

Technical Review

ポリマーコート型カラム充填剤

神田 武利

Polymer-Coated Packing Materials

Taketoshi Kanda

Frontier Science Business Division, SHISEIDO CO., LTD.

2-2-1, Hayabuchi, Tsuzuki-ku, Yokohama-shi. 224-8558

Abstract

Silicone polymer-coated packing materials were developed by coating silica with a silicone polymer, and modifying it with vinyl compounds in the presence of hexachloroplatinic acid. This silicone polymer coating, which indicates that the homogeneous silicone polymer film of 7 Å in thickness was formed and that it was formed even inside the small micropore. This silicone polymer-coated silicas showed both a high resolution of chemically bonded silicas and an alkaline resistance of organic porous polymer. Polymer-coated C18 packings optimized in the balance of polymer coating and introduction of C18 groups showed a high symmetrical peak shape for amitriptyline, a strong basic compound, under neutral conditions obtained in different organic modifiers, methanol and acetonitrile. The silicone polymer-coated packing materials showed a good reproducibility in the comparison with conventional chemically bonded silicas of different surface activity.

Keyword: Silicone polymer-coated packing materials, Homogeneous silicone polymer, High resolution, Alkaline resistance, High symmetrical peak shape

1. 緒言

現在、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は、分離分析の欠かせない手法となり、種々の分野で広範囲に使用される分析法となったが、HPLC が急速に発展したのは、カラム充填剤及び装置に関する技術の進歩に起因するところが大きい。カラム充填剤は、化学結合型充填剤の導入によって多様化し、その粒子径は、5 µm から 3 µm へ、さらには 2 µm 近傍 (Sub 2 µm) まで微粒子化し、高分解能及び高速化を達成するに至った。

カラム充填剤の基材はシリカ系とポリマー系の 2 種類に大別されるが、ポリマー系充填剤は高い耐酸性及び耐アルカリ

性を有している反面、分離能や耐圧性が劣る欠点を有している。一方、シリカ系充填剤 (いわゆる化学結合型充填剤) は高い分離能及び耐圧性を有し、逆相モードに使用されるカラム充填剤の大部分を占めるが、シリカはアルカリ性で溶解するため、酸性～中性領域の移動相でしか使用できないといった欠点を有していた。

化学結合型充填剤は原料であるシリカをアルキル化して得られるが[1]、アルキル化試薬がすべてのシラノール基と反応するわけではなく、一部未反応のシラノール基 (残存シラノール基) が残る。この残存シラノール基は、塩基性物質等と吸着を起こすため、その後二次的な処理 (エンドキャッ

(株)資生堂 フロンティアサイエンス事業部
〒224-8558 横浜市都筑区早渕 2-2-1
Tel: 045-590-6058
Fax: 045-590-6090
E-mail: taketoshi.kanda@to.shiseido.co.jp

プ)を行う必要がある。このエンドキャップにより塩基性物質の吸着を防ぎ、テーリングを改善することは可能であるが、長時間の使用によりエンドキャップが損なわれ、シラノール基の影響が出現することがある。

そこでわれわれは、シリカの表面をシリコンポリマーで被覆した後アルキル基等を直接結合させることにより、シリカ系充填剤とポリマー系充填剤の両方の長所を有し、また残存シラノール基の影響の少ないポリマーコート型カラム充填剤を開発した[2]~[4]。

本特集は、開発したポリマーコート型カラム充填剤について、その合成法から性能評価まで、体系的に技術内容をまとめることが目的である。

2. ポリマーコート型カラム充填剤の合成

(1) シリカのポリマーコーティング

シリカ表面に1, 3, 5, 7-тетраметилсиклореттосилоксан (H4, MW=240) を、化学蒸着により均一なシリコンポリマーを形成させる[5]。このシリコンポリマーの被膜は、細孔分布の測定結果からシリカの細孔に沿って均一の薄膜を形成し、またそのシリコンポリマーの被膜はシリカ表面のシラノール基と一部結合していることが固体²⁹Si-NMRの測定結果から示唆された[2]。このようにして得られたポリマーコート型シリカは、基材のシリカ表面が疎水性のシリコンポリマーで被覆されているために、シラノール基の影響を受けにくく、さらにアルカリ性領域においても使用可能である。またこのシリカ表面を被覆しているシリコンポリマーは極めて薄いため、シリカ系充填剤の高い分離能を維持しており、シリカ系充填剤とポリマー系充填剤の両方の長所を合わせ持つ充填剤になっている。

