薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
111 (4, 5) 225-233 (1991)

電気化学検出高速液体クロマトグラフィーによる生体成分の分析

島田和武,* 大江知行

金沢大学薬学部, 〒920 金沢市宝町 13-1

Trace Analysis of Biological Substances by High-Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection

Kazutake SHIMADA* and Tomoyuki Oe

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University,
13-1 Takara-machi, Kanazawa 920, Japan

High-performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection has been developed for the trace analysis of electrochemically active substances in biological fluids such as catecholamines. The recent development of this system, both instruments and application, has been reviewed.

The principle of instrument and newly developed electrode for electrochemical detector have been described at the first section. Series electrodes, especially with coulometric detection, gave much higher selectivity to the analysis of biological substances.

The application of HPLC with electrochemical detection to the determination of estrogens in biological fluids clarified the metabolic pathway of catechol estrogens. The applicability to the determination of vitamin D₃ and related compounds has been also suggested.

For the purpose of extending the applicability of HPLC with electrochemical detection to electroinactive compounds, pre- and post-column labeling methods have been developed. Pre-column derivatization reagents possessing ferrocene as an electrophore provided a selective and sensitive response to the detector, because of their high-reversibility and low applied potential in the redox reaction. Post-column reaction by using immobilized enzyme reactor has been widely used for the determination of acetylcholine and choline in biological fluids.

Keywords—HPLC; electrochemical detection; electrophore; pre-column derivatization; post-column derivatization; biological substance

はじめに

高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は, 分離能に優れ, かつガスクロマトグラフィー (GC) では困難な揮発性や熱安定性に乏しい化合物の分析も可能なことから, 広い分野で急速に普及し, その威力を発揮している. とところで, HPLC の感度及び選択性を決める要因として検出器の果たす役割は大きく, 種々の検出器が開発されている. しかし, 多岐にわたる分析対象のすべてに高感度な応答を示すものは未だ開発されていない. 質量分析計 (MS) とのオンライン化 (LC-MS) がその最短距離にあるとされているものの, 感度, 再現性等十分ではない.

現在, 主に用いられている検出器としては, 示差屈折計, 紫外吸収 (UV) 検出器, 蛍光検出器, 電気化学検出器 (electrochemical detector: ECD) が挙げられる.¹⁾ 示差屈折計は, 汎用性は高いものの, 検出限界は μg オーダーと感度が低く, 温度の影響を受け易い等の欠点を有している. UV 検出器は ng オーダー, 蛍光検出器は pg オーダーの溶質の検出が可能であり, 分析対象, 目的により使い分けられている.

一方, Kissinger 一派により開発された ECD は,²⁾ その測定対象が電気化学的に活性なものに限定されるため選択性が高く, しかも蛍光検出器に匹敵する高感度な応答を示すことから, カテコールアミンをはじめとする生体成分の分析に汎用されている. ECD の原理は, 溶質が電極で酸化又は還元を受ける際に生じる電流又は電気量を増幅して記録することにあるが, 溶存酸素などの問題から酸化反応検出が主流を占めている. 本検出器は上述のような長所に加えダイナミックレンジも広く, 優れた性質を有しているが, 以下のような欠点も知られてい

る。すなわち、その測定原理が電極という固相と液相中の溶質との反応に基づくため、作用電極の状態が感度に大きく影響し、再現性の点で難がある。温度、流速、溶離液組成等試料が電極を通過する環境は同一でなければならず、例えば液温 1°C の変化で約 1.5—9% の感度変化があるとされている。これは定量に際し大きな問題であり、測定対象と同一の電気化学活性基 (electrophore) を有する内標準物質の使用が必要である。また高感度で使用する場合、安定なベースラインを得るのにかなりの時間を要する場合もある。その他、検出の機構上移動相に電解質を含むことが必須なことから、分離モードが逆相系又はイオン交換系に限定されること、溶離液組成の変化に対して高い応答性を示すことから、グラジェント溶離には不向きなこと等も使用上の制限となっている。³⁾

