

高分子被覆シリカの機能設計と高選択性の発現

熊本大学 伊原 博隆
Kumamoto Univ., Hirota IYARA
ihara@kumamoto-u.ac.jp

1. はじめに

分離技術は欠かすことのできない現代科学技術のひとつであり、水や空気の浄化、石油やガスの精製、医薬や農薬の精製、血液の浄化、医療診断、そして環境分析など、われわれの生活は各種の分離技術によって支えられている。将来の重要な生産技術とされるコンビナトリアルケミストリやバイオテクノロジーにおいても、高度な分離技術の導入があって初めてわれわれの生活に新規物質が送りだされているし、もしそうでなければたいへん不気味な事態に陥る。

ところで、この分離技術に高分子は大きく貢献してきた。低分子では実現しにくい化学的・物理的な安定性が確保できるとともに、成形・加工性における自由度の高さが好ましく受け入れられているためである。天然高分子であるセルロースを基体とする濾紙を用いた「濾過」は分離のもっとも初歩的な手法であり、泥で濁った水を濾紙でこすと、ある程度水は透明度を取り戻す。すなわち、この「濾過」を「膜を通じた精製技術」としてとらえると、高分子は膜という形態を獲得することによって分離に大きく貢献していることがわかる。おそらく、目的とする物質を希釈することなく大量に精製する技術としては、膜分離法が今後もさらに発展し、社会に貢献していくであろう。膜分離についての進展については後の機会に譲るとして、本稿ではカラムを利用する分離について概説する。このカラム法は一般に分離対象物が希釈される点において不利な要素をかかえているが、分離剤の機能の設計や開発が容易で、空のカラムにこの分離剤を充填するだけで高性能な分離ユニットができること、結果として圧倒的な理論段数の高さが達成されるために精密な分離が実現できる点においてたいへん魅力のある分離技術と言える。本稿では、カラム法の優位性を支える充填剤の進歩、とくに分離能に優れ、汎用性の高い化学修飾シリカを用いる高速液体クロマトグラフィ（HPLC）用充填剤について概説するとともに、この分野における高分子の新しい展開について紹介する。

2. 充填剤の機能設計

2.1 基体の選択

HPLCは、迅速かつ高精度に分離・分析が可能な分離技術であり、この発展には、分離の高速化や装置の低価格化、コンパクト化、検出器の多用化などが大きく貢献している。これに比べて、分離の原点である充填剤（分離剤）についてはそれほど劇的な進化を感じない。後述するように、現実にはさまざまな分離剤が開発されているが、今のところそれらが市場に出回る確率はかなり小さい。その理由の一つとして、もっとも広範に使用されているシリカゲル系に限って言うと、オクタデシル化シリカゲル（ODS）に代表される疎水化シリカゲルというかなりオールマイティな充填剤の存在がある。多少の欠点は使用条件の最適化（ソフトウェアの充実）や充填剤のわずかな改善（ケミカルモディフィケーション）によって補われている。とくに、品質管理や臨床検査等を日常としている分野では、上記に代わる新しい充填剤への変更にはかなり抵抗感があるようだ。とは言っても、医薬や農薬の光学分割が当たり前の時代になっており、より精密な分離を余儀なくされる今後には、既存の分離剤だけでは対応しきれないのは明白である。

カラム法においては、分離に関与しないいわゆる無駄体積が大きくなると、保持係数が小さくなるだけでなく、ピークのブロードニングが起こり、結果として分離度が低下する。無駄体積を小さくするための一般的な解決策は、形状が均質で径の小さな微粒子を用いて充填効率を向上させる方法である。ODSにおいては、分析レベルでは直径 $5 \pm 1 \mu\text{m}$ の球状粒子が一般的であり、それより径が大きく、また径の分布の広いものでは分離能が格段に低下する。最近では、平均粒径が $2 \mu\text{m}$ や $1 \mu\text{m}$ 程度のもの^{1,2)}まで登場するようになった。ただし、分析ではなく分取を目的とする場合には、流速やコスト面を重視して直径数 $10 \sim 25 \mu\text{m}$ 程度のものが利用されている。一方、充填効率の向上は流速の増大に伴う圧力増大を引き起こす。シリカゲルのように無機系の硬質粒子ではこの問題に対応できるが、多糖類ゲルのように軟質で膨潤性の高いゲルの場合にはきわめて深刻な問題となる。水系サイズ排除クロマトグラフィ（SEC）で広範に使用されているデキストランやアガロースゲルはきわめて耐圧性が低く、直径 $45 \sim 105 \mu\text{m}$ のものでさえHPLCに対応しない。そのため、水系SECの分野では、高流速に耐えられ

