

Focussing Review

キャピラリー内で合成された分離機能高分子を用いる電気クロマトグラフィー

藤本忠蔵

浜松医科大学医学部化学教室
〒431-3192 浜松市半田町3776

Electrochromatography using in-capillary polymerized separation media

Chuzo Fujimoto

*Department of Chemistry, Hamamatsu University School of Medicine,
Hamamatsu, 431-3192, Japan*

Received, May 25, 2000. Accepted, June 13, 2000.

Abstract

The objective of this review is to describe column technology in capillary electrochromatography (CEC), focusing especially on the methods for the in situ preparation of separation media inside fused silica capillaries. There are many monomers which can be polymerized directly in a capillary to be used as stationary phase for CEC separation: (comonomers) acrylamides, alkyl acrylates, and styrene; (crosslinking monomers) diacrylamides, diacrylates, and divinylbenzene; and (functional monomers) 2-acrylamido-2-methyl-1-propane sulfonic acid, vinyl sulfonic acid, acrylic acid, acrylamido ammonium halides, and ally ammonium halides. In addition to the organic polymer-based stationary phases, silica-based stationary phases are prepared from tetraethoxysilane or tetramethoxysilane by the sol-gel method. In situ prepared columns possess some desirable features: column packing and frit construction - the method makes these difficult steps unnecessary; and the electroosmotic flow is expected to be constant at every part of the column. Fifty-three papers are cited to review the development in the specific area.

Key words : capillary electrochromatography, fritless columns, monolith, rod, stationary phases, electroosmotic flow

1 はじめに

マイクロ高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が開発されてからすでに四半世紀が過ぎようとしている。その後、高性能カラム調製法に関する多くの報告がなされ、それに合わせて多岐にわたる周辺技術が開発された [1,2]。最近では

種々の高性能マイクロカラムやその関連装置が市販されるようになり、マイクロスケールの分離は研究者の手を離れて一般にもかなり浸透してきた。この間、1980年代になってキャピラリー電気泳動が発表され、それが普及したこともあって、キャピラリーを用いる液体クロマトグラフィーの研究はさら

に広がりを見せている。

マイクロHPLCでは、高圧ポンプから充填カラムに毎分 μl の移動相を送液することにより分離が行われる。このとき、カラム内の流れの速度分布は放物面を形成すると考えられている。一方、電圧をカラムに印加して発生した電気浸透流は栓流に近い速度分布をもつと考えられている[3]。この速度分布の違いは、分離性能(HETP)の速度依存性を表すvan Deemterの式のA項(渦巻き状拡散)の寄与に最も顕著に現れる[4, 5]。

HPLC充填剤を充填したフューズドシリカキャピラリーの両端に電圧を印加して分離を行う方法は一般にキャピラリー電気クロマトグラフィー(capillary electrochromatography, CEC)と呼ばれる[6, 7]。この方法は、HPLCとキャピラリー電気泳動のハイブリッド技術であり、溶質は充填剤とカラム壁の表面で発生する電気浸透流の存在下で、クロマトグラフィー相互作用と泳動移動度の違いによって分離される。CECは高い分離選択性と分離性能を与えるが、そのカラム作製は容易ではない。充填剤を保持するためのフリット作製ならびに充填剤の充填に関して多くの研究が報告されているが、相当熟練を要する。また、それぞれの作製方法でどの程度再現性よく安定したカラム性能が得られるかは個人の技術にかなり依存するように思われる。市販のカラムを利用することも可能であるが、その評価はこれからである。このタイプのCECカラムに関連した別の問題は、キャピラリー通電を遮断する気泡がフリット部で発生しやすいことである[4]。移動相の十分な脱気をした後、入り口と出口のリザーバーに等しい圧力をかける、あるいは、圧力差流を併用することが推奨される[6]。気泡の問題を別にしても、微視的にはフリット部と充填剤充填部で電気浸透流の速度が異なる可能性があり、これが流れの速度分布ならびにカラム性能に影響を与えることは必然である。

以上述べたCECカラムの問題点を解決するために、シリカ系充填剤粒子を互いに付着させることでフリットの要らないカラムを作る方法が幾つか報告された[8-11]。付着のために使用した物質によって、充填剤本来の保持の減少が起らなければ、そして、付着の条件を再現性よく管理できれば、フリット作製の問題は消える。あとの成否はマイクロHPLCカラムと同様、充填剤をキャピラリーに充填する技術にかかっている。

