

Technical Review

蒸発光散乱検出器の有効的な使い方

寺田 英敏、早川 禎宏、三上 博久

How to Use Evaporative Light Scattering Detector Effectively

Hidetoshi Terada, Yoshihiro Hayakawa and Hirohisa Mikami

Analytical & Measuring Instruments Division, Shimadzu Corporation

1 Nishinokyo-Kuwabaracho, Nakagyo-ku, Kyoto 604-8511, Japan

Abstract

HPLC detectors are selected based on the specific properties of target compounds such as UV absorption, fluorescence and redox ability. However, some compounds have no such specific properties and a refractive index detector has been commonly used in those cases. In recent years, evaporative light scattering detector (ELSD) has been utilized for those compounds due to its wide range of applicability except for volatile compounds. In this paper, we review the principle, feature and know-how of ELSD and also introduce some applications by ELSD.

Keywords: HPLC, evaporative light scattering detector, ELSD

1. 緒言

HPLC では目的の分析種の光吸収性、蛍光性や酸化還元性などの特性を利用して検出を行うが、全ての物質が上記のような性質を有している訳ではない。蒸発光散乱検出器 (Evaporative Light Scattering Detector, ELSD) は、示差屈折率検出器 (Refractive Index Detector, RID) とともにユニバーサルな検出特性を有しており、原理的には不揮発性の分析種であれば分子構造などによらず検出することができる検出器であり、近年様々な分野で汎用的に使用されるようになっていく。

ここでは、ELSD をより有効的に使用するために、ELSD の検出原理および検出特性、条件設定における注意点について解説するとともに、代表的なアプリケーションを紹介する。

2. 検出原理

ELSD の歴史は古く、1966年にはカラムクロマトグラフィーの検出器として ELSD を用いて脂質を分析した例が報告されている[1]。この頃は、「Evaporative Analyzer」や「Mass Detector」という名前で表現され、1980年代中頃になって ELSD という名前が使われるようになった。基本原理は創成期から大きく変わっていないが、1970年代後半から1980年代にかけて HPLC 用 ELSD が市販されるようになり、ネブライザーの形状や光散乱に関する検出特性などにフォーカスした学術的な議論がなされるようになった[2-10]。その後、1990年代から汎用検出器として様々な分析に用いられるようになってきた[11-14]。

ELSD の検出原理は Figure 1 に示すように、大きく分けて①噴霧、②蒸発、③検出の3工程に分けることができる。

株式会社島津製作所分析計測事業部
〒604-8511 京都市中京区西ノ京桑原町1
TEL: 075-823-1083
FAX: 075-841-9326
E-mail: h-terada@shimadzu.co.jp

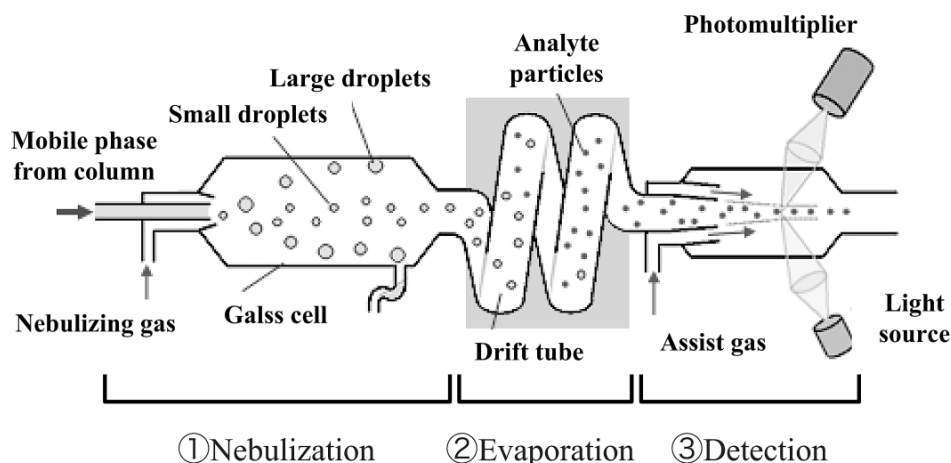


Figure 1 Detection process of ELSD.

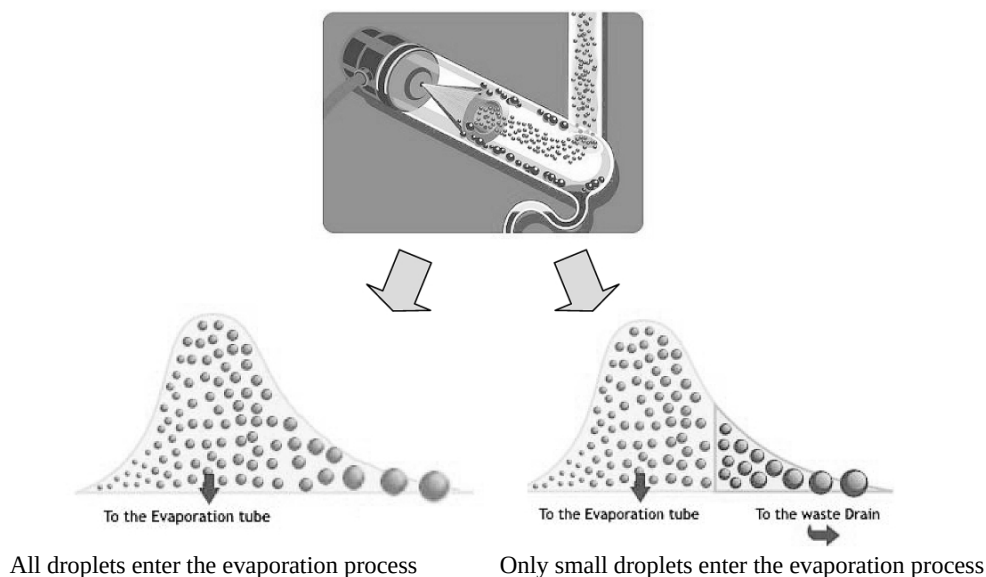


Figure 2 Nebulization Process.

