

論文

高速液体クロマトグラフィーを用いた緑色植物 のリポフィリシティ

新井田 聖次¹・柴田 勝²

¹総務課技術室 (Technical Section, General Affairs Division, Nagaoka National College of Technology)

²物質工学科 (Department of Materials Engineering, Nagaoka National College of Technology)

LIPOPHILICITY OF PLANT PIGMENTS BY REVERSED-PHASE HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Seiji NIITA¹ and Masaru S. SHIBATA²

Abstract

A quantitative measurement has been developed characterizing the hydrogenation of side chain of 10 chlorophylls, 6 isoprenols and 4 quinone on the basis of their reversed-phase liquid chromatographic retention data, eluting with methanol-water solvent system from the hydrocarbon chemically bonded reversed phase using a HPLC. A linear relationship was observed between the logarithm of k' , $\log k'$, and the logarithm of the molarity of the organic moiety, $\log[C]$, in the mobile phase. This line was consist with the equation, $\log k' = -\alpha \log[C] + \log k'_i$, derivated from partion efficient and equilibrium constant. The α value was recognized as the number of the released solvent molecules after the formation of the bristle-solvent-solute complex when the solvated solute molecules were adsorbed on the solvated bristles of the bonded materials. The $\log k'_i$ was obtained from the calculation of extrapolated $\log k'$ values at 0% methanol in the mobile phase for the compounds. The relationship between number of double bonds in side chain and $\log k'_i$ of substrates with same hydrophilic group were found. The plots fro $\log k'_i$ vs α value shows line relationship, when cross point for line obtained from plot of $\log[C]$ vs. $\log k'$ of chlorophylls and other is only one. The $\log k'_i$ is related with $\log k'_w$ which is indicator of lipophilicity. The $\log k'_i$ value increased in the order of Chl b, Chl b', Chl a and Chl a', for difference in porphylinering of chlorophyll among chlorophyll a and b and those epimer, The order was Chl-GG < Chl-DHGG < Chl-THGG < Chl-P; GG < DHGG < THGG < P for difference alcohols, alpha-tocopherol < ganmmatocopherol, menaquinone < phyloquinone for quinones. The $\log k'$ value increased with decreasing of hydrogenation of side chain. A slope of line obtained from plot of $\log k'_w$ vs. α value indicate β value which is factor of structure similarity. We discussed that effect of hydrogenation of chlorophyll side chain on lipophilicity of chlorophyll.

Key Words : HPLC, lipophylicity, pigments, capacity factor

1. 緒言

リポフィリシティは、疎水結合を基本とした分子間の結合力を示しており、逆相カラムを用いた高速液体クロマトグラフィー(RP-HPLC)や薄層クロマトグラフィー(TLC)により核酸塩基や薬剤について測定され、その値がドラッグデザインなどに用いられてきた¹⁻³⁾。RP-HPLCによるリポフィリシティは、カラムに ODS、溶離液にメタノールやエタノールなど、水との親和性が高い有機溶媒に水を加えた混合水溶液を用いて求めることができる。従来、溶離液の有機溶媒の体積分率(vol%)と基質のリテンションタイムから計算される capacity factor (k')の対数をプロットすることにより得られる直線に対して、有機溶媒濃度を 0%に外挿して得られる値($\log k'w$)とされてきた^{4,5)}。

リポフィリシティは、生体膜とタンパク質などの生体分子間の親和性を間接的に示すことから、薬剤の膜透過性の指標として用いられ、薬剤効果を高めるためにその値を高める分子設計が精力的に行われてきた⁶⁻⁸⁾。しかし、自然界に大量に存在する脂溶性物質の植物色素は、タンパク質と複合体を形成して機能するが、そのリポフィリシティはその機能評価を行う上で重要な因子でありながら、薬剤と比較してそのデータ数は極端に少ない。色素の安定性、植物機能を考えるために色素構造とリポフィリシティとの関係を明確にする必要がある^{9,10)}。