しかし、現在までに 2000 報以上の HPLC/ECD に関する報告がなされている上に、最近も総説、⁴⁾ 成書⁵⁾ が出版されており、高感度分析の一手法として確固たる地位を築いていることは確かである。これらの点を踏まえ、本総説では本システムの生体成分分析への応用について著者ら及び過去 2 年間に発表された研究の主なものを紹介したい。

1. ECD について

ECD はアンペロメトリック型とクーロメトリック型に大別されるが、いずれも参照電極による一定電位のもとと作用電極上で定電位電解し、対極との間に流れる電流又は電気量を測定している (Fig. 1)。参照電極 (カロメル, Ag/AgCl 等) 及び対極 (ステンレス, 白金等) の材質は検出器の特性にそれほど差異をもたらさないが、作用電極のそれは大きな影響を与える。これには白金, 金アマルガム, 炭素 (グラッシーカーボン, ポーラスグラファイト等) 等が用いられるが、最も汎用されているのはグラッシーカーボン電極である。これは化学的に安定であり、残余電流が小さく、印加電位の幅が広い等の特長を有していることによる。主な作用電極とその測定対象等について Table I に示した。アンペロメトリック, クーロメトリック型 ECD の電解効率はいずれも 0, 100% が原則であるが、その区別は厳密なものではなく実際には前者が 0.1—5%, 後者が 95—100% とされている。³⁾ 電解効率の点より後者的の方が感度の点で有利と考えられるものの、広い面積を持つ作用電極の安定性との兼ね合い

Fig. 1. The Diagram of Electrochemical Detector

TABLE I. Representative Working Electrodes and Detectable Compounds

Working electrode	Detectable compound	Nonusable solvent
Glassy carbon and porous graphite	Phenols, catechols, aromatic amines	
Pt	H_2O_2 , formalin	Alcohol
Au-amalgam	Thiols	Solvent containing halogen
Ag	Iodine, cyan	Solvent containing halogen

Fig. 2. The Diagram of Dual-Electrode Amperometric Cell

から、それ程大きな差はみられない。コスト、保守の点では前者が有利であり主流をなしてきたが、最近後者の開発も進み汎用され始めた。

また、ECD の有用性を高めるものとして、同一セル内に複数の作用電極を近接して配したマルチ電極セルが開発されている。汎用されているのは直列型のもので、クロメトリック、アンペロメトリック型の各々を Fig. 1b, 2a に示した。典型的な使用例を示すと、まず測定対象を第 1 電極で酸化し、生成物を第 2 電極で還元反応検出する。これにより酸化還元 reversible に富む溶質のみを高選択的に検出できる。これは蛍光検出器の励起波長、蛍光波長に相当するとも考えられるもので、クロマトグラム上ピークの同定にも有用である。またクロメトリック型の場合は、第 1 電極で不用の溶質をすべて電解し、第 2 電極で目的物のみを検出することもできる。この場合後者で電解されるものの半波電位 ($E_{1/2}$) の方が、前者のそれに比して高く（酸化反応検出の場合）なければならない。このようなスクリーニングモードの利用はクロマトグラフィー上分離が困難な化合物の選択的検出にも利用できる。⁶⁾ その他、並列型 (Fig. 2b), 対向型 (Fig. 2c) のものも開発されている。並列型は各電極に異なった印加電位をかけることで、高次の情報が得られる。これは UV 検出器の 2 波長同時検出に対応する。対向型は redox cycling により応答性が増幅され、高感度検出が可能とされている。⁷⁾

一方、ウォールジェット型セルを有する ECD も市販されはじめた。⁸⁾ これは電極面に垂直に溶出液を衝突させることで物質移動を容易にし、高感度化を図ったものである。従来、糖の ECD による検出はグラッシーカーボン電極等では困難である上、セルへの吸着も問題とされていた。最近、この点の改善を目的としたセルやパルス・アンペロメトリック型のものが開発されている。⁹⁾ 以上の他、マイクロ HPLC 用セルの開発も進んでおり、¹⁰⁾ ECD のハード面における動向から目が離せない。