① 噴霧過程

カラム溶出液を窒素ガスや空気などを用いてネブライザーで噴霧し、微小な液滴状態にして蒸発過程に導入する工程で、ネブライザーとしては一般にベンチュリータイプのものが使用される。生成される液滴径はある分布を持ち (Figure 2)、この分布は検出時の再現性や感度に影響を与え、分布が狭い方が良いとされている[8]。

生成される液滴の平均粒子径は (式 1) で表すことができ、生成される液滴径は分析種の濃度には依存せず、ネブライザーの形状や移動相の物性、移動相流量とガス流量などに依存する[2]。

$$D_{sv} = \frac{585\sqrt{\sigma_l}}{(v_g - v_l)\sqrt{\rho_l}} + 597 \left[\frac{\mu_l}{\sqrt{\sigma_l \rho_l}} \right]^{0.45} \left[\frac{Q_l}{Q_g} \right]^{1.5} \quad (\text{式 1})$$

D_{sv} : 平均粒子径、 σ_l : 表面張力、 ρ_l : 密度、 μ_l : 粘度、

v_l : 移動相流速、 v_g : ガス流速、 Q_l : 移動相流量、 Q_g : ガス流量

ネブライザーで噴霧された液滴は蒸発過程に導入されるが、生成した全ての液滴を導入する方法と、液滴径により分級を行い、大きな液滴を排除してから導入する方法の2つのタイプがある (Figure 2)。前者は、検出過程に導入される分析種の絶対量が多いためピーク強度は大きいですが、蒸発し難い大きな液滴も導入されるため、蒸発温度を高く設定する必要があり、移動相由来のノイズが発生しやすい。後者は、検出過程に導入される分析種の絶対量が少なくなるため、前者に比べてピーク強度は小さくなるが、蒸発しやすい小さな液滴のみが蒸発過程に導入されるため、蒸発温度を下げることで、移動相由来のノイズが小さく、移動相中に水が多い場合でもグラジエント溶離法が適応できる[13]。ELSD が汎

用的に使用されるようになったのは、後者が開発されたことによるところが大きい。

② 蒸発過程

噴霧過程より導入された微小液滴を含むガスの流れを温度調整（加温）しているドリフトチューブと呼ばれる配管に導入し、揮発性の移動相成分を蒸発・除去する（Figure 3）。このドリフトチューブの中を進むにつれて、揮発性の移動相は蒸発し、気体として検出器を通過する。一方、不揮発性成分（厳密には加熱温度で蒸発・昇華しない物質）は移動相が蒸発した後も粒子として残り、ドリフトチューブ出口の検出部に送られる。従って、ELSDで使用できる移動相は揮発性溶媒や揮発性の塩に限定される。

ドリフトチューブには、低い温度でも蒸発させることができる螺旋状のタイプと高い温度で蒸発させる必要があるもののドリフトチューブが短い直線状のタイプがある。ドリフトチューブの温度は、通常30～100℃程度で設定されるが、蒸発させる温度が高い場合には、物性によっては分析種自体も気化してしまう可能性があるため注意が必要である。

蒸発過程で液滴中に溶質含まれていた場合、生成される粒

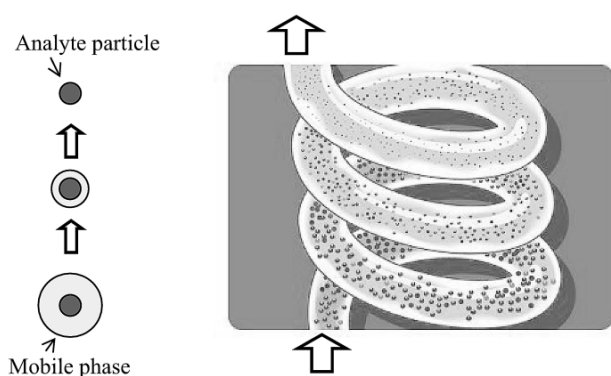


Figure 3 Evaporation process.

子の大きさは（式2）で表される[2,8]。液滴中の溶質濃度は、移動相成分が蒸発した後の粒子径に影響を与え、溶質濃度が高ければ生成する粒子径も大きくなる。粒子の大きさは、検出過程において光散乱の角度や強度に大きな影響を与える。

$$D = D_0 \times \left[\frac{C}{\rho} \right]^{1/3} \quad (\text{式 2})$$

D ：蒸発後の粒子径、

D_0 ：蒸発部に導入される微小液滴径、

C ：溶質の濃度、 ρ ：液滴の密度

* D_0 は噴霧後に大きな液滴を分級することや、途中で部分的に凝集することがあるため、ネブライザーで噴霧されて出来た液滴径（の分布）と同じではない。

③ 検出過程

蒸発過程を通過したガス流体に光を照射して、分析種（不揮発性物質）の微粒子による散乱光の強度を測定する（Figure 4）。光源はタングステンランプや発光ダイオード（LED）ランプ、最近ではレーザー光源が使用され、波長は400～900nmが選択されることが多い。検出はフォトダイオードやフォトマルチプライヤーが用いられるが、光源からの光の照射角に対して角度をずらした位置で検出を行い、散乱光のみが検出されるように工夫されている。

光散乱のパターンは、粒子径と照射される光の波長により異なることが知られており、粒子径と照射光の波長の比（ α ）の値により大きく3つの散乱に分けて説明される[2,13,15]。Figure 5に示すように、 $\alpha < 0.1$ の領域ではレイリー散乱が、 $0.1 < \alpha < 1$ の領域ではミー散乱が、 $1 < \alpha$ の領域では、反射と屈折が支配的となる。Figure 5では、一つの粒子に光を照射した際の散乱パターンを示しているが、 α の値により散乱パターンは大きく異なることが分かる。ELSD

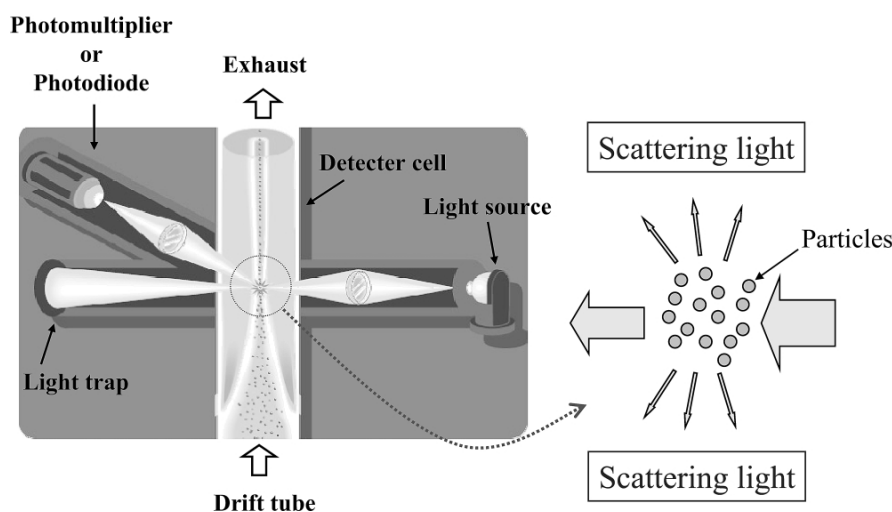


Figure 4 Detection process.