フリット作製と充填剤の充填が不要な充填カラムを製作するには、キャピラリー内で溶液から直接充填剤を合成すればよい。このようにして作製されたカラムはモノリスカラム、フリットレスカラム、ロッドカラムなどと呼ばれている。この方法はかなり以前にガスクロマトグラフィーや液体クロマトグラフィーで試みられた[12-15]が、当時あまり注目さ

れなかったと思われる。さらに1990年代に入ってHjerténらがこのタイプのHPLCカラムを発表する[16-19]が、強い関心が寄せられるようになったのはCECが注目されるようになった最近のことである[20]。

本稿では、キャピラリー内で重合により得られる有機ポリマーならびにシリカゲルからなる、いわゆる「一体型」カラムを用いるCECについて、これまでの進歩を振り返る。

2 有機ポリマー系

アクリルアミド系カラムはCECカラムとして最初に使用された。従来のゲル電気泳動法の延長線上にありながら、キャピラリー内で重合されたポリマーが電荷ならびに相互作用を有する物質からなるという点で過去のものとは基本的に異なる。これらの相互作用は、従来からのタンパク質や核酸のゲル電気泳動では一般に好ましくない。しかし、有効なゼータ電位をポリマーに付与して電気浸透流を発生するには、クロマトグラフィー相互作用を与えるモノマーを電荷をもつモノマー(functional monomer)と共重合することが効果的である。これにより、電荷を持つ化合物だけでなく電荷を持たない化合物も分離できる。Fujimotoらは、0.1M Tris-0.15M ホウ酸(TB)緩衝液中で2-アクリルアミド-2-メチル-1-プロパンスルホン酸(AMPS)をfunctional monomerに用い、アクリルアミド(AAm)とN,N'-メチレンビスアクリルアミド(MBAA, 架橋剤)を過硫酸アンモニウム(APS)とN,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン(TMEDA)によってキャピラリー内で重合した[20, 21]。キャピラリーは予め3-メタクリルオキシプロピルトリメトキシシラン(MAPS, 固定相のキャピラリー壁へのアンカー試薬, bifunctional reagent)で処理してあるため、固定相はキャピラリー壁に結合しており、電気浸透流が発生してもカラムから流出することはない。このカラムを用いて中性溶質の分離が達成されたが、このときの分離は主に分子ふるいによるものと予想された。続いて、親水性のアクリルアミドをより疎水性の高いN-イソプロピルアクリルアミドに代え、アセトニトリル混合溶媒を用いて逆相CEC分離を行った[22]。電気浸透流はAPSのモル比とともに増加した。APSは陽極から陰極へ向かう電気浸透流を与えるが、四級アンモニウム塩モノマーを使用すると、その方向を逆にすることができる。Table 1に、陰極から陽極へ向かう電気浸透流を発生しうるfunctional monomerを示した。このうちの幾つかについては実際にカラムが作製され、その方向が確認されている[22, 23]。さらに、このアクリルアミド系カラムは、たとえカラムの調製中や分離中に気泡が発生しても、通電とともに気泡が消失するという特徴を有する。これについては著者が顕微鏡ビデオ観察により確認しており、他の研究者によっても報告されている

Table 1 Functional monomers used for generating anodic electroosmotic flow^a

formula	name	pK ^b
$(\text{CH}_2=\text{C}(\text{CH}_3)\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3)\text{Cl}$	methacroylcholine chloride	>12
$(\text{CH}_2=\text{CHCONHCH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{C}_2\text{H}_5)_3)\text{I}$	<i>N</i> -(2-acrylamidoethyl)triethyl ammonium iodide	>12
$(\text{CH}_2=\text{CHCH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2\text{Cl}$	diallydimethylammonium chloride	>12
$\text{CH}_2=\text{CHCONH}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2$	[(<i>N,N</i> -dimethylamino)propyl]acrylamide	9.3
$\text{CH}_2=\text{CHCONH}(\text{CH}_2)_2\text{N}(\text{CH}_3)_2$	[(<i>N,N</i> -dimethylamino)ethyl]acrylamide	8.5
$\text{CH}_2=\text{CHCONH}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{C}_2\text{H}_4)_2\text{O}$	(3-morpholinopropyl)acrylamide	7.0

^a The compounds listed here are commercially available.^b The pK values are taken from refs. 26 and 27.Table 2 Enantiomeric CEC of acidic and neutral compounds in a capillary filled with acrylamide based polymer^a.