2. 生体成分分析への応用

HPLC/ECD はカテコールアミン分析用として開発されたが、その適用範囲は近年益々拡大している。これは機器が普及し化合物自身が持つ electrophore を利用する測定法の開発が進んだことに加え、それ自身は電気化学的に不活性なものもプレー又はポストカラム誘導体化により活性なものへと変換し測定する方法が開発されたことにもよる。

以下、化合物自身の electrophore を利用する場合と、誘導体化を伴う場合に分け生体成分分析への応用例について述べる。本文において、特記しない限り印加電位はグラッシーカーボン電極を用いるアンペロメトリック型検出器に対するものを示した。なお、印加電位は測定対象の $E_{1/2}$ 等により決定されるが、0 V に近い電位で測定した方が、安定なベースラインが得やすく有利である。

2.1. 化合物自身の Electrophore を利用する測定 先に述べたように ECD による測定は酸化反応による検出が主流を占めている。検出可能な代表的化合物と印加電位を Table II に示したが、¹¹⁾ 以下主なものについて最近の応用例を含めて説明する。

神経伝達物質として重要な役割を果たしているカテコールアミン及びその代謝産物の分析は、疾病の診断や治療上欠かせないものの 1 つである。例えば小児の神経芽細胞腫は、副腎や胸、首等の神経系に発生し、早期より転移を伴う悪性腫瘍である。しかし、初期の段階で発見されれば、加療により完治することが知られており、乳

TABLE II. Typical Active Substances of HPLC/ECD Analysis¹¹⁾

	Compound	Applied potential (V vs. Ag/AgCl)
Phenols	Morphine	+0.8
	Estrogen	+0.9
Catechols	Epinephrine	+0.4—0.7
	L-Dopa	+0.4—0.7
Guaiacols	Vanillic acid	+0.8—0.9
	Metanephrine	+0.8—0.9
Aromatic amines	Aniline	+0.9—1.0
	Benzidine	+0.9—1.0
Indoles	Tryptophane	+0.8—0.9
	Serotonin	+0.6—0.7
Phenothiazines	Chlorpromazine	+0.9
	Promethazine	+0.9
Purines	Uric acid	+0.8—1.0
	Xanthine	+0.8—1.0
Thiols	Cysteine	+1.0
	Penicillamine	+1.0

Fig. 3. The Metabolic Pathway of Catecholamine

児を対象としたマススクリーニングが実施されている。これは神経芽細胞腫の腫瘍細胞がカテコールアミンを産生することから、その代謝産物であるバニルマンデル酸とホモバニリン酸の尿中濃度を測定し診断指標とするものである (Fig. 3)。呈色反応を始め種々の方法で測定されていたが、最近 HPLC/ECD によるものが増えてきた。これは誘導体化することなく高感度検出 (検出限界 5 pg) が可能なこと、プロファイル分析が可能なこと、選択性に優れること等によるが、専用のシステムも市販されており ECD の果たす役割は大きい。¹²⁾ また直列型マルチ電極を有するクロメトリック型検出器の特長を活かした生理活性アミン測定法の開発も進んでいる。これは化

Fig. 4. The Metabolic Pathway of Vitamin D₃

化合物により $E_{1/2}$ が異なることと、完全に電気分解される点に着目したものであり、選択性の向上に寄与している。¹⁸⁾

カテコールエストロゲンを含むエストロゲンの体内動態を的確に把握することは、胎児胎盤系機能診断、正常月経周期婦人における排卵予知等との関連から重要視されている。著者らは HPLC/ECD の高感度、高選択性に着目し、*in vitro* におけるカテコールエストロゲンの代謝経路等を明らかとした。^{14,15)} また、最近 Numazawa らもクロマトリッック型検出器を用いて高感度なエストリオール検出法を開発し、アロマトーゼの活性測定へ応用している。¹⁶⁾ エストリオールの選択的固相抽出に QAE-Sephadex A-25 borate-form を導入したことも有効であった。

さらに Yoshizawa らによる HPLC/ECD を用いたエストロゲン代謝経路及び生理的意義解明に関する詳細な研究もあり、¹⁷⁾ 本システムがこの分野における研究手法として定着した感がある。

