薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
117 (10・11)647-656(1997)

分離分析における誘導体化法の進歩

後藤順一,*^a 南原利夫^b

東北大学薬学部,^a 〒980-77 仙台市青葉区荒巻字青葉

星薬科大学,^b 〒142 品川区荏原 2-4-41

Recent Progress in Detection-Oriented Derivatization

Junichi GOTO*^a and Toshio NAMBARA^b

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tohoku University,^a Aobayama, Sendai 980-77, Japan,
and Hoshi University,^b 2-4-41 Ebara, Shinagawa-ku, Tokyo 142, Japan

(Received July 28, 1997)

Derivatization reactions to enhance the sensitivity and selectivity of gas and high-performance liquid chromatographic detection of biologically important substances are reviewed, with emphasis on the papers reported in the last decade. The achiral and chiral reagents for various functional groups, such as amino, carboxy, thiol, carbonyl and hydroxy groups, include phthalimidyl, quinolyl, quinoxalyl, benzoxazolyl and benzoxadiazolyl analogous having a reacting group to make a covalent bond with analytes. The derivatization methods for increasing sensitivity in liquid chromatography combined with mass spectrometry are also discussed.

Key words—HPLC; GC; LC/MS; derivatization; optical resolution

1. はじめに

生命科学において、「何が、どこに、どのような状態で、どれだけ存在するか」を明らかにする方法論に分析化学の果たす役割は極めて大きなものがあり、分子の認識とその捕捉の高精密化は、生体内における現象を解明し、解析するうえで避けることの出来ない課題である。1960年前後に相次いで創案されたイムノアッセイ、HPLCは、それに先立つGCとともに分子、とりわけ有機化合物の測定に大きな威力を発揮し、生命科学研究の進展に大きな役割を果たしてきた。今日では、さらに分析法の高性能化、高精密化を目指し、相補的な関係にある手法を組み合わせたハイファネーテッド型、ハイブリッド型測定法が考案され、分子1個の検出という超超高感度を達成するため、それぞれの検出法に応じた測定対象物の化学変換すなわち誘導体化法 (detection-oriented derivatization) が工夫されている。

1991年以降、分離分析法における誘導体化法の論文は、そのほとんどがHPLCに関するものであり、次いでキャピラリー電気泳動、GC、その他のクロマトグラフィーの順になっている。また、測定対象物との間で共有結合を生成させる反応活性基にも新規なものは見られず、発色団、発蛍光団の工夫がその主なものとなっている。一方、生命科学研究の進展と歩調を合わせるように測定対象の範囲が拡大し、DNA、蛋白、糖質など生体高分子の構造解析のための特異的ラベル化や、アミノ酸、薬物をはじめとするキラルな微量物質の測定などへの既報の適

用が広範に検討されている。また、HPLCとMSとのハイファネーテッド手法の登場とも相俟って、各種イオン化法における効率的イオン生成と誘導体化法との関係にも吟味が加えられつつある。

本稿では、1991—1997年前半における有機化合物を対象とするHPLC、GCの誘導体化法の進歩、及びハイファネーテッドMSにおける誘導体化法の話題について概説したい。なお、1990年以前の誘導体化法については、成書^{1,2)} 総説^{3,4)}を参照されたい。