る充填剤の開発が重要な課題となっている。

しかしながら、基体が硬質で均質な粒子でありさえすれば良いというわけではない。基体としてもっとも広く利用されているシリカゲルにいて言及すれば、物理的な安定性に優れ、粒径や細孔径、比表面積の制御が可能なため理想的な基体としての地位を確保しているように思うが、それなりの欠点も有している。第一の欠点は、シリカゲル自体がシラノール基による弱い酸性を示すイオン交換体である点にある。HPLCでは一般にこのシラノール基の反応性を利用して化学修飾する（官能基を導入する）ことによって様々な分離機能を付与させるが、この残存するシラノール基が好ましくぬ静電吸着作用を示すために、分離機構を複雑にするからである。また、酸やアルカリによって加水分解されやすいという欠点もある。ODSの場合、使用上の保証範囲はpH 3～8とされているのが一般的である。このような限定は、ペプチド類のように様々な等電点を有する物質の分離に致命的な使用上の制限を与える。この欠点を補うために、高分子で化学修飾する方法³⁾やシリカゲルの代りにチタンなどを担体として用いた例⁴⁾がある。さらに高性能な分離を目指す場合には、シリカゲル中の金属不純物の存在も問題視されている。二次的な予測不可能な保持の温床となるからである。⁵⁾

一方、多糖類ゲルに代表されるように、高分子を基体とする充填剤は耐圧性において不利であることを先に強調したが、上述のシリカゲルにおける欠点を排除した材料を選択できる点においては優位性が認められる。多糖類ゲルは、生体関連物質の水系SECの分野では大きなシェアを獲得しているし、有機溶媒系ではポリスチレン-ジビニルベンゼン粒子が一般的であり、後者の場合、橋かけ度を調節することによりかなり硬質なゲルの作製も可能である。合成高分子を利用するもう一つの利点は、モノマーの選択段階で機能を予測することができる点にある。官能基選択のバリエーションも広い。ただし、充填効率や耐流速特性を向上させるための均質粒子化については、モノマーの種類が変わるたびに対応していかなければならないし、分離効率を左右する重要な因子である空孔特性を制御するとなれば、さらに基礎的な検討の積み重ねが必要となる。最近では、二段階重合法やシード重合法によって種々のモノマーに適用可能な有望な手段が開発されてきたが、^{6,7)} それでも粒子化法および多孔質化法が確立されているスチレン-ジビニルベンゼン重合体が高分子担体として利用される頻度が高くなり、このことが高分子系分離剤のバリエーションの低下につながっている。

分離剤の開発において基体の選択はきわめて重要な因子であるが、分離剤に特殊な分子認識能を求めることを優先するならば、多少の欠点には目をつぶり、化学修飾が容易なシリカゲルがもっとも便利な基体であると言ってよいだろう。さらに言えば、基体に特殊な機能を組み込むという観点にこだわれば、種々のモノマーから選択できる高分子系に圧倒的に期待感もてるし、とくに、立体規則性や二次構造を利用する分離は高分子のもっとも得意とするところであるので、シリカゲル（無機相）と高分子（有機相）の組合せに多大な期待を寄せることができる。そこで本稿では、基体としてはとくにシリカゲルに限定し、選択性を生み出す有機相の設計について述べることにする。

2.2 分離モードと有機相の分子設計について

図1は、HPLCを分離モードによって分類し、その相関性を図示したものである。分子のサイズを識別するサイズ排除クロマトグラフィを除けば、残りのほとんどが分離剤と分離対象物との間の相互作用を利用したものである。したがって、基体としてのシリカゲルに相互作用可能な有機相を固定化すれば、HPLC用の分離剤ということになる。実際、もっとも広く利用されている分離剤ODSは、シリカゲルにオクタデシル基を有機相として導入したきわめて単純なものであり、分離対象分子の疎水性（あるいは極性）を識別することができる。このような分離モードは逆相分配型と呼ばれている。分子の多くは、化学構造がわずかに異なるだけでも疎水性（極性）が異なるので、理論段数の高いODSカラムを用いれば、現存するかなりの化学物質の分離を達成することができる。しかしながら、光学異性体や幾何異性体に代表されるように、疎水性（極性）がまったく同一あるいはきわめて類似した異性体も多く、これらの分離がODSで対応できないことは明白であり、より精密な分子認識を可能とする分離剤の開発が望まれている。新たな有機相を固定化したシリカゲルが必要とされる所以がここにある。

() 特殊な低分子有機相について

基体には充填効率と耐圧性だけの役目を与えるとすれば、導入可能な特殊な官能基は無数に現存する。すなわち、基体としてのシリカゲルを限定すれば、あとは官能基の選択と固定化方法の確立だけで新規なHPLC用充填剤を作製することができる。図2にはHPLC用充填剤中に固定化された特殊な官能基についての一例を抜粋している。官能基の電子性および剛直平面性を積極的に利用する試みとして、コロネン固定化シリカゲル(OS-1)が知られている。⁸⁾ 相互作用は、極性の高い有機溶媒中においてさえフラレンの分離を可能にしている。⁹⁾ ポルフィリンを固定化したシリカゲル(OS-2)も同様にフラレンの分離を可能とする。この場合、中心金属の種類を変えることにより、電子系物質に対する特異性の変化が確認できる。¹⁰⁾ また、アミノ酸に対する特異性も報告され