(2) 各種官能基の導入

ポリマーコート型シリカ表面には、反応部位としてSi-H基が存在する。このSi-H基に白金触媒下で二重結合を有する各種官能基を反応させることにより、目的とする種々の官能基を有するポリマーコート型カラム充填剤を合成することができる。

① ポリマーコート型アルキル充填剤

反応試薬として1-オクタデセン、1-オクテン及びスチレン等を反応させることにより、それぞれポリマーコート型C18、C8、及びPh充填剤を得ることができる。1-オクタデセンを反応させて得られたポリマーコート型C18充填剤の耐アルカリ性は、pH=9の移動相下での連続運転において550時間、またpH=10の移動相下での連続運転において300時間の連続運転が可能であり、シリカをシリコンポリマーで被覆することにより向上することが明らかになった[6]。

② ポリマーコート型アミノ充填剤

糖、核酸塩基及びアミノ酸のようなC18充填剤で保持することが困難な高極性物質を保持させるには、順相モード(あるいはHILICモード[7])が有効な場合が多い。ポリマー

コート型アミノ充填剤は、ポリマーコート型C18充填剤と同様に、シリコンポリマー上のSi-H基にスパーサーとしてアリルグリシジルエーテルを反応させた後、ペンタエチレンヘキサミンを反応させてアミノ基を導入した充填剤である。この充填剤はさらに導入したアミノ基を安定化するために、ホルムアルデヒドを反応させている[8]。

③ ポリマーコート型強カチオン交換充填剤

一般に薬物の多くはアミノ基を有しており、このカチオン性物質を有効に保持分離させるためには強カチオン交換充填剤が使用されることが多い。ポリマーコート型強カチオン交換充填剤は、ポリマーコート型アミノ充填剤と同様に、シリコンポリマー上のSi-H基にスパーサーとしてアリルグリシジルエーテルを反応させた後、スルファニル酸を反応させ、スルホン基を導入した充填剤である[9]。ポリマーコート型強カチオン交換充填剤も、シリコンポリマーを被覆したシリカを基材として用いているため耐久性が向上する。

この他、除タンパクや抽出といった前処理を行わずに生体試料(血清、血しょう等)を直接注入し、血中の薬物を測定することができるポリマーコート型ミックスドファンクショナル(MF)充填剤がある[10][11]。

3. カラムの性能評価

ここでは、各種ポリマーコート型カラム充填剤の中で、C18基を導入したポリマーコート型C18充填剤の性能評価について詳細に述べる。

(1) 基本特性

まず、基材のシリカがクロマトグラムに与える影響について検討した。当初、シリカ中の金属不純物による影響についての報告は多くなかったが、われわれはキレート生成能を有する化合物が充填剤に吸着し、ピークのテーリングや回収率の低下といった現象を起こすことを見出し[3]、シリカ中の金属不純物(Fe, Zn, Mg, Ti, Al, Na)を極力排除し(5 ppm以下)、ポリマーコート型C18充填剤を合成した(SG, UGタイプ)。

また、これらのポリマーコート型C18充填剤は、シリカを疎水性のシリコンポリマーで被覆しているため、他の充填剤と比較して極性物質の分離に有効である表面極性のパラメータ(後述する)が相対的に小さくなるという特長を有していた。そこで、比表面積の異なるシリカ基材を用いることにより、シリコンポリマーのコーティング量をコントロールし、また1-オクタデセンの反応量を変化させ、表面極性のパラメータが大きくなるようにポリマーコート型C18充填剤(MGタイプ)を開発した[12]。

