薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
105 (9) 848-854 (1985)

高速液体クロマトグラフィーによる生体液並びに組織中の
カフェインとジメチルキサンチン類の定量

中澤一治,* 田中晴美

国立武蔵療養所神経センター疾病研究第二部

Determination of Caffeine and Dimethylxanthines in Biological Fluids
and Tissues by High Performance Liquid Chromatography

KAZUHARU NAKAZAWA* and HARUMI TANAKA

Division of Mental Retardation and Birth Defect Research, National Center
for Nervous, Mental and Muscular Disorders, 4-1-1, Ogawa-Higashi-
machi, Kodaira, Tokyo, 187, Japan

(Received March 18, 1985)

Simple, rapid and sensitive methods for separation and quantification of caffeine and/or dimethylxanthines in biological fluids and tissues were developed by high performance liquid chromatography.

A 0.1-ml of the serum was denatured and precipitated with 0.1 ml of acetonitrile. A 0.01-ml of the supernatant was injected into the chromatograph with a reversed-phase Zorbax ODS column and ultraviolet (UV) detector set at 273 nm and 0.01 a.u.f.s. The flow rate of the mobile phase of 0.2 M acetate buffer-acetonitrile (85 : 15, v/v) was 0.5 ml/min. The limit of detection was 0.2 µg/ml for caffeine.

On analyses of biological fluids, caffeine and its metabolites were extracted from 0.2 ml of the plasma or saliva by using 2.5 ml of chloroform-isopropanol solution (75 : 25, v/v). On analyses of tissues, the liver, placenta or fetal cerebrum was homogenated by saline, adjusted to 10% solution, and caffeine and its metabolites were extracted from 0.5 ml of 10% tissue homogenates by using 5.0 ml of chloroform-isopropanol solution. The reversed-phase µBondapak C₁₈ column was used, connected with UV detector set at 280 nm and 0.01 a.u.f.s. The flow rate of mobile phase of 0.005 M acetate buffer-methanol-acetonitrile-tetrahydrofuran (92.5 : 3.0 : 2.8 : 1.7, v/v) was 1.5 ml/min. The limits of detection of caffeine and dimethylxanthines on analyses of biological fluids and tissues were 0.1—0.2 µg/ml and 1.0—2.0 µg/g wet weight, respectively. The practicability and utility of the method were demonstrated in human and rat studies.

Keywords—caffeine; dimethylxanthine; HPLC; serum; plasma; saliva; liver; placenta; fetal cerebrum

緒

言

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いたカフェインの定量法に関しては多数の報告¹⁻⁵⁾がある。放射性同位体を使用した方法^{1,2)}以外はかなり多量の試料を必要とするものが多いが、本実験では迅速かつ簡便で微量の試料を用いたカフェインの定量法について検討をした。

また妊娠時におけるカフェイン摂取による胎児への悪影響が近年指摘されている。⁶⁾ 妊娠時にはカフェイン代謝の低下することが知られており、⁷⁾ 妊婦のカフェイン代謝を把握するためにカフェインを含めその主代謝産物であるジメチルキサンチン類の同時定量法を血液と唾液について検討した。また母体-胎児間の薬物動態を把握することに応用するため、カフェインとジメチルキサンチン類の組織内濃度についての定量法も合わせ検討した。

実 験 の 部

試薬 カフェイン, テオフィリン, テオブロミン (試薬特級), クロロホルム, イソプロパノール, メタノー

ル, アセトニトリル, テトラヒドロフラン (吸収スペクトル用純溶媒) は和光純薬工業株式会社製を使用. 8-クロルテオフィリン (試薬一級), 7-(2-ヒドロキシエチル) テオフィリン (試薬特級) は東京化成工業株式会社製を使用. パラキサンチン, プロキシフィリンはシグマ社製を使用. カフェイン, テオフィリン, パラキサンチン, テオブロミンの標準液はメタノール溶液とし, 少なくとも1ヶ月は室温で安定.

HPLC の装置: 島津高速液体クロマトグラフ LC-3A, 検出器: 島津 SPD-2A 紫外外部吸収検出器, 記録及び積算計: 島津データ処理装置 C-R1A.