ている。¹¹⁾ 一方,官能基として分子の非平面性あるいはかさ高さを積極的に利用した例もある。2,4,6-(トリ-tert-ブチルフェノキシ)ジメチル基を固定化シリカゲル(OS-3)は,非平面性の分子をより保持する。¹²⁾

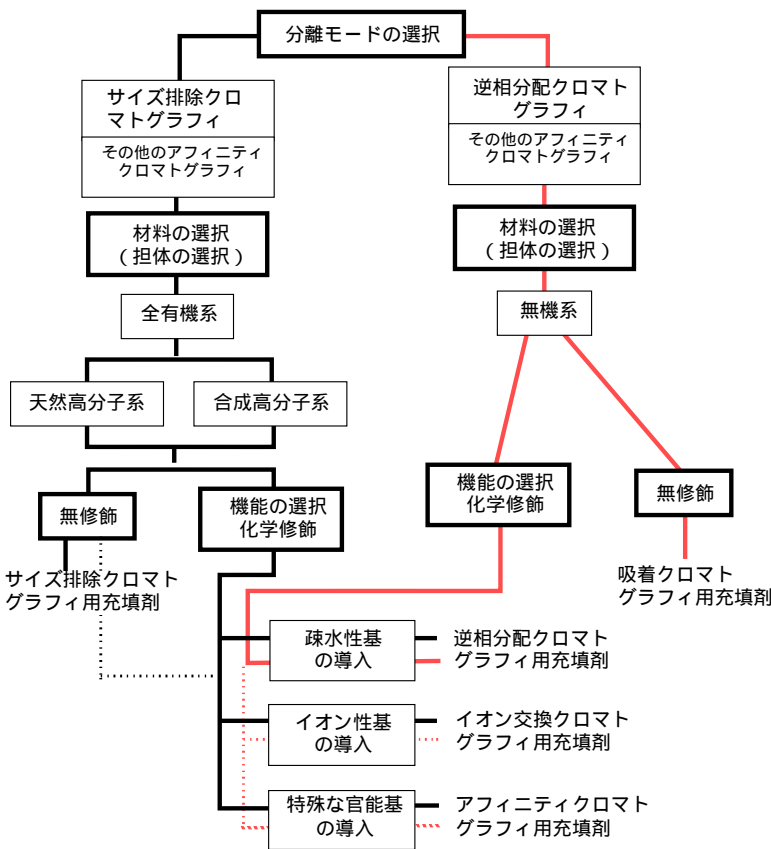
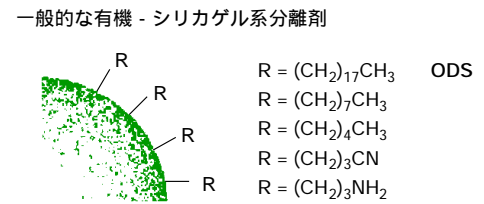


図1 液体クロマトグラフィにおける分離モード



特殊な有機-シリカゲル系分離剤

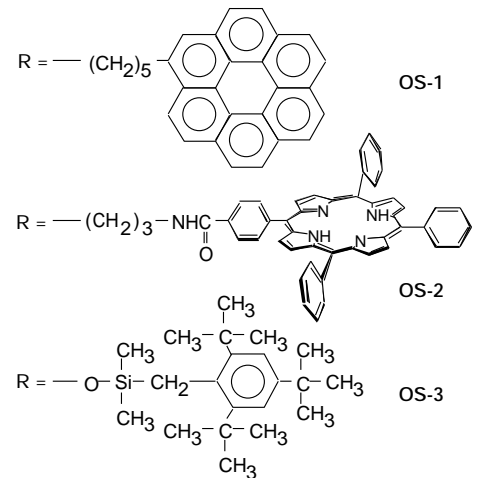


図2 特殊な低分子有機相の一例

() 高分子を有機相とする分離剤

先にODSの欠点として加水分解により有機相が脱離し,使用pH範囲が限られることを述べたが,これを補う方法として,オクタデシル基をポリメリックにシリカゲルに結合する方法が報告されている。実際に耐久性が格段に向上している。しかしながらこの手法においてより興味深い結果が見いだされている。これはしばしば分子スリットと呼ばれる効果であり,シリカゲル上に整然と並んだオクタデシル基が分子の形状をある程度識別することが確認されたからである。¹³⁾ このように分子間あるいは連鎖間での相互作用により二次的な効果が発現する例は高分子によく見られる現象であり,ある意味においては予測外の興味深い結果が得られる。

分子配向の典型的な例は有機分子による液晶状態である。図3におけるOS-4は,液晶を形成する代表的な分子である。これをシリカゲルに固定化し,液晶特有の特性を有する分離剤の開発を試みた例がある。^{14,15)} しかしながらこの試みは必ずしも成功していない。液晶という現象は,分子配向だけでなく流動性がある初めて形成される状態であるので,シリカゲルに共有結合によって固定化された状態では,シリカゲル上で液晶状態が形成されているとするのは甚だ疑問であり,おそらくそうではないと予測する。そこで,液晶性の分子を予め重合によって安定化させ,これをシリカゲルに担持した例も認められるが,液晶性の特徴が十分に発揮されたとは言いきない。^{14,15)} 分子設計あるいは固定化方法に改善の余地があると考えられる。

