薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
102 (10) 923-934 (1982)

紫外線照射によるサイロキシンの光分解に関する研究¹⁾: ガスクロマト
グラフィー-マススペクトロメーターによる分解生成物の同定²⁾

小屋佐久次,^{*,a} 松浦健二,^b 久保田英次^b

群馬大学内分泌研究所薬学研究部,^a 日本電子株式会社^b

Studies on the Photodegradation of Thyroxine with Ultraviolet-light
Irradiation¹⁾: Identification of Degraded Products with
Gaschromatograph-Mass Spectrometer²⁾

SAKUJI KOYA,^{*,a} KENJI MATSUURA,^b and EIJI KUBOTA^b

Department of Pharmaceutical Chemistry, Institute of Endocrinology, Gunma
University,^a 3-39-15, Showa-machi, Maebashi, 371, Japan and JEOL
Ltd.,^b 1418, Nakagami-cho, Akishima, Tokyo, 196, Japan

(Received February 15, 1982)

Identification of photodegraded products of L-thyroxine (T₄) suffering ultraviolet-(UV)-light irradiation (sterilization lamp 20 W, $\lambda_{\max}$ 253.7 nm, radiation distance 40 cm) was carried out by gas chromatograph-mass spectrometer (GC-MS). *N,O*-Bis(trifluoroacetyl)methyl ester derivatives of authentic T₄ and its related compounds and UV-light irradiated T₄ samples were analyzed by GC-MS (JEOL JMS-D300 GC-MS and JEOL JMA-2000 Data Analysis System). Gas chromatography was carried out with a 1 m×2 mm column packed with 3% OV-17 and the temperature was programmed from 100°C to 300°C with 10°C/MIN. Mass spectrometry was performed by electron impact ionization method at 70 eV.

M⁺ was found to be measured in all compounds except L-tyrosine (Tyr) and the base peaks were shown at (M-113)⁺ for T₄, L-3,5,3'-triiodothyronine (T₃), L-diiodotyrosine (DIT), L-monoiodotyrosine (MIT), and at (M-184)⁺ for L-3,3',5'-triiodothyronine (3,3',5'-T₃), L-3,5-diiodothyronine (T₂), L-3,3'-diiodothyronine (3,3'-T₂), L-3',5'-diiodothyronine (3',5'-T₂), L-3-monoiodothyronine HCl·H₂O (3-T₁), L-3'-monoiodothyronine (3'-T₁), L-thyronine (T), Tyr. Individual derivatives gave single symmetrical peaks without tailing on their mass chromatograms. From the results of authentic compounds and of UV-light irradiated samples in mass spectra and mass chromatogram, T₃, 3,3',5'-T₃, T₂, 3,3'-T₂, 3',5'-T₂, 3-T₁, 3'-T₁, T, DIT, MIT, and Tyr were identified as photodegraded compounds of UV irradiated thyroxine.

We confirmed the degraded processes of thyroxine caused by UV-light irradiation. That is, the photodegradation liberated iodine at the first step and then cleaved the ether bond in the molecule, and finally caused the liberation of α -phenyl ring on our experiment.

Keywords—thyroxine; iodothyronine; iodotyrosine; ultraviolet-light; photodegradation; gas chromatograph-mass spectrometer; *N,O*-bistrifluoroacetyl methyl ester derivative

甲状腺ホルモンおよびその関連物質は紫外線照射によって光分解を起こし、脱ヨード、エーテル結合の開裂、そして、 α -芳香環の遊離、これらの現象が引続いて起こる結果、サイロキシンは Chart 1 に示すような経路をへて分解が進行すると考えられることは既に報告した。¹⁾ しかし、この結論は、紫外部吸収 (UV) スペクトルおよび赤外線吸収 (IR) スペクトルの測定、各種クロマトグラフィーによる結果から得られたものであって、分解生成物の直接的な同定によるものではなかった。従って、これらの紫外線照射分解生成物を直接的に確認するために、ガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー (GC-MS) の実験を行った。

甲状腺ホルモンおよびその関連物質のガスクロマトグラフィー (GC) に関しては数多くの報告があるが、GC-MS についての報告は少い。著者らは、報告例の多い *N,O*-bis(trimethylsilyl)acetamide (BSA) による tri-