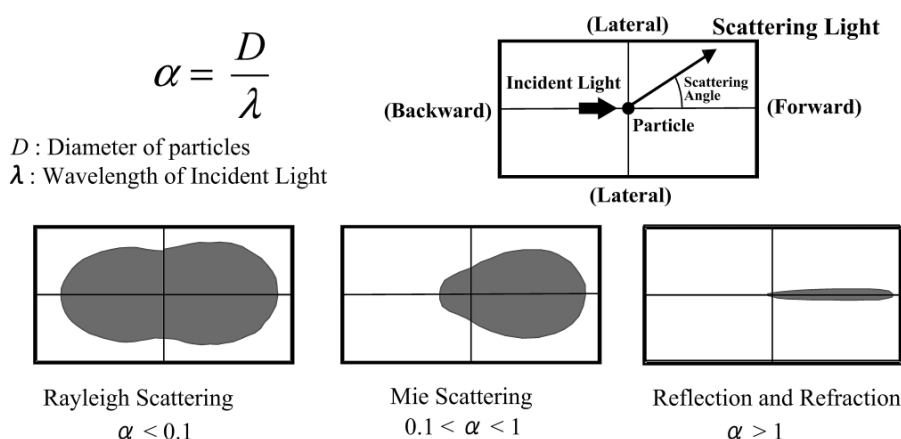


Figure 5 Relations between particle diameter and scattering light distribution pattern.

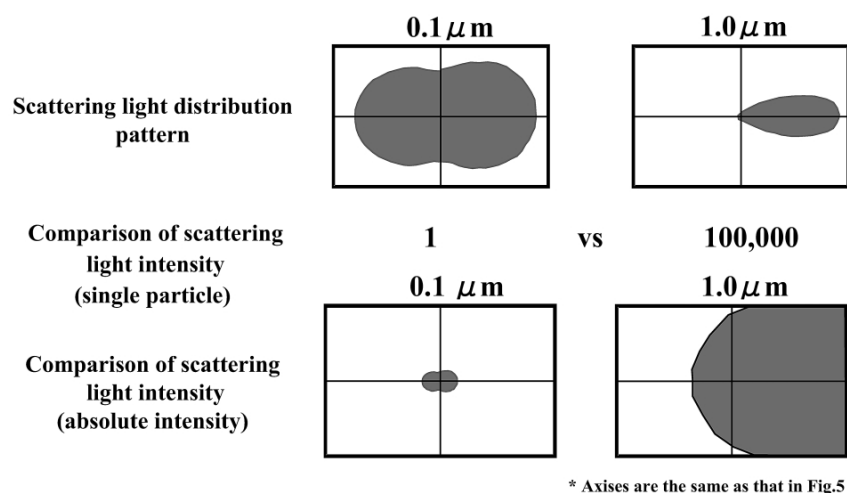


Figure 6 Relations between particle diameter and scattering light intensity.

の場合には入射光の波長は固定されているため、蒸発過程で出来た粒子の大きさが散乱パターンに大きな影響を与えることになる。

一方、散乱強度も粒子径に大きく依存する。Figure 6 に、粒子径の違いによる散乱強度を比較する[9,16]。粒子径が大きい方が指数関数的に散乱強度も大きくなる。ELSD では噴霧・蒸発過程によって大きさに分布を持った粒子群が検出部に導入されるので、粒子径とその数により散乱が重ね合わされた状態で検出されることになる。その結果、検出器レスポンスは単純な直線応答性ではなく、指数応答性を示すことになる。

3. 検出特性

蒸発過程で分析種も移動相と一緒に気体になってしまうと検出時に光散乱を生じないため、ELSD は揮発性物質や昇華性物質を検出することはできない。しかし、分析種が不揮発性であれば、吸光光度検出器のように物質の光吸収特性に依存せずに検出可能であり、同一の分析条件下（例えば、イソ

クラティック溶離法）では分析種による感度差が少なく、量比についての概算値が得られる特徴を有している。ただし、グラジエント溶離法などで移動相の組成が分析の途中で変化する場合、移動相の表面張力、密度や粘度が変わるため、(式 1) から分かるようにネブライザーで生成される液滴径とその分布も変動する。結果的に、分析の途中で検出感度変動するので注意が必要である。分析種の検出の可否については、用いる ELSD の機種によって検出の過程での粒子径や蒸発温度、検出角度などが異なるので、実際に注入して検出器レスポンスが得られるか否かを確認するのが一番確実である。

ELSD の検出特性を特徴付けるものとして、検出時には移動相は蒸発しているため、移動相条件は検出に影響せずグラジエント溶離法が適応できる点がある。この点、同じユニバーサル検出器の RID と実用上、アプリケーションの拡張性が決定的に異なり、ELSD は保持強度の異なる多成分の一斉分析に有効である (Figure 7)。

また、検出器レスポンスは検出原理で前述のように指数応

答性を示す。クロマトグラムでは、検出器レスポンスはピークレスポンスとなり、ピーク面積と分析種の注入量の関係は(式3)で表すことができる。

$$I = km^b \quad (\text{式 3})$$

I : ピーク面積 (散乱光の強度)

m : 分析種の注入量 (質量)

k, b : 粒子径やその他分析や検出条件によって決まる定数

(式3)の両辺の対数をとると(式4)となり、「検出されるピーク面積(散乱強度)の対数」と「粒子数の対数」は一次関数となることを示している(Figure 8)。

$$\log I = b \log m + \log k \quad (\text{式 4})$$

定量分析時には、便宜上得られた信号強度と注入した物質量を両対数でプロットした検量線を作成し、値付けを行うことが多い。両対数プロットで検量線を作成する場合には2点以上の検量点が必要であり、ELSDの検量線は多点検量線が基本となる。試料間の濃度差が大きく検量範囲が広がる場合には、検量点の数は多い方がよい。

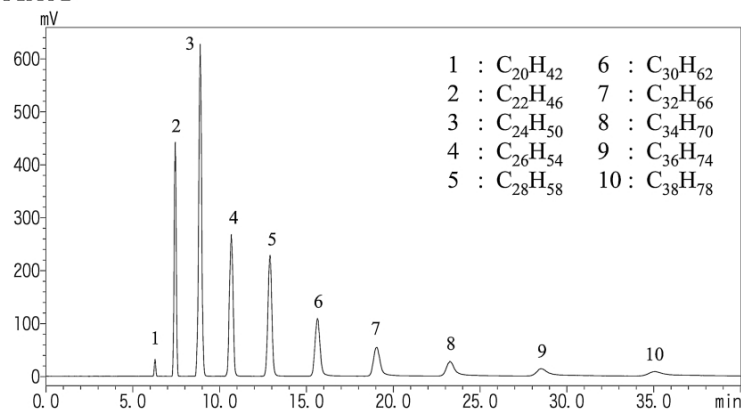
4. 条件設定における注意点

ELSDを用いる場合、移動相など条件設定に以下の注意が必要である。

① 移動相

ELSDは不揮発性成分から生じる微粒子の散乱光を検出するため、不揮発性移動相では、移動相由来の微粒子と分析種の微粒子が共に検出部へ送り込まれてしまい区別が出来なくなる。従って、移動相は蒸発過程で完全に気化する必要がある。