その他、チオール、芳香族アミン等多岐にわたる化合物が測定可能であり、本検出器の適用範囲が拡大していることを示している。表にあるもの以外で最近注目されているのはビタミン D₃ (D₃) 関連物質への適用である。D₃ は食物として摂取される他、生体内で 7-dehydrocholesterol (7-DHC) より生合成される。D₃ は肝に運ばれ 25 位に水酸化を受けた後 (25(OH)D₃)、腎で 1 位が水酸化され活性型ビタミン D₃ (1,25(OH)₂D₃) に変換される (Fig. 4)。これら代謝産物の体液中濃度を的確に把握することは栄養診断、病態解析上重要であり、HPLC を含む種々の測定法が開発されている。しかし、いずれも簡便性、信頼性に欠けることから新しい分析法の開発が望まれている。¹⁸⁾ ところで 7-DHC 及び D₃ の有する共役ジエン構造は ECD に対して高い応答性を示す。印加電位を高くしなければならない欠点はあるが (Fig. 5)、実試料への適用例も報告されている。¹⁹⁾ 著者らも検討中であり、²⁰⁾ ECD の特長を活かした分析法の開発が期待される。

Fig. 5. The Hydrodynamic Voltammograms of Vitamin D₃ and 7-Dehydrocholesterol²⁰⁾

Coulometric detection: working electrode, porous graphite.

○, 7-DHC; △, D₃.

なお、還元反応検出による ECD の利用はあまり進歩していない。これは先に述べたように溶離液中等の溶存酸素の還元に基づく大きなバックグラウンド電流が障害となっているためである。最近、これを除去する工夫や、電極（金アマルガム電極等）の開発が進み、測定例も増えてきた。還元反応で測定されるものとしては金属イオンや無機イオンの他、ニトロ化合物、硝酸エステル、ニトロソアミン及びキノン等がある。キノンは印加電位 -0.4 V 程度で十分な応答を示し、検出しやすい。しかし、ニトロ体のそれには -0.7 V 程度の電位を必要とし、必ずしも実用的ではない。⁸⁾

2.2. 誘導体化による測定 HPLC の適用範囲拡大を目的として UV 及び蛍光検出用誘導体化法の開発が進んでいるが、ECD に対するそれも同様の観点より行われている。最近、成書⁸⁾も出版されておりこの種の研究の進展をうかがうことができる。なお誘導体化法にはプレ及びポストカラム法があり、各々一長一短を有しているが、ここでは別々に説明したい。

2.2.1. プレカラム誘導体化法—プレカラム誘導体化の成否は使用する誘導体化剤の性質と、過剰の試薬等を除去するための前処理に起因することが多い。誘導体化剤は、その分子内に特定の官能基と選択的に反応する活性部位 (reacting group) 及び検出器に対して高感度な応答を示す原子団 (signal group: ECD では electrophore) を併せ持つことが必要である (Chart 1)。したがって、誘導体化剤を開発する立場からすると、いかに優れた signal 及び reacting group を選択し結びつけるかが大切である。さらに試薬及び反応成績体の安定性や安全性等も考慮されるべき要因である。例えば反応性に富む活性基を有する試薬は、それ自身が不安定な場合が多く、高純度の試薬が得にくい。このため反応成績体と試薬分解物との分離をも考慮しなければならず、微量分析には適さない。この点では合成化学で使われている各種保護基とは多少異なるが、この分野の最近の進歩は目覚ましく、安定でかつ反応性に優れるものも多数開発されており、常にこの分野に目を向けておく必要がある。

Chart 1

ECD 用プレカラム誘導体化剤の electrophore としては酸化反応で検出できるフェノール、グアヤコール、芳香族アミンが一般的だが、⁸⁾ 著者らは有機金属化合物であるフェロセンを用いた (Fig. 6)。フェロセンは易酸化性で、他の electrophore が酸化を受けにくい印加電位 $+0.5\text{ V}$ において高い応答性を示すとともに、酸化還元 redox 性にも優れている。したがって、これを electrophore とすると、酸化反応検出が容易な他、マルチ作用電極の有用性を活かすことができる。すなわち、第 1 電極で酸化し、ついで第 2 電極 (0.0 V) で還元反応検出すれば、より一層高い選択性が得られる (Fig. 7)。以上の点より開発された各種誘導体化剤については文献、²¹⁾ 成書⁵⁾を参考としていただきたいが、最近同一の electrophore を用いて Gamoh らが brassinosteroid の分析を行っている。²²⁾ なお、この試薬 (ferroceneboronic acid) は GC の誘導体化剤として開発されたものである。²³⁾ また同様にペプチド、プロテイン用誘導体化剤の開発が Eckert, Koller により行われ、3-ferrocenylpropionic anhydride 又は ferrocenylmethyl-succinimidyl-glycine·hydrochloride が優れるとしている。²⁴⁾