2. 高速液体クロマトグラフィー

水酸基の誘導体化には、反応活性基としてカルボニルクロリド、及びそのプソイドハロゲン体であるカルボニルシアニド、カルボニルアジドが利用され、時にはイソシアナート誘導体やカルボジイミド存在下カルボン酸との直接縮合反応も試みられる。カルボニルアジドは、他の同族体が反応成績体としてエステルを与えるのに対し、ウレタン誘導体を与える。この種プレカラム化剤としてクマリン誘導体⁵⁾やキノキサリン誘導体^{6,7)}が知られているが、フタルイミジル骨格を持つ3-(5,6-methylenedioxy-2-phthalimidyl)benzoyl azide (**1**) (Fig. 1)が新たに開発され、コレステロールの45 fmolが検出されている。⁸⁾ *N*-アリアル置換フタルイミドは、発蛍光性として知られており、既にマレイミドを反応活性基として配したチオール基用試薬が同じ著者らによって開発されている。⁹⁾ 水溶性のカルボジイミド存在下エステルを生成する発蛍光性試薬として2-(4-carboxyphenyl)-5,6-dimethoxybenzimidazole (**2**)があり、コルチコイド、エストロゲンの一斉分析に利用されている。^{10,11)} なお、反応系に塩基として4-ピペリジノピリジンを添加しており、Em 440 nm (Ex 336 nm)でモニタリングするときの検出限界は0.06—0.3 pg (S/N=3)である。フェーズトランスファーを利用した蛍光誘導体化法も工夫されている。¹²⁾ エストラジオールのアルカリ性水溶液に、テトラペンチルアンモニウム (TPA) ブロミドを添加し、いったんTPA塩に誘導後、pyrene sulfonyl chloride 溶液 (クロロホルム、ジクロロメタン、酢酸エチル)を加えると、フェノール性水酸基にピレンスルホニル基の導入された誘導体が有機層に移る (Chart 1)。検出限界はfmolオーダーである。

アミノ基用誘導体化剤は、ポストカラム、プレカラム用を含め早くから開発されてきたが、新規試薬の登場は数少ない。6-Aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidyl carbamate (**3**)¹³⁾ 2-(1-pyrenyl)ethyl chloroformate (**4**)¹⁴⁾ はそれぞれアミノ酸、ポリアミンを対象として開発されている。活性カルバメートである前者は、pH 8.2—10.0の緩衝液中アミノ酸と反応して尿素誘導体を与え、Em 395 nm (Ex 250 nm)で検出するときPheの40 fmolが測定できる。また、反応液を

Fig. 1. Derivatization Reagents for Hydroxy and Amino Groups

そのまま分析系に注入しても副生成物である6-aminoquinoline 以外測定を妨害するものは認められないという。後者は 9-fluorenylmethyl chloroformate¹⁵⁾ と同種の誘導体化剤であり、発蛍光団としてピレンを持つためより感度に優れるが、脂溶性の高いことが懸念される。ポリスチレンとジビニルベンゼン又はエチルビニルベンゼンとジビニルベンゼンの共重合体を担体とし、スペーサーであるヒドロキシベンゾフェノンあるいはヒドロキシベンゾトリアゾールに 3,5-dinitrobenzoyl 基を結合させたオンカラムラベル化器材も開発されており、交換反応によりアミノ基を持つ溶質をジニトロベンゾイル化する。¹⁶⁾

Chart 1. Derivatization of Phenolic Hydroxy Groups

1-Benzyl-2-chloropyridinium bromide (5) (Fig. 2) は、チオールを介して縮合し、314 nm に吸収を持つ誘導体を与え、カプトプリルの測定に適用されている。¹⁷⁾ 検出限界は 10 ng/ml という。

カルボキシル基を対象とする誘導体化剤としては、脱離基として活性なハロゲンを持つアルキル化剤が数多く開発されているが、5-bromomethylfluorescein (5-BMF) (6) は同系の誘導体化剤である。^{18, 19)} アルカリ溶液中における分子吸光係数、量子収率 (Ex 490 nm, Em 520 nm) が極めて大きく、2.3—38 fmol のカルボン酸を測定できる。2-(4-Hydrazinocarbonylphenyl)-4,5-diphenylimidazole (7) は、活性基としてカルボン酸ヒドラジドを有し、ピリジン中カルボジイミド存在下室温でカルボキシル基と縮合し発蛍光性誘導体 (Ex 335 nm, Em 455 nm) を与える。²⁰⁾ 7—57 fmol の脂肪酸を検出できる。同種の試薬として 6,7-dimethoxy-1-methyl-2(1H)-quinoxalinone-3-propionylcarboxylic acid hydrazide (DMEQ-hydrazide) (8),^{21, 22)} 2-(5-hydrazinocarbonyl-2-oxazolyl)-5,6-methylenedioxybenzofuran (9) 及び 2-(5-hydrazinocarbonyl-2-oxazolyl)-5,6-dimethoxybenzothiazole (10)²³⁾ があり、DMEQ-hydrazide では Em 445 nm (Ex 367 nm) でモニタリングするときの検出限界は 10 fmol である。アミノ基を持つ発蛍光性物質もカ