1) Isocratic



2) Gradient

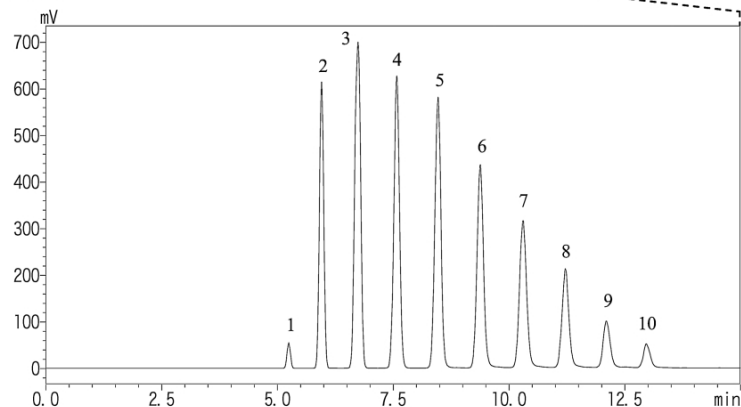


Figure 7 Comparison of isocratic and gradient elution.

Column : Shim-pack VP-ODS (250 mm×4.6 mm i.d.)
 Mobile Phase : 1) Isocratic; MeOH/Chloroform=8/2 (v/v)
 2) Gradient; A) MeOH, B) Chloroform
 B. Conc. 25% (0 min)→50% (15.0 min)→25% (15.01-25.0 min)
 Flow Rate : 1.0 mL/min
 Column Temp. : 40°C

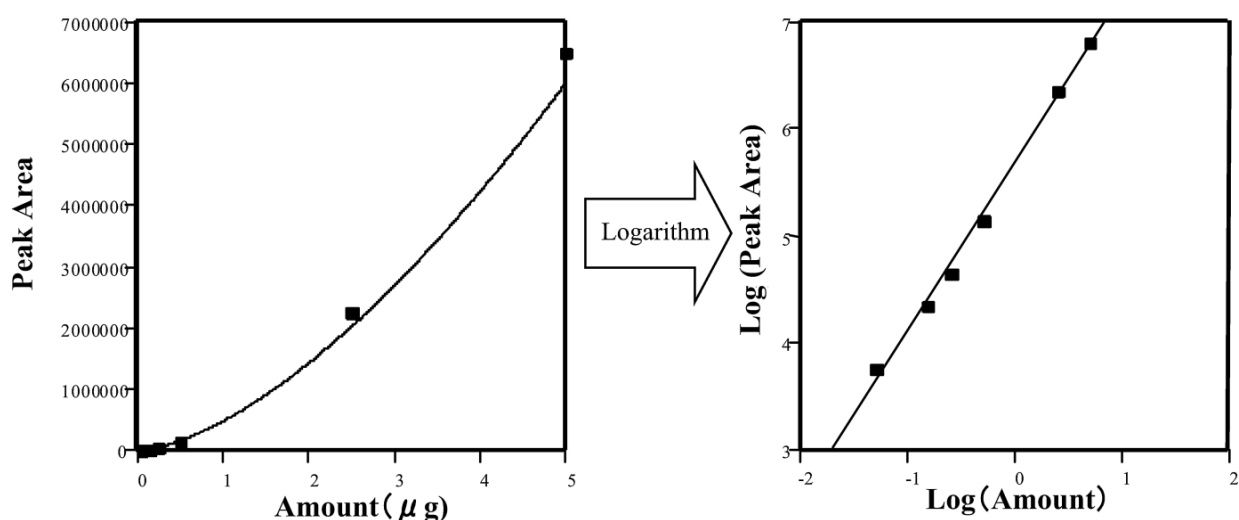


Figure 8 Calibration curve by ELSD.

一般的にELSDで使用する有機溶媒はHPLCグレード以上のものを、水は超純水製造装置などで得られる超純水を使用する。有機溶媒や水の純度が低いとベースラインノイズ増大の原因に繋がることがある。テトラヒドロフラン (THF) など一部の有機溶媒には不揮発性の安定剤が含まれている場合があり、これらの溶媒を使用する際には安定剤の含まれていないものを選択する。また、*N,N*-ジメチルホルムアミド (DMF) など沸点が高い溶媒を用いる際には、蒸発温度を高く設定する必要がある。

移動相のpHを調整したり緩衝液を用いる場合などは、一般的に下記のLC/MSで使用されるものと同様の酸、塩基、塩類、イオンペア剤を用いる。各試薬は、不純物の少ないものを選択する。

- ・酸：ギ酸、酢酸、トリフルオロ酢酸
- ・塩基：アンモニア、トリエチルアミン
- ・塩類：ギ酸アンモニウム、酢酸アンモニウム
- ・イオンペア試薬：

(塩基性物質用)

ペンタフルオロ酢酸、ペンタフルオロ酢酸、ノナフルオロ吉草酸、ペンタデカフルオロオクタン酸

(酸性物質用)

酢酸ジアミルアンモニウム、酢酸ジブチルアンモニウム、酢酸ジヘキシルアンモニウム、酢酸ジプロピルアンモニウム

② ネブライザーガス

ELSDでは、ネブライザーガスとして主に窒素ガスや空気が用いられる。一般的に高純度ガスは必要ない場合が多く、供給源としてはボンベ、窒素ガスジェネレータやエアコンプレッサーなどが用いられる。しかし、いずれの場合もネブライザーガスからの微粒子混入がスパイクノイズ発生の原因となるため、ガス用粒子除去フィルターを使用する。

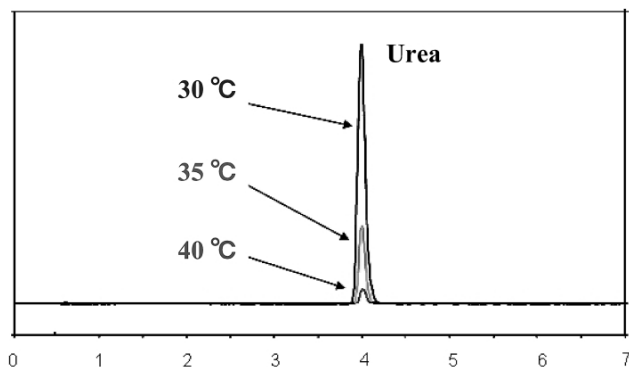


Figure 9 Effect of drift tube temperature on peak response.