蛍光検出用誘導体化剤には、試薬自身は蛍光を有していないが、反応成績体が蛍光を発するもの（発蛍光試薬）も多数知られている。この種の試薬を用いると、過剰の試薬による妨害ピークが少なく良好なクロマトグラムが得やすい。o-Phthalaldehyde, naphthalenedialdehyde は優れた蛍光誘導体化剤であり、1 級アミンの誘導体化剤として汎用されている。これら試薬自身は ECD に応答しないが、生成する isoindole²⁵⁾ 及び benzoisoindole 体²⁶⁾は高い応答性を示し、蛍光検出器に対するそれと同様の特長を有している。なお、本法はポストカラムラベル化法においても利用されている。²⁷⁾

還元反応検出によるものとして、各々活性メチレンの呈色試薬、ケトンの誘導体化剤として汎用されている 1,2-naphthoquinone-4-sulfonic acid (0.0 V) や、2,4-dinitrophenylhydrazine (-0.75 V) の利用が知られていたが、⁵⁾ 最近 digoxin を 3,5-dinitrobenzoate として測定する例が報告された。²⁸⁾ これは、2 作用電極を有するクー

ロメトリック型検出器（作用電極：ポーラスグラファイト）を用いるもので第1電極（-0.8 V）で還元し，第2電極（+0.8 V）で酸化して検出するものである．検出限界は 0.88 ng であるが，実試料への適用が期待される．なお，ロイコトリエンの分析についても同様の誘導体化法が用いられている.²⁰⁾ ニトロ基を *electrophore* とすれば，誘導体化剤の開発は容易になるものの，高い還元電位，引き続く酸化電位の高さ等の問題が残されている．

2.2.2. ポストカラム誘導体化法——ポストカラム誘導体化法は反応成績体が複数でも良く，その点有利であるが，装置の複雑化を伴う場合が多い．開発されている種々の HPLC/ECD 用ポストカラム誘導体化法⁴⁾のうち最も汎用されているものは，Chart 2 に示したアセチルコリン (Ach)，コリン (Ch) の定量システムである．これは Ach, Ch を HPLC で分離後，アセチルコリンエステラーゼ (AchE) 及びコリンオキシダーゼ (ChO) を固定化した固定化酵素カラム (immobilized enzyme reactor: IMER) で処理し，生成する過酸化水素を ECD で定量するものである．IMER の安定性，再現性の問題はあるものの，それ程複雑な装置ではない．マイクロダイアリシスを用いる Ach, Ch の定量は神経化学領域で極めて重要であり，高感度 (5 pmol) 分析可能な本システムは注目されている.³⁰⁾ 最近では数多くの測定例と共に前処理に関する改良法が報告されている.³¹⁾ なお，作用電極はポーラスグラファイトでも測定可能であるが，白金電極が一般的である．その他 IMER での成績体，あるいは酵素反応に伴い変換された補酵素等を測定する方法もあるが，これらについては成書，³²⁾ 総説^{33,34)}に詳述されているので参照していただきたい．

上記のシステムにおいて IMER の代わりに光反応^{35,36)}を含む化学反応を利用したものも多い．これらのうち最近の例として，ペプチド検出用の biuret 反応が ECD に応答することを利用したものがある．これは反応により生成する Cu(I) イオンをクーロメトリック検出（作用電極：ポーラスグラファイト，+0.7 V）するものであるが，³⁷⁾ アンペロメトリック型 2 作用電極を用いて他のグループもほぼ同時に報告している．^{38,39)} なお最近，HPLC/ECD を含む生理活性ペプチドの定量法に関する総説が出されたので，⁴⁰⁾ 付記しておく．