Fig. 2. Derivatization Reagents for Various Functional Groups

Fig. 3. Derivatization Reagents Having Benzofurazan Nucleus

ルボン酸の誘導体化剤として利用される。Luminarin (11) は化学発光検出用に用いられ,²⁴⁾ イソ吉草酸の 50 fmol が検出される。

1,2,4-Triazoline-3,5-dione は、7-デヒドロコレステロールやビタミン D が持つ特徴的なジェン構造と緩和な条件下反応し、安定な付加体を生成するジェノフィルとして知られている。この 4 位にピレンを配した誘導体化剤が既に報告されているが、²⁵⁾ 同種の 4-[2(6,7-dimethoxy-4-methyl-3-oxo-3,4-dihydroquinoxalyl)ethyl]-1,2,4-triazoline-3,5-dione (DMEQ-TAD) (12) も工夫され、ビタミン D の 1 fmol が検出されている。^{26, 27)}

Imai らは、発蛍光団としてベンゾフラザン骨格に着目し、1980 年頃より各種反応活性基をこれに配した誘導体化剤を精力的に開発し (Fig. 3), その適用を幅広く試みている。これら試薬はいずれも 500 nm 以上に蛍光波長を示す特性を有しており、内因性の蛍光性化合物の妨害を受けるおそれが少なく、生体試料の測定には好都合である。4-Fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F) (13) は、最初に開発されたアミノ基用の誘導体化剤で、アミノ酸をはじめ広く利用されている。^{28, 29)} 生理活性アミンとの反応は pH 8.0, 60°C, 5 分間で完結する。生成する誘導体は、嵩高いベンゾフラザン骨格が直接アミノ基に結合するため、この結合の近傍は立体的に固定されているものと推測され、光学対掌体という微少差の弁別に有利と考えられる。そこで Pirkle 型キラルカラムを用いアミノ酸に適用して、光学異性体を高感度に分離、検出することに成功するとともに、³⁰⁾ 腎疾患患者において D-Ser の排泄量の多いことを、³¹⁾ また成熟期のラット松果体に D-Asp の多いことを見い出している。³²⁾ なお、 α 位にカルボキシル基を持たない光学活性アミンでは、対掌体相互の分離が見られないことから、固定相のアミドグループとの間の水素結合が不斉分離に重要な役割を果たしていると考えられている。³³⁾ 4 位にジメチルアミノスルフォニル基を持つ 4-(dimethylaminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-F) (14) もアミノ基を対象として用いられており、化学発光検出で fmol レベルの感度が得られている。^{34, 35)} 同じく 7 位に活性なフッ素を配した 4-(aminosulfonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole (ABD-F) (15), 及び ammonium 7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole-4-sulfonate (SBD-F) (16) は、チオール誘導体化剤として開発されたものである。両者の蛍光特性はほとんど同じであるが (Em 374—375 nm, Ex 500 nm), 前者の脂溶性ははるかに高いことから、これらを使い分けることにより還元型、酸化型チオールの同時測定が可能となる。³⁶⁾ すなわち ABD-F でまず還元型のチオールを誘導体化後、酢酸エチルで過剰の試薬を除去する。次いでトリブチルホスフィンで酸化型を還元して、SBD-F でこれを発蛍光性誘導体に変換し、クロマトグラフ

に注入する。ABD 誘導体の脂溶性のため、酸化型チオールの方が早く溶出される。DBD-COCl (17) は、水酸基、チオール、アミノ基と反応して対応する発蛍光性 (Ex 437—445 nm, Em 543—555 nm) の誘導体を与え、検出感度は fmol レベルである。³⁷⁾ 芳香族アミンを除いて縮合には塩基が必要で、キヌクリジンが用いられている。ベンゾフラザン骨格にイソチオシアネートを配した DBD-NCS (18), ABD-NCS (19) は、Edman タイプの、^{38, 39)} またアルキルアミノ基 (カダベリン CD, ピペララジン PZ) を持つベンゾフラザン誘導体 DBD-CD (20), NBD-PZ