Column : NH2P-50 (150 mm×4.6 mm i.d.)
Mobile Phase : Acetonitrile/0.1%TFA=85/15 (v/v)
Flow Rate : 0.8 mL/min

③ 蒸発温度 (ドリフトチューブ温度)

高温にするほど移動相の揮発が促進されるが、分析種が揮発・昇華する恐れもある。半揮発性分析種を検出する場合には、Figure 9に示すように蒸発温度により感度が大きく変化することがある。同じ移動相であっても用いる機種により移動相を完全に気化できる蒸発温度は異なるが、移動相が完全に揮発する範囲で、できるだけ低い温度に蒸発温度として設定することが望ましい。

④ カラム

新品のカラムであっても、充てん剤の汚れや合成時の反応試薬残渣などが溶出することがある。このような場合には、ノイズの増大やバックグラウンド上昇が起こってしまう。従って、ELSDで使用するカラムは、予めエージングしておくが良い。りん酸緩衝液のような不揮発性の塩を含む移動相を使用していたカラムをそのまま接続して通液すると、カラム内に残っている移動相がELSDに導入されてしまうため、

検出器レスポンスが振り切ってしまう。カラムを ELSD に接続する前に、カラム内の移動相を流しだし、使用する移動相に十分に液置換を行うか、ELSD で使用するカラムを専用化した方がよい。

5. アプリケーション

ELSD は目的の分析種が光吸収性に乏しく、一斉分析にはグラジエント溶離法が必要な脂質、脂肪酸、糖、糖アルコール、界面活性剤、テルペノイド類、天然高分子や合成高分子などの分析に用いられることが多い。吸光光度検出器などと併用することにより、これらでは検出できない分析種を補完的に検出することも行われる (Figure 10)。以下に代表的なアプリケーションを示す。

① トリグリセリド

食用油中トリグリセリドの分析例を Figure 11 に示す。トリグリセリドは短波長領域 (200nm~210nm) に光吸収性を持つため、吸光光度検出器で検出可能だが、移動相にアセトンを使用する条件では、移動相自身の光吸収により吸光光度検出はできない。食用油を構成しているトリグリセリドは、アシル基の違いにより非常に多くの種類が存在する。これら

トリグリセリドのパターン分析により、食用油の品質管理にも応用されている。

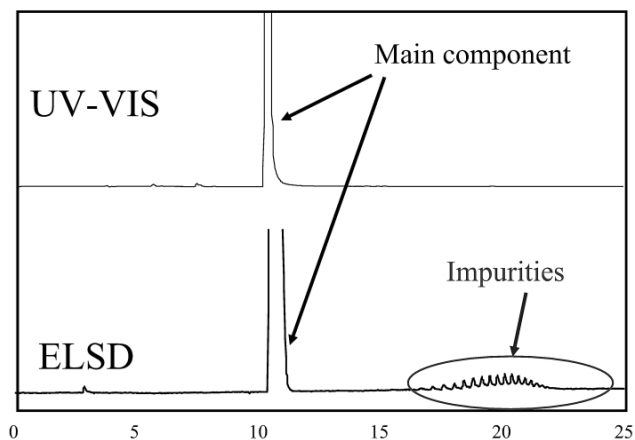


Figure 10 Comparison of UV-VIS detector and ELSD.
 Column : ODS
 Mobile Phase : A; 10 mmol/L Ammonium acetate buffer (pH 3.6), B; Acetonitrile Gradient condition
 Flow Rate : 1.0 mL/min

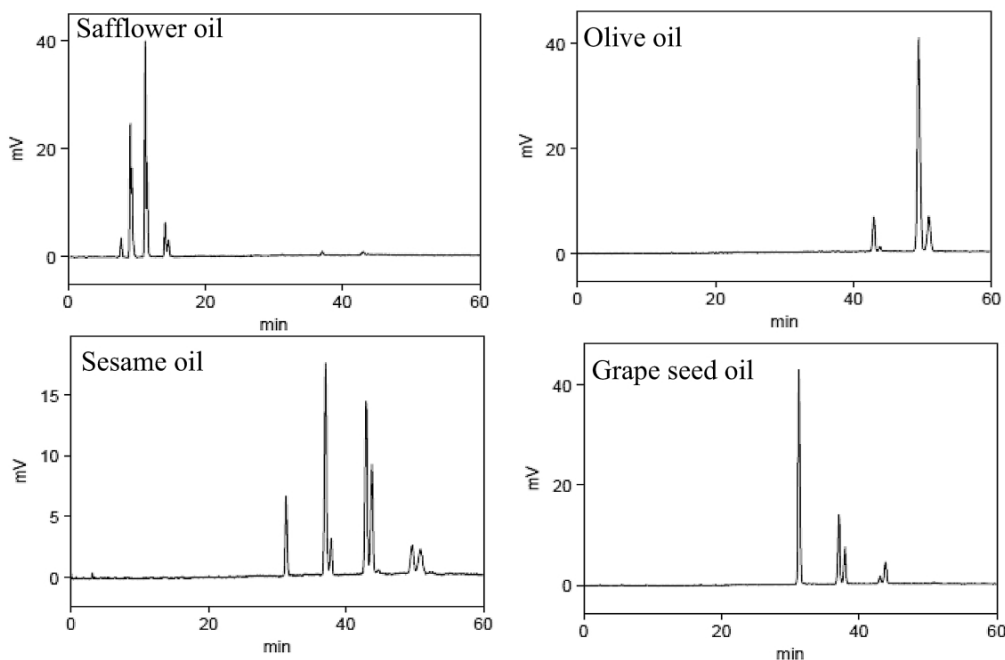
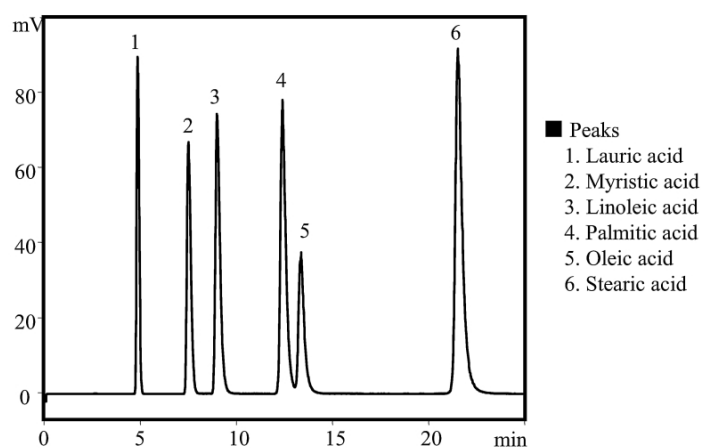
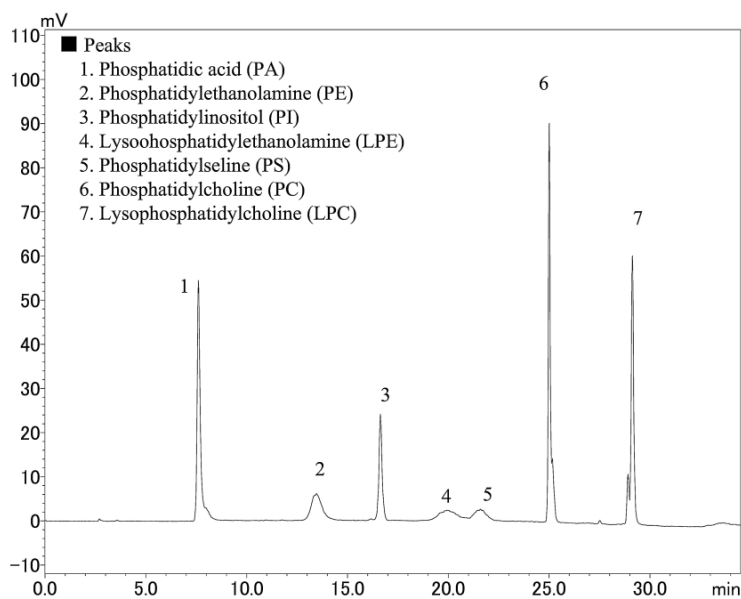