また，既に紹介したがマルチ電極タイプ ECD の第1電極を反応セルとして使い，第2電極で検出するシステムもポストカラム誘導体化法の一つと考えられる．これとは別に，クーロメトリック型検出器を電気分解セルとして利用し，成績体を他の手段で高感度検出するシステムも開発されている．⁴¹⁻⁴³⁾

Fig. 6. N-Succinimidyl 3-Ferrocenylpropionate

Fig. 7. Series Dual-Electrode Chromatogram for Tryptamine (1), Phenethylamine (2) and Phenylpropylamine (3) (Each 10 ng) Derivatized with N-Succinimidyl 3-Ferrocenylpropionate

3. おわりに

どのような分析システムでも長所、短所を有することは否定できず、ここに紹介した HPLC/ECD も同じである。現在 HPLC が普及し、ほとんどの研究室で各種の検出器が備えられ、使い分けられている。いかにしてこれらの長所を活かし、“分析のための分析”ではない分析法を開発するかが我々への課題であろう。今後共 HPLC/ECD 及びこれを用いる研究がどう発展するか注目してゆきたい。

謝辞 本総説のうち著者らの研究の一部は東北大学薬学部薬品分析化学教室在籍中に行ったものであり、御指導いただいた南原利夫現東北大学名誉教授に厚く御礼申し上げます。また研究費の一部は薬学研究奨励財団第五回研究助成によるものであり、ここに深謝致します。

引用文献

- 1) T. M. Vickrey (ed.), "Liquid Chromatography Detectors," Marcel Dekker, Inc., New York, 1983.
- 2) R. M. Riggan, L. Rau, R. L. Alcorn, P. T. Kissinger, *Anal. Lett.*, **7**, 791 (1974).
- 3) 渡辺訓行, "超高感度高速液体クロマトグラフィー," 今井一洋, 沢田嗣郎, 渡辺訓行, 渡辺秀夫編, 学会出版センター, 東京, 1985, pp. 85—155.
- 4) P. T. Kissinger, *J. Chromatogr.*, **488**, 31 (1989).
- 5) 島田和武, "化学総説," No. 9, 日本化学会編, 学会出版センター, 東京, 1990, pp. 91—97.
- 6) T. Ohkubo, T. Wakasawa, K. Shimada, T. Nambara, *J. Liquid Chromatogr.*, **12**, 2093 (1989).
- 7) S. A. McClintock, W. C. Purdy, "Progress in HPLC," Vol. 2, ed. by H. Parvez, M. Bastart-Malsot, S. Parvez, T. Nagatsu, G. Carpentier, VNU Science Press, Utrecht, 1987, pp. 37—51.
- 8) J. A. Lisman, W. J. M. Underberg, H. Lingeman, "Chromatographic Science Series," Vol. 48, ed. by H. Lingeman, W. J. M. Underberg, Marcel Dekker, Inc., New York, 1990, pp. 283—322.
- 9) D. C. Johnson, W. R. LaCourse, *Anal. Chem.*, **62**, 589A (1990).
- 10) 後藤正志, 岐薬紀要, **39**, 1 (1990).
- 11) T. Kurahashi, H. Nishino, S. Parvez, H. Parvez, K. Kojima, T. Nagatsu, "Progress in HPLC," Vol. 2, ed. by H. Parvez, M. Bastart-Malsot, S. Parvez, T. Nagatsu, G. Carpentier, VNU Science Press, Utrecht, 1987, pp. 3—36.
- 12) E. Morier, R. Rips, "Progress in HPLC," Vol. 2, ed. by H. Parvez, M. Bastart-Malsot, S. Parvez, T. Nagatsu, G. Carpentier, VNU Science Press, Utrecht, 1987, pp. 377—396.
- 13) H. Takeda, T. Matsumiya, T. Shibuya, *J. Chromatogr.*, **515**, 265 (1990).
- 14) K. Shimada, Y. Yumura, E. Terashima, T. Nambara, *J. Steroid Biochem.*, **20**, 1163 (1984) 及び引用文献.
- 15) K. Shimada, T. Nambara, "Progress in HPLC," Vol. 2, ed. by H. Parvez, M. Bastart-Malsot, S. Parvez, T. Nagatsu, G. Carpentier, VNU Science Press, Utrecht, 1987, pp. 235—260.
- 16) M. Numazawa, T. Konno, R. Furihata, S. Ishikawa, *J. Steroid Biochem.*, **36**, 369 (1990).
- 17) 渡辺一弘, 和田裕爾, 高梨香織, 吉沢逸雄, 薬誌, **109**, 329 (1989) 及び引用文献.
- 18) K. Shimada, N. Kobayashi, *Trends Anal. Chem.*, **10**, 103 (1991).
- 19) J. P. Moody, C. A. Humphries, S. M. Allan, C. R. Paterson, *J. Chromatogr.*, **530**, 19 (1990).
- 20) K. Shimada, T. Oe, *Analyst*, submitted.
- 21) K. Shimada, Y. Kawai, T. Oe, T. Nambara, *J. Liquid Chromatogr.*, **12**, 359 (1989) 及び引用文献.
- 22) K. Gamoh, H. Sawamoto, S. Kakatsuto, Y. Watabe, H. Arimoto, *J. Chromatogr.*, **515**, 227 (1990).
- 23) C. J. W. Brooks, W. J. Cole, *J. Chromatogr.*, **399**, 207 (1987).
- 24) H. Eckert, M. Koller, *J. Liquid Chromatogr.*, **13**, 3399 (1990).
- 25) G. M. Wall, J. K. Baker, *J. Chromatogr.*, **491**, 151 (1989).
- 26) S. M. Lunte, T. Mohabbat, O. S. Wong, T. Kuwana, *Anal. Biochem.*, **178**, 202 (1989).
- 27) M. D. Oates, J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, **61**, 432 (1989).
- 28) L. Embree, K. M. McErlane, *J. Chromatogr.*, **526**, 439 (1990).
- 29) S. Steffenrud, H. Salari, *Biomed. Chromatogr.*, **3**, 5 (1989).
- 30) C. Eva, M. Hadjiconstantinou, N. H. Neff, J. L. Meek, *Anal. Biochem.*, **143**, 320 (1984).

