

소수성 파라미터를 적용한 알킬벤젠류의 역상컬럼내의 용출거동 예측

이창영 · 박명용* · 이용문*[#]

동서대학교 시스템 경영공학과, *충북대학교 약학대학

(Received May 24, 2009; Revised July 7, 2009; Accepted July 15, 2009)

Prediction of Retention Behavior of Alkyl Benzenes by Hydrophobicity Parameters in Reversed-Phase Column

Chang Young Lee, Myung-Yong Park* and Yong Moon Lee*[#]

Department of System Management Engineering, Dongseo University, Pusan 617-716, Korea

*College of Pharmacy, Chungbuk National University, Chongju 361-763, Korea

Abstract — The retention of solutes in reversed-phase high-performance liquid chromatography depends on their hydrophobicity. Although the retention behaviors of alkyl benzenes have been reported so far, quite a few authors have mentioned the retention behavior of alkyl benzenes with plural hydrophobicity parameters. In this sense, we were interested in the retention behaviors of alkyl benzenes having benzene moiety and increasing alkyl chain. In this study, we therefore investigated the retention behavior of alkyl benzenes in reversed-phase high-performance liquid chromatography in order to obtain information concerning the effects of the aromatic moiety and the carbon chain on the retention mechanism by comparing their capacity factor (k') in relation to the carbon chain length. The eluent acetonitrile (CH_3CN) showed high selectivity on alkyl benzenes, showing the high difference of capacity factor ($\Delta \log k'$) between toluene and octyl benzene. Indeed, the $\Delta \log k'$ of 80% CH_3CN represented 1.42- and 4.25-times longer than 90% MeOH and 60% THF, respectively. The hydrophobicity parameters, van der Waals volume, bond constant, partition constant, π -energy effect and enthalpy were evaluated with the capacity factor (k') of alkyl benzenes eluted on 80% CH_3CN , 90% MeOH and 60% THF, respectively. The best eluent for predicting retention behavior of alkyl benzenes was 90% MeOH (R^2 0.999). The three parameters, van der Waals volume, bond constant and partition constant were well coincident to $\log k'$ by increasing alkyl benzenes. However, π -energy effect and enthalpy were severely disagreeable. Taken together, van der Waals volume, bond constant and partition constant were a reliable parameters to predict the retention behaviors of alkyl benzenes on reversed-phase column.

Keywords □ retention behavior, alkyl benzene, hydrophobicity, reversed-phase, HPLC

역상 액체크로마토그래피(RP-HPLC)에 있어서 목적성분의 용출거동을 예측하는 것은 분리분석에서 중요한 이슈 중의 하나이다. 그 이유는 혼합물중의 목적성분의 분석결과가 이미 문헌 중에 발표되어 있다 하더라도, 전처리 조작, 분리기기의 특성, 고정상의 특성 등에 의하여 미묘한 편차를 가져오기 때문에 실제로 기존의 분석결과가 참고가 되는 경우는 많지 않다. 현재까지 역상 크로마토그래피에서 보다 정확한 예측 값을 얻기 위하여 반데르발스 체적(VWV), 결합정수(X), 분배정수($\log P$), π -에너지효과(π) 및 엔탈피($-\Delta H$) 등의 파라미터가 연구되어 왔다.

일반적으로, 크로마토그래피 분리는 고정상과 용질 및 이동상과 용질, 그리고 고정상과 이동상간의 상호작용에 의해서 이루어진다. 이러한 상호작용에 영향을 미치는 화학적 인자(이동상의 종류 및 조성비 등)와 물리적 인자(컬럼 온도, 고정상의 길이, pH, 밀도, 표면적, 공극면적, monomeric/polymeric coatings 등)는 용출거동에 영향을 미치며, 그 중요성에 대한 많은 선행 연구가 보고되었다.¹⁻⁶⁾

그러나, 상기 인자들을 이용한 용출거동의 예측이 서로 다른 타입의 혼합물에 적용하기에 한계가 있으므로, 보다 적합한 예측값을 얻기 위하여 VWV, π -에너지효과, 수소결합에너지 효과, 해리상수 등을 이용한 예측 값에 대한 연구가 진행되어 왔다.⁷⁻⁹⁾