分析条件及び定量 1. Zorbax ODS カラムによるカフェインの分析—a) 分析条件: カラム: Zorbax ODS (粒子径 $5\ \mu\text{m}$, $15\ \text{cm} \times 4.6\ \text{mm}$, i.d.), Zorbax ODS 用プレカラム (粒子径 $37\text{--}50\ \mu\text{m}$, $5\ \text{cm} \times 2.1\ \text{mm}$, i.d.) (島津製作所製), 移動相: $0.2\ \text{M}$ 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.0)-アセトニトリル ($85:15$, v/v), 流速, $0.5\ \text{ml/min}$, 圧力: $20\ \text{kg/cm}^2$, 温度: 室温, 検出: 波長 $273\ \text{nm}$, 感度 $0.01\ \text{a.u.f.s.}$, 定量: 内部標準物質に対するピーク面積比より算出.

b) ラット血清中カフェインの定量: ラット血清 $0.1\ \text{ml}$ をポリプロピレン製遠心チューブ ($1.5\ \text{ml}$ 用) に取り, $0.1\ \text{ml}$ のアセトニトリル (内部標準として $5\ \text{mg/l}$ の 8-クロルテオフィリンを含有) を添加し, ボルテックスミキサーにて約 30 秒間混和後, $12800 \times g$ にて 10 分間遠心分離した. 分離後の上清 $0.01\ \text{ml}$ を HPLC に注入, 回収実験はブランク血清にカフェインを $1, 5, 10, 20, 40\ \mu\text{g/ml}$ 添加し, 検量線の作成はカフェインを $0.2, 1, 5, 10, 15, 20, 40\ \mu\text{g/ml}$ 添加し行った.

2. $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ カラムによるカフェインとジメチルキサンチン類の分析—a) 分析条件: カラム: $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ (粒子径 $10\ \mu\text{m}$, $30\ \text{cm} \times 3.9\ \text{mm}$, i.d., ウォーターズ社製), Co: Pell ODS プレカラム (粒子径 $30\text{--}38\ \mu\text{m}$, $7\ \text{cm} \times 2.1\ \text{mm}$, i.d., ワットマン社製), 移動相: $0.005\ \text{M}$ 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0)-メタノール-アセトニトリル-テトラヒドロフラン ($92.5:3.0:2.8:1.7$, v/v), 流速: $1.5\ \text{ml/min}$, 圧力: $105\ \text{kg/cm}^2$, 温度: 室温, 検出: 波長 $280\ \text{nm}$, 感度 $0.01\ \text{a.u.f.s.}$, 定量: 内部標準物質に対するピーク面積比より算出.

b) 血漿, 唾液中カフェインとジメチルキサンチン類の定量: 血漿又は唾液 $0.2\ \text{ml}$ を試験管に取り $0.02\ \text{ml}$ の内部標準液 (7-(2-ヒドロキシエチル) テオフィリン を $0.005\ \text{M}$ 酢酸ナトリウム緩衝液で $50\ \text{mg/l}$ に調製) を添加し, $2.5\ \text{ml}$ のクロロホルム-イソプロパノール ($75:25$, v/v) 混液を加えボルテックスミキサーで 1 分間混和した. 4°C , $1200 \times g$ で 10 分間遠心分離後, $2.0\ \text{ml}$ の有機層を分取, 窒素気流下にて 60°C で蒸発乾固させた. この残留物に $0.2\ \text{ml}$ の $0.005\ \text{M}$ 酢酸ナトリウム緩衝液を加え再溶解し, $0.02\ \text{ml}$ を HPLC に注入, 回収実験はブランク血漿又は唾液を用いて, カフェインとジメチルキサンチン類を 2 及び $10\ \mu\text{g/ml}$ 添加し行った. また検量線の作成はカフェインとジメチルキサンチン類を $0.5, 1, 2, 5, 10, 20\ \mu\text{g/ml}$ 添加し行った.

c) 肝臓, 胎盤, 大脳中のカフェインとジメチルキサンチン類の定量: 各組織を 0.9% 生理食塩水にて 10% ホモジネートとした. ホモジネート溶液 $0.5\ \text{ml}$ に $0.02\ \text{ml}$ の内部標準液 (7-(2-ヒドロキシエチル) テオフィリンを $0.005\ \text{M}$ 酢酸ナトリウム緩衝液で $50\ \text{mg/l}$ に調製. ただし肝臓ホモジネートでは $50\ \text{mg/l}$ のプロキシフィリンを内部標準として使用) を添加し, $5\ \text{ml}$ のクロロホルム-イソプロパノール ($75:25$, v/v) 混液を加え, ボルテックスミキサーで 1 分間混和した. 4°C , $1200 \times g$ で 10 分間遠心分離後, $4\ \text{ml}$ の有機層を分取, 窒素気流下にて 60°C で蒸発乾固した. この残留物に $0.2\ \text{ml}$ の $0.005\ \text{M}$ 酢酸ナトリウム緩衝液を加え再溶解し, $0.02\ \text{ml}$ を HPLC に注入, 回収実験はブランクの組織を用いて, カフェインとジメチルキサンチン類を 2 及び $10\ \mu\text{g/g}$ 添加し行った. また検量線の作成はカフェインとジメチルキサンチン類を $2, 4, 6, 8, 10\ \mu\text{g/g}$ 添加し行った.