	t(min) ^b	N(/10 ³) ^c	α^d
ACIDIC			
Dansyl Asp	23.4	78	1.16
Glu	23.4	83	1.13
Ser	27.8	151	1.10
Val	33.8	93	1.16
Thr	42.2	65	1.16
Met	31.5	95	1.09
Trp	56.8	80	1.04
Phe	74.4	41	1.06
Phenylmercapturic acid	23.2	48	1.06
Warfarin	43.0	45	1.05
2-Phenoxypropionic acid	14.9	37	1.05
<i>N</i> -FMOC-Val	43.0	46	1.06
NEUTRAL			
Benzoin	108.9	26	1.09
1-(1-Naphthalene)ethanol	58.7	58	1.01

^a Modified from ref.23. Conditions: mobile phase 0.2 M Tris-0.3 M boric acid (pH 8.1); capillary, 75 μm i.d. $\times$ 55-70 μm (effective length, 35 cm).^b the retention time of the first eluted enantiomer.^c The plate number per meter for the first eluted enantiomer.^d The ratio of the retention times of the enantiomers.

[23] これは通常の電気泳動と異なり、電気浸透流が発生しているために起こるためと考えられる。

UenoとKoideはエナンチオマー分離のためのアクリルアミド系カラムを開発した [23 - 25]。MBAAで架橋したPoly(AMPS-co-AA)ヒドロゲルにキラルセクターであるポリβ-シクロデキストリン (poly β-CD) やカルボキシメチルβ-シクロデキストリンポリマー (CM β-CD polymer) を高分子ゲルの網目構造中に閉じ込めることによって固定化した [24]。共有結合によるβ-CDの固定化も検討された。アリルカルバモイル化したβ-CDを合成し、AAm, MBAA, AMPSとともに重合し、カチオン性ならびに中性のエナンチオマーを

分離した [25]。さらに、*N*-(2-アクリルアミドエチル)トリエチルアンモニウムヨードをfunctional monomerとして使用し、酸性ならびに中性のエナンチオマーを分離した [23]。Table 2に得られた結果を示す。

Novotnyのグループはより疎水性の高いモノマーを溶解するためにTB緩衝液と*N*-メチルホルムアミド (NMF) の混合溶媒を用いた [28]。AAm, MBAA, アクリル酸 (AA, functional monomer) と疎水性モノマー (ブチルアクリレート, ヘキシルアクリレート, またはラウリルアクリレート) を組み合わせてAPS/TMEDAによりキャピラリー内で重合した。疎水性モノマーの濃度が29%のとき、NMFの濃度は

アクリル酸ブチルに対して50%, アクリル酸ラウリルに対して95%であった。重合溶液中に分子量10,000のポリエチレングリコール(PEG)を3%加えることによって高いカラム性能が得られた。PEGは分離の前に電気浸透流によりカラムから除かれた。このような親水性ポリマーの添加は架橋以前にアクリルアミド鎖の凝集をもたらす、大きな細孔構造を与えると考えられている[29]。functional monomerとしてはビニルスルホン酸(VS)も使用された[28]。

Hjerténらのグループは、種々のアクリルアミド系CECカラムの調製法を示した[30-32]。最初に報告された方法[30, 31]は多段階によるもので、次のステップからなる。

- 1) 予めMAPSで処理したキャピラリー中で、硫酸アンモニウム(高濃度)を含むAPS/TEMED系によりヒドロキシエチルメタクリレート(HEMA)とピペラジンジアクリルアミド(PDAAm, 架橋性モノマー)(いずれも10%以下)を共重合し、細孔構造を有するマトリックスを構築する。
- 2) 細孔内でアリルグリシジルエーテル, HEMA, PDAAm, デキストラン硫酸(Na塩, 分子量500,000)をAPS/TEMEDにより重合し、電気浸透流を発生するポリマーを形成する。
- 3) 1, 2-エポキシオクタデカンのエポキシド基をカラム内物質の尿酸基やエポキシド基とBF₃を触媒として反応させることにより、疎水基を導入する。反応はトルエンを溶媒とし、超音波浴中で行われた。

後に同じグループによってより簡便な方法が発表された[32]。PDAAm, メタクリルアミド(MAAm), VS, 硫酸アンモニウムを0.015M Trisに溶解し、ステアリルメタクリレート(SMA)(または*n*-ブチルメタクリレート, BMA)ならびにトリトンX-100(メタクリレートの溶解のために添加)を加え、APS/TMEDAにより重合した。このカラムを臨界ミセル濃度以下のドデシル硫酸ナトリウムを含む移動相と組み合わせ、分離度の高い分離を達成した。