(21), DBD-PZ (22), SBD-PZ (23) はカルボキシル基用のプレラベル化剤である。⁴⁰⁾ DBD-CO-Hz (24) は、ピリジン中水溶性カルボジイミドの存在下室温でカルボン酸と反応して蛍光性誘導体 (Ex 440 nm, Em 550 nm) を与える。⁴¹⁾

光学活性カルボニル化合物のキラル分離には十分な結果を与えなかった 4-(2-carbazoylpyrrolidin-1-yl)-7-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-ProCZ)⁴²⁾ は、アキラルなカルボン酸、及び還元糖のプレラベル化剤として有用であるという。⁴³⁾

光学対掌体の HPLC 分離にも多くの検討が加えられている。o-Phthalaldehyde (OPA) と *N*-アセチルシステインを組み合わせる光学不斉一級アミノ化合物の分離は、既に Nimura らにより報告されているが、⁴⁴⁾ *N*-acetyl-D-penicillamine⁴⁵⁾ などに続いて光学活性チオールを 2,3,4,6-tetra-*O*-acetyl-1-thio-β-D-glucopyranoside に置き変えた手法も工夫されている。⁴⁶⁾ また、逆に OPA とアミノ酸を試薬とし光学活性チオール化合物の不斉分離も試みられている。⁴⁷⁾ Imai らはベンゾフラザン骨格を持つ光学活性プレラベル化剤の開発も行っている (Fig. 4). 4 位にプロリンを配した構造を持つ 4-(2-chlorocarbonylpyrrolidin-1-yl)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-Pro-COCl) (26), 及び 4-(2-chlorocarbonylpyrrolidin-1-yl)-7-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-Pro-COCl) (27) は、光学活性アルコール、アミンと反応して、Ex 450 nm, Em 560 nm の蛍光特性を持つジアステレオマーを生成する。^{48—50)} Toyo'oka らにより開発されたアミノピロリジン (APy) を有する NBD-APy (28) 及び DBD-APy (29) は、2,2'-ジピリジルジスルフィドとトリフェニルフォスフィン存在下室温でイブプロフェンなど光学活性カルボン酸と縮合し、生成するジアステレオマーも逆相 HPLC で容易に分離され、検出感度も 20—50 fmol と高い^{51—53)} Edman タイプの光学活性イソチオシアネート 4-(3-isothiocyanatopyrrolidin-1-yl)-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-PyNCS) (30), 及び 4-(3-isothiocyanatopyrrolidin-1-yl)-7-(*N,N*-dimethylaminosulfonyl)-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-PyNCS) (31) は、ペプチド中の D-, L-アミノ酸の測定に試みられている。⁵⁴⁾