ポリマーコート型カラム充填剤は、耐アルカリ性のほかに残存シラノール基の影響がほとんどないという利点を有している。これはシリカをシリコンポリマーで被覆することにより、測定物質とシリカ表面のシラノール基の相互作用を小さくすることができるためである。残存シラノール基の影響

を測定する手法としては、pKaが9.4であるアミトリプチリンを指標物質とし、中性条件下で残存シラノール基による影響を測定する手法[13]が主となっている。中性条件下で残存シラノール基を解離させ、あわせてアミトリプチリンが強塩基性物質であることを利用し、イオニックな吸着を評価する方法である。われわれはこの評価法を用いて、従来のポリマーコート型C18充填剤に比較して、残存シラノール基による影響を、シリコーンポリマーによるコーティングをさらに密にすることにより最小限に抑制した充填剤(MG IIタイプ)を開発した[14]。さらに質量分析(MS)インターフェイス技術の発展とともに、MS側において最適な充填剤を検討する必要性が生じてきた。MSの感度を減少あるいは増幅させるイオンサブプレッションの少ない充填剤、すなわちカラムブリーディングの少ない充填剤の開発が求められた。われわれは、MGタイプの充填剤の製造時に発生する副産物及び試薬由来の不純物を効果的な洗浄により除去し、カラムブリーディングの少ないポリマーコート型C18充填剤(MG IIIタイプ)を開発した[15]。

このほか、ポリマーコート型C18充填剤として、シリカ表面に3官能性試薬を使用してC18基を導入した後、ポリマーコーティングを行うことにより耐酸性を向上させた充填剤(ACRタイプ)[16]、シリカ表面にC18基を導入する際、この導入量を制御しポリマーコーティングを行うことにより、

水100%の移動相下における使用を可能にした充填剤(AQタイプ)[17]、シリカ粒子径が小さく(1.8 μm)高速分析に対応した充填剤(IFタイプ)[18]などがある。

(2) カラム性能評価法と分離特性

Table 1に、メタノール/水=50/50 (v/v)の移動相を用い、10種類の標準物質の保持時間を用いて算出した分離係数 α から得られた各種ポリマーコート型C18充填剤の分離パラメータ[19]を示す。

ポリマーコート型C18充填剤の各タイプ(AG、SG、UG及びMGタイプ)において、大きく異なるのは疎水性と表面極性のバランスである。AG、SG及びUGタイプは、疎水性パラメータに対して相対的に表面極性パラメータが小さく、10種類の標準物質から得られるクロマトグラムにおいて、ベンゼンと安息香酸メチルが分離して溶出する(Figure 1)。一方MGタイプでは疎水性パラメータに対して相対的に表面極性パラメータが大きいため安息香酸メチルの保持が大きくなり、ベンゼンと安息香酸メチルの保持時間の差が小さくなる傾向にある。これらの分離特性の差は、有機酸を測定試料とした場合に顕著に現れる。Figure 2にUGタイプとMGタイプから得られたクロマトグラムを示した。MGタイプはUGタイプに比較して表面極性パラメータが大きいため、有機酸の分離が良好であった。ポリマーコート型C18充填剤(AQタイプ)は、水系100%に移動相下で使用可能な

Table 1. Definition of chromatographic parameters

| | | |
|-----------------------------------|-----------------|---|
| Hydrophobicity | α (T/B) | = k (toluene) / k (benzene) |
| Surface polarity | α (MB/T) | = k (methyl benzoate) / k (toluene) |
| Ion-exchangeability | α (EP/B) | = k (2-ethylpyridine) / k (benzene) |
| Hydrogen bonding capacity | α (C/P) | = k (caffeine) / k (phenol) |
| Effect of residual surface metals | A (PAA/N) | = Peak area (phenylacetylacetone) / peak area (naphthalene) |
| Steric selectivity | α (T/O) | = k (triphenylene) / k (o-terphenyl) |