植物の色素は、光合成器官である葉緑体のチラコイド膜や包膜に局在している¹¹⁾。緑色のクロロフィル(Chl)は、マグネシウムを配位する親水性のテトラピロール環(クロロフィライド)に炭素 20 個(C5の isoprene が 4 つ重合した化合物)からなる疎水性の側鎖を結合している。Chl は、光合成にとって光エネルギーを補足するための分子であり、植物にとって重要である。Chl の合成は、クロロフィライドに側鎖として geranylgeraniol (GG) (二重結合が 4 つ) が結合し、次いで段階的に還元され chlorophyllide-dehydrogeranylgeraniol (Chl-DHGG), Chl-THGG (Chl-tetrahydrogeranylgeraniol)を経て Chl-P (Chl-P) (二重結合が 1 つ) を形成する反応である。Shibata *et al.* は、不完全還元状態の Chl を蓄積するイネの変異株が光に対して感受性であり、幼苗の段階で枯死してしまうことを報告している¹²⁾。これらのことから、本論文では Chl 側鎖の還元が、Chl とタンパク質・脂質間の相互作用の指標としてのリポフィリシティを測定し、Chl 中間体の安定性についての考察を行った。Chl 側鎖の還元によるリポフィ

リシティの変化を調べるために Chl 種として 10 種(側鎖として GG, DHGG, THGG, P を結合した Chla, Chlb およびそれらの epimers である Cha'-P, Chlb'-P)、6 種の prenyl alcohol (geraniol; G, farnesol; F, GG, DHGG, THGG, P)、2 種の tocopherol (TQH) (α -TQH and γ -TQH)、2 種の naphthoquinone (NQ) (phyloquinone, menaquinone-4)、計 20 種の prenyl 分子について検討を行った。また、リポフィリシティは、固相と液相の分子吸着の分配率に依存することから従来のリポフィリシティ($\log k'w$)より、分配平衡をより反映した式を誘導し、得られたリポフィリシティ($\log k'i$)との比較を行った。その理論的背景も合わせて報告する。

2. 実験

2.1 クロロフィル種の調整

Chla-THGG, Chla-DHGG, Chla-GG, Chlb-THGG, Chlb-DHGG, Chlb-GG を Chl 中間体を蓄積するイネ変異株 M249 から、Chla-P, Chlb-P をイネ野性株からアセトンにより抽出し、部分精製した後に実験に用いた^{10, 12, 13)}。Chla'-P, Chlb'-P は、トウヒ Chl を含むアセトン抽出液に等量のピリジンを加え 80°C で 2 時間、湯浴中でエピマー反応を起こさせることにより Chla, b を Chla', b' に変換した後、ヘキサンおよび水を反応溶液に加えて液液分配後、キサン相に濃縮させた色素を減圧乾固し、アセトンに再溶解したものをを用いた¹⁴⁾。

2.2 イソプレノイド誘導体の調整

GG, DHGG, THGG の調整を DEAE-Sepharose CL-6B により変異株の Chl 中間体を精製し、中間体のアルカリ加水分解により側鎖を遊離させて行った。M249 の幼苗をアセトンと共にポリトロン破碎し、遠心後、Chl を含むアセトン上清にヘキサン、水を加え有機相に Chl を濃縮させた。ヘキサン相のキサントフィル色素を 80%メタノールにより取り除いた後に、無水硫酸ナトリウムにより脱水後、減圧乾固し、少量のアセトンにて再溶解し、濃縮クロロフィル粗抽出液を得た。

アセトンにてクリーニングした DEAE(15ml)カラムに粗抽出液の色素類を吸着させ、吸着しているカロチノイドのみを 100%アセトンにて溶出させることで、Chl 類とカロチノイドを分離した。カラムに残存吸着している Chl 類をアセトン・メタノール(10/3(v/v))により溶出させ、溶出溶液を乾固し、少

量のメタノールに再溶解することで Chl 類の部分精製品を得た¹⁵⁾。

クロロフィルから側鎖を遊離させるために精製した溶液に2倍容量の30% KOH-MeOHを加えて30°Cで2時間、アルカリ加水分解を行った。反応終了後、アルカリ反応溶液にヘキサンを加え、遊離した側鎖を有機相に移し、ヘキサン相に残るアルカリを除くために蒸留水によりヘキサンを数度洗浄した。有機相を減圧乾固し、正確にエタノール 2.5ml に溶解し、GG, DHGG, THGG の標準混合サンプルとした。P, F, G, TQH 類, NQ 類については、Sigma から購入した標品をエタノールに溶解したものをを用いた。

