)；温度，25 $^{\circ}\text{C}$ ；流速，1 mL/min；検出，UV 254 nm

##### (6) エンドキャッピング修飾基の耐酸性

トリメチルシリル化エンドキャッピング ODS では、カラム使用中にエンドキャッピング修飾基が加水分解し、エンドキャッピングの効果がなくなるとされていた[41]。Figure 13 は、高エンドキャッピング率 ODS では、高温酸性下でピリジンの理論段数がほとんど変化しないことを示している。すなわち、カラム使用中にエンドキャッピング効果が減少しにくいことを明らかにした。

## 5. まとめ

以上、LC 用充填剤の基材としてのシリカゲルの特性並びに ODS の調製法と特徴について説明した。また、高温シリル化反応のエンドキャッピングへの応用とエンドキャッピングの重要性について紹介した。シリカゲルは当分の間、充填剤の基材の主流であり続けると思われる。現在でも、新しい

機能を持ったシリカ系充填剤が開発されている。一方、ODSは長い間研究されてきたが、未だに解明されていない溶出・分離挙動が見られるなど、性能向上の余地が残されており、より汎用性の高いODSの開発が期待される。

## 文献

- [1] Davydov, V. Ya.; Zhuravlev, L. T.; Kiselev, A.V. *Russ. J. Phys. Chem.* **1964**, *38*, 1108-1112.
- [2] Unger, K. *Angew. Chem. Internat. Edit.* **1972**, *11*, 267-278.
- [3] 近藤精一, 石川達雄, 安部郁夫 吸着の科学, 丸善, **1991**; 7章.
- [4] Davydov, V. Ya.; Kiselev, A. V.; Zhuravlev, L. T. *Trans. Faraday Soc.* **1964**, *60*, 2254-2264.
- [5] Hair, M. L.; Hertl, W. *J. Phys. Chem.* **1969**, *73*, 4269-4276.
- [6] Köhler, J.; Chase, D. B.; Farlee, R. D.; Vega, A. J.; Kirkland, J.J.; *J. Chromatogr.* **1986**, *352*, 275-305.
- [7] Unger, K. Porous Silica; Journal of Chromatography Library 16; Elsevier: Amsterdam, **1978**; Chapter 1.
- [8] Sauer, J.; Schröder, K.-P. *Z. Phys. Chemie, Leipzig* **1985**, *266*, 379-387.
- [9] Sadek, P. C.; Koester, C. J.; Bowes, L. D. *J. Chromatogr. Sci.* **1987**, *25*, 489-493.
- [10] Nawrocki, J.; Moir, D. L.; Szczepaniak, W. *J. Chromatogr.* **1989**, *467*, 31-40.
- [11] Nawrocki, J.; Moir, D. L.; Szczepaniak, W. *Chromatographia* **1989**, *28*, 143-147.
- [12] Gilpin, R. K.; Burke, M. F. *Anal. Chem.* **1973**, *45*, 1383-1389.
- [13] Kingston, D. G. I.; Gerhard, B. B. *J. Chromatogr.* **1976**, *116*, 182-183.
- [14] Kinkel, J. N.; Unger, K. K. *J. Chromatogr.* **1984**, *316*, 193-200.
- [15] Jones, K. *J. Chromatogr.* **1987**, *392*, 1-10.
- [16] Sebestian, I.; Halász, I. *Chromatographia* **1974**, *7*, 371-375.
- [17] Hemtsberger, H.; Maasfeld, W.; Ricken, H. *Chromatographia* **1976**, *9*, 303-310.
- [18] Buszewski, B.; Jurásek, A.; Garaj, J.; Nondek, L.; Novák, I.; Berek, D. *J. Liq. Chromatogr.* **1987**, *10*, 2325-2336.
- [19] Buszewski, B.; Suprynowicz, Z. *Chromatographia* **1987**, *24*, 573-578.
- [20] Sander, L. C.; Wise, S. A. *Anal. Chem.* **1984**, *56*, 504-510.
- [21] 中村 洋監修, 液クロ実験 *How to* マニュアル; 医学評論社: **2007**; 4章.
- [22] Wise, S. A.; Sander, L. C. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.*, **1985**, *8*, 248-255.
- [23] Noll, W. Chemistry and Technology of Silicones; Academic Press, Inc.: Orland, **1968**; Chapter 6.
- [24] 中村 洋監修, 液クロ虎の巻, 筑波出版会, **2001**, 38ページ.
- [25] Pryde, A. *J. Chromatogr. Sci.* **1974**, *12*, 486-498.
- [26] Kark, K.; Sebestian, I.; Halasz, I. *J. Chromatogr.* **1976**, *122*, 3-16.
- [27] Engelhardt, H.; Müller, H. *Chromatographia* **1984**, *19*, 77-84.
- [28] Marshall, D. B.; Cole, C. L.; Norman, A. D. *J. Chromatogr. Sci.* **1987**, *25*, 262-266.
- [29] McMurtrey, K. D. *J. Liq. Chromatogr.* **1988**, *11*, 3375-3384.
- [30] Karkland, J. J.; Henderson, J. W.; DeStefano, J. J.; van Straten, M. A.; Claessens, H. A. *J. Chromatogr. A* **1997**, *762*, 97-112.
- [31] Wilson, N. S.; Gilroy, J.; Dolan, J. W.; Snyder, L. R. *J. Chromatogr.* **2004**, *1026*, 91-100.
- [32] Welsch, T.; Engewald, W.; Klauke, Ch. *Chromatographia* **1977**, *10*, 22-24.
- [33] Verzele, M. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* **1979**, *2*, 647-653.
- [34] Grob, K.; Grob, G.; Grob Jr., K. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* **1979**, *2*, 31-35.
- [35] Sudo, Y. *J. Chromatogr.* **1997**, *757*, 21-28.
- [36] Rutten, G.; de Haan, J.; van de Ven, L.; van de Ven, A.; van Cruchten, H.; Rijks, J. *J. High Resolut. Chromatogr. Chromatogr. Commun.* **1985**, *8*, 664-672.
- [37] Sudo, Y.; *J. Chromatogr. A* **1996**, *737*, 139-147.
- [38] Shreedhara Murthy, R. S. S.; Leyden, D. E. *Anal. Chem.* **1986**, *58*, 1228-1233.
- [39] Sokolowski, A.; Wahlund, K. -G. *J. Chromatogr.* **1980**, *189*, 299-316.
- [40] Nahum, A.; Horáth, Cs. *J. Chromatogr.* **1981**, *203*, 53-63.
- [41] Snyder, L. R.; Glajch, J. L.; Kirkland, J. J. Practical HPLC Method Development; John Wiley & Sons, Inc.: New York, **1988**; Chapter 3.