반데르발스 체적(VWV)은 각 구성원소의 반데르 발스 반경(r)을 가지고 계산한 분자전체의 체적을 나타낸다. 결합정수(X)는

[#]본 논문에 관한 문의는 저자에게로
(전화) 043-261-2825 (팩스) 043-268-2732
(E-mail) ymleefn@cgnu.ac.kr

소수성 분자가 물에 들어갔을 때 필요한 에너지를 나타내며, 옥탄올과 물에서의 용질의 소수성을 나타내는 분배정수(log P)와 함께 소수성을 나타낸다. π -에너지효과 (π)는 일정한 크기의 알칸의 용출시간과 동일한 분자체적을 갖는 다환방향족 화합물간의 용출시간의 차이를 나타낸다. RP-HPLC에서의 엔탈피(- ΔH)는 분자의 고체표면에 대한 흡착 정도를 나타내는 척도로 표현한다.

본 연구는 소수성을 대표하는 파라미터의 개념을 RP-HPLC에 도입하여 알킬벤젠의 용출거동의 예측을 시도함으로써 이들 화합물과 유사구조를 갖는 의약품 및 그 대사물에 대한 용출거동을 예측하는 데 적용하고자 한다.

이에 저자는 Bondi¹⁰⁾의 식에 의하여 얻은 VVV값과 Hanai¹¹⁾에 의하여 산출된 값을 이용하여 방향족 특성과 측쇄를 갖는 알킬벤젠류에서 측쇄의 길이를 연장하여 분자크기를 증대시킬때의 용출거동 예측에 어떠한 파라미터가 유용한지 검토하였다.

Hildebrand의 solubility parameter(δ)는 액체분자의 응집에너지(E)와 분자용적(V)에 의한 값으로, $\delta=(E/V)^{1/2}$ 로 나타내며 δ 값이 클수록 극성이 강한 용매이다.¹²⁾

Kazuyo M. Okamura는 binary organic/aqueous system에서 용매의 조성비율이 서로 다른 이동상에서 동일한 용출력을 얻기 위한 이론적인 δ 값을 구하였다.

$$\delta = \Phi_a \delta_a + \Phi_b \delta_b$$

Φ_a, Φ_b : Volume fraction of solvents A and B

δ_a, δ_b : Solubility parameter of pure solvents A and B

저자가 본 실험에 도입한 각 용매조성의 변화에 대한 δ 값은 주어진 식에 의하여 계산된 평균값으로 메탄올(MeOH), 아세트니트릴(CH_3CN), 테트라히드로퓨란(THF)에서 이론치를 계산하였다(Table I). 본 논문에서는 이론적 δ 치와 실험적으로 일치하는 화합물군의 VVV의 범위를 정하였고, 이론적으로 동일하 δ 치에서의 3가지 용매의 용출력의 특성 비교하였다.

실험방법

시약 및 기기

알킬벤젠인 톨루엔(Junsei, Japan) 및 에틸벤젠(Junsei, Japan)

은 일급시약을 구하여 사용하였고, 프로필벤젠, 부틸벤젠, 헥실벤젠, 헵틸벤젠, 옥틸벤젠, 노닐벤젠 및 데실벤젠은 Tokyo Casei, (Japan)사에서, 이소프로필벤젠 (BDH사)을 구입하여 사용하였다. 사용한 유기용매는 모두 HPLC grade의 메탄올(Fisher), 아세트니트릴(Merck Co), 테트라히드로퓨란(Fisher)을 사용하였다.

시료의 무게는 H2O balance(Mettler)를 사용하여 달았으며, 혼합용액의 조제는 Mili-Q증류수 제조기에 의해 제조된 증류수를 사용하였고, filtration kit(Altech)에 진공펌프를 연결해 용리액을 filtration하였다. 고속액체크로마토그래피에 사용되는 이동상용매를 사용 전에 초음파 세척기에서 5분 동안 탈기조작을 행하였다.

HPLC system은 L-4200 UV-VIS detector, L-6200 intelligent pump, 655A-52 column oven, D-2500 Chromato-integrator로 이루어진 Hitachi(Japan) LC modules을 사용하였으며, 컬럼은 Cosmosil packed column 5C18(4.6 mm I.D.×150 mm L) Nacalai Tesque사 제품을 사용하였다.