Fig. 4. Chiral Derivatization Reagents Having Benzofurazan Nucleus

Fig. 5. Chiral Derivatization Reagents Having Benzoxazole Nucleus

Fig. 6. Chiral Derivatization Reagents for Amino, Carboxy and Hydroxy Groups

一方, Kondo らは, ベンゾキサゾールを発蛍光団とし, これに光学活性な反応活性基を組み合わせた一連のプレラベル化剤を報告している (Fig. 5). すなわち, カルボキシル用として 2-[4-(1-aminoethyl)phenyl]-6-methoxybenzoxazole (32), 2-[4-(L-leucyl)aminophenyl]-6-methoxybenzoxazole (33), 2-[4-(L-phenylalanyl)aminophenyl]-6-methoxybenzoxazole (34), 2-[4-(D-phenylglycyl)aminophenyl]-6-methoxybenzoxazole (35)^{55, 56} があり, 例えば 32 で 2-phenylpropionic acid を測定するときの検出限界は 10 fmol である. さらに, 光学活性アミノ化合物を対象として *N*-[4-(6-methoxy-2-benzoxazolyl)]benzoyl-L-proline (36) 及び *N*-[4-(6-methoxy-2-benzoxazolyl)]benzoyl-L-phenylalanine (37)⁵⁷ が工夫されている. カルボキシル基用として 1-(4-dansylaminophenyl)ethylamine,⁵⁸ 1-methyl-2-(2,3-naphthalimido)ethyl trifluoromethanesulfonate (38),⁵⁹ 1-(5-dimethylamino-1-naphthalenesulfonyl)-(S)-3-aminopyrrolidine (39)⁶⁰ が開発されている (Fig. 6). 特異な軸不斉構造と反応活性基としてカルボニルシアニドを持つ 2-methyl-1,1'-binaphthalene-2'-carbonyl cyanide が水酸基用プレラベル化剤として報告されているが,⁶¹ さらに高感度化を図り, メチル基をメトキシル基に置き換えた 2-methoxy-1,1'-binaphthalene-2'-carbonyl cyanide (40) が工夫され,⁶² β -遮断薬光学異性体の分離に適用されている.⁶³ 検出感度は前者より 10 倍高く, 100 fmol である. Marfey 試薬は, 光学活性プレラベル化剤としてよく知られているが, アミノ酸 (Ala) 部分を種々変えて, 分離能との関係を検討した報告もあり, Val がより優れているという.⁶⁴

3. ガスクロマトグラフィー

GC 用誘導体化剤の開発は, 1980 年頃まで広範に行われてきていたが, 1990 年代に入り新規試薬のデザインは少ない. 水酸基を対象とする誘導体化剤としてシリル化剤が最も広く知られており, トリメチルシリル (TMS), 及びそのメチル基 1 個をエチル, *n*-プロピル, *iso*-プロピル基などに置き変えたジメチルアルキルシリル化剤が繁用されている. 一方, 1,2-グリコールの誘導体化にはアルキルボロネートが用いられるが, 分子内に孤立水酸基をともに含む場合, シリル化との 2 段階誘導体化が必須となる.⁶⁵ *N,O*-Bis(diethylhydrogensilyl) trifluoroacetamide (DEHS-BSTFA) は,⁶⁶ 孤立水酸基とはジエチルヒドロゲンシリルエーテルを, 一方立体障害を受けていない 1,2-グリコールとは環状のジエチルシリレン誘導体を与えこの点有利であり, ポリヒドロキシ胆汁酸の一斉分析に利用されている (Chart 2).^{67, 68} また, 他のシリル化剤と組み合わせると, メチレンユニット (MU) 値の変化から水酸基の数, 性質を予測することも可能になるという. 11-Dehydrothromboxane B₂ はラクトン環を持ち, その開環型と閉環型が存在し, 通常の Me エステル-TMS エーテル化では 2 種の生成物を与える. そこで Me エステル化後 *n*-propylamine でいったんアミドに誘導し, シリル化するという手法が工夫されている.⁶⁹

今日, GC はハイファネーテッド MS として用いられることが多い. 本手法では, 極めて感度

Chart 2. Derivatization of Hydroxy Groups with DEHS-BSTFA

に優れる負イオン検出化学イオン化 (NICI) が利用でき, 例えばカルボキシシル基をペンタフルオロベンジル (PFB) エステルに誘導し, 特徴的なイオン $[\text{M}-\text{PFB}]^-$ でモニタリングすると attomol という超高感度を得られる.^{70, 71)} カルボニル基に対するこの種誘導体化も工夫されている. すなわち, カルボキシメトキシムにいったん誘導後, カルボキシシル基を PFB 化する.⁷²⁾ また, 筆者らが開発した ECD 用試薬 pentafluorobenzoyloxyamine⁷³⁾ で直接オキシム化し GC/NICI-MS 分析に付す手法も工夫されている.⁷⁴⁾

4. 液体クロマトグラフィー/マスマススペクトロメトリー

LC/MS の普及には目を見張るものがあり, タンデム型の LC/MS-MS も広く利用されるに至っている. これにはサーモスプレーイオン化 (TSPI), 大気圧イオン化 (APCI), エレクトロスプレーイオン化 (ESI), パーティクルビームイオン化 (PBI), フリット FAB など各種インターフェイスの開発によるところが大きい. ハイファネーテッド MS における高感度化は, 高質量領域に測定対象物に対して特徴的なイオンを効率よく生成させることによって達成される. これらインターフェイスは各々特徴を持っており, それぞれに対応した誘導体化が必要になると考えられる. 最近, こうした検討が見られるようになってきており, その例を紹介したい.