最近の論文でHjerténらは[33]、PDAAm, MAAm, SMAを少量のジメチルホルムアミドを含む緩衝液中で、超音波を照射して乳化し、APS/TMEDAにより重合を開始した。一度重合禁止剤を加えて反応を抑制したのち、このエマルジョンにジメチルジアリルアンモニウムクロリド(DMDA, functional monomer)とPDAAm(DMDA, PDAAmどちらも架橋性モノマー)を加えて、APS/TMEDAにより再び重合を開始した。これによりエマルジョン中のポリマー粒子の表面に電荷をもったモノマーが結合する。この反応混合物をMAPSで処理したキャピラリーに導入し、反応を完結させた。DMDAの量を変えることにより、電気浸透流の異なる2種類のカラムを製作し、これを用いてタンパク質の逆相CECに

よるグラジエント分離について考察した。

FréchetらはHPLCカラムで検討した手法をCECに適用した[34-37]。エチレングリコールジメタクリレート(EDMA), BMA, AMPS混合物にアゾビスイソブチロニトリル(AIBN, 開始剤)を溶解した後、1-プロパノール, 1,4-ブタンジオール, 水の3成分からなるporogen(細孔形成剤)を加えて、未処理のキャピラリーに導入し、熱的に[34-36]あるいは紫外線照射下[37]で重合を行った。3成分系溶媒中の1-プロパノールの割合は細孔の大きさに著しく影響し、250-3000nmの範囲で制御できた[35]。中性低分子の逆相分離に加えて、高分子量ポリスチレンのサイズ排除CEC分離も示された[36]。N-(3,5-ジニトロベンゾイル)ロイシンジアリルアミドのエナンチオマー分離のために、EDMA, グリシジルメタクリレート(GMA), AMPSのNa塩, 2-ヒドロキシエチルメタクリレート(N-L-バリン3,5-ジメチルアニリド)カーバメート(キラルセクター)を3成分系溶媒中でAIBNを用いて重合した[38]。重合終了後、酸を流してエポキシド環を加水分解して親水性ポリマーに変えることにより、高い分離効率でエナンチオマー分離が達成された。

Horváthらは単一アルコールまたは3成分系porogen溶媒を用いて、AIBNを開始剤としてスチレン(St)とジビニルベンゼン(DVB)の重合を行った[39]。functional monomerを用いていないにもかかわらず十分な電気浸透流を与えた。ビニルベンジルクロリドとDVBの重合を*n*-プロパノール/ホルムアミド混合溶媒をporogenとしてキャピラリー内で重合した後、N,N-ジメチルオクチルアミンと反応させて、四級アンモニウム基を有する疎水基を導入した[39]。これらのカラムを用いてペプチドのCEC分離が行われた。MAPSによるキャピラリー内壁の処理法について検討した。最近、Horváthらは*n*-プロパノール-ホルムアミド混合溶媒をporogenとして用いて、グリシジルメタクリレート, メチルメタクリレート, EDMA(架橋剤)の重合を行った[40]。続いて、細孔内をN-エチルブチルアミンで満たしてグリシジルメタクリレートのエポキシド環と反応させ、四級アンモニウム基を導入した。アセトニトリル混合溶媒(酸性)を用いてタンパク質、ペプチドの分離が行われた。

Zhangらはトルエン中St, DVB, メタクリル酸(MAA)をAIBNによりキャピラリー内重合したカラムを用い、中性分子の高速逆相CEC分離を行った[41]。

3 モレキュラーインプリントポリマー系

モレキュラーインプリント法(MI法)を用いるCECでは重合によって生成した微視的環境がエナンチオマーの分離に用いられる。テンプレート分子(ポリマーに分子を記憶させておくために重合溶液に加えられる分子)の存在下に機

能性モノマー（テンプレート分子と相互作用する分子）と架橋性モノマーを重合する。相互作用として水素結合が利用される場合には重合には非水素結合性溶媒が好まれる [42]。重合終了後にテンプレート分子が抽出・除去され、特異的相互作用部位がポリマー中に残される。英語のfunctional monomerは、2節有機ポリマー系ではEOF発生機能を有する荷電性モノマーの意味で使用されているが、MI法ではテンプレートと相互作用する置換基をもつモノマーの意味で使われる。移動相の条件によっては、ポリマー形成後にMI機能性モノマー部分が電荷を持ち、十分なEOFを発生させることがある。