Figure 11 Chromatogram of triglycerides.

Column : Shim-pack VP-ODS (250 mm×4.6 mm i.d.)
 Mobile Phase : A; Acetonitrile, B; Acetone
 B. Conc. 50% (0 min)→70% (10-40 min)
 Flow Rate : 1.0 mL/min
 Column Temp. : 30°C
 Detection : Shimadzu ELSD-LT II
 Drift Temp. : 35°C
 Nebulizer Gas : N₂
 Gas Pressure : 350 kPa

**Figure 12** Chromatogram of fatty acids.

Column : Shim-pack VP-ODS (150 mm×4.6 mm i.d.)
 Mobile Phase : Acetonitrile/Water=85/15 (v/v)
 Flow Rate : 1.0 mL/min
 Column Temp. : 30°C
 Detection : Shimadzu ELSD-LT II
 Drift Temp. : 35°C
 Nebulizer Gas : N₂
 Gas Pressure : 350 kPa

**Figure 13** Chromatogram of phospholipids.

Column : YMC-Pack Diol-120-NP (250 mm×4.6 mm i.d.)
 Mobile Phase : A; i) Hexane, ii) Acetone/Acetic Acid/Triethylamine=1000/7.5/5 (v/v/v)
 i) /ii)=7/93 (v/v), B; Methanol/Acetic Acid/Triethylamine=1000/7.5/5(v/v/v)
 B. Conc. 0% (0 min)→15% (16.5 min)→50% (28.0 min)
 →50% (32.0 min)→0% (35.0→46.0 min)
 Flow Rate : 1.0 mL/min
 Column Temp. : 35°C
 Detection : Shimadzu ELSD-LT II
 Drift Temp. : 40°C
 Nebulizer Gas : N₂
 Gas Pressure : 350 kPa

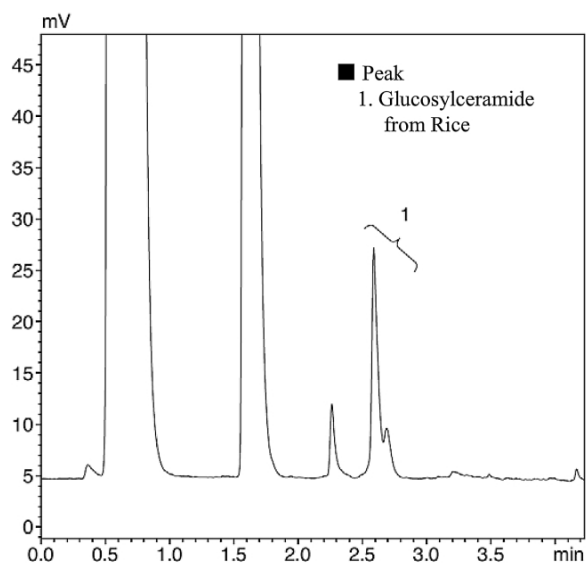


Figure 14 Chromatogram of Glucosylceramide.

Column : Shim-pack XR-SIL (75 mm×3.0 mm i.d.)
 Mobile Phase : A; Chloroform, B; Methanol/Water=95/5 (v/v)
 B. Conc. 1% (0 min)→25% (3 min)
 →90% (4 min)→1% (5 min)→1% (8 min)
 Flow Rate : 0.8 mL/min
 Column Temp. : 35°C
 Detection : Shimadzu ELSD-LT II
 Drift Temp. : 40°C
 Nebulizer Gas : N₂
 Gas Pressure : 350 kPa

② 高級脂肪酸

高級脂肪酸の分析例を Figure 12 に示す。食用油にはリノール酸、リノレン酸とオレイン酸が含まれており、原料により含有の割合は異なる。胡麻油では、リノール酸とオレイン酸が、紅花油はリノール酸が多く、菜種油ではオレイン酸の割合が高いことが知られている。

③ りん脂質

りん脂質のクラス別分析例を Figure 13 に示す。順相モードを用いることにより、りん脂質をクラス別に分離することができるが、各クラスによって保持が大きく異なるため、グラジエント溶離法が必須になる。また、逆相モードで分離を行うことにより、分子種の分離も可能である。

④ グリコシルセラミド

グリコシルセラミドの分析例を Figure 14 に示す。グリコシルセラミドは、グルコースにセラミドが結合したスフィンゴ糖脂質の一種である。ここでは、市販サプリメント中に含まれているグリコシルセラミド（米由来）を分析している。

⑤ 糖類

糖類の分析例を Figure 15 に示す。糖類はグルコースのような単糖や2～20個の単糖がグリコシド結合で重合したオリゴ糖、それ以上に重合している多糖など非常に多くの種類があり、光吸収性が乏しい物質である。単糖からオリゴ糖まで

の一斉分析を行う場合には、親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC) を用いたグラジエント溶離法が必須となる。

⑥ 糖アルコール

糖アルコールの分析例を Figure 16 に示す。糖アルコールは、糖のアルドースまたはケトースのカルボニル基の還元によって得られる多価アルコールであり、糖類同様に光吸収性に乏しい物質である。ここでも、HILIC によるグラジエント溶離法を用いて、多成分の一斉分析を行っている。