알킬벤젠류의 조제

톨루엔, 에틸벤젠, 이소프로필벤젠, 프로필벤젠, 부틸벤젠, 헥실벤젠, 헵틸벤젠, 옥틸벤젠, 노닐벤젠 및 데실벤젠의 10개의 알킬벤젠을 각각 10 μ 씩 취하여 3 ml의 THF에 녹여 각각의 test sample을 조제하였고, 10개 알킬벤젠의 혼합시료는 각각의 시료를 10 μ 씩 다시 취하여 합하고 THF를 가하여 최종부피가 3 ml이 되도록 조제하여 혼합시험액으로 사용하였다.

HPLC에 의한 분리

이동상 용매의 조성비율은 Hildebrand solubility parameter(δ)의 값이 동일하도록 계산한 결과, 90% MeOH($\delta=13.71$), 80% CH_3CN ($\delta=13.64$) 그리고 60% THF($\delta=13.86$)의 조성에서 이동상의 용출력이 거의 유사함을 알 수 있었다. 따라서 상기의 3가지 유기용매 혼합용리액을 이동상으로 하여 각각의 알킬벤젠류의 측쇄길이에 따른 용출패턴을 기록하였다. 측정할 HPLC조건은 유속 1.0 ml/min, 컬럼 온도 30°C, 주입량 20 μ l, 검출기의 검출과장 210 nm(THF의 경우 229 nm)로 고정하여 측정하였으며, 용매 THF를 t_0 값(void volume)측정을 위해 사용하였다.

이동상의 선택성 평가

동일한 용출력을 갖는 90% MeOH($\delta=13.71$), 80% CH_3CN

Table I – Eluents composition and calculated δ values

MeOH/H ₂ O	δ value	CH ₃ CN/H ₂ O	δ value	THF/H ₂ O	δ value
100% MeOH	12.90	100% CH ₃ CN	11.80	75% THF	12.08
90% MeOH	13.71	90% CH ₃ CN	12.72	70% THF	12.67
80% MeOH	14.52	80% CH ₃ CN	13.64	60% THF	13.86
70% MeOH	15.33	70% CH ₃ CN	14.56	50% THF	15.05
60% MeOH	16.40	60% CH ₃ CN	15.48	40% THF	16.24

($\delta=13.64$) 그리고 60% THF($\delta=13.86$)의 조성에서 이동상의 선택성은 크기가 작은 톨루엔과 크기가 큰 옥틸벤젠간의 $\log k'$ 값의 차이가 크기로 평가하였다. 주어진 이동상에 대하여 각 파라미터의 적합성은 직선식에서 얻은 R^2 값으로 평가하였다.

실험결과 및 고찰

실험에 사용한 알킬벤젠은 고정된 벤젠고리 크기에 알킬 사슬의 길이를 늘이면 소수성이 증가한다. 알킬벤젠 화합물은 소수성이 증가함에 따라 각각의 소수성 파라미터, 반데르발스 체적(VWV), 결합정수(X), 분배정수(log P), π -에너지효과(π) 및 엔탈피(- ΔH)의 값이 증가하였다(Table II). 각 알킬벤젠의 역상 컬럼에서의 머무름 시간($\log k'$)을 서로 다른 소수성 파라미터 값과 비교하여 알킬벤젠의 소수성의 증가와 소수성 파라미터 값을 도식하여 나타내었다(Fig. 1).

Table II – Alkyl benzenes and hydrophobicity parameters

Alkyl benzenes	VWV	X	log P	π	$-\Delta H$
Toluene	59.51	2.411	2.588	2.303	1.658
Ethyl benzene	69.74	2.971	3.118	2.752	1.794
Isopropyl benzene	77.02	3.354	3.525	2.878	1.906
Propyl benzene	79.97	3.471	3.648	2.927	2.053
Butyl benzene	90.20	3.971	4.178	3.092	2.331
Hexyl benzene	110.66	4.971	5.238	3.336	2.797
Heptyl benzene	120.89	5.471	5.768	3.385	3.200
Octyl benzene	131.12	5.971	6.297	3.478	3.673
Nonyl benzene	141.35	6.471	6.828	3.453	*
Decyl benzene	151.58	6.971	7.358	3.655	*

*Not defined.