結 果 と 考 察

1. Zorbax ODS カラムによるカフェインの分析

Fig. 1 に Zorbax ODS カラムを用いた血清中カフェインの分析チャートを示した. 血清中に夾雑する妨害ピークはなく, $0.2\text{--}40\ \mu\text{g/ml}$ の範囲で良好な直線関係が得られた ($Y=0.190X+0.001$, $r=1.000$, X : カフェイン濃度 ($\mu\text{g/ml}$), Y : 内部標準物質に対するピーク面積比, r : 回帰係数). また回収率は $95.7\text{--}104.0\%$, 変動係数は $0.8\text{--}8.5\%$ と良い結果が得られた (Table I). 検出限界は $0.2\ \mu\text{g/ml}$ であった.

生体液中のカフェインの高感度微量定量に関してはラジオイムノアッセイ,¹⁾ 放射性同位体を用いる方法²⁾ が報告されている. しかしこれらの方法には放射性物質を用いるという不便な点がある. HPLC による血清又は血漿中カフェインの定量法に関しては多くの報告がなされている.³⁻⁵⁾ その多くは $0.1\text{--}1.0\ \text{ml}$ の試料量で除蛋白, 抽出を行い定量している. 本 HPLC 法ではカフェインの代謝産物であるジメチルキサンチン類の定量は血清中の夾雑物質による妨害があるため不可能である. しかし抽出操作を必要とせず迅速に, かつ微量でカフェインの

Fig. 1. Chromatograms on Analysis of Caffeine in Rat Serum

(A), a standard mixture of caffeine and theophylline, each at 5 $\mu\text{g/ml}$, and 8-chlorotheophylline. (B), blank rat serum. (C), rat serum spiked with caffeine and theophylline, each at 10 $\mu\text{g/ml}$, and 8-chlorotheophylline. (D), serum obtained from a rat given 0.04% caffeine solution *ad lib*. The concentration of caffeine in serum was about 3.3 $\mu\text{g/ml}$.

Peaks: 1, theophylline; 2, 8-chlorotheophylline; 3, caffeine.

定量を行うことができるのでラットをはじめとする小動物のカフェインの血中動態の把握に応用できると考える。また近年、諸外国において特に小児科領域で未熟児無呼吸発作の予防、治療としてカフェインを使用する試みもなされており⁸⁾ この方面における血中濃度モニターに有用な方法となると考える。

2. $\mu\text{Bondapak C}_{18}$ カラムによるカフェインとジメチルキサンチン類の分析

Fig. 2 にラット血漿中カフェインとジメチルキサンチン類の分析チャートを示した。ラット血漿中の成分による妨害ピークは認められなかった。Fig. 3 にカフェイン投与後のヒト血漿と唾液及びラットの各組織におけるカフェインとジメチルキサンチン類の分析チャートを示した。ヒト血漿と唾液中には夾雑する妨害ピークは出現しなかったが、ラットの組織ホモジネート溶液にはテオブロミンと夾雑する未知物質があるためテオブロミンについては正確な定量が不可能であった。また肝臓のホモジネートについては、7-(2-ヒドロキシエチル) テオフィリンと同じ保持時間を有する夾雑物質が出現するため、内部標準にはプロキシフィリンを使用した。

Table II に回収率を示した。生体液については 92.5—108.3%⁹⁾ 組織ホモジネートでは 95.0—109.2% の回収結果が得られた。また変動係数については生体液で 2.1—8.4%⁹⁾ 組織ホモジネートで 1.8—11.6% の結果を得た。検出限界は生体液で 0.1—0.2 $\mu\text{g/ml}$ ⁹⁾ 組織ホモジネートで 1—2 $\mu\text{g/g}$ 湿重量であった。検量線については Table III に示したごとく良好な直線関係が得られた。