Characterization of various polymer-coated C18 packing materials

| Column | RT (N) | α (T/B) | α (CA/Ph) | α (MB/T) | α (EP/B) | A (PAA/N) ^a | α (TP/OT) |
|---------------------------|--------|----------------|------------------|-----------------|-----------------|------------------------|------------------|
| CAPCELL PAK C18 AG120 | 29 | 2.09 | 0.33 | 0.38 | 0.40 | 0.37 | 1.30 |
| CAPCELL PAK C18 SG120 | 29 | 2.06 | 0.35 | 0.40 | 0.38 | 0.59 | 1.33 |
| CAPCELL PAK C18 UG120 | 29 | 2.09 | 0.31 | 0.39 | 0.31 | 0.64 | 1.27 |
| CAPCELL PAK C18 UG80 | 38 | 2.15 | 0.30 | 0.36 | 0.29 | 0.65 | 1.34 |
| CAPCELL PAK C18 MG(MG II) | 36 | 2.09 | 0.33 | 0.43 | 0.65 | 0.65 | 1.32 |
| CAPCELL PAK C18 ACR | 36 | 2.10 | 0.26 | 0.38 | 0.30 | 0.50 | 1.64 |
| CAPCELL PAK C18 AQ | 30 | 2.01 | 0.35 | 0.50 | 0.71 | * | 1.35 |

* Peak not observed

Chromatographic parameters were measured by the following conditions:

column size, 150 mm x 4.6 mm I.D.; mobile phase, methanol-water (50:50); flow-rate, 1.0 mL/min; detection, 254 nm; column oven temperature, 40 °C.

^aSteric selectivity tests were performed under the following conditions:

column size, 150 mm x 4.6 mm I.D.; mobile phase, methanol-water (80:20); flow-rate, 1.0 mL/min; detection, 254 nm; column oven temperature, 35 °C.

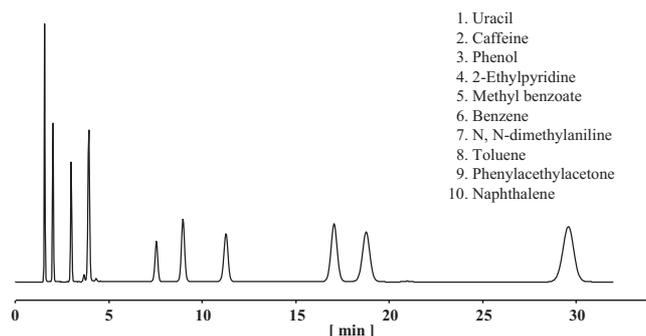


Figure 1. Chromatogram of test mixture obtained with CAPCELL PAK C18 UG120.

Column size, 150 mm x 4.6 mm I.D.; mobile phase, methanol–water (50:50); flow–rate, 1.0 mL/min; detection, 254 nm; column oven temperature, 40 °C. Sample; uracil, caffeine, phenol, 2–ethylpyridine, methyl benzoate, benzene, N, N–dimethylaniline, toluene, phenylacetylacetone, naphthalene (in this order in chromatogram).

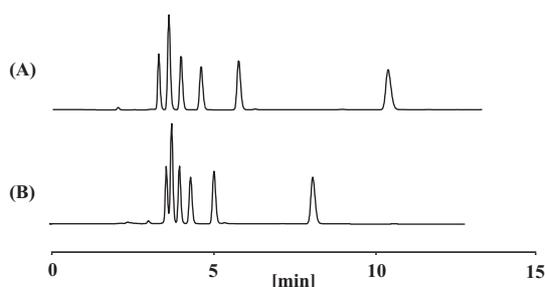


Figure 2. Chromatograms of polar substances obtained with two polymer–coated C18 phases.

(A) CAPCELL PAK C18 MG; (B) CAPCELL PAK UG120. Column size, 250 mm x 4.6 mm I.D.; mobile phase, 0.1 % phosphoric acid in acetonitrile–water (2.5:97.5); flow rate, 1.0 mL/min; column oven temperature, 40 °C; detection, UV 210 nm. Sample; malonic acid, lactic acid, acetic acid, citric acid, succinic acid, and propionic acid (from left to right).