VWV에 의한 용출 예측

이동상의 선택성을 잘 나타내는 파라미터를 얻기 위하여 VWV와 $\log k'$ 를 도식한 결과, 90% MeOH에서의 톨루엔과 옥틸벤젠간의 $\log k'$ 값의 차이($\Delta \log k'$)는 0.960, 80% CH_3CN 은 1.360 그

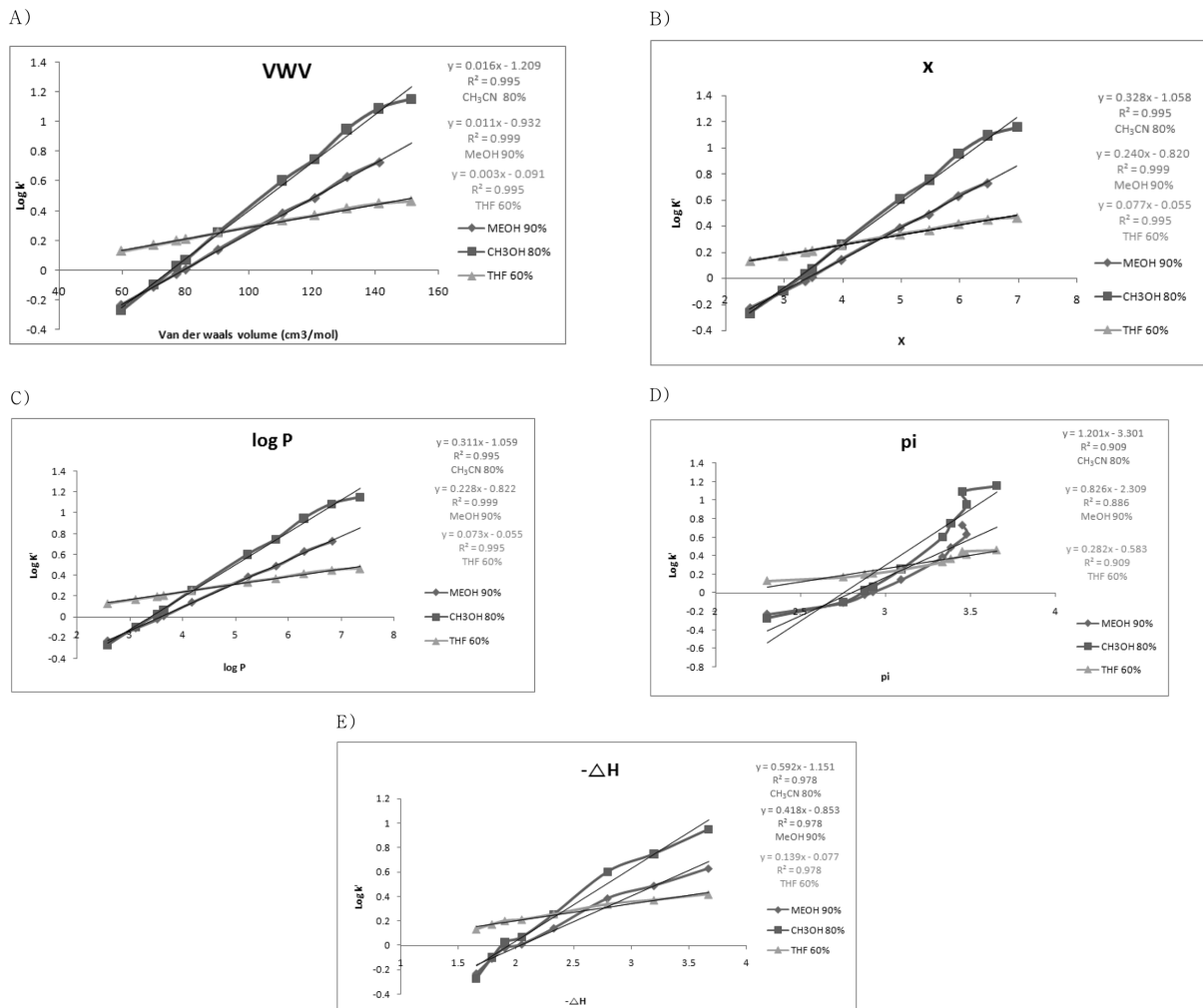


Fig. 1 – Evaluation of five hydrophobicity parameters in relation to the capacity factor ($\log k'$) of alkyl benzenes in reversed-phase HPLC column. A) van der Waals volume (VWV) B) bond constant (X) C) partition constant (log P) D) π -energy effect (π) E) enthalpy ($-\Delta H$).