分子配向をより効果的に利用し,特殊な分子認識能を発現させた例が以下に示すクシ型高分子をシリカゲルに固定化する手法である。この手法の根底には,生体膜の構成成分である脂質二分子膜の機能をシリカゲル上に導入しこれによって生体膜類似の高い選択性を発現させようとする試みがある。¹⁶⁾ 同様な目的として,生体膜の構成成分であるホスファチジルコリンを誘導体化して直接シリカゲルに直接固定化した例¹⁷⁾も認められるが,この報告では水溶性ペプチド類の分離が達成されているものの,固定化された脂質は脂質膜の基本特性である分子配向と側方拡散性(流動性)が失われているので,脂質膜本来の特異性は発現していない。

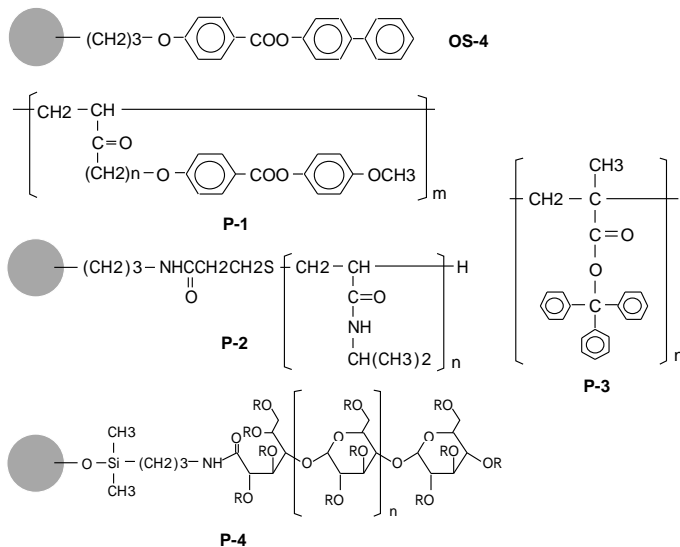


図3 高分子有機相の一例

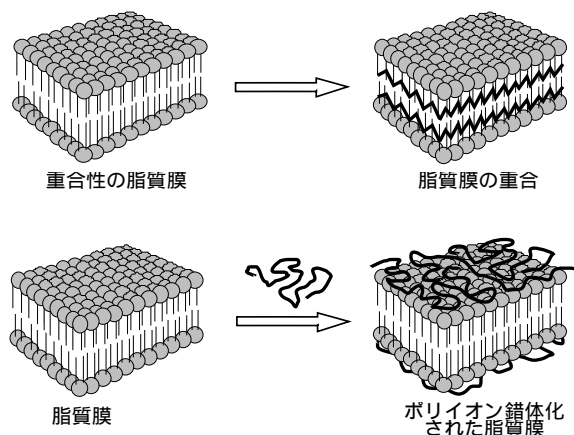


図4 脂質膜を安定化する方法の一例

脂質二分子膜は脂質が分子集合したものであるので、何らかの方法で担持したとしても、脂質分子の溶出を防ぐことはできない。脂質膜の安定化を簡便に行う方法として重合性の脂質を利用する方法¹⁸⁻²⁰⁾があるが、同法においては脂質の流動性と分子配向を両立させることは難しい。この矛盾を解決するために、主鎖の片末端にシリル基を有し、脂質膜同様の分子配向(側鎖配向)と相転移挙動(流動性の維持と変化)を有するクシ型ポリマー、ODA_n^{18,21-23)}(図5)が提案されている。片末端をシリカゲルに固定化(図6)することによって基体の影響がかなり低減している。図6にはポリマーの固定化前後における示差走査熱量分析の結果を示している。相転移は結晶相から等方相への転移が存在することを示唆しており、このことによって、少なくとも相転移温度以下の温度ではクシ型ポリマーがシリカゲル上で分子配向していると予想された。