TSPI は, 比較的疎水性化合物の測定に有利とされるが, プロスタグランジン, コルチゾールなどでは水酸基をアセチル化すると感度の向上することが報告されている.^{75, 76)} また, アミノ基を 9-fluorenylmethyl chloroformate で誘導体化すると $[\text{M}-\text{FMOC}+2\text{H}]^+$ を効率的に生成するという.⁷⁷⁾ オリゴ糖では, *p*-アミノ安息香酸アルキルエステルで誘導体化するとフリット FAB における感度が向上する.⁷⁸⁾ 一方, PBI, ESI では電子親和性に富む原子団の導入が有利であり, カルボン酸の PFB 化,⁷⁹⁾ オリゴ糖の 4-aminobenzoic acid 2-(diethylamino)ethyl ester による誘導体化が,⁸⁰⁾ またビタミン D 関連化合物に対しては, ジェノフィル試薬 4-pentafluorobenzyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione が提供されている.⁸¹⁾

5. おわりに

分析化学において分子 1 個の特異的認識と捕捉は究極の目標の一つであり, このための誘導体化法の工夫は今後とも大きな課題といえよう. 一方, 生体成分の測定にあたっては attomol, zeptomol といった検出感度の向上に伴って, 妨害物質の除去, 誘導体化反応といった一連の操作すなわち前処理の重要性が増すことになり, 酵素, 抗体といった生体由来の機能性物質をオンラインで利用することも必要となろう. これまで誘導体化試薬は, 主として低分子化合物を対象として開発されてきたが, LC/MS や matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI)