Table IV にカフェイン投与後のカフェインとジメチルキサンチン類の生体液中並びに組織中濃度の実測値を示した。カフェインをヒト (体重 49—67 kg, $n=6$) に 3 mg/kg 経口投与した。その 3 時間後におけるカフェイン濃度は血漿中で 4.9 $\mu\text{g/ml}$, 唾液中で 4.1 $\mu\text{g/ml}$ であった。またヒトにおけるカフェインの主代謝産物であるパラキサンチンは血漿中で 1.0 $\mu\text{g/ml}$, 唾液中で 0.8 $\mu\text{g/ml}$ であった。0.04% カフェインを飲用した妊娠ラットで

TABLE I. Recovery of Caffeine Added to Rat Serum

Caffeine added ($\mu\text{g/ml}$)	Found ($\mu\text{g/ml}$)	C.V. (%)	Recovery (%)
1.0	0.96	8.5	95.7
5.0	5.13	3.2	102.6
10.0	9.71	0.8	97.1
20.0	20.80	3.1	104.0
40.0	40.83	3.4	102.1

Each value represents the mean for four separate experiments. Coefficient of variation is expressed as C.V. Zorbax ODS column was used in the present experiment.

Fig. 2. Chromatograms on Analyses of Caffeine and Dimethylxanthines in Rat Plasma

(A), a standard mixture of caffeine, theophylline, paraxanthine and theobromine, each at $5 \mu\text{g/ml}$, and 7-(2-hydroxyethyl)theophylline and proxyphylline as internal standard in distilled water. (B), blank rat plasma. (C), rat plasma spiked with a mixture of caffeine and dimethylxanthines, each at $5 \mu\text{g/ml}$. (D), plasma obtained from a rat given 0.04% caffeine solution *ad lib*. The concentrations of caffeine, theophylline, paraxanthine and theobromine were 7.5, 3.0, 3.2 and $4.6 \mu\text{g/ml}$, respectively.

Peaks: 1, theobromine; 2, paraxanthine; 3, theophylline; 4, 7-(2-hydroxyethyl)theophylline; 5, caffeine; 6, proxyphylline.

The unknown peaks are indicated by the arrows.

Fig. 3. Chromatograms on Analyses of Caffeine and Dimethylxanthines in Biological Materials

Plasma (A) and saliva (B) were obtained from a woman at 3 h after oral administration of 3 mg/kg of caffeine. Liver (C), placenta (D) and fetal cerebrum (E) extracts were obtained from a pregnant rat on gestational day 21. The rat was given 0.04% caffeine solution *ad lib*. For the identification of peaks see Fig. 2. The unknown peaks are indicated by the arrows. Dotted lines show the chromatograms of extracts from blank biological materials.

TABLE II. Recoveries of Caffeine and Dimethylxanthines Added to Biological Fluids and Tissues

Added	Caffeine			Theophylline			Paraxanthine			Theobromine								
	Found	μg/ml	%	C.V.	Recovery	%	Found	μg/ml	%	C.V.	Recovery	%	Found	μg/ml	%	C.V.	Recovery	%
μg/ml	μg/ml																	
Biological fluids																		
Human plasma	2.0	1.99	4.8	99.5	1.94	6.5	96.0	1.93	6.6	96.5	1.98	6.7	99.0					
	10.0	9.28	8.3	92.5	10.83	6.5	108.3	9.42	6.6	94.2	10.27	7.0	102.7					
Human saliva	2.0	1.93	4.2	96.5	2.01	4.0	100.6	1.92	4.8	96.0	2.03	5.3	101.4					
	10.0	10.20	8.2	102.0	10.16	2.1	101.6	10.38	2.4	103.8	10.14	3.0	101.4					
Rat plasma	2.0	1.87	5.9	93.5	1.93	2.8	96.5	1.95	3.0	97.5	2.13	8.4	106.5					
	10.0	10.08	2.7	100.8	9.90	2.7	99.0	9.75	3.1	97.5	10.27	5.1	102.7					
Tissues ^{a)}																		
Rat liver	2.0	2.15	10.4	107.4	1.95	8.2	97.7	1.91	8.8	95.5	—	—	—					
	10.0	9.50	6.0	95.0	10.39	2.6	103.9	10.86	3.6	108.6	—	—	—					
Rat placenta	2.0	1.91	5.4	95.3	2.01	5.4	100.7	2.07	2.6	103.3	—	—	—					
	10.0	10.92	3.8	109.2	10.13	2.3	101.3	10.44	2.4	104.4	—	—	—					
Rat fetal cerebrum	2.0	1.99	4.4	99.5	2.08	5.6	104.0	2.18	11.6	109.0	—	—	—					
	10.0	9.83	4.2	98.3	10.39	1.8	103.9	10.44	2.8	104.4	—	—	—					

Each value represents the mean of five or six separate experiments. Coefficient of variation is expressed as C.V.