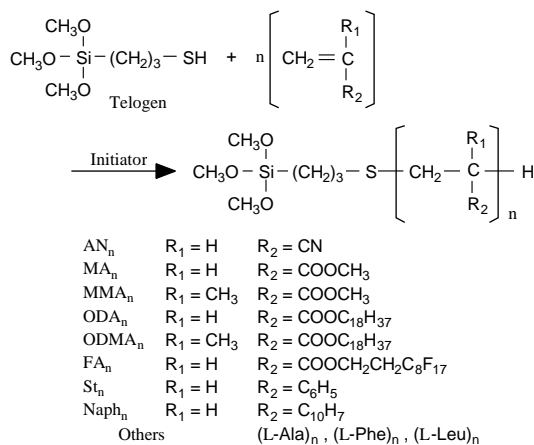


図5 クシ型ポリマーとしてのODA_n とODMA_n およびその関連物質

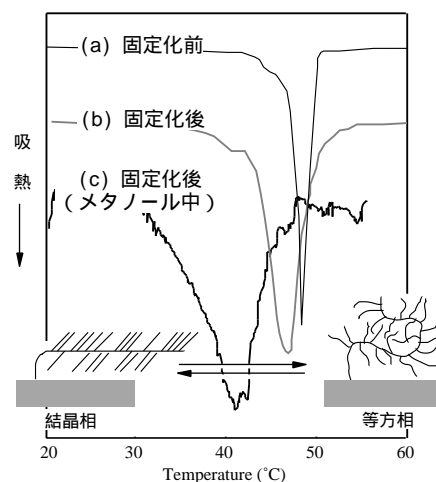


図6 SiI-ODA_nの相転移挙動

実際に、シリカゲルに担持されたクシ型ポリマー、SiI-ODA_nを分離剤としてHPLCを実施すると、単純疎水化シリカゲルであるODSとはまったく異なった分離挙動を示すことが確認されている。そのもっとも特徴的な機能は、芳香族化合物に対して著しい選択性が存在すること、ならびにその選択性に顕著な熱応答性が認められることにある。選択性の一例を表1に示すとともに、図7に典型的な温度依存性を、また選択性発現の機構を図8に模式的に表している。結論として、側鎖の分子配向は、分子スリットの形成というよりはむしろ分子間相互作用の基点となるカルボニル基が配向することより、より多重の分子間相互作用が期待できる平面性が高く、また直線性の高い物質に対して強い相互作用を発揮するものと考えられる。²³⁾

表 1 SiI-ODA₂₃ および ODS による多環芳香族に対する選択性

aromatic hydrocarbons	SiI-ODA ₂₃ at 5°C		SiI-ODA ₂₃ at 60°C		ODS at 5°C	
	k'		k'		k'	
naphthalene (NL) C ₁₀ H ₆	0.22	} 2.1	0.22	} 1.5	0.20	} 2.0
anthracene (AC) C ₁₄ H ₁₀	0.46		0.33		0.40	
naphthacene (NC) C ₁₈ H ₁₂	2.35	} 5.1	0.54	} 1.6	0.65	} 1.03
chrysene (CS) C ₁₈ H ₁₂	1.30		0.48		0.63	
pentacene (PC) C ₂₂ H ₁₄	41.4	} 9.4	1.13	} 2.1	1.03	} 1.4
1,2,5,6-dibenzoanthalene (DBA) C ₂₂ H ₁₄	4.40		0.70		0.97	

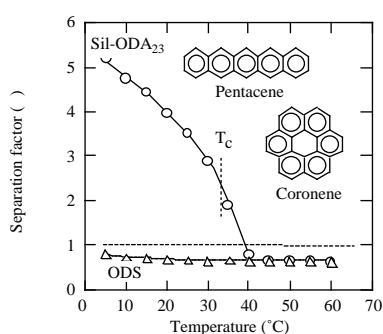
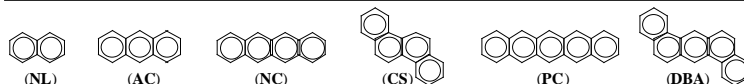


図7 ペンタセンとコロネンに対する選択性

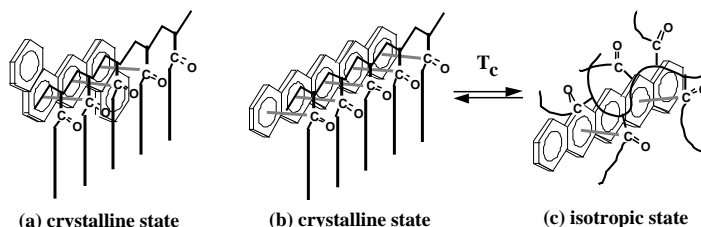
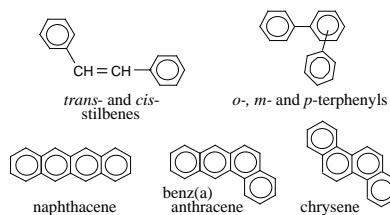


図8 SiI-ODA_nの分子形状認識の機構

脂質膜は分子配向場の典型的な例であるが、分子内における官能基間の配向も見逃すことのできない機能を発現する。たとえば、ペプチドがその良い例であり、光学活性なアミノ酸を重合すると自然に α -ヘリックス構造や β -シート構造を形成する。図5に示すように、ペプチドの片方の末端にシリカゲルと反応しうるトリメトキシシリル基を導入することができるので、このペプチドをシリカゲルに担持し、HPLCを実施すると、SiI-ODA_n 同様な分子形状認識を確認することができる。²⁴⁾ 表2に示すように、その選択性はアラニンのポリペプチドにおいてきわめて高い。アラニンより残基のかさばったロイシンやフェニルアラニンでこのような選択性が発現しないこと、またトリフルオロ酢酸や電子性の溶媒を添加するとアラニンにおいても選択性が低下することから、アラニンにおいても ODA_n 同様の分子間相互作用の基点となるカルボニル基が配向することより、より多重の分子間相互作用が期待できる平面性が高く、また直線性の高い物質に対して強い相互作用を発揮するものと考えられる。すなわちロイシンやフェニルアラニンでは、側鎖残基のかさばりが大きすぎて、ペプチド鎖上のカルボニル基が相互作用に関与しえないことを意味している。