HoboらのグループはL-フェニルアラニンアニリド（テンプレート分子）、MAA/2-ピニルピリジン（VP）（機能性モノマー）、EDMA（架橋性モノマー）をAIBNを開始剤としてクロロホルム中60℃で重合した [43]。テンプレート分子はカラムの通電により除去された。キャピラリーにはグリニャール試薬で処理されたものが使用された。アセトニトリル/酢酸/水（80：10：10）が移動相として使用された。テンプレート分子はL-フェニルアラニンのクロロホルムへの溶解性が低いために選ばれたが、L-フェニルアラニンならびに類似構造をもつアミノ酸のエナンチオマー分離に有効であった。

NilssonらはMAPSで処理したキャピラリー内で、 β -アドレナリン性ブロッカー（プロプラノロールとメトロプロロール、テンプレート分子）、メタクリル酸（機能性モノマー）、トリメチロールプロパントリメタクリレート（TRIM、架橋性モノマー）をAIBNを開始剤としてトルエン中-20℃で光重合した [44]。80分で光照射を止め、カラムをアセトニトリル/酢酸 pH 3.0（80：20）でフラッシュした。1-25%のイソオクタンを含むトルエンをporogen溶媒として使用したときには、反応を途中で打ち切らなくてもスーパーポア構造が形成できた [45, 46]。プロプラノロールをテンプレート分子としたMI-CECにより他の構造類似体も分離された [47]。局所麻酔薬ロピバカイン（テンプレート分子）、MAA、VP（以上、機能性モノマー）、TRIM、EDM、ペンタエリトリートリアクリレート（PETRA）、ペンタエリトリートテトラアクリレート（PETEA）（以上、架橋性モノマー）をキャピラリー内で重合し、ロピバカインならびに構造類似体をエナンチオマー分離した [46]。

4 無機ポリマー系

ゾルゲル法によるシリカゲル固定相の合成がキャピラリー内で行われた。WendelkenはSiO₂とK₂Oの混合物にホルムアミドを加えた混合物をキャピラリーに導入してシリカゲル固定相を合成した [48]。その後、オクタデシルジメチルクロロシラン（ODS-Cl）またはオクタデシルジメチル-N,N-ジ

エチルアミノシラン（ODS-DEA）で誘導体化した。テトラエトキシシラン（TEOS）と*n*-オクチルトリエトキシシランの加水分解溶液による誘導体化も試みられた。

Fujimotoは、多孔性シリカロッドHPLCカラムに関するTanakaらの方法 [49] をキャピラリー内重合に適用できるように検討した [4, 50, 51]。テトラメトキシシラン（TMOS）、PEG（分子量10,000）、酢酸水溶液の混合物をキャピラリーの一部に注入して40℃に保ち、湿潤ゲル体を得た。60-80℃で乾燥した後、300℃で加熱処理した。得られたゲルをODS-Clと反応させ、逆相充填剤とした。Fig.1はこの方法によって得られたカラムの断面である。2 μ m程度の粒子が観察されるが、その表面はアンモニア処理の条件によって変わる。アセトニトリル/HEPES（60：40）を移動相に用いてパラベンに対して流速約0.4mm/sで9 - 10 μ mの段高を得た。より大きなスルーポアの存在も指摘されているが [49, 52, 53]、キャピラリーを折るときに粒子同士が無理やり剥がれること、チャージアップのために脆い部分が引き剥がれることがあると思われるため、走査型電子顕微鏡写真だけでは結論づけられなかった。Fig.2はこのカラムによって得られた多環芳香族化合物の分離例、Fig.3はフラーレンの分離例である。