充填剤である。Table 1における分離パラメータの中で疎水性のパラメータは最も小さく、表面極性のパラメータは最も大きい値を示している。

MGタイプと同一のパラメータを有するMG IIタイプは、残存シラノール基による影響を最小限に抑制した充填剤である。Figure 3に中性条件下においてポリマーコート型C18充填剤(MG IIタイプ)を用い、指標物質のアミトリプチリンを測定し得られたクロマトグラムを示した。非対称性ファクター(As)の値は1.03と良好な値を示し、残存シラノール基の量が非常に少ないことが示唆された[20]。一般的に中性条件下におけるアミトリプチリンの測定は、移動相の有機溶媒にメタノールを使用することが多いが、アセトニトリルを使用したほうが残存シラノール基の量をより厳密に評価することができる。MG IIタイプは、移動相の有機溶媒にメタノール及びアセトニトリルを使用しても共にアミトリプチリ

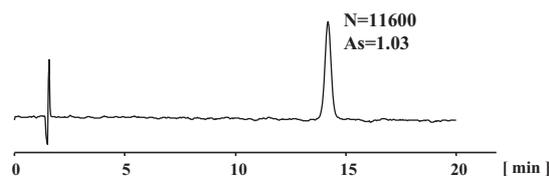


Figure 3. Chromatograms of amitriptyline obtained with CAPCELL PAK C18 MG II.

Column size, 150 mm x 4.6 mm I.D.; mobile phase, 20 mmol/L phosphate buffer (pH 6.9)–methanol (25:75); flow rate, 1.0 mL/min, column oven temperature, 40 °C; detection, UV 254 nm.

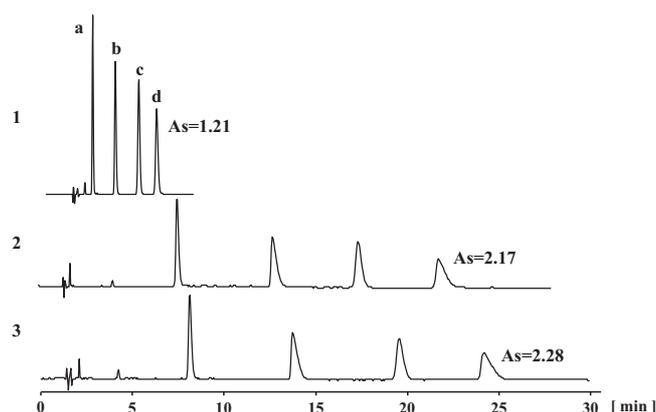


Figure 4. Peak profiles of basic compounds promethazine (peak a), amitriptyline (peak b), chlorpromazine (peak c) and clo-mipramine (peak d).

Column size, 150 mm x 4.6 mm I.D.; mobile phase, 0.1 % formic acid, acetonitrile–water (70:30); flow rate, 1.0 mL/min; column oven temperature, 40 °C; detection, UV 254 nm. Column: 1 = CAPCELL PAK C18 MG III, 2 and 3 = conventional ODS columns.

ンのAsは良好な値を示すが、一般的なODS系充填剤はメタノールでは良好なAsを示すものの、アセトニトリルではアミトリプチリンのピークはテーリングする傾向にある。これは、メタノールが残存シラノール基のマスキング剤として作用し、中性条件下で解離したアミトリプチリンとの相互作用を抑制しているためと考えられる[21]。このようにポリマーコート型C18充填剤(MG IIタイプ)は、他のタイプに比較して保持が大きく極性物質の分離に優れ、また中性条件下においても塩基性物質のピーク形状にも優れた充填剤であると考えられた。

最近のLC-MSの発展にともない、カラムブリーディングの少ない充填剤が求められるようになってきた。カラムブリーディングがあるとイオンサプレッションによりMSの感度が低下するためである。ポリマーコート型C18充填剤(MG IIIタイプ)は、他のタイプに比較してブリーディングの少ない充填剤である。またMG IIIタイプは、移動相にギ酸を添加した酸性条件下での強塩基性物質において良好なピーク形状を示す。Figure 4にMG IIIタイプと、一般的なODS系充填剤を用い、ギ酸系酸性条件下で測定し、得られたクロマ