表2 アラニンおよびロイシンからのポリペプチドによる分子形状認識

	Separation factor		
	Sil-Ala ₃₂	Sil-Leu ₂₇	ODS
<i>cis</i> -stilbene ^a	1	1	1
<i>trans</i> -stilbene	1.7	1.07	1.04
<i>o</i> -terphenyl ^b	1	1	1
<i>m</i> -terphenyl	1.5	1.5	1.4
<i>p</i> -terphenyl	7.2	1.7	1.5
chrysene ^a	1	1	1
benz(a)anthracene	0.81	1.02	1.03
naphthacene	6.0	1.2	1.2
benzene ^a	1	1	1
naphthalene	1.2	1.5	2.0
anthracene	2.8	2.4	3.5
naphthacene	37.5	4.5	7.8



Mobile phases: 25 °C, methanol-water = 7 : 3 in Sil-Ala₃₂ and Sil-Leu₂₇, methanol-water = 9 : 1 in ODS. The separation factor corresponds to the relative retention factor based on the substances. ODS: octadecylated silica.

ポリアラニンの二次構造はキラリティを有しているので、光学分割への期待も高まる。実際に、ピナフトールのように分子内に平面性のナフトール環を有するキラルな化合物に対しては良好な光学分割を行う。このように有機相がキラルな二次構造を形成する場合、光学分割能を有する分離剤の作製が可能となる。この分野でもっとも初期に成功した例は、かさばりの大きな置換基を有するメタクリル酸エステルの不斉重合体 (P-3) を光学分割剤として用いた例である。²⁵⁾ その後、同様な構造キラリティを有する多糖類^{26,27)} やポリペプチド^{28,29)} を用いた例が続々と登場している。最近では一部のキラル分離剤 (P-5) について不斉認識の機構³⁰⁾ も明らかになっているので、今後の分子設計にも弾みがつくものと思われる。

ポリマー系有機相の特徴は、配向性だけで発現するものではない。単に分子内に多数の官能基を濃縮できるという点においても低分子に見られない機能を発揮する。先に述べたクシ型ポリマーを作製する方法は、付加重合が可能な多くのビニル化合物に適用可能であり、実際に様々なポリマー系有機相が開発されている。³⁰⁻³⁴⁾ たとえば、ポリアクリロニトリルでは、これをシリカゲルにグラフト化させると、疎水性にはほとんど見向きもせず、電子を有する物質に対してのみ特異な分離能を発揮する。³⁰⁾ もちろん、モノメリックなニトリル基を直接担持した場合よりも分離能はかなり高くなる。ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) も注目されている。このシリカゲル担持物 (P-4) は、ポリマーの膨潤 - 収縮の変化を利用した HPLC を可能とする。³⁵⁾ 中でも興味深い高分子系有機相としてポリビニルピリジン (VP_n) がある。³⁶⁾

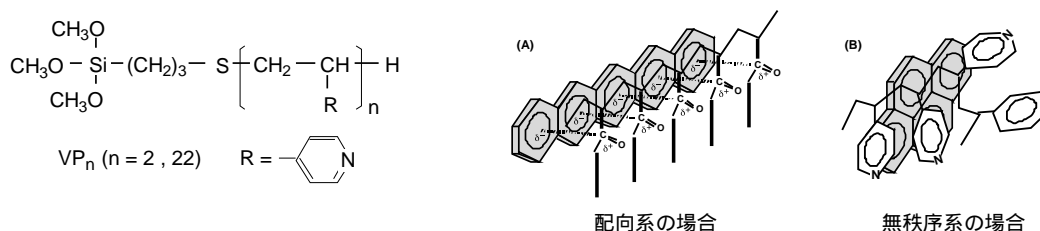


図9 高分子系有機相としてのポリビニルピリジンの化学構造と分子認識の機構

クシ型ポリマーである ODA_n と同様の方法で調製することができ、これをシリカゲルに固定化すると特異な機能を発揮する。まず第一に、シリカゲルに存在するシラノール残基に対して VP_n がマスキング効果を発揮する点が挙げられる。2 - 1 の基体の選択の項で述べたように、シリカゲルの最大の欠点の一つはシラノール残基の存在に由来するもので、塩基性物質に対する異常吸着やピークテーリングの原因となるので、シラノール残基に対する様々なエンドキャッピング剤の開発³⁷⁻⁴⁰⁾ や処理法が開発^{41,42)} されてきた。これに対して VP_n を固定化した場合には、とくに二次的な処理をすることなく、塩基性物質、たとえばピリジンやピリミジン、アニリン、キノリン、ピピリジンなどに対してまったく吸着現象を示さない。これは、VP_n のピリジル基がシラノール残基と静電的な相互作用を行い、結果としてシラノール残基をマスキングしているためと推察される。