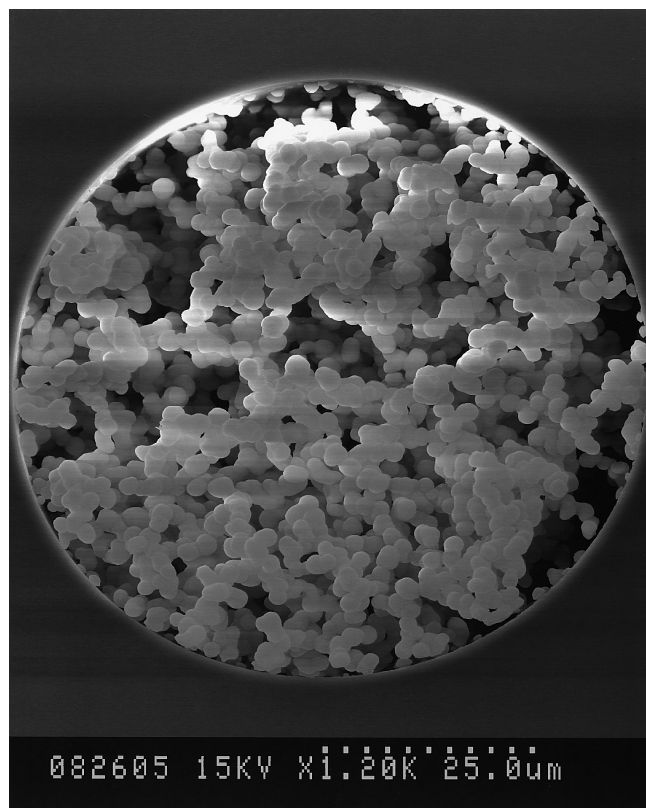


Fig. 1 Scanning electron micrograph of silica prepared directly in a fused silica capillary. The inner diameter of the capillary is 75 μ m.

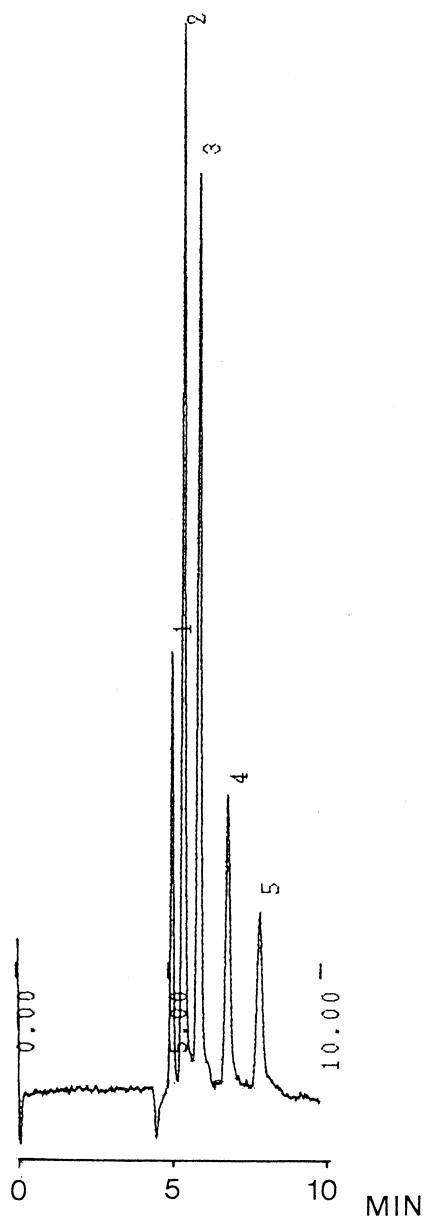


Fig. 2 Electrochromatogram of a mixture of polyaromatic hydrocarbons. Column; ODS-modified silica monolith, 75 μm $\times$ 48.9 cm (23.7 cm packed bed); mobile phase; acetonitrile-50 mM HEPES pH6.8 (80:20); applied voltage, 20 kV; current, 2 μA ; injection, 2 s (4kV) electrokinetic; detection, 254 nm; solutes, (1) naphthalene, (2) anthracene, (3) triphenylene, (4) benzo[a]pyrene, and (5) benzo[ghi]perylene.

最近, Tanakaらによって具体的なカラム作製方法が発表された [52, 53]. 反応物の組成は彼らがHPLCカラム用に用いたものと同じであるが, HPLCではゲル生成後にカラム材で被うため, ゲル生成後の処理方法に違いがある。ODS化は ODS-DEA [52, 53], ODS-Cl [53], オクタデシルトリクロ