2.3 HPLC 分析

HPLC 分析をカラム Zorbax-ODS (4.6x250mm)、溶離液メタノール・H₂O 混合液、流速 1.5ml/min、カラム温度 45°C の条件で行った。分離した化合物の検出を 10 種の Chl 類に対して蛍光(ex.450nm, em.650nm)、6 種の prenyl alcohol に対して UV 吸収(210nm)、2 種の TQH 類に対して蛍光(ex.288nm, em.335nm)、NQ 類について UV 吸収(295nm)を測定することにより行った^{10, 12)}。void 時間は、各サンプル測定条件と同条件において、硝酸ナトリウムのピークリテンションタイムから求めた¹⁶⁾。

3. 結果および考察

現在までに TLC や HPLC による薬剤のリポフィリシティーが求められてきた^{8, 17)}。RP-HPLC によるリポフィリシティー測定は、カラムに ODS、溶離液に水/メタノールや水/エタノールなどの有機溶媒との混合水溶液が用いられ、溶離液に占める有機溶媒の体積分率(vol%)と基質のリテンションタイムから求められる capacity factor (k') の対数とのプロットにより得られる直線に対してメタノール濃度が 0% になる値(logk'w)とされてきた¹⁸⁾。

Fig.1 に示されるように体積分率ではなく溶離液のメタノール濃度の対数とサンプルの logk' に直線関係が存在していた。Tanaka *et al.* は、溶媒分子に着目し、ODS の C18 アルキル分子鎖と溶質の複合体形成時に溶質や C18 から脱離する溶媒和分子からその分離機構の説明を行っている^{19, 20)}。C18 分子鎖が、溶媒分子の単一相で溶媒和された状態であるために溶媒和溶質分子が C18 分子鎖に吸着すると、C18 分子-溶媒-溶質の複合体が形成され、数分子の溶媒分子が C18 分子、溶質から溶媒和分子脱離する²⁰⁾。こ

れを以下のような平衡式として表わすことができる。



ここで B は C18 アルキル直鎖分子、S は溶質分子、BS は、C18 と溶質の複合体、m, n は、それぞれ B, S に溶媒和している溶媒分子数、α は、溶質に溶媒和している溶媒分子が外れた分子数を示している。溶質に対する平衡定数(K)と分配係数(k')は、次式のように表わすことができる。

$$K = \frac{[C_{m+n-\alpha}BS][C]^\alpha}{[C_mB][C_nS]} \quad (1)$$

$$k' = \frac{[C_{m+n-\alpha}BS]}{[C_nS]} \quad (2)$$

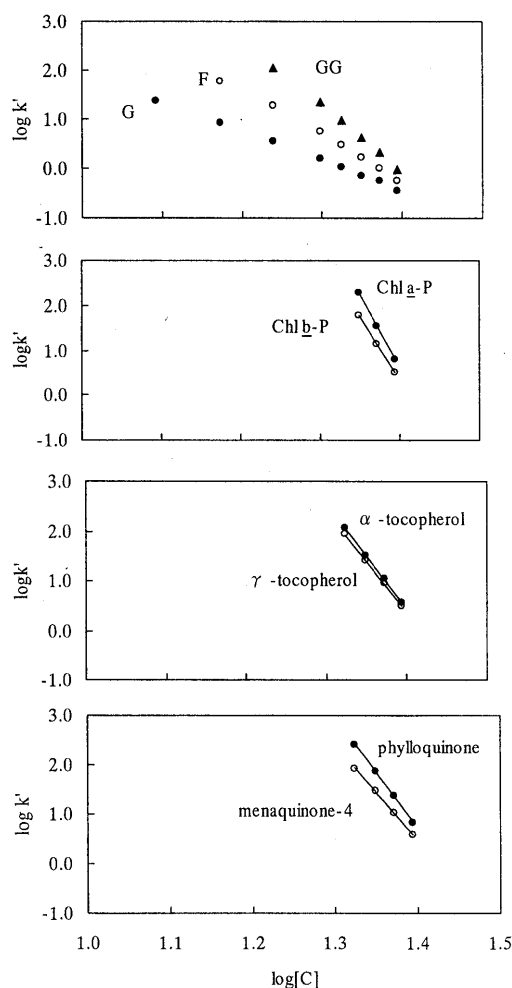


Figure 1. Relationship between logarithm of capacity factor and concentration of methanol in eluent. (A) C-20 prenyl alcohols, (B) chlorophylls, (C) tocopherols and (D) naphthoquinones. Chromatographic parameters of the C-20 prenyl derivatives were calculated from the retention time determined as described in Materials and Methods.