VP_n は特異な選択性も有している。分子の疎水性をほとんど識別せず、そのかわりに電子系分子に対して特異的に選択性を示す。表3と4にその代表的な結果を示している。興味深いのは、ODA_n のように分子配向系の有機相の場合には、より直線性の高い物質に対して高い選択性が得られるのに対し、VP_n ではよりディスク状 (アスペクト比の小さな物質) と強く相互作用する (図9参照のこと)。そのほか、シクロデキストリンやニトロ化合物に対して特異的な選択性を示す。

表3 Comparison of the separation factor for polycyclic aromatic hydrocarbons

		Sil-VP _n ^{a)} (n = 21)		Sil-AN _n ^{b)} (n = 21)		Sil-CN ^{c)}		ODS ^{d)}	
		k'		k'		k'		k'	
triphenylene	C ₁₈ H ₁₂	14.76	12.80	5.22	6.50	2.92	1.86	2.76	1.45
o-terphenyl	C ₁₈ H ₁₄	0.92	1.00*	0.80	1.00*	1.58	1.00*	1.90	1.00*

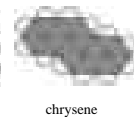
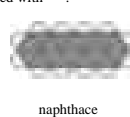
Mobile phases: a) methanol - water = 8 : 2, 30 °C; b) methanol - water = 6 : 4, 35 °C; methanol - water = 7 : 3, 35 °C; methanol - water = 9 : 1, 25 °C. The separation factor () was evaluated by using the compounds marked with "**".



表4 Comparison of the separation factor for polycyclic aromatic hydrocarbons

		Sil-VP _n ^{a)} (n = 21)		Sil-AN _n ^{b)} (n = 21)		Sil-CN ^{c)}		ODS ^{d)}	
		k'		k'		k'		k'	
naphthacene	C ₁₈ H ₁₂	7.64	1.00*	7.96	1.00*	3.57	1.00*	3.48	1.00*
benz[a]anthracene	C ₁₈ H ₁₂	8.29	1.09	6.71	0.84	3.41	0.96	2.99	0.86
					<1.19>		<1.04>		<1.16>
chrysene	C ₁₈ H ₁₂	8.87	1.16	6.48	0.81	3.04	0.85	2.90	0.83
					<1.23>		<1.18>		<1.20>
triphenylene	C ₁₈ H ₁₂	11.76	1.54	5.22	0.66	2.92	0.82	2.76	0.79
					<1.52>		<1.22>		<1.27>

Mobile phases: a) methanol - water = 8 : 2, 30 °C; b) methanol - water = 6 : 4, 35 °C; methanol - water = 7 : 3, 35 °C; methanol - water = 9 : 1, 25 °C. The separation factor () was evaluated by using the compounds marked with "**".



3. おわりに

本稿では、生体由来の物質を直接固定化した分離剤にはいっさい触れていないが、タンパク質や酵素、抗体などが固定化された分離剤は多数ある。⁴³⁾ 固定化される材料の特性は既知であるので、分離能を予測することは容易であるし、時には光学分割のような付加的な機能を発掘することもできる。生体由来物質の官能基としての潜在能力の高さは誰も認めるところであり、今後もこの分野は進展し続けるであろう。しかし、生体由来物質の多くは *in vitro* でかなり脆弱であることも確かであり、また、あまりにも限られた特異性を発揮する点は汎用性の限界を与えてしまう。アフィニティの根源を見極め、バイオメテックなアプローチが HPLC の世界の主役になる時期を密かに願っている。また、充填型のカラムに代わりモノリスカラムに関する研究も活気を帯びている。カラム法による大量・高速分取法の救世主として期待されている。