Chart 1. Scheme of Ultraviolet-light Photodegradation of Thyroxine

methylsilyl (TMS) 誘導体について検討したが良い結果が得られなかったので、Richards ら³⁾ の *N,O*-bis(trifluoroacetyl) methyl ester (TFA-ME) 誘導体法を用い、電子衝撃イオン化法にてマスペクトルの測定を行うこととした。関連物質であるジョードチロシンについても、サイロキシンと同様の実験を行って比較検討した。

実 験 の 部

1. 甲状腺ホルモンおよびその関連物質 L-Thyroxine (T_4) (Sigma Ltd.), L-3,5,3'-triiodothyronine (T_3) (Sigma Ltd.), L-3,3',5'-triiodothyronine (3,3',5'- T_3) (Henning Berlin GMBH), L-3,5-diiodothyronine (T_2) (Sigma Ltd.), L-3,3'-diiodothyronine (3,3'- T_2) (Henning Berlin GMBH), L-3',5'-diiodothyronine (3',5'- T_2) (Henning Berlin GMBH), L-3-monoiodothyronine HCl·H₂O (3- T_1) (Henning Berlin GMBH), L-3'-monoiodothyronine (3'- T_1) (Henning Berlin GMBH), L-thyronine (T) (Sigma Ltd.), L-diiodotyrosine (DIT) (Sigma Ltd.), L-monoiodotyrosine (MIT) (Sigma Ltd.), L-tyrosine (Tyr) (Sigma Ltd.), L-serine (Ser) (味の素 K.K.), L-alanine (Ala) (味の素 K.K.), L-glycine (Glg) (味の素 K.K.).

試薬 MeOH (HPLC 用・東京化成 K.K.), dichlormethane (HPLC 用・東京化成 K.K.), 乾燥 HCl ガス (巴商会), dimethylformamide (Pierce 社), trifluoroacetic anhydride (ガスクロ工業 K.K.), methyl stearate (東京化成 K.K.).

紫外線 (UV) 照射 紫外線光源としては殺菌ランプ (東芝 20 W· $\lambda_{\max}$ 253.7 nm) を用いた。試料は石英のミクロ試験管 (5 mm ϕ) に入れ、暗箱の中で照射した。その際の紫外線のエネルギーは 22 erg/s/mm² である。

測定装置 日本電子 JMS-D 300 ガスクロマトグラフ・マスペクトロメーターおよび日本電子 JMA-2000 コンピューター・データシステムを使用した。

実験方法

1. サイロキシンおよびジヨードチロシン溶液の紫外線照射 T_4 および DIT をそれぞれ 2 mg 秤量し, AcOEt, MeOH および 4N-NH₄OH の混液 (7:2:1) で 0.1% 濃度に溶解した. この溶液 0.5 ml を石英製のミクロ試験管に入れて栓をし, 照射サンプルとした. これを暗箱に入れ, 距離 40 cm で室温にて紫外線照射を行い, 一定時間毎にサンプルを取り出して共栓褐色試験管に移し, 溶媒を蒸発させたものを GC-MS の測定試料とした.

2. TFA-ME 誘導体の調製 標準物質としての甲状腺ホルモンおよびその関連物質は, それぞれを正確に秤量して EtOH と 0.1N-NH₄OH の混液 (1:1) で 0.1% の濃度に溶解をし, 各 500 μ g を共栓褐色試験管に入れて溶媒を蒸発させた. この標準物質および UV 照射試料の入っている共栓褐色試験管それぞれに対して, 2 ml の HCl-MeOH 溶液 (MeOH に乾燥 HCl ガスを約 10 分間導入して飽和させたもの) を加え, 約 30 分間攪拌しながら室温に放置することによりメチル化を行った. そして, 約 60°C で MeOH を留去した後に trifluoroacetic anhydride 0.1 ml, dichloromethane 0.1 ml, dimethylformamide 0.01 ml を順次加えて室温にて反応させ, 1 時間後にその 1 μ l を GC に注入した. なお, 内部標準物質としては methyl stearate を用い, メチル化後 50 μ g をそれぞれ添加した. サイロキシンおよびジヨードチロシンの TFA-ME 誘導体の構造式は Chart 2 に示した.