⑦ ポリエチレングリコール

界面活性剤であるポリエチレングリコールの分析例を Figure 17 に示す。ポリエチレングリコールも光吸収性に乏しく、ELSD が有力な検出手段となる。特に、重合度別に分離する場合にはグラジエント溶離法が必須であり、RID ではこのような分析は不可能である。

⑧ テルペノイド

テルペノイド類の分析例を Figure 18 に示す。イチヨウ葉に含まれるビロバリドとギンコリドを分析した例で、生薬の有効成分には光吸収性に乏しい成分も多く、生薬の品質保証などに ELSD を用いたフィンガープリント分析などに応用されている。

⑨ ジメチルポリシロキサン

ジメチルポリシロキサンの分析例を Figure 19 に示す。ジメチルポリシロキサンは、ジメチルシロキサン基が重合した疎水性の高い合成高分子で、重合度により使用される目的も変わる。ここでは、シャンプー中のジメチルポリシロキサンを分析している。

6. まとめ

以上、ELSD の検出原理、検出特性および条件設定の注意点について解説し、ELSD を用いた代表的なアプリケーションを紹介した。ELSD は分析種が不揮発性（非昇華性）であればどんなものでも検出でき、光吸収性に乏しい成分に対する汎用検出器として広く用いられる。また、RID と異なりグラジエント溶離法が適応可能であり、保持強度の異なる多成分の一斉分析に有効な検出器である。ただし、使用できる移動相に制限があり、検出器レスポンスも他の検出器と異なることも多く、ELSD の基礎的な知識をしっかりとつとともに、自分が使用する装置の構造や機構なども十分理解しておくことが大切である。本稿が ELSD への理解を深め、有効的に使う上で少しでもお役に立てば幸いである。

文献

- [1] Ford, D. L.; Kennard, W. J. *Oil Colour Chem. Assoc.* **1966**, 49, 299-313.
- [2] Charlesworth, J. M. *Anal. Chem.* **1978**, 50, 1414-1420.
- [3] Macrae, R.; Dick, J. J. *Chromatogr.* **1981**, 210, 138-145.
- [4] Macrae, R.; Trugo, L. C.; Dick, J. *Chromatographia* **1982**,

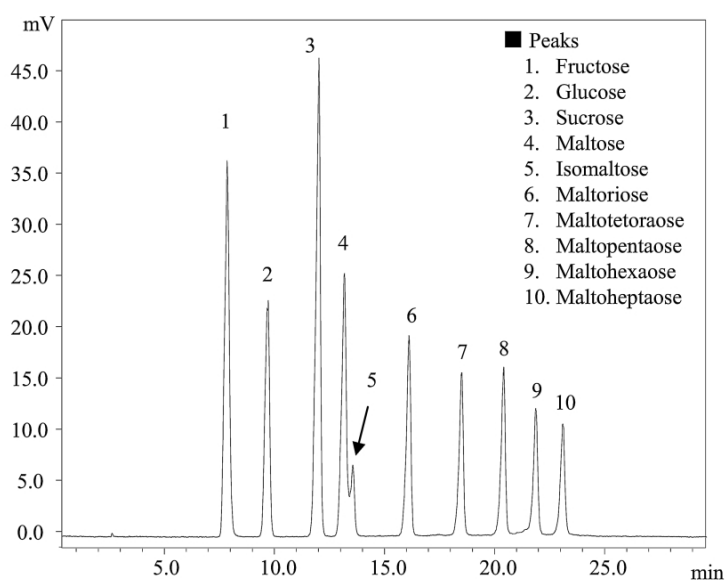


Figure 15 Chromatogram of mono-oligosaccharides.

Column : Asahipak NH2P-50 (250 mm L.×4.6 mm i.d)
 Mobile Phase : A; Water, B; Acetonitrile
 B. Conc. 80% (0 min)→40% (30 min)
 Flow Rate : 1.0 mL/min
 Column Temp. : 40°C
 Detection : Shimadzu ELSD-LT II
 Drift Temp. : 40°C
 Nebulizer Gas : N₂
 Gas Pressure : 350 kPa

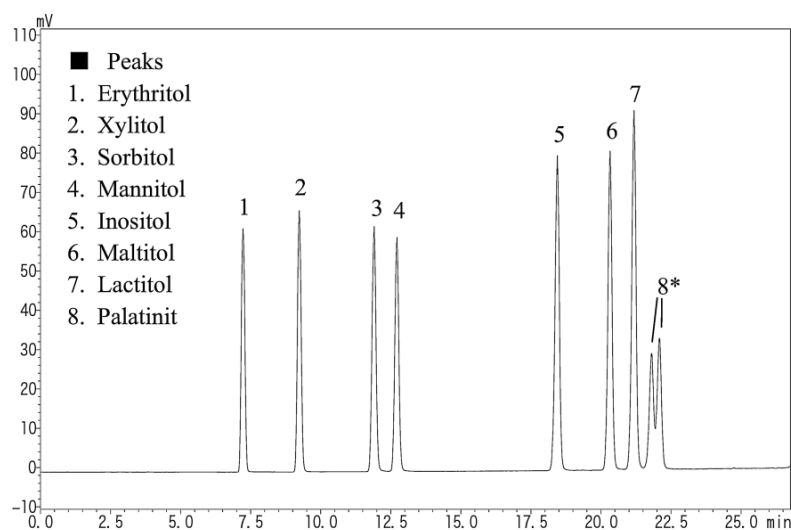


Figure 16 Chromatogram of sugar alcohols.

Column : Unison UK-Amino (250 mm×4.6 mm i.d)
 Mobile Phase : A; Water, B; Acetonitrile
 B. Conc. 90% (0 min)→75%(25 min)→40% (25.01-30 min)
 →90%(30.01-40 min)
 Flow Rate : 1.0 mL/min
 Column Temp. : 40°C
 Detection : Shimadzu ELSD-LT II
 Drift Temp. : 40°C
 Nebulizer Gas : N₂
 Gas Pressure : 350 kPa

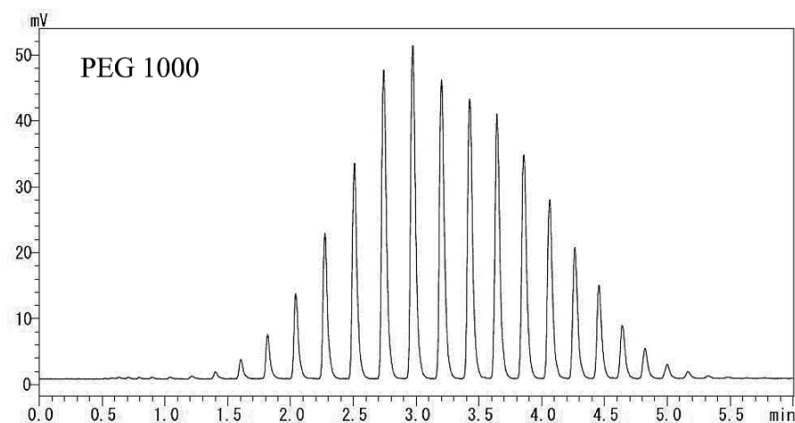


Figure 17 Chromatogram of polyethyleneglycol 1000.