HPLCにより得られる k' は、次式のように表わすことができる¹⁹⁾。

$$k' = \frac{K'V_m}{V_s} \quad (3)$$

ここで t_0 は、それぞれ溶質および void リテンションタイムであり、 V_B 、 V_S は、それぞれ、固定相および溶媒体積を示している。 k' は(1), (2)より次式のように表わすことができる。

$$\log k' = \log \left(\frac{[C_m B] K V_m}{[C]^\alpha V_s} \right) \quad (4)$$

$\log k' = \log[C_m B] + \log K + \log(V_m/V_s)$ である場合、式(4)は、以下のようになる。

$$\log k' = -\alpha \log[C] + \log k'_i \quad (5)$$

$\log k'_i$ は、溶離液の有機溶媒濃度が 1.0M の時に得られる capacity factor である。Fig.1 に示されるように $\log k'$ は、 $\log[C]$ とに相関関係が存在しており、式(6)に矛盾なく一致している。この事から式(6)の α 、 $\log k'_i$ を Fig.1 から求めることができる。

(A) in Fig.1 は、イソプレン(C5)単位の鎖長が異なる isoprenyl alcohol の G(C10), F(C15), GG(C20)の k' に対する溶媒効果を示している。鎖長と共に k' 値が増加し、水溶性溶媒による影響がより大きくなっていった。各 prenyl 誘導体を比較するために標準自由エネルギー(ΔG°)による比較を行った。

Table 1. Number of double bond and carbon in side chain of compounds and linear relationship between $\log k'$ values and composition of the mobile phase from 40 to 100% range of methanol concentrations according to the equation $\log k' = -\alpha \log[C] + \log k'_i$ where $[C]$ is the methanol concentration in molar.

Compounds	Double bond No. in side chain	Carbon No. in side chain	α	$\log k'_i$	R^{2*}
Chlorophylls					
Chl a'-P	20	1	32.052	45.511	0.996
a -P	20	1	31.091	44.083	0.996
a -THGG	20	2	29.920	42.371	0.995
a -DHGG	20	3	28.770	40.684	0.996
a -GG	20	4	27.859	39.348	0.996
Chl b'-P	20	1	28.322	40.001	0.994
b -P	20	1	27.649	39.008	0.997
b -THGG	20	2	26.436	37.241	0.997
b -DHGG	20	3	25.317	35.604	0.997
b -GG	20	4	24.333	34.164	0.997
Isoprenyl alcohols					
P	20	1	16.967	23.856	0.996
THGG	20	2	15.116	21.224	0.998
DHGG	20	3	14.303	20.019	0.999
GG	20	4	13.481	18.800	0.999
F	15	3	9.209	12.640	1.000
G	10	2	5.800	7.694	0.998
Quinone					
γ -Tocopherol	15	0	21.163	30.067	1.000
α -Tocopherol	15	3	20.355	31.840	1.000
Phylloquinone	15	0	22.230	31.840	1.000
Menaquinone-4	15	3	19.016	27.098	1.000

Retention time was determined as described in Materials and Methods. The capacity factor k' is given by $k' = (t_r - t_0)/t_0$, where t_r and t_0 are the retention time of retained and unretained solutes in the given HPLC analytical system, respectively.

G および GG の標準自由エネルギーは -0.45 (kJ/mol), -1.11 (kJ/mol)であった。側鎖が P である Chl 類においても prenyl alcohol と同様に溶離液組成の変化により指数関数的に影響を受けていた(B in Fig. 1)。側鎖が P 以外の GG, DHGG, THGG においても P 側鎖と同様な直線が得られた (data not shown)。その傾きは P 側鎖で得られた Chl に比べて小さくなっていった(Table 1)。キノン類においても Chl 類と同様な結果が得られた(C and D in Fig.1)。 α -TQH は γ -TQH と比較して親水基のクロマキノン環に結合しているメチル基が 1 個少なく、その標準自由エネルギーは各々-1.88 (kJ/mol), -1.78 (kJ/mol)となり、NQ 類である phyloquinone (ΔG° =-1.88 (kJ/mol))の側鎖に 4 つの二重結合をもつ menaquinone の ΔG° が-1.60(kJ/mol)となり、側鎖の二重結合を増加させることにより効率的にリポフィリシティを大きくすることができ、その効果はメチル基付加と同程度であった(Fig.1 & Table 1)。