^{a)} The concentrations of theobromine in tissues could not be determined, because of the interfering peak.

TABLE III. Calibration Curves for Caffeine and Dimethylxanthines in Biological Fluids and Tissues

	Caffeine			Theophylline			Paraxanthine			Theobromine		
	Slope	Inter- cept	<i>r</i>	Slope	Inter- cept	<i>r</i>	Slope	Inter- cept	<i>r</i>	Slope	Inter- cept	<i>r</i>
Biological fluids												
Human plasma	0.206	0.056	1.000	0.249	0.102	0.999	0.157	0.086	0.999	0.254	0.137	0.999
Human saliva	0.206	-0.011	0.999	0.241	0.042	1.000	0.159	0.034	0.999	0.243	0.075	0.999
Rat plasma	0.208	0.108	0.995	0.281	0.044	1.000	0.187	0.033	1.000	0.287	0.048	1.000
Tissues ^{a)}												
Rat liver	0.063	-0.032	0.996	0.069	0.002	0.999	0.037	-0.005	0.999	—	—	—
Rat placenta	0.051	-0.006	0.995	0.068	-0.003	1.000	0.040	-0.010	0.998	—	—	—
Rat fetal cerebrum	0.052	-0.015	0.996	0.067	-0.017	0.999	0.041	-0.023	0.998	—	—	—

Calibration regression lines are $Y = (\text{slope})X + (\text{intercept})$, where X is concentration of each compound ($\mu\text{g/ml}$ or $\mu\text{g/g}$ wet weight) and Y is peak area ratio against the internal standard. r is regression coefficient. Each equation is calculated by the least squares method ($n=5$ or 6). ^{a)} The concentrations of theobromine in tissues could not be accurately determined, because of the interfering peak.

TABLE IV. Concentrations of Caffeine and Dimethylxanthines in Biological Fluids and Tissues after Oral Administration of Caffeine

	Caffeine	Theophylline	Paraxanthine	Theobromine
Human study ^{a)}				
Plasma ($\mu\text{g/ml}$)	4.89 ± 1.33	0.10 ± 0.02	0.98 ± 0.38	0.12 ± 0.06
Saliva ($\mu\text{g/ml}$)	4.08 ± 0.84	trace	0.75 ± 0.26	0.14 ± 0.07
Rat study ^{b)}				
Maternal plasma ($\mu\text{g/ml}$)	6.02 ± 3.86	3.47 ± 0.75	3.24 ± 0.71	5.03 ± 0.82
Maternal liver ($\mu\text{g/g}$ wet weight)	6.52 ± 3.35	2.86 ± 0.44	2.62 ± 0.53	—
Placenta ($\mu\text{g/g}$ wet weight)	5.31 ± 3.78	2.37 ± 0.45	2.53 ± 0.70	—
Fetal cerebrum ($\mu\text{g/g}$ wet weight)	5.74 ± 3.61	2.06 ± 0.37	2.20 ± 0.49	—

Each value represents the mean $\pm$ S.D. ^{a)} The plasma and the saliva were collected at 3 h after oral administration of 3 mg/kg of caffeine ($n=6$). ^{b)} Five rats had received 0.04% caffeine solution *ad lib* during pregnancy. On gestational day 21, the plasma and the tissues of mother and fetus were obtained by cesarean sectioning. The concentrations of theobromine in tissues could not be accurately determined, because of the interfering peak.

は、カフェインは母体血漿中濃度の 95% 相当が胎仔大脳中に存在していた。また代謝産物であるパラキサンチン、テオフィリンは母体血漿中濃度の 68% と 60% 相当が胎仔大脳中に存在していた。

生体液中のカフェインとその代謝産物の同時定量法についてはいくつかの報告がある。サルが生体液中濃度の定量に関しては、0.1 ml の試料量に内部標準として 8-クロルテオフィリンを添加し逆相カラムを用い分析を行っている。^{10,11)} またヒト血漿あるいは唾液^{12,13)} 及びイヌ血漿¹⁴⁾ の分析では 0.3—0.5 ml の試料量を用いている。本 HPLC 法では 0.2 ml の血漿を用いて定量を行ったが、検出限界はかれらの報告^{13,14)} とほぼ同程度の結果を得ることができ全血として 0.5 ml 程度で十分に定量が可能である。⁹⁾