UV 照射分解生成物の確認は, 各標準物質の TFA-ME 誘導体のマススペクトルの比較により行い, 特に異性体についてはマスキロマトグラム上の保持時間の対比により定性を行った. これによって同定出来た分解生成物については, それぞれの主なフラグメントイオン ($M-113$)⁺, ($M-184$)⁺ および内部標準物質である methyl stearate の分子イオン m/z 298 のマスキロマトグラムにおけるピーク高比を計算し, 分解生成物の経時変化を観察した.

Chart 2. Chemical Structure of TFA-ME Derivatives of Thyroxine (A) and Diiodotyrosine (B)

3. GC-MS の測定条件 カラム 3% OV-17, gas chrom-Q 80—100 mesh, 1 m $\times$ 2 ϕ ; column temp. 100—300°C (10°C/min); injection temp. 300°C; chamber temp. 240°C; He flow rate 30 ml/min; ionizing energy 70 eV.

4. 検量線の作成 本方法の定量性を確認するため T_4 と DIT の標準物質について, それぞれの溶液から 0.1—5.0 μ g を採取して GC-MS の測定を行い, マスキロマトグラム上の内部標準物質に対するピーク高比を計算して検量線を作成した.

結 果

1. 甲状腺ホルモンおよびその関連物質の標準物質のマススペクトル

各標準物質 TFA-MS 誘導体のマススペクトルを Fig. 1 から Fig. 3 までに示した. T_4 , T_3 , DIT, MIT は, $[M-113(NH_2\cdot CF_3CO)]^+$ が基準ピークを示し, 3,3',5'- T_3 , T_2 , 3,3'- T_2 , 3',5'- T_2 , 3- T_1 , 3'- T_1 , T, Tyr は, $[M-184(\frac{CH\cdot COOCH_3}{NH\cdot CF_3CO})]^+$ が基準ピークである. また, マススペクトルは図示しないが, Ala, Gly では $[M-59(COOCH_3)]^+$ が基準ピークであり, Ser では m/z 138 のフラグメントイオンが基準ピークを示した. M^+ は Tyr と Ser では見られなかったが, T_4 , T_3 , T_2 では強く, 3,3',5'- T_3 , 3,3'- T_2 , 3- T_1 , DIT では弱く, 3',5'- T_2 , 3'- T_1 , T, MIT, Ala, Gly では非常に弱かった.

主なフラグメントイオンの質量数と相対強度は Table I に示した.

2. T_4 と DIT の検量線

T_4 および DIT について, それぞれ 5, 2, 1, 0.2, 0.1 μ g における GC-MS の測定を行い, マスキロマトグラム上の内部標準物質に対するピーク高比の値から作成した検量線が Fig. 4 である. 相関係数は, T_4 0.9924, DIT 0.9981 であって定量性を認めることが出来る. 他の標準物質についての検討は行わなかったが, これらについて

Fig. 1. Mass Spectra of TFA-ME Derivatives of T₄, T₃, 3,3',5'-T₃, and T₂

Fig. 2. Mass Spectra of TFA-ME Derivatives of 3,3'-T₂, 3',5'-T₂, 3-T₁, and 3'-T₁

Fig. 3. Mass Spectra of TFA-ME Derivatives of T, DIT, MIT, and Tyr

TABLE I. Main Fragment Ions and Intensity of TFA-ME Derivatives of Thyroxine and Related Compounds