- 31) Y. Fujiki, Y. Ikeda, S. Okuyama, K. Tomoda, K. Ooshiro, H. Matsumura, T. Itoh, T. Yamauchi, *J. Liquid Chromatogr.*, **13**, 239 (1990).
- 32) L. Dalgaard, "Progress in HPLC," Vol. 2, ed. by H. Parvez, M. Bastart-Malsot, S. Parvez, T. Nagatsu, G. Carpentier, VNU Science Press, Utrecht, 1987, pp. 219—233.
- 33) K. Shimada, T. Oe, T. Nambara, *J. Chromatogr.*, **492**, 345 (1989).
- 34) G. Marko-Varga, L. Gorton, *Anal. Chim. Acta*, **234**, 13 (1990).
- 35) L. Dou, I. S. Krull, *Anal. Chem.*, **62**, 2599 (1990).
- 36) L. Dou, I. S. Krull, *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.*, **8**, 493 (1990).
- 37) H. Kubo, Y. Huang, T. Kinoshita, *Anal. Sci.*, **6**, 265 (1990).
- 38) A. M. Warner, S. G. Weber, *Anal. Chem.*, **61**, 2664 (1989).
- 39) H. Tsai, S. G. Weber, *J. Chromatogr.*, **515**, 451 (1990).
- 40) 甲斐雅亮, ふんせき, **1991**, 27.
- 41) H. Nohta, E. Yamaguchi, Y. Ohkura, H. Watanabe, *J. Chromatogr.*, **467**, 237 (1989).
- 42) N. Imaizumi, K. Hayakawa, Y. Suzuki, M. Miyazaki, *Biomed. Chromatogr.*, **4**, 108 (1990).
- 43) H.-K. Jeon, H. Nohta, Y. Ohkura, *Anal. Sci.*, **6**, 677 (1990).