また、 $\log k'_i$ と $\log k'_w$ に直線関係が存在していた (Fig.2)。このため、相対的なリポフィリシティを比較する場合、 $\log k'_w$ 値ではなく $\log k'_i$ 値により行うことができる。Guerra *et al.* は、メタノールの体積分率から得られる傾きと切片 ($\log k'_i$ の代りに $\log k'_w$) をそれぞれプロットすると直線を示すことを報告している^{18, 21, 22})。 α 値と $\log k'_i$ のプロットを行ったところ、より複雑な構造の色素類であっても、プロット ($\log k'_i$ vs. $\log[C]$) により得られた切片 ($\log k'_i$) と傾き (α) で直線が得られ、その相関係数 R^2 は 0.9996 と高かった (data not shown)。

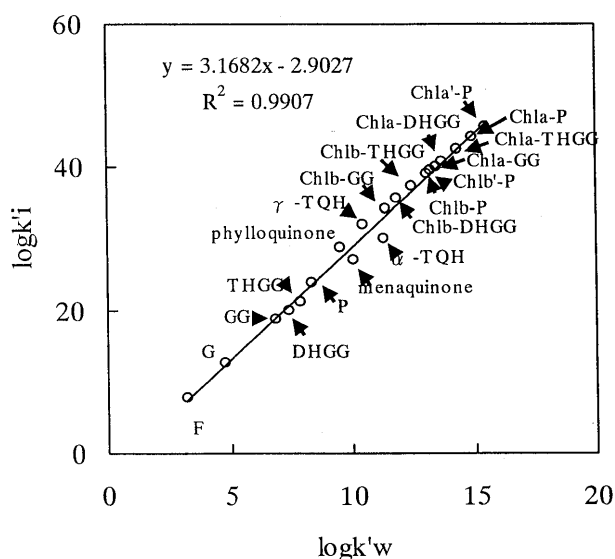


Figure 2. Relationship between logarithms of k'_w and k'_i of chlorophyll *a* and *b* species, C-20 prenyl alcohols, tocopherols and naphthoquinones. Data for all prenyl derivatives in Table 1 were used.

これらのことから、 $\log k'_i$ を基質の相対的なリポフィリシティの指標として用いることができることが明らかとなった。Table 1 に示されるように α , $\log k'_i$ の値は、イソプレノ単位と共に増加していた。これは、C18 分子鎖との相互作用に占める表面積の割合が F よりも GG の方が大きく、より強い分子鎖との相互作用が働いているためである¹³)。Chl 側鎖の炭素数の伸長について Shioi *et al.* は、側鎖とし G, F, GG を有する合成 Chl 類の $\log k'_i$ と側鎖炭素数とのプロットには、直線関係が存在しており、炭素数の伸長と共に k'_i 値が大きくなるを報告している^{5, 9, 23})。このため、同様な親水性基を持つ分子は、側鎖が G, F, GG と伸長することにより k'_i が大きくなり、そのリポフィリシティが増大することが示された。これは、生育環境の違いで側鎖長が異なる生体分子を蓄積することから、タンパク質や脂質との相互作用の調整を側鎖長により行っていると考えられる。

C20 イソプレノイド誘導体の分子内の二重結合数に対して $\log k'_i$ をプロットしたものを Fig.3 に示す。Chl 側鎖や C20 アルコールの二重結合の還元により $\log k'_i$ 値は定量的に増加していた。このことから、二重結合が水素化 (二重結合数の減少) されることによりその基質のリポフィリシティが増加すると考えられる。