唾液中のカフェインとジメチルキサンチン類の HPLC による測定報告において、¹⁵⁾ 血清中濃度と唾液中濃度との間には有意な相関性があること、また唾液中濃度より血清中濃度を推測することが可能であることが結論されている。しかし内部標準物質としてテオブロミンが使用されているのでテオブロミンの定量は不可能である。本 HPLC 法では、Hartley ら¹³⁾ 及び Tse と Szeto¹⁴⁾ が用いた 7-(2-ヒドロキシエチル) テオフィリンを使用した。

唾液中濃度の測定は血中濃度を推測できるという理由から採血の困難な場合に有益な方法となるであろう。

ラットにおいて母体のカフェイン摂取による胎仔大脳発達への影響については既に報告した。^{16,17)} この点において母体-胎仔間におけるカフェインとジメチルキサンチン類の組織内分布を把握することは重要と思われる。Burg と Werner¹⁸⁾ は放射性同位体のカフェインを用いマウスにおいてカフェインとパラキサンチンの組織内分布を検討している。本 HPLC 法で組織中のテオブロミンを正確に測定することは不可能であったが、カフェインを含め他のジメチルキサンチン類の組織内濃度の定量に本 HPLC 法は有用と考える。

結 び

本 HPLC 法における Zorbax ODS カラムによる血清中カフェインの分析は微量で迅速、かつ正確に定量が行え、臨床サンプルの分析に有用な方法と思う。

また μ Bondapak C₁₈ カラムを使用した生体内のカフェインとジメチルキサンチン類の定量法はカフェインとジメチルキサンチン類の分布、代謝、体内動態の把握に有益な方法であると思う。さらに妊娠中のカフェイン代謝の変化を知る上でカフェイン飲用妊婦のモニターに応用が可能であると考ええる。

謝辞 本研究は一部 昭和 59 年度厚生省神経疾患研究委託費 No. 84—11 によって行われた。

引 用 文 献

- 1) C. E. Cook, C. R. Tallent, E. W. Amerson, M. W. Myers, J. A. Kepler, G. F. Taylor, H. D. Christensen, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **199**, 679 (1976).
- 2) H. Milon, J. A. Antonioli, *J. Chromatogr.*, **162**, 223 (1979).
- 3) J. Blanchard, J. D. Mohammadi, K. A. Conrad, *Clin. Chem.*, **26**, 1351 (1980).
- 4) D. B. Haughey, R. Greenberg, S. F. Schaal, J. J. Lima, *J. Chromatogr.*, **229**, 387 (1982).
- 5) S. E. O'Connell, F. J. Zurzola, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1009 (1984).
- 6) P. S. Weathersbee, L. K. Olsen, J. R. Lodge, *Postgrad. Med.*, **62**, 64 (1977).
- 7) R. Knutti, H. Rothweiler, Ch. Schlatter, *Eur. J. Clin. Pharmacol.*, **21**, 121 (1981).
- 8) J. V. Aranda, C. E. Cook, W. Gorman, J. M. Collinge, P. M. Loughnan, E. W. Outerbridge, A. Aldridge, A. H. Neims, *J. Pediatr.*, **94**, 663 (1979).
- 9) K. Nakazawa, H. Tanaka, M. Arima, *J. Pharmacobio-Dyn.*, **8**, 151 (1985).
- 10) R. Klassen, B. Stavric, *J. Liquid Chromatogr.*, **6**, 895 (1983).
- 11) B. Stavric, R. Klassen, S. G. Gilbert, *J. Chromatogr.*, **310**, 107 (1984).
- 12) K. T. Muir, M. Kunitani, S. Riegelman, *J. Chromatogr.*, **231**, 73 (1982).
- 13) R. Hartley, J. R. Cookman, I. J. Smith, *J. Chromatogr.*, **306**, 191 (1984).
- 14) F. L. S. Tse, D. W. Szeto, *J. Chromatogr.*, **226**, 231 (1981).
- 15) N. N. Khanna, H. S. Bada, S. M. Somani, *J. Pediatr.*, **96**, 494 (1980).
- 16) H. Tanaka, K. Nakazawa, M. Arima, *Brain Dev.*, **5**, 397 (1983).
- 17) H. Tanaka, K. Nakazawa, M. Arima, S. Iwasaki, *Brain Dev.*, **6**, 355 (1984).
- 18) A. W. Burg, E. Werner, *Biochem. Pharmacol.*, **21**, 923 (1972).