리고 60% THF에서 0.320로 산출되었다. 즉 알킬벤젠에 대한 이동상의 선택성은 80% CH₃CN에서 90% MeOH의 1.42배, 60% THF의 4.25배 높은 선택성을 나타내었다(Fig. 1A). 따라서 80% CH₃CN에서 알킬벤젠 화합물간의 분리능이 최대가 됨을 알 수 있었다.

VWV에 대한 용출예측 적합성을 평가하기 위하여 각 용매조건에 따른 알킬벤젠의 log k'와 알킬벤젠의 계산된 VWV값과의 상관성을 나타내는 직선의 R²값을 상호 비교하였다. 그 결과, 90% MeOH(0.999), 80% CH₃CN(R² 0.995) 그리고 60% THF(R² 0.995)와 같이 세가지 용리액 모두 양호한 용출예측 적합성을 나타내었다.

결합정수(X)에 의한 용출 예측

수용액에 녹기 위하여 필요한 에너지 값을 나타내는 소수성 파라미터인 결합정수(X)와 알킬벤젠의 log k'값을 도식하였다(Fig. 1B). 결합정수 X는 알킬사슬내의 탄소수 또는 탄소의 밀도를 량적으로 나타내는 척도이며, 결합밀도지수(connectivity index)라고도 한다. 세가지 용매에서의 직선성은 90% MeOH(R² 0.999), 80% CH₃CN(R² 0.995) 그리고 60% THF(R² 0.995)로 VWV에서와 동일한 값을 나타내었다. 따라서 VWV 및 결합정수(X)는 적용하는 소수성의 의미는 다르나 역상 HPLC에서의 알킬벤젠류의 용출거동에서는 동일한 파라미터로 사용할 수 있음을 알 수 있었다. 세가지 용리액 모두 양호한 용출예측 적합성을 나타내었다.

분배정수(log P)에 의한 용출 예측

분배정수(log P)는 오랫동안 역상 HPLC에서 유기화합물의 용출예측에 사용되어 왔다. 알킬벤젠류를 사용하여 검토한 결과, 예상대로 세가지 용매에서의 log k'와의 직선성은 90% MeOH(R² 0.999), 80% CH₃CN(R² 0.995) 그리고 60% THF(R² 0.995)로 VWV와 결합정수(X)에서와 동일한 값을 나타내었다(Fig. 1C). 동일한 δ값을 나타내는 세가지 용매조건에서도 실제 용출력의 세기는 THF>CH₃CN>MeOH 순이었으며, 용출예측 상관성(MeOH>CH₃CN=THF)은 미세하나마 용출력의 세기와 반비례함을 알 수 있었다. 따라서 알킬벤젠 화합물의 용출거동 예측에 적합한 소수성 파라미터는 VWV, X 및 log P를 동일하게 사용할 수 있음을 알 수 있었다. 그러나, 분자크기가 가장 큰 테실벤젠의 경우, 80% CH₃CN에서 모든 소수성 파라미터 VWV, X 및 log P값과 용출거동에서 크게 편차를 나타내기 시작하는 것을 알 수 있었다(Fig. 1A, B, C). 이는 용출력이 센 용매 60% THF에서는 나타나지 않으므로, 테실벤젠보다 소수성이 큰 분자의 경우 MeOH이나 CH₃CN보다는 오히려 THF에서 용출 적합성을 나타낼 가능성을 시사한다.

흥미있게도 모든 소수성 파라미터 VWV, X 및 log P값에서, 90% MeOH과 80% CH₃CN의 log k'값은 에틸벤젠보다 큰 소수

성 화합물부터 차이를 나타내기 시작하였다. 90% MeOH과 80% CH₃CN의 조건과 60% THF에서의 log k'값의 반전은 부틸벤젠과 헥실벤젠 크기 사이에서 나타나기 시작하였다.

π-에너지효과(π)에 의한 용출 예측

π-결합의 유무에 따른 소수성의 차이를 나타내는 π-에너지효과를 알킬벤젠의 용출 예측에 대입해보았다(Fig. 1D). 용출예측 적합성을 R²값으로 비교한 결과, 90% MeOH(R² 0.886), 80% CH₃CN(R² 0.909) 그리고 60% THF(R² 0.909)으로 나타나, 소수성 파라미터 VWV, X 및 log P에서 얻은 값과 큰 차이를 나타내었다. 즉 π-에너지효과는 π-결합을 갖는 벤젠고리를 고정하고 알킬벤젠의 사슬길이만을 변화시킬 경우에는 용출예측에 상당히 큰 편차를 가져옴을 알 수 있었다. 특히 에틸벤젠이하의 저분자와 옥틸벤젠 이상의 고분자군은 용출 예측이 불가능할 정도로 심하게 직선성에서 이탈함을 알 수 있었다.