トグラムを示した。ODS系充填剤ではピークはテーリングしていたが、MGⅢタイプで得られた各塩基性物質のピーク形状は良好であった。これは、前述した洗浄効果によるものと考えられた。このようにポリマーコート型C18充填剤(MGⅢタイプ)は、LC-MSで汎用される移動相条件下で大きなパフォーマンスを示す。

ポリマーコート型C18充填剤(AQタイプ)は、水100%に移動相下で使用可能な充填剤である。Table 1における分離パラメータの中で疎水性のパラメータは最も小さく、表面極性のパラメータは最も大きい値を示している。一般にこのタイプの充填剤はC18基の導入量を制限し表面極性のパラメータを大きくしているため、その反面耐久性に影響が現れる。Figure 5に市販されている他社の水100%移動相が使用可能な充填剤と、耐酸性及び耐アルカリ性について比較し得られた結果を示した。AQタイプは、ポリマーコート型であるため、耐アルカリ性も良好であるが、他社充填剤と比較して耐酸性が非常に高い。

ポリマーコート型C18充填剤(ACRタイプ)は、pH = 1の強酸性移動相の使用可能な充填剤である。酸性領域における充填剤の劣化は、結合しているC18基が切断され保持時間が減少したり、またピーク形状に変化(ピーク割れやテーリング)が現れることで判断できる。そこで、著者らは正確な耐酸性評価法として、グラジエント法を用い移動相のアセトニトリル濃度を98%まで高め、カラム内で切断されたC18基がカラムから溶出される評価法を新たに設定し、耐久性を評価した。その結果、ACRタイプは保持及びピーク形状にほとんど変動が認められず非常に安定であり、一般的なODS系充填剤と比較しても、pH = 1における耐久性は最も高かった(Figure 6)。

ポリマーコート型C18充填剤(IFタイプ)は、平均粒子径が1.8 μmで高分離能・高速分析用充填剤である。Figure 7にナフタレンを試料とし、市販されているSub 2 μmの粒

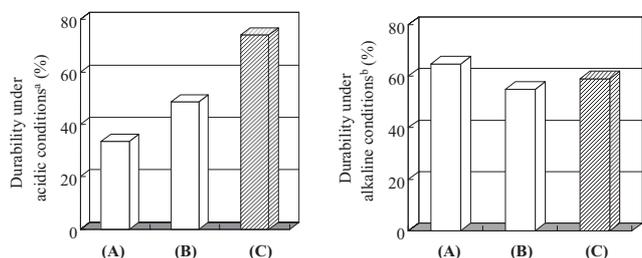


Figure 5. Durability under acidic and alkaline mobile phases of high-polarity C18 columns.

Column size, 150 mm x 4.6 mm I.D.; Column: (A) and (B) = conventional ODS columns, (C) = CAPCELL PAK C18 AQ.

^aMobile phase, 3.5 mmol/L Na₂B₄O₇ (pH 10) in methanol-water (10:90); column oven temperature, 50 °C; detection, UV 254 nm.

^bMobile phase, methanol-water-formic acid (10:89:1); column oven temperature, 60 °C; detection, UV 254 nm. Sample: benzyl alcohol in methanol. Percent of k value at 20 h over the initial one.

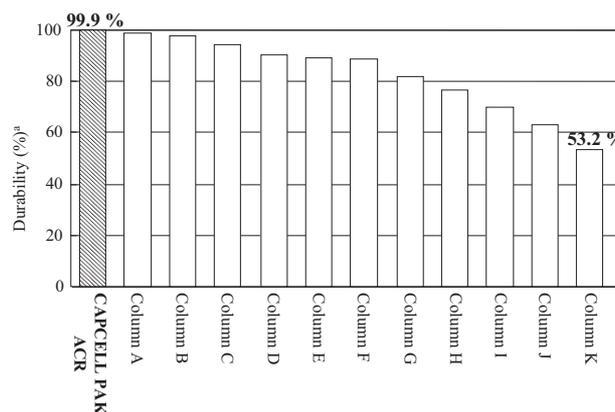


Figure 6. Durability of conventional C18 columns under an acidic condition.