Compounds	M ⁺		(M-59) ⁺ (M-COOCH ₃) ⁺		(M-113) ⁺ (M-NH ₂ ·TFA) ⁺		(M-184) ⁺ CH·COOCH ₃ ⁺ NH·TFA		(M-210) ⁺ (M-113-TFA) ⁺	
	m/z Intensity		m/z Intensity		m/z Intensity		m/z Intensity		m/z Intensity	
	m/z	Intensity	m/z	Intensity	m/z	Intensity	m/z	Intensity	m/z	Intensity
T ₄	983	322	924	15	870	1000	799	566	773	144
3, 5, 3'-T ₃	857	431	798	16	744	1000	673	739	647	102
3, 3', 5'-T ₃	857	75	798	15	744	721	673	1000	647	63
3, 5-T ₂	731	396	672	20	618	993	547	1000	521	55
3, 3'-T ₂	731	66	672	14	618	552	547	1000	521	34
3', 5'-T ₂	731	16	672	21	618	456	547	1000	521	47
3-T ₁	605	82	546	18	492	445	421	1000	395	4
3'-T ₁	605	22	546	28	492	368	421	1000	395	22
T	479	9	420	—	366	195	295	1000	269	2
DIT	639	95	580	25	526	1000	455	171	429	107
MIT	513	8	454	39	400	1000	329	468	303	36
Tyr	387	—	328	—	274	790	203	1000	177	—
Ser	311	—	252	157	198	51	127	—	101	—
Ala	199	17	140	1000	86	3				
Gly	185	3	126	1000	72	6

Fig. 4. Calibration Curve of Thyroxine (A) and Diiodotyrosine (B)

も定量性のある検量線の作成は可能であると考える。

3. UV 照射試料のマスキンググラム

紫外線照射 T₄ (UV-T₄) および紫外線照射 DIT (UV-DIT) の照射 5 時間における分解生成物の (M-113)⁺ と (M-184)⁺ についてのマスキンググラムを Fig. 5 に示した。得られたピークは、いずれも単一で対称的でありテーリングは見られなかった。このことは紫外線照射 0, 1, 3, 10, 24 時間の試料でも同様であり、UV-DIT でも全く同じであった。UV-T₄ では照射時間の経過と共に T₃, T₂, T₁ とそれぞれの異性体および T, DIT, MIT Tyr の生成を、各標準物質のモニターイオンと保持時間から確認することが出来た。Ser, Ala, Gly については、UV-

Fig. 5. Mass Chromatogram of Thyroxine (A) and Diiodotyrosine (B) UV-light Irradiated for 5h

T₄ および UV-DIT の各照射時間のマスプロマトグラムを詳細に検討したが、これを確認することは出来なかった。

4. 光分解生成物の経時変化

UV-T₄ の各照射時間のマスプロマトグラムから同定した分解生成物について、内部標準物質に対するピーク高比を計算し、それぞれの分解生成物の照射時間に関して図示したのが Fig. 6 である。UV-DIT についても Fig. 7 に示した。

この結果から、T₄ は UV 照射によって 1 時間後に約 1/2 となり、以後次第に減少して 10 時間では極めて少く、24 時間では検出されない。3,5,3'-T₃ および 3,3',5'-T₃ はどちらもかなり高い値で 1 時間後に認められ、3 時間では T₃ はわずかに減少、3,3',5'-T₃ はわずかに増加を示すが、以後は減少して 24 時間では認められない。T₂, 3,3'-T₂, 3',5'-T₂, 3-T₁, 3'-T₁, DIT, MIT は、値の差はあるがいずれも 1 時間後から検出出来て、5 時間までは増加傾向を示し (3,3'-T₂ が最も大きい)、以後 24 時間まで減少していく。DIT は 1 時間から出現して 5 時間まで増加するが、10 時間ですでに認めることが出来なかった。T と Tyr は、T が 1 時間から、Tyr が 3 時間から認められ、以後どちらも 24 時間まで増加傾向を示す。値は T の方が高い。

UV-DIT の結果では、DIT は照射開始と共に次第に減少してゆき、24 時間では非常に低い値となる。MIT は 1 時間で現われ 5 時間まで増加し、以後は減少傾向となるが 24 時間でも認められた。Tyr は 1 時間で認められるが値は非常に低く、以後 24 時間まで徐々に増加して高い値を示した。

考 察

甲状腺ホルモンの GC による測定は、1966 年 Stouffer ら⁴⁾ の報告以来、*N,O*-dipivalyl methyl ester (PV-ME)^{4,5)} TMS⁶⁾ heptafluorobutyl-methyl ester (HFB-ME)⁷⁾ TFA-ME⁸⁾ およびジアゾメタンでのメチル化体⁹⁾等の誘導体を用いての多くの報告がなされている。中でも TMS 誘導体によるものが最も多く、次いで PV-ME 誘導体である。