飛行時間型 (TOF) MS の登場とも相俟って、生体高分子や超分子の分析を容易にする特異的誘導体化法の工夫も今後の研究課題となろう。

引用文献

- 1) Goto J., "Detection-Oriented Derivatization Techniques in Liquid Chromatography," ed. by Lingeman H., Underberg W. J. M., Marcel Dekker, Inc., New York, 1990, pp. 323—358.
- 2) 南原利夫, 後藤順一, "最新ガスクロマトグラフィー IV," 池川信夫編, 1981, pp. 251—279.
- 3) 中村 洋, ぶんせき, **1980**, 561.
- 4) 後藤順一, ぶんせき, **1990**, 888.
- 5) Takadate A., Irikura M., Suehiro T., Fujino H., Goya S., *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1164 (1985).
- 6) Iwata T., Yamaguchi M., Nakamura M., *J. Chromatogr.*, **421**, 43 (1987).
- 7) Iwata T., Hanazono H., Yamaguchi M., Nakamura M., Ohkura Y., *Anal. Sci.*, **5**, 67 (1989).
- 8) Tsuruta Y., Teranishi T., Date Y., Kohashi K., *J. Chromatogr.*, **617**, 213 (1993).
- 9) Tsuruta Y., Tomida H., Kohashi K., *Anal. Sci.*, **4**, 531 (1988).
- 10) Katayama M., Masuda Y., Taniguchi H., *J. Chromatogr.*, **612**, 33 (1993).
- 11) Katayama M., Taniguchi H., *J. Chromatogr.*, **616**, 317 (1993).
- 12) DeSilva K. H., Vest F. B., Karnes H. T., *Biomed. Chromatogr.*, **10**, 318 (1996).
- 13) Cohen S. A., Michaud D. P., *Anal. Biochem.*, **211**, 279 (1993).
- 14) Cichy M. A., Stegmeier D. L., Veening H., Becker H. D., *J. Chromatogr.*, **613**, 15 (1993).
- 15) Vogt W., Egeler E., Sommer W., Eisenbeiss F., Meyer H. D., *J. Chromatogr.*, **400**, 83 (1987).
- 16) Bourque A. J., Krull I. S., *J. Chromatogr.*, **537**, 123 (1991).
- 17) Bald E., Sypniewski S., Drzewoski J., Stepień M., *J. Chromatogr.*, **681**, 283 (1996).
- 18) Mukherjee P. S., DeSilva K. H., Karnes H. T., *Pharm. Res.*, **12**, 930 (1995).
- 19) Mukherjee P. S., Karnes H. T., *Anal. Chem.*, **68**, 327 (1996).
- 20) Nakashima K., Taguchi Y., Kuroda N., Akiyama S., Duan G., *J. Chromatogr.*, **619**, 1 (1993).
- 21) Iwata T., Inoue K., Nakamura M., Yamaguchi M., *Biomed. Chromatogr.*, **6**, 120 (1992).
- 22) Iwata T., Ishimaru T., Nakamura M., Yamaguchi M., *Biomed. Chromatogr.*, **8**, 283 (1994).
- 23) Saito M., Ushijima T., Sasamoto K., Ohkura Y., Ueno K., *J. Chromatogr.*, **674**, 167 (1995).
- 24) Tod M., Prevot M., Chalom J., Farinotti R., Mahuzier G., *J. Chromatogr.*, **542**, 295 (1991).
- 25) Shimada K., Oe T., *Anal. Sci.*, **6**, 461 (1990).
- 26) Shimizu M., Kamachi S., Nishii Y., Yamada S., *Anal. Biochem.*, **194**, 77 (1991).
- 27) Shimizu M., Gao Y., Aso T., Nakatsu K., Yamada S., *Anal. Biochem.*, **204**, 258 (1992).
- 28) Watanabe Y., Imai K., *Anal. Biochem.*, **116**, 471 (1981).
- 29) Kotaniguchi H., Kawakatsu M., Toyo'oka T., Imai K., *J. Chromatogr.*, **420**, 141 (1987).
- 30) Imai K., Fukushima T., Uzu S., *Biomed. Chromatogr.*, **7**, 177 (1993).
- 31) Fukushima T., Santa T., Homma H., Nagatomo R., Imai K., *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 1130 (1995).
- 32) Imai K., Fukushima T., Hagiwara K., Santa T., *Biomed. Chromatogr.*, **9**, 106 (1995).