엔탈피(-ΔH)에 의한 용출 예측

역상 컬럼의 고정상에 대한 친화성을 나타내는 파라미터로 엔탈피(-ΔH)를 사용하여 알킬벤젠의 용출 예측에 대입해보았다(Fig. 1E). R²값으로 용출 예측을 비교한 결과, 90% MeOH, 80% CH₃CN 그리고 60% THF에서 R² 0.978로 계산되었다. 이 값은 π-에너지효과로 계산한 예측치보다 높으나, 알킬벤젠의 용출 예측에는 다른 소수성 파라미터 VWV, X 및 log P를 사용하는 것이 신뢰도가 높았다. 그 이유는 용질의 고정상의 친화력은 일반적으로 어느정도 일정한 크기가 필요한 만큼, 일정한 분자크기를 요구한다. 실제, 프로필벤젠보다 크기가 작은 알킬벤젠에서는 엔탈피의 크기가 용출거동 예측값에서 점차 낮아지는 것을 알 수 있었다.

이상에서와 같이 5개의 소수성을 나타내는 파라미터와 알킬벤젠의 사슬길이의 변화에 따른 용출예측을 시도하였다. 동일한 Hildebrand의 solubility parameter(δ)를 갖도록 조제한 3종류의 용매에서, 알킬벤젠에 대한 이동상의 선택성은 80% CH₃CN에서 가장 높은 선택성을 나타내었다. VWV, X 및 log P값은 π나 -ΔH 값과 비교할 때, 10종류의 알킬벤젠의 소수성에 근거한 용출예측을 정확하게 할 수 있음을 알 수 있었다. 그러나 π의 경우, 용출예측도가 검토한 소수성 파라미터중에서 가장 낮았다. 만일 용출력이 우수한 THF를 사용한다면 용출예측성이 향상될 수 있음을 알 수 있었다. 반면, -ΔH 값은 VWV, X 및 log P값보다는 떨어지나 어느 정도 예측가능하다고 할 수 있었다. 그러나, 저분자에서 예측하기 어려운 점으로 보아 실제 역상 크로마토그래피에서의 용출 예측 파라미터로는 적합하지 않았다. 특히, π-에너지효과(π)와 엔탈피(-ΔH)는 컬럼온도의 미세한 변화에도 민감하여 용출 예측 값에 편차가 커지는 게 아닌가 생각한다. 또한 탄소수가 큰 노닐벤젠과 테실벤젠은 탄소수 18개인 역상고정상에서 예측치와 큰 편차를 나타내었다. 따라서 이론적으로 고정

상의 탄소수를 18개 이상으로 늘려보면 본 예측 파라미터와 일치되는 조건도 찾을 수도 있으나, 일반적으로 시판 고정상이 탄소수 18개가 최대이므로 본 연구에서는 검토하지 않았다.

한편, 동일한 용해도 파라미터값을 가지는 세 가지 용매에 대해서 $\log k'$ 의 변화를 보이는 이유는 화합물의 용출거동이 용해도 파라미터뿐만 아니라 시료, 고정상, 이동상 상호간의 수소 결합 능력이나 electron donor 또는 acceptor 특성에 의해서 영향을 받기 때문이다.

이상의 용해도 파라미터를 도입한 용출력의 세기를 조사한 결과로서 볼 때에 실험에 사용된 알킬벤젠류 가운데는 중간 정도의 소수성을 갖는 범위에서 이론치와 실험치가 일치한 반면, 그 밖의 범위에서는 약간의 차이를 보였다.