マススペクトロメトリーの甲状腺ホルモン等への応用は、1966 年 Stouffer ら⁴⁾ が DIT の PV-ME 誘導体の構造をマススペクトルで確認した報告をしているが、GC-MS としては 1974 年 Lawson ら^{6e)} による甲状腺ホルモンおよびヨードサイロニン、そして、これらのアラニン側鎖の酢酸およびプロピオン酸置換体を TMS 誘導体

Fig. 6. Changes in Ratio of UV-light Irradiated Thyroxine and Its Photodegraded Compounds against Internal Standard at Various Irradiation Time

Fig. 7. Changes in Ratio of UV-light Irradiated Diiodotyrosine and Its Photodegraded Compounds against Internal Standard at Various Irradiation Time

として測定した報告と, Hoffenberg ら⁹⁾ の各種誘導体についての報告が最初である. その後は, GC 測定のために調製した誘導体の構造を確認するためにマスペクトルを用いた報告はあるが,^{6f,7a)} GC-MS による測定報告は日置ら,¹⁰⁾ Petersen ら¹¹⁾ のみである.

Lawson ら^{6e)} と日置ら¹⁰⁾ は, TMS 誘導体によって GC-MS の測定を行っており, 各化合物の TMS 誘導体に共通なフラグメントイオンであり, 高い強度を示す m/z 218 を用いて Selected Ion Monitoring (SIM) 法で測定出来ることを強調している. 特に日置ら^{10a)} は, m/z 218 を用いる SIM 法により測定感度が高まると述べている.

TMS 誘導体による検出限界については, Lawson ら^{6e)} は 500 ng 以下の測定は定量性が失われると云っているが, 日置ら^{10a)} は SIM 法で T_4 500 pg, T_3 50 pg, T_2 20 pg, DIT および MIT 10 pg まで可能であると報告している. Petersen ら¹¹⁾ は, HFB-ME 誘導体で T_4 , T_3 , 3,3', 5'- T_3 , T_2 等の測定を行って, (M-213)⁺, (M-284)⁺, (M-410)⁺ のフラグメントイオンが各化合物誘導体に共通して見出されることから, 重水素標識された内部標準物質を用いて (M-213)⁺ の SIM 法を行えば, 1-2 pg での同時測定が出来ると述べている.

Hoffenberg ら⁹⁾ は, TMS, PV-ME, *N,O*-TMS-メチルエステル (TMS-MS), およびパーメチル化など各種誘導体での測定を報告しており, TMS 誘導体では m/z 218 による, TMS-ME では m/z 160 による SIM 法で効果的な測定が出来ると述べている.

著者らは, 最初に報告例の多い TMS 誘導体を検討した. m/z 218 による測定が出来る利点は認められるが, T_4 と T_3 の 100 ng 以下での検出が困難であるとの結果が得られたので, 次に, アミノ酸の GC-MS 測定における誘導体として広く用いられている TFA 誘導体について検討した. Lamkin ら¹²⁾ によれば, アミノ酸の誘導体としては TFA-ME が調製も簡単で揮発性が高く, そのために低温での操作が出来るので試料の熱分解が防げるが, 調製中の損失は *N*-trifluoroacetyl-*n*-butyl ester (TFA-BE) の方が低いと述べている. また, Richards ら⁸⁾ は, T_4 , T_3 , T_2 , DIT, MIT の TFA-ME 誘導体の GC で好結果を報告しているが, Docter ら^{5a)} はクロマト感度が低く, 分析中の分解が起こることを指摘している.

TFA-ME 誘導体の調製は二段階の反応で約 2 時間を要するが, 室温で操作出来るので温度コントロールが容易であり, 調製は比較的簡単である. そして, 収量も良く安定性があり, 再現性も高く, 高質量域での S/N 比が高いので良好な測定を行うことが出来た.

ヨードサイロニンの異性体の測定に関しては, GC では T_3 と 3,3',5'- T_3 を Hansen,^{6a)} Funakoshi ら^{6b)} Heidl ら^{6c)} Bilous ら^{6d)} Petersen ら^{11,7b)} が, T_2 と 3',5'- T_2 については Funakoshi ら^{6b)} が, 3- T_1 と 3'- T_1 および T_2 , 3,3'- T_2 , 3',5'- T_2 については Heidl ら^{6c)} が報告しているが, GC-MS では Petersen ら¹¹⁾ が T_3 と 3,3',5'- T_3 , 日置^{10b,c)} が L- T_2 と DL- T_2 について報告しているのみである.