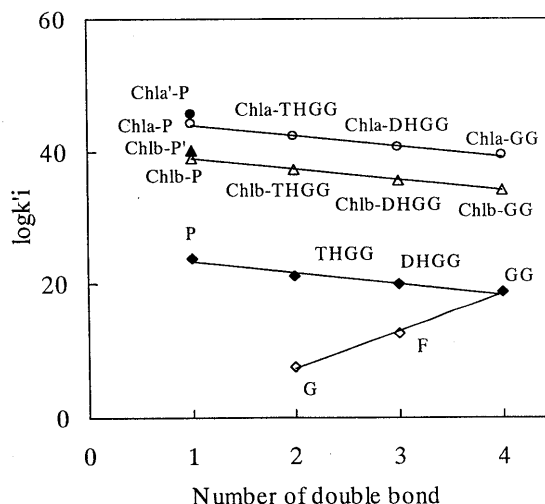


Figure 3. Relationship between logarithm of capacity factor and the number of double bonds in the prenyl side chain of methyl-naphthoquinone-prenyl (A), chlorophyll *a* (B), and C-20 prenyl alcohol (C). Chromatographic parameters of the C-20 prenyl derivatives were calculated from the retention time determined as described in Materials and Methods. Data for isoprenoid alcohol and Chls shown in Table 1 were used. Symbols used were as follows: chlorophyll *a* species, ○; chlorophyll *b* species, △; C-20 prenyl alcohol, ◇.

このような結果を基に Chl 側鎖の還元による Chl のリポフィリシティの増加について考える。野性株の Chl 側鎖に比べ、二重結合の数が少ない Chl を蓄積する変異株は、光飽和の状態において野性株と同程度の光合成活性を有しているが、野外では生育できず、枯れてしまう^{12, 13)}。また、弱光下で生育させた野性、変異株のイネを野外に移動させると、野性株が Chl 増加を示すのに対して、変異株は Chl の減少が観察されている^{10, 12)}。この原因の一つとして Shibata *et al.* は、Chl-P より Chl-GG がタンパク質との結合が弱いために光に対して不安定で分解されやすいことを示唆している^{10, 12, 13)}。

helicity が高いタンパク質ほど RP-HPLC のリテンションタイムが遅くなることが知られている。このことから、log*k'* 値が高い分子ほど helicity の高いペプチド部分と相互作用しやすいと考えられる。Chl 合成の最終段階である側鎖の二重結合の水素化（二重結合数の減少）によるリポフィリシティ増加は、helices 部分と側鎖のより強い相互作用を引き起こすと考えられており、実際に光合成タンパク質の helices site に Chl 類が配置されている。

また、今回測定された Chl 類の中で最も大きな log*k'* を示す Chl a' は、他のクロロフィルと違い、光化学反応系 I の反応中心を構成していることから、Chl a' の側鎖が P ではなく GG となり log*k' i* が低下すると反応中心 Chl が不安定となり光化学系 I 活性が大きく低下すると考えられる。事実、Shibata *et al.* は pulse amplitude modulating chlorophyll fluorescence system により変異株の光化学系 I 活性が、野性株に比べ大きく低下していることを示している¹⁰⁾。これらのことから、Chl 側鎖の GG から P への還元は、タンパク質内での色素の安定性を増すために、Chl のリポフィリシティを高めていると考えられる。

参考文献

- 1) Biagi, G. L., Barbaro, A. M. and Reccanatini, M., Determination of lipophilicity by means of reversed-phase thin layer chromatography. III. Study of the TLC equations for a series of ionizable quinone derivatives, *J. Chromatogr.*, 678, 127, 1994.
- 2) Biagi, G. L., Barbaro, A. M. and Sapone, A., Determination of lipophilicity by means of reversed-phase thin layer chromatography. I. Basic aspects and relationship between slope and intercept of TLC equations, *J. Chromatogr.*, 662, 341, 1994.
- 3) Dolan, J. W., Grant, J. R., Gradient elution in high-