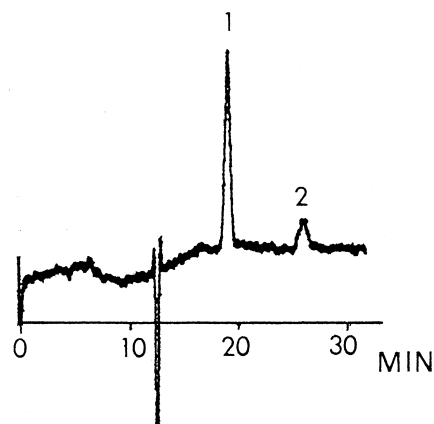


Fig. 2 Electrochromatogram of a fullerene mixture. Column; ODS-modified silica monolith, 75 μm $\times$ 47.7 cm (22.5 cm packed bed); mobile phase; tetrahydrofuran-acetonitrile (50:50) containing 5 mM tetrabutylammonium percholate; applied voltage, 15 kV; current, 6 μA ; injection, 2 s (2.5kV) electrokinetic; detection, 350 nm; solutes, (1) C_{60} , and (2) C_{70} .

ロシラン (ODS-TriCl) [53] により行われた。キャピラリーの全長が充填されたカラムを使用し, アセトニトリル/Tris (90 : 10) を移動相に用いてアルキルベンゼンに対して流速 1.3mm/s で 7 - 8 μm の段高を得た [52]. ODS-TriCl で修飾したカラムを用いてヘキシルベンゼンに対してさらに小さい段高が得られた [53].

5 おわりに

本稿ではCECカラム技術を中心に紹介した。一つのCECカラムが報告される前に, HPLCや電気泳動の分野でそれに関連した多くの研究報告がある。その数はあまりにも多くて割愛せざるを得なかった。有機ポリマー系カラムでは広い範囲のpHの移動相が使用でき, また, 電気浸透流の大きさも重合溶液中のfunctional monomerの仕込み量で制御できることが, シリカゲル系カラムにない利点である。一方, シリカゲル系カラムではこれまでHPLCで得られた保持や分離選択性に関する情報が豊富である。本稿ではカラム性能についてほとんど触れなかったが, いずれのカラムでも細孔構造はカラム性能に大きな影響を与える。また, 実際の適用に当っては, 電気浸透流の高い再現性が重要になる。HPLCとの違いを考えると, 試料の電荷について考慮することは勿論であるが, 移動相の選択はHPLCほど自由ではないことに留意すべきである。CECではこれまで高い電気浸透流を与えるアセトニトリルが主に使用されてきた。溶媒に制限があるCECにおいては, この意味でもCECのための新しい固定相の開発が必要になるだろう。