Column : Shim-pack XR-ODS (75 mm×3.0 mm i.d.)
 Mobile Phase : A ; Water, B ; Acetonitrile
 B. Conc. 20% (0 min)→30% (5.00 min)→20% (5.0-70.0 min)
 Flow Rate : 1.0 mL/min
 Column Temp. : 40°C
 Detection : Shimadzu ELSD-LT II
 Drift Temp. : 40°C
 Nebulizer Gas : N₂
 Gas Pressure : 350 kPa

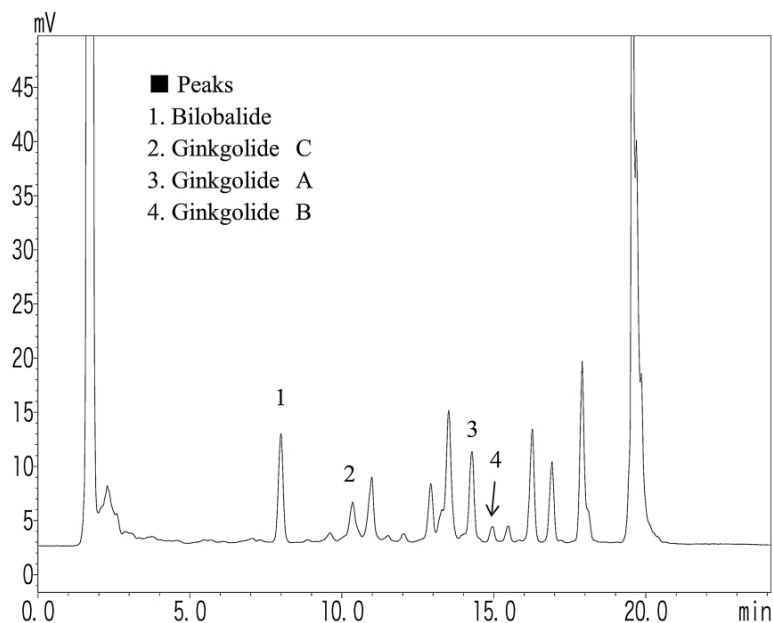


Figure 18 Chromatogram of terpenoids.

Column : Shim-pack FC-ODS (150 mm×4.6 mm i.d.)
 Mobile Phase : A ; Water, B ; Methanol
 B. Conc. 20% (0 min)→45% (16 min)→80% (16.01-20 min)
 →20% (20.01-30 min)
 Flow Rate : 1.0 mL/min
 Column Temp. : 50°C
 Detection : Shimadzu ELSD-LT
 Drift Temp. : 35°C
 Nebulizer Gas : N₂
 Gas Pressure : 350 kPa

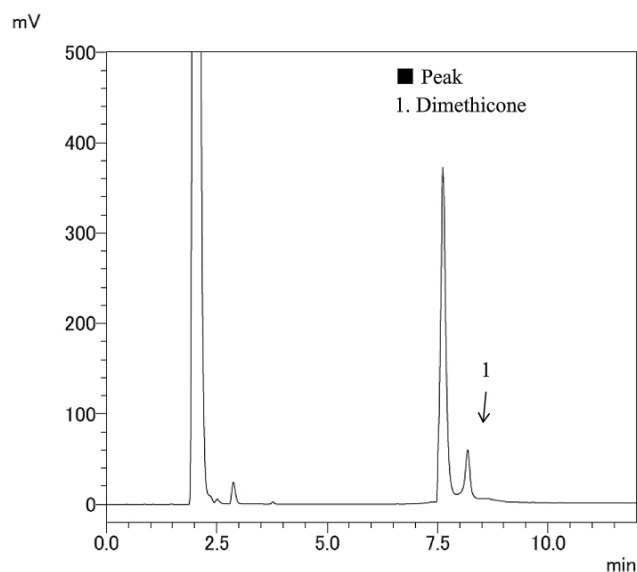


Figure 19 Chromatogram of Dimethylpolysiloxane.

Column : Presto FF-C18 (150 mm×4.6 mm i.d.)
 Mobile Phase : A; 0.5% Formic acid/Acetonitrile=1/1 (v/v),
 B; Tetrahydrofuran
 B. Conc. 30% (0-4 min)→100% (5-9 min)
 →30% (9.01-15 min)
 Flow Rate : 0.5 mL/min
 Column Temp. : 40°C
 Detection : Shimadzu ELSD-LT II
 Drift Temp. : 40°C
 Nebulizer Gas : N₂
 Gas Pressure : 350 kPa

- 15, 476-478.
- [5] Stolyhwo, A.; Colin, H.; Guiochon, G. *J. Chromatogr.* **1983**, 265, 1-18.
- [6] Mourey, T. H.; Oppenheimer, L. E. *Anal. Chem.* **1984**, 56, 2427-2434.
- [7] Stolyhwo, A.; Colin, H.; Martin, M.; Guiochon, G. *J. Chromatogr.* **1984**, 288, 253-275.
- [8] Oppenheimer, L. E.; Mourey, T. H. *J. Chromatogr.* **1985**, 323, 297-304.
- [9] Righezza, M.; Guiochon, G. *J. Liq. Chromatogr.* **1988**, 11, 1967-2004.
- [10] Guiochon, G.; Moysan, A.; Holley, C. *J. Liq. Chromatogr.* **1988**, 11, 2547-2570.
- [11] Young, C. S.; Dolan, J. W. *LCGC North Am.* **2003**, 21, 120-128.
- [12] Webster, G. K.; Jensen, J. S.; Diaz, A. *Lipid Chromatogr. Anal.* **2004**, 42, 484-490.
- [13] Megoulas, N. C.; Koupparis, M. A. A. *Crit. Rev. Anal. Chem.* **2005**, 35, 301-316.
- [14] Lucena, R.; Cardenas, S.; Valcarcel, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, 388, 1663-1672.
- [15] Kinoshita, T.; Maruyama, M. *Shimadzu Review* **2003**, 60, 49-56.
- [16] Zarrin, F.; Bornhop, D. J.; Dovichi, N. J. *Anal. Chem.* **1987**, 59, 854-860.