- performance liquid chromatography. II. Practical application to reversed-phase system, *J. Chromatogr.*, 165, 1, 1979.
- 4) Kuchar, M., Kraus, E. and Jelinkova, M., Influence of mobile phase composition on evaluation of lipophilicity by partition chromatography, *J. Chromatogr.*, 557, 399, 1991.
- 5) Konemann, H., Zelle, R., Busser, F. and Hammeres, E. W., Determination of log *P*oct values of chlorosubstituted benzenes, toluenes and anilines by high-performance liquid chromatography on ODS-silica, *J. Chromatogr.*, 178, 559, 1979.
- 6) Prenzel, U. and Lichtenthaler, H. H., High-performance liquid chromatography of prenylquinones, prenylvitamins and prenyls, *J. Chromatogr.*, 242, 9, 1982.
- 7) Schoenmakers, J. P., Billiet, A. H. H. and De Galan, L., Influence of organic modifiers on the retention behaviour in reversed-phase liquid chromatography and its consequences for gradient elution, *J. Chromatogr.*, 185, 179, 1979.
- 8) Taylor, R. B., Ochekepe, N. A. and Wangboonskul, J., Quantitative structure retention relationship studies of some basic antimalarial compounds, *J. Liq. Chromatogr.*, 12, 1645, 1989.
- 9) Malnar, I. and Horvath, C., Separation of amino acids and peptides on non-polar stationary phases by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 142, 623, 1977.
- 10) M Shibata, M Tsuyama, T Takami, H Shimizu and Y Kobayashi: Accumulation of menaquinones with incompletely reduced side chains and loss of α -tocopherol in rice mutants with alternations in the chlorophyll side chain, *Journal Experimental Botany*, 55, 1989-1996, 2004.
- 11) Lichtenthaler HK, Prenzel U, Douce R, Joyard J. : Localization of prenylquinones in the envelope of spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 641, 99-105, 1981.
- 12) M. Shibata, T. Mikota, A. Yoshimura, N. Iwata, M. Tsuyama, Y. Kobayashi : Chlorophyll formation and photosynthetic activity in rice mutants with alterations in the hydrogenation of chlorophyll alcohol side chain, *Plant Science* 166, 593-600, 2004.
- 13) M. Shinya (Shibata), M. Tsuyama and Kobayashi : Hydrogenation of chlorophyll alcohol side chain and its role on photosynthesis, *Research in*

Photosynthesis, Vol.III, 993-995, 1993.

- 14) Helfrich, M., Schoch, S., Ulrika, L., U., CMIEL, E. Rudiger, W., Chlorophyll synthetase cannot synthesize chlorophyll *a'*, *FEBS J*, 219, 267-275, 1994.
- 15) Omata, T. and Murata N., Preparation of chlorophyll : *a*, chlorophyll *b* and bacteriochlorophyll *a* by column chromatography with DEAE-sepharose CL-6B and sepharose CL-6B, *Plant Cell Physio.*, 24, 1093-1100, 1983.
- 16) Wells J. M. M. and Clark, C. R., Liquid Chromatographic elution characteristics of some solutes used to measure column void volume on C18 bonded phases, *Anal. Chem.*, 53, 1341, 1981.
- 17) Guerra, C. M., Barbaro, M. A., Forti, G. C., Pietrograndel, C. M., Borea, A.P. and Biagi, L. G., Determination of lipophilic character of a series of demorphin-related oligopeptides by means of reversed-phase HPLC, *J. Liq. Chromatogr.*, 7, 1495, 1984.
- 18) Pietrograndel, C. M., Bigli, C., Borea, A. P., Barbaro, M. A., Guera, C. M. and Biagi, L. G., Relationship between $\log k'$ values of benzodiazepines and composition of the mobile phase, *J. Liq. Chromatogr.*, 8, 1711, 1985.
- 19) Horvath, C. and Melander, W., Liquid chromatography with hydrocarbonaceous bonded phases; theory and practice of reversed phase chromatography, *J. Chromatog. Sci.*, 15, 393, 1977.
- 20) Tanaka, N., Goodell, H. and Karger, L., The role of organic modifiers on polar group selectivity in reversed-phase liquid chromatography, *J. Chromatogr.*, 158, 233, 1978.
- 21) Horvath, C. and Melander, W., I. Solphobic interactions in liquid chromatography with nonpolar stationary phases, *J. Chromatogr.*, 125, 129, 1976.
- 22) Murakami, F., Retention behaviour of benzene and derivatives on bonded on bonded reversed-phase columns, *J. Chromatogr.*, 178, 393, 1979.
- 23) Jandera, P, Reversed-phase liquid chromatography of homologous series. A general methods for prediction of retention, *J. Chromatogr.*, 314, 13, 1984.

(2008.1.17 受付)