결 론

알킬벤젠류에 대한 용출거동 예측을 반데르발스 체적(VWV), 결합정수(X) 및 분배정수(log P)를 사용하여 예측할 수 있었다. CH_3CN 은 온도변화에 의한 상대적 $\log k'$ 의 변화가 적어 반데르발스 체적(VWV), 결합정수(X) 및 분배정수(log P)에 의한 $\log k'$ 예측에 MeOH, THF보다 적용범위가 넓고 R^2 값이 높아 최적의 용매임을 알 수 있었다. 용해도 파라미터 δ 의 적용범위는 THF와 CH_3CN 을 비교할 경우에 VWV가 알킬벤젠에서 90.20~120.89 범위에서 이론치와 실험치가 일치하며, MeOH와 CH_3CN 을 비교할 경우에 δ 치가 알킬벤젠인 경우에 14.5(80% MeOH, 70% CH_3CN)를 전후해서 이 point 이하에서는 MeOH의 용출력이 세며 그 이상에서는 CH_3CN 의 용출력이 세게 나타났다. π -에너지효과와 엔탈피의 효과가 소수성 알킬벤젠의 용출 거동 예측에 실패한 이유로는 1) 온도변화에 민감한 점 2) 실험에 사용한 알킬벤젠의 소수성 증가가 사슬의 길이에만 의존한 점 3) 엔탈피의 효과가 작은분자에서는 편차가 커지는 점등을 열거할 수 있다. π -에너지의 $\log k'$ 에 미치는 영향은 분자크기가 큰 알킬벤젠에서는 역비례 관계가 나타났으며, π -에너지 효과는 분자량이 큰 물질에서 더욱 크게 나타나고, 불포화도가 적은 물질이 불포화도가 많은 물질보다 크게 나타났다. 본 연구결과를 활용하면 의약품에서 일차적으로 가장 많이 나타나는 cytochrome P450에 의한 산화물, 즉 aromatic hydroxylation 과정(또는 epoxidation 과정) 및 지방족 사슬에서 일어나는 hydroxylation(-OH) 반응 대사체들에 대하여 예상할 수 있는 대사체 구조에 대한 이론적 VWV를 산출할 수 있으며, 예상 대사체의 용출거동을 예측을 용이하게 할 수 있을 것이다.

감사의 말씀

이 논문은 2007학년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구

비지원에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Sentell, K. B. and Dorsey, J. G. : Retention mechanism in reversed-phase chromatography stationary phase bonding density and solute selectivity. *J. Chromatogr.* **461**, 193 (1989).
- 2) Jinno, K. and Ibuki, T. : Retention behavior of large polycyclic aromatic hydrocarbons in reversed-phase liquid chromatography on a polymeric octadecylsilica stationary phase. *J. Chromatogr.* **461**, 207 (1989).
- 3) Tanaka, N., Sakagami, K. and Araki M. : Effect of alkyl chain length of the stationary phase on retention of selectivity in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **199**, 327 (1980).
- 4) Hanai, T. : Chromatography and computational chemical analysis for drug discovery. *Curr. Med. Chem.* **12**, 501 (2005).
- 5) Esters, V., Angenot, L., Brand, V., Frdrich, M., Tits, M., Van Nerum, C., Wauters, J. N. and Hubert, P. : Validation of a high-performance thin-layer chromatography/densitometry method for the quantitative determination of glucosamine in a herbal dietary supplement. *J. Chromatogr. A.* **21**, 156 (2006).
- 6) Karthikeyan, K., Saravanan, R., Rajeswari, R. and Chandrasekara Pillai, K. : Validation of single isocratic HPLC method for the assay of valdecoxib and determination of metaisomer impurity. *J. Chromatogr. Sci.* **47**, 309 (2009).
- 7) Hanai, T., Jukurogi, A. and Hubert, J. : Retention vs van der Waals volume, pi-energy in liquid chromatography. *Chromatographia* **19**, 266 (1984).
- 8) Hanai, T. and Hubert, J. : Retention vs van der Waals volume, pi-energy and hydrogen bonding energy effect and enthalpy in liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **290**, 197 (1984).
- 9) Melander, W., Campbell, D. E. and Horvath, C. : Enthalpy entropy compensation in reversed-phase liquid chromatography. *J. Chromatogr.* **158**, 215 (1978).
- 10) Bondi, A. : Van der Waals volume and radii. *Physical Chemistry* **68**, 441 (1964).
- 11) Hanai, T. and Hubert, J. : Dependence of the retention of phenols upon van der Waals volume, pi-energy and hydrogen bonding energy effects. *J. Chromatogr.* **302**, 89 (1984).
- 12) Yamamoto, F. and Rokushika, S. : Solubility parameter treatment for the characterization of the stationary phase in the reversed-phase chromatography of benzene derivatives. *J. Chromatogr.* **515**, 3 (1990).