今回の実験においては、3-T₁と3'-T₁、T₂と3,3'-T₂および3',5'-T₂、T₃と3,3',5'-T₃の各異性体を明確に分離測定することが出来て、TFA-ME 誘導体による本法が、甲状腺ホルモンおよび異性体を含むその関連物質のGC-MSによる分析に極めて有効な方法であることを見出した。即ち、用いたヨードサイロニンおよびヨードチロシンは、マススペクトルにおいて(M-113)⁺あるいは(M-184)⁺のフラグメントイオンが基準ピークを示すか、それに次ぐ高い強度のピークを示し(Table I), Fig. 5に見られるごとくマスクロマトグラムにおいても保持時間の重なるものではなく、確実に分離されていることがわかる。そして、これらの結果からUV照射試料の分析結果において、推定した分解生成物が同定され、それらの経時変化を示したのがFig. 6とFig. 7である。この結果から、紫外線によって脱ヨードやエーテル結合の開裂、そこでα-芳香環の遊離と云う、サイロキシンの光分解の過程が証明されたと云える。

また、著者らが推定した分解生成物の中で、Ser, Ala, Glyを見出すことが出来なかった。光分解によるこれらのアミノ酸の生成量がGC-MSの感度以下であったとも考えられる。Ser¹³⁾およびAla^{13,14)}から紫外線照射によってアンモニアが生成する報告があり、これらのアミノ酸が生成しても直ちに紫外線の影響を受けて、更に光分解が進行するために検出出来なかったものと考えられる。

サイロキシンの分解に伴って生成する化合物T₃と3,3',5'-T₃は1時間ですでに高い値を示し、Tyrを除く他の化合物も値は低いながら1時間後から認められることは、紫外線による分解が極めて短時間に起こることを示している。また、分解生成物のTとTyrが24時間まで増加を示したことは、ヨードの脱離に比して、エーテル結合の開裂やα-芳香環の遊離は進行しがたいものと思われる。

著者らは、サイロキシンの紫外線照射による分解生成物の同定のためにGC-MSを用い、TFA-ME 誘導体によって前報¹⁾において推定した光分解生成物を、異性体を含めてその殆どを同定することが出来、サイロキシンの紫外線による光分解の過程を明らかにした。さらに、極めて微量の生成試料中の甲状腺ホルモンおよびその関連物質の測定においては、TFA-ME 誘導体でSIM法を行えば分析は可能と考えられる。

結 論

1. 紫外線照射によるサイロキシンの光分解生成物の同定をGC-MSにより行った。
2. 甲状腺ホルモンおよびその関連物質の標準物質とサイロニンおよびヨードチロシンの紫外線照射試料について、N,O-bis(trifluoroacetyl)methyl ester 誘導体を調製してGC-MSを行い、各標準物質のマススペクトルからのフラグメントイオンの値とマスクロマトグラムにおける保持時間から、照射試料についての各物質を同定した。この分解生成物のマスクロマトグラム上の内部標準物質に対するピーク高比を求め、分解生成物の経時変化を検討した。
3. サイロキシンの紫外線による光分解生成物として、T₃, 3,3',5'-T₃, T₂, 3,3'-T₂, 3',5'-T₂, 3-T₁, 3'-T₁, T, DIT, MIT, Tyrを、ヨードチロシンの照射試料からはMIT, Tyrを同定した。
4. T₃と3,3',5'-T₃は1時間後に高い値で検出され、以後減少する。T₂, 3,3'-T₂, 3',5'-T₂, 3-T₁, 3'-T₁, DIT, MITは1時間で検出され、5時間まで増加傾向を示して以後減少する。DITは10時間で認められなくなる。Tは1時間から、Tyrは3時間から認められて、以後24時間までいずれも増加傾向であった。
5. これらの結果から、サイロキシンの紫外線による光分解は、ヨードの脱離、エーテル結合の開裂、α-芳香環の遊離が生じてChart 1に示した過程で進行することを証明した。