^aPercent of k value at the 15 th run over the initial one.

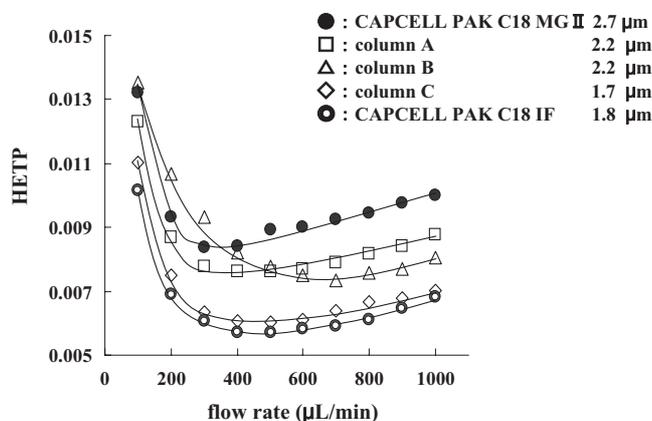


Figure 7. van Deemter curves of C18 phases based on spherical particles.

Column size, 50 mm x 2.0 mm I.D.; mobile phase, acetonitrile-water (60:40); detection, 254 nm; column oven temperature, 40 °C. Sample: naphthalene.

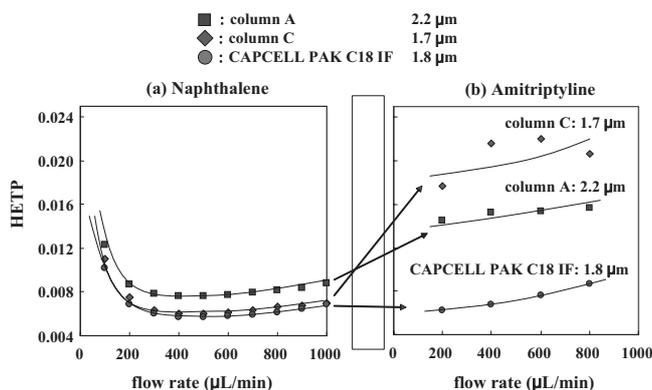


Figure 8. Comparison of HETP between naphthalene and amitriptyline.

Column size, 50 mm x 2.0 mm I.D.; mobile phase, (a) acetonitrile-water (60:40);

(b) 0.1 % formic acid, acetonitrile-water (50:50); detection, 254 nm; column oven temperature, 40 °C.

子径をもつ充填剤と IF タイプの van Deemter 曲線を示した。通常理論段高は粒子径の小さいほうが小さくなるが、粒子径 1.7 μm と 1.8 μm が逆転している。また粒子径 2.7 μm においても 2.2 μm より値が小さくなっている領域があり、これらはこのような Sub 2 μm の充填の困難さに由来するものと考えている。次に指標物質をナフタレンからアミトリプチリンに換え、LC-MS で汎用される移動相 (0.1%ギ酸系) で測定したところ、IF タイプに比較して市販の 1.8 μm 及び 2.2 μm 充填剤はその値に大きな違いが認められた (Figure 8)。この大きな差は、中性化合物では評価できなかった充填剤そのものもつ化学的性質に由来していると考えられ、逆相モードにおいて生じる二次効果 (シラノール基によるイオンの相互作用、あるいは金属配位作用等) によりピークがテーリングし理論段高の値が大きくなっていると考えられる。