References

- 1) 波多野博行編：高分解能クロマトグラフィー，南江堂，1983.
- 2) 藤本忠蔵，神野清勝，石井大道：ぶんせき，(1987) 567.
- 3) T. Tsuda (ed.): Electric Field Applications in Chromatography, Industrial and Chemical Processes, VCH, 1995.
- 4) C.Fujimoto: Trends Anal. Chem., 18(1999)291.
- 5) M.M. Dittman, K. Wienand, F. Bek and G.P. Rozing, LC-GC, 13(1995)800.
- 6) T. Tsuda: Chromatography, 21(2000)1.
- 7) C. Fujimoto, J. Kino and H. Sawada, J. Chromatogr. A., 716(1995)107.
- 8) K.K. Unger, Chromatography Seminar, Toyohashi University of Technology, November 4, 1997.
- 9) M.T. Dulay, R.P. Kulkarni and R.N. Zare, Anal. Chem., 70(1998)5103.
- 10) Q. Tang, B. Xin and M.L. Lee, J. Chromatogr. A, 837(1999)35.
- 11) G. Chirica and V.T. Remcho, Electrophoresis, 20(1999)50.
- 12) W.D. Ross and R.T. Jefferson, J. Chromatogr.Sc., 8(1970)386.
- 13) F.D. Hileman, R.E. Sieves, G.G. Hess and W.D. Ross, Anal. Chem., 45(1973)1126.
- 14) T.R. Lynn, D.R. Rushneck and A.R. Cooper, J. Chromatogr. Sci., 12(1974)76.
- 15) L.C. Hansen and R.E. Sievers, J. Chromatogr. 99(1974)123.
- 16) S. Hjertén, Y.-M. Li, J.L. Liao, K. Nakazato, J. Mohammad and G. Pettersson, Nature, 356(1992)810.
- 17) S. Hjertén, K. Nakazato, J. Mohammad and D. Eaker, Chromatographia, 37(1993)287.
- 18) S. Hjertén, J. Mohammad and K. Nakazato, J. Chromatogr., 646(1993)121.
- 19) K. Nakazato, J. Mohammad and S. Hjertén, Chromatographia, 39(1994)655.
- 20) C. Fujimoto, Anal. Chem., 67(1995)2050.
- 21) C. Fujimoto, J. Kino and H. Sawada, J. Chromatogr. A., 716(1995)107.
- 22) C. Fujimoto, Y. Fujise and E. Matsuzawa, Anal. Chem., 68(1996)2753.
- 23) T. Koide and K. Ueno, J. High Resolut. Chromatogr., 23(2000)59.
- 24) T. Koide and K. Ueno, Anal. Sci., 14(1998)1021.
- 25) T. Koide and K. Ueno, Anal. Sci., 15(1998)791.
- 26) M. Chiari, E. Casale, E. Santaniello and P.G. Righetti, Appl. Theor. Electr., 1(1989)103.
- 27) P.G. Righetti, E. Gianazza, C. Gelfi, M. Chiari and P.K. Sinha, Anal. Chem., 61(1989)1602.
- 28) A. Palm and M.V. Novotny, Anal. Chem., 60(1997)4499.
- 29) P.G. Righetti, S. Caglio, M. Saracchi and S. Quaroni, Electrophoresis, 13(1992)587.
- 30) S. Hjertén, D. Eaker, K. Elenbring, C. Ericson, K. Kubo, J.-L. Liao, C.-M. Zeng, P.-A. Lindström, C. Lindh, A. Palm, T. Srichaiyo, L. Valtcheva and R. Zhang, Jpn. J. Electr., 39(1995)105.
- 31) C. Ericson, J.-L. Liao, K. Nakazato and S. Hjertén, J. Chromatogr. A, 767(1997)33.
- 32) J.-L. Liao, N. Chen, C. Ericson and S. Hjertén, Anal. Chem., 68(1996)3468.
- 33) C. Ericson and S. Hjertén, Anal. Chem., 71(1999)1621.
- 34) E.C.Peters, M. Petro, F. Svec and J.M.J. Fréchet, Anal. Chem., 69(1997)3646.
- 35) E.C.Peters, M. Petro, F. Svec and J.M.J. Fréchet, Anal. Chem., 70(1998)2288.
- 36) E.C.Peters, M. Petro, F. Svec and J.M.J. Fréchet, Anal. Chem., 70(1998)2296.
- 37) C. Yu, F. Svec and J.M.J. Fréchet, Electrophoresis, 21(2000)120.
- 38) E.C.Peters, K. Lewandowski, M. Petro, F. Svec and J.M.J. Fréchet, Anal. Commun., 35(1998)83.
- 39) I. Gusev, X. Huang and C. Horváth, J. Chromatogr. A., 855(1999)273.
- 40) S. Zhang, X. Huang, J. Zhang and C. Horváth, J. Chromatogr. A., in press.
- 41) B. Xiong, L. Zhang, Y. Zhang and J. Wang, J. High Resol. Chromatogr., 23(2000)67.
- 42) L. Schweitz, L.I. Andersson and S. Nilsson, J. Chromatogr. A., 817(1998)5.
- 43) J.-M. Lin, T. Nakagama, K. Uchiyama and T. Hobo, J. Pharm. Biomed. Anal., 15(1997)1351.
- 44) L. Schweitz, L.I. Andersson and S. Nilsson, Anal. Chem., 69(1997)1179.
- 45) S. Nilsson, L. Schweitz and M. Petersson, Electrophoresis, 18(1997)884.
- 46) L. Schweitz, L.I. Andersson and S. Nilsson, J. Chromatogr. A., 792(1997)401.
- 47) L. Schweitz, L.I. Andersson and S. Nilsson, Chromatographia, Suppl.I, 49(1999)S-93.
- 48) S.C. Wendelken, Ph.D. Thesis, University of Cincinnati, Cincinnati, OH, 1996.
- 49) H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, N. Ishizuka and N.

- Tanaka, Anal. Chem., 68(1996)3498.
- 50) C. Fujimoto, Analusis, 26(1998)M49.
- 51) C. Fujimoto, J. High Resol. Chromatogr., 23(2000)89.
- 52) N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, N. Soga, H. Nagayama, K. Hosoya and N. Tanaka, Anal. Chem., 72(2000)1275.
- 53) N. Tanaka, H. Nagayama, H. Kobayashi, T. Ikegami, K. Hosoya, N. Ishizuka, H. Minakuchi, K. Nakanishi, K. Cabrera and D. Lubda, J. High Resol. Chromatogr., 23(2000)111.