謝辞 本研究に当り、終始御懇篤なる御指導と本論文の御校閲をいただいた滝川決男教授に心から感謝申し上げます。また、マススペクトロメトリーに関しての御指導をいただいた日本電子株式会社の板垣又丕博士に厚く御礼申し上げます。

引用文献および注

- 1) 小屋佐久次, 薬誌, 93, 717 (1973).
- 2) 小屋佐久次, 滝川決男, 松浦健二, 久保田英次, 日本薬学会第101年会講演要旨集, 1981, p. 170.
- 3) A.H. Richards, W.B. Mason, *Anal. Chem.*, 38, 1751 (1966).
- 4) J.H. Stouffer, P.I. Jaakonmäki, J. Wenger, *Biochim. Biophys. Acta*, 127, 261 (1966).

- 5) a) R. Docter, G. Hennemann, *Clin. Chim. Acta*, **34**, 297 (1971); b) P.I. Jaakomäki, J.E. Stouffer, *J. Gas Chromatogr.*, **5**, 303 (1967); J.E. Stouffer, *J. Chromatogr. Sci.*, **7**, 124 (1969); N.N. Nihei, M.C. Gershengorn, T. Mitsuma, L.R. Stringham, A. Cordy, B. Kunohmy, C.S. Hollander, *Anal. Biochem.*, **43**, 433 (1971); M. Tajuddin, S.G. Elfbaum, *Clin. Chem.*, **19**, 109 (1973).
- 6) a) L.B. Hansen, *Anal. Chem.*, **40**, 1587 (1968); b) K. Funakoshi, H.J. Cahnmann, *Anal. Biochem.*, **27**, 150 (1969); c) B.M.R. Heintz, H.M. Ortner, H. Spitzzy, *J. Chromatogr.*, **60**, 51 (1971); d) R. Bilous and J.J. Windheuser, *J. Pharm. Sci.*, **62**, 274 (1973); e) A.M. Lawson, D.B. Ramsden, P.J. Raw, R. Hoffenberg, *Biomed. Mass Spectromet.*, **1**, 374 (1974); f) G.J. Manius, P. Fallon, R. Tscherne, *Anal. Biochem.*, **87**, 496 (1978); g) E.T. Backer, V.J. Pileggi, *J. Chromatogr.*, **36**, 351 (1968); F. Shahrokhi, C.W. Gehrke, *Anal. Biochem.*, **24**, 281 (1968); N.M. Alexander, R. Sceig, *Anal. Biochem.*, **22**, 187 (1968).
- 7) a) B.A. Petersen, R.N. Hanson, R.W. Giese, B.L. Karger, *J. Chromatogr.*, **126**, 503 (1967); b) B.A. Petersen, R.W. Giese, P.R. Larsen, B.L. Karger, *Clin. Chem.*, **23**, 1389 (1977); c) J.A. Corkill, R.W. Giese, *Anal. Chem.*, **53**, 1667 (1981).
- 8) R.O. Zimmerer, Jr., L.T. Grady, *J. Pharm. Sci.*, **60**, 493 (1971).
- 9) R. Hoffenberg, A.M. Lawson, D.B. Ramsden, P.J. Raw, "Mass Spectrometry in Biochemistry and Medicine," Raven Press, New York, 1974, p. 303.
- 10) a) 日置長夫, 能登康夫, 細島弘行, 高橋誠二, 村田 武, 日本内分泌, **52**, 149 (1976); b) 日置長夫, 日本内分泌, **54**, 1151 (1978); c) 日置長夫, 日本内分泌, **54**, 1157 (1978).
- 11) B.A. Petersen, P. Vouros, *Anal. Chem.*, **49**, 1304 (1977).
- 12) W.W. Lamkin, C.W. Gehrke, *Anal. Chem.*, **37**, 383 (1965).
- 13) T. Pavolini, R. Cultrera, P.G. Pifferi, *Gazz. Chim. Ital.*, **91**, 706 (1961); 中井久徳, 長崎医学会雑誌, **34**, 1249 (1959).
- 14) I. Mandl, A.D. McLaren, *J. Am. Chem. Soc.*, **73**, 1826 (1951).