4. おわりに

シリコンポリマーでシリカを被覆するという考え方は、著者らのコア技術である粉体処理技術から派生したものである。このコーティングによりシリカ表面に由来する影響を最小限に抑制可能であり、また薄膜であるためにシリカ自身の長所を失うことなく基材としての性能を維持できたと考えている。ポリマーコート型カラム充填剤は従来のシリカ系化学結合型カラム充填剤では困難であった耐アルカリ性の向上と残存シラノール基の二次効果を排除した画期的な充填剤と思われる。

最近の充填剤開発は、基材であるシリカ自身のハイブリット化や、シリカの表面構造の解析をともなった表面修飾が可能になるなど従来とは異なるアプローチにより、耐アルカリ性の向上と残存シラノール基の二次効果の排除が可能になってきた。

今後はさらなる高感度化・高速化及び LC-MS 技術の発展に対応した充填剤の開発が行われていくものと感じている。

文献

- [1] Kirkland, J.J. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1060, 9–21.
- [2] Ohtsu, Y.; Fukui, H.; Kanda, T.; Nakamura, K.; Nakano, M.; Nakata, O.; Fujiyama, Y. *Chromatographia* **1987**, 24, 380–384.
- [3] Ohtsu, Y.; Shiojima, Y.; Okumura, T.; Koyama, J.; Nakamura, K.; Nakata, O. *J. Chromatogr.* **1989**, 481, 147–157.
- [4] Shiota, O.; Ohtsu, Y.; Nakata, O. *J. Chromatogr. Sci.* **1990**, 28, 553–558.
- [5] Fukui, H.; Ogawa, T.; Nakano, O.; Yamaguchi, M.; Kanda, Y.; “Controlled interphases in composite materials”; Elsevier: New York, **1990**, p. 469.
- [6] 神田武利; 小山純一; 中村 淳; 大津 裕; 太田忠男, *日本化学会誌*, **1989**, 4, 702–705.
- [7] Alpert, A.J. *J. Chromatogr.* **1990**, 499, 177–196.
- [8] Kutsuna, H.; Ohtsu, Y.; Yamaguchi, M. *J. Chromatogr.* **1993**, 635, 187–193.
- [9] Ohkubo, A.; Kanda, T.; Ohtsu, Y.; Yamaguchi, M. *J. Chromatogr. A* **1997**, 779, 113–122.
- [10] Kanda, T.; Kutsuna, H.; Ohtsu, Y.; Yamaguchi, M. *J. Chromatogr. A* **1994**, 672, 51–57.
- [11] Kanda, T.; Kutsuna, H.; Ohtsu, Y.; Yamaguchi, M. *J. Chromatogr. A* **1996**, 722, 115–121.
- [12] Kobayashi, A.; Kanda, T.; Ohtsu, Y.; Shiota, O. *Am., Lab.* **2002**, 58–62.
- [13] Neue, U.D.; Serowik, Ed.; Bonnie, P.; Alden, B.A.; Walter, T.H. *J. Chromatogr. A*, **1999**, 849, 87–100.
- [14] Kanda, T.; Takezawa, K.; Kobayashi, A.; Xin, X.; Kutsuna, H. *LC-GC*, **2004**, p. 56.
- [15] Haseyama, K.; Hiroe, Y.; Igarashi, Y.; *LC-GC*, **2008**, p. 62.
- [16] 神田武利, 小林 淳, 竹澤和子, 大津 裕, 第7回 LC テクノプラザ講演要旨集, **2002**, p. 20.
- [17] 株資生堂 日本特許公開広報, **2002. 8. 30**, 2004–093360.
- [18] 廣江宜久, 江幡美穂, 神田武利, 石田雅美, 第13回 LC テクノプラザ講演要旨集, **2008**, p. 82.
- [19] Kobayashi, S.; Tanaka, I.; Shiota, O.; Kanda, T.; Ohtsu, Y. *J. Chromatogr. A*, **1998**, 828, 75–81.
- [20] 神田武利, 竹澤和子, 小林 淳, 香名 裕, 第15回クロマトグラフィー科学会議, **2004**.
- [21] Nawrocki, J.; *J. Chromatogr. A*, **1997**, 779, 29–71.