- 1) H. Moriyama, M. Anegayama, K. Komiyama, U. Kato, *J. Chromatogr. A*, 691, 81 (1995).
- 2) E. Venema, J. C. Kraak, H. Poope, R. Tijssen, *J. Chromatogr. A*, 740, 159 (1996).
- 3) M. Hanson, A. Kuruganov, K. K. Unger, V. A. Davankov, *J. Chromatogr. A*, 656, 369 (1993).
- 4) K. Murayama, H. Nakamura, T. Nakajima, K. Takahashi, A. Yoshida, *Anal. Sci.*, 10, 497 (1994).
- 5) G. B. Cox, *J. Chromatogr. A*, 656, 353 (1993).
- 6) K. Hosoya, K. Kimata, N. Tanaka, T. Araki, M. Terashima, J. M. Frechet, *J. Liq. Chromatogr.*, 16, 3059 (1993).
- 7) K. Ogino, H. Sato, Y. Aihara, H. Suzuki, S. Moriguchi, *J. Chromatogr. A*, 699, 67 (1995).
- 8) K. Kimata, T. Hirose, K. Morichi, K. Hosoya, T. Araki, N. Tanaka, *Anal. Chem.*, 67, 2556 (1995).
- 9) J. Xiao, C. E. Kibbey, D. E. Coutant, G. B. Martin, M. E. Meyerhoff, *J. Liq. Chromatogr.*, 19, 2901 (1996).
- 10) J. Xiao, M. R. Savina, G. B. Martin, A. H. Francis, M. E. Meyerhoff, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 9341 (1994).
- 11) K. Jinno, C. Okumura, M. Harada, Y. Saito: *J. Liq. Chromatogr.*, 19, 2883 (1996).
- 12) S. Allenmark, S. Andersson, *J. Chromatogr. A*, 666, 167 (1994).
- 13) L. C. Sander, S. A. Wise, *Anal. Chem.*, 56, 504 (1984).
- 14) J. J. Pesek, A. M. Siouffi, *Anal. Chem.*, 61, 1928 (1989).
- 15) B. H. Klein, J. Spinger, *J. Liq. Chromatogr.*, 14, 1519, 1539 (1991).
- 16) C. Pidgeon, U. V. Venkataram, *Anal. Biochem.* 176, 36 (1989).
- 17) C. Hirayama, H. Ihara, T. Mukai, *Macromol.*, 25, 6357 (1992).
- 18) E. Ropez, D. F. O'Brien, T. H. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 104, 305 (1982).
- 19) L. Regen, J. Shin, K. Yamaguchi, *J. Am. Chem. Soc.*, 106, 2446 (1984).
- 20) T. Kunitake, A. Tsuge, N. Nakashima, *Chem. Lett.*, 1984, 1783.
- 21) H. Ihara, H. Tanaka, S. Nagaoka, K. Sakaki, C. Hirayama, *J. Liq. Chromatogr.* 19, 2967 (1996).
- 22) M. A. Jamil Chowdhury, H. Ihara, T. Sagawa, C. Hirayama, *J. Chromatogr. A*, 877, 71 (2000).
- 23) H. Ihara, Y. Goto, T. Sakurai, M. Takafuji, T. Sagawa, S. Nagaoka, *Chem. Lett.*, 2001, 1252.
- 24) H. Ihara, T. Nakanishi, T. Sagawa, C. Hirayama, T. Sakurai, T. Kinoshita, Y. Tsujita, *Chem. Lett.*, 1998, 963.
- 25) Y. Okamoto, S. Honada, I. Okamoto, H. Yuki, S. Murata, R. Noyori, H. Takaya, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 6971 (1981).
- 26) N. Enomoto, S. Furukawa, Y. Ogasawara, H. Akano, Y. Kawamura, E. Yashima, Y. Okamoto, *Anal. Chem.*, 68, 2798 (1996).
- 27) C. Miguillon, P. Franco, L. Oliveros, *J. Chromatogr. A*, 728, 415 (1996).
- 28) H. Kuniwa, Y. Doi, Nishikaji, N. Ogata, *Makromol. Chem.*, 188, 1841 (1987).
- 29) C. Hirayama, H. Ihara, K. Tanaka, *J. Chromatogr.*, 530, 148 (1990).
- 30) H. Ihara, S. Okazaki, K. Ohmori, S. Uemura, C. Hirayama, S. Nagaoka, *Anal. Sci.*, 14, 349 (1998).
- 31) H. Ihara, H. Tanaka, M. Shibata, S. Sakaki, C. Hirayama, *Chem. Lett.*, 1997, 113.
- 32) H. Ihara, S. Uemura, S. Okazaki, C. Hirayama, *Polym. J.*, 30, 394 (1998).
- 33) C. Hirayama, H. Ihara, S. Nagaoka, T. Wada, *Polym. J.*, 26, 499 (1994).
- 34) H. Ihara, N. Nakamura, S. Nagaoka, C. Hirayama, *Anal. Sci.*, 11, 739 (1995).
- 35) H. Kanazawa, K. Yamamoto, Y. Matsushima, N. Takaki, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano, *Anal. Chem.*, 68, 100 (1996).
- 36) H. Ihara, W. Dong, T. Mimaki, M. Nishihara, T. Sakurai, M. Takafuji, S. Nagaoka, *J. Liq. Chromatogr.*, 26, 2473 (2003).
- 37) C. H. Lochmuller, D. B. Marshall, *Analytica Chimica Acta*, 142, 63 (1982).
- 38) N. Tanaka, H. Kinoshita, M. Araki, T. Tsuda, *J. Chromatogr.*, 332, 57 (1985).
- 39) Y. Sudo, *J. Chromatogr.*, 737, 139 (1996).
- 40) L. A. Belyakova, A. M. Varvarin, *Colloids and Surfaces*, 154, 285 (1999).
- 41) J. E. Sandoval, J. J. Pesek, *Anal. Chem.*, 63, 2634 (1991).
- 42) J. J. Pesek, M. T. Matyska, R. J. Yu, *J. Chromatogr.*, 947, 195 (2002).
- 43) S. Allenmark, S. Andersson, *J. Chromatogr. A*, 666, 167 (1994).