- 33) Fukushima T., Kato M., Santa T., Imai K., *Biomed. Chromatogr.*, **9**, 10 (1995).
- 34) Uzu S., Imai K., Nakashima K., Akiyama S., *Biomed. Chromatogr.*, **5**, 184 (1991).
- 35) Nakashima K., Suetsugu K., Yoshida K., Akiyama S., Uzu S., Imai K., *Biomed. Chromatogr.*, **6**, 149 (1992).
- 36) Toyo'oka T., Uchiyama S., Saito Y., Imai K., *Anal. Chim. Acta*, **205**, 29 (1988).
- 37) Imai K., Fukushima T., Yokosu H., *Biomed. Chromatogr.*, **8**, 107 (1994).
- 38) Imai K., Uzu S., Nakashima K., Akiyama S., *Biomed. Chromatogr.*, **7**, 56 (1993).
- 39) Imai K., Matsunaga H., Fukushima T., Santa T., Homma H., Nakashima K., Akiyama S., *Biomed. Chromatogr.*, **9**, 152 (1995).
- 40) Toyo'oka T., Ishibashi M., Takeda Y., Nakashima K., Akiyama S., Uzu S., Imai K., *J. Chromatogr.*, **588**, 61 (1991).
- 41) Santa T., Kimato K., Fukushima T., Homma H., Imai K., *Biomed. Chromatogr.*, **10**, 183 (1996).
- 42) Toyo'oka T., Liu Y-M., *Anal. Proc.*, **31**, 265 (1994).
- 43) Toyo'oka T., Takahashi M., Suzuki A., Ishii Y., *Biomed. Chromatogr.*, **9**, 162 (1995).
- 44) Nimura N., Kinoshita T., *J. Chromatogr.*, **352**, 169 (1986).
- 45) Buck R. H., Krummen K., *J. Chromatogr.*, **387**, 255 (1987).
- 46) Desai D. M., Gal J., *J. Chromatogr.*, **629**, 215 (1993).
- 47) Sano A., Takitani S., Nakamura H., *Anal. Sci.*, **11**, 299 (1995).
- 48) Toyo'oka T., Ishibashi M., Terao T., Imai K., *Analyst (London)*, **118**, 759 (1993).
- 49) Toyo'oka T., Liu Y-M., Hanioka N., Jinno H., Ando M., Imai K., *J. Chromatogr.*, **675**, 79 (1994).
- 50) Toyo'oka T., Liu Y-M., Jinno H., Hanioka N., Ando M., Imai K., *Biomed. Chromatogr.*, **8**, 85 (1994).
- 51) Toyo'oka T., Ishibashi M., Terao T., *J. Chromatogr.*, **625**, 357 (1992).
- 52) Toyo'oka T., Ishibashi M., Terao T., *J. Chromatogr.*, **627**, 75 (1992).
- 53) Toyo'oka T., Ishibashi M., Terao T., *Anal. Chim. Acta*, **278**, 71 (1993).
- 54) Toyo'oka T., Liu Y-M., *Analyst (London)*, **120**, 385 (1995).
- 55) Kondo J., Imaoka T., Kawasaki A., Nakanishi A., Kawahara Y., *J. Chromatogr.*, **645**, 75 (1993).
- 56) Kondo J., Suzuki N., Imaoka T., Kawasaki T., Nakanishi A., Kawahara Y., *Anal. Sci.*, **10**, 17 (1994).
- 57) Kondo J., Imaoka T., Suzuki N., Kawasaki T., Nakanishi A., Kawahara Y., *Anal. Sci.*, **10**, 697 (1994).
- 58) Imai K., Bunrin T., Kameda Y., Yamazaki M., *J. Chromatogr.*, **662**, 87 (1994).
- 59) Yasaka Y., Matsumoto T., Tanaka M., *Anal. Sci.*, **11**, 295 (1995).
- 60) Al-Kindy S., Santa T., Fukushima T., Homma H., Imai K., *Biomed. Chromatogr.*, **11**, 137 (1997).
- 61) Goto J., Goto N., Shao G., Ito M., Hongo A., Nakamura S., Nambara T., *Anal. Sci.*, **6**, 261 (1990).
- 62) Goto J., Shao G., Fukasawa M., Nambara T., Miyano S., *Anal. Sci.*, **7**, 645 (1991).

- 63) Goto J., Shao G., Ito M., Kuriki T., Nambara T., *Anal. Sci.*, **7**, 723 (1991).
- 64) Brückner H., Cah C., *J. Chromatogr.*, **555**, 81 (1991).
- 65) Iida T., Komatsubara I., Chang F. C., Goto J., Nambara T., *J. Chromatogr.*, **537**, 345 (1991).
- 66) Yamashita K., Watanabe K., Ishibashi M., Katori M., Miyazaki H., *J. Chromatogr.*, **424**, 1 (1988).
- 67) Goto J., Teraya Y., Nambara T., Iida T., *J. Chromatogr.*, **585**, 281 (1991).
- 68) Goto J., Hasegawa K., Nambara T., Iida T., *J. Chromatogr.*, **574**, 1 (1992).
- 69) Ishibashi M., Watanabe K., Ohyama Y., Mizugaki M., Hayashi Y., Takasaki W., *J. Chromatogr.*, **562**, 613 (1991).
- 70) Goto J., Watanabe K., Miura H., Nambara T., Iida T., *J. Chromatogr.*, **388**, 379 (1987).
- 71) Goto J., Miura H., Inada M., Nambara T., Nagakura T., Suzuki H., *J. Chromatogr.*, **452**, 119 (1988).
- 72) Bagnati R., Fanelli R., *J. Chromatogr.*, **547**, 325 (1991).
- 73) Nambara T., Kigasawa K., Iwata T., Ibuki M., *J. Chromatogr.*, **114**, 81 (1975).
- 74) Selley M. L., *J. Chromatogr.*, **691**, 263 (1997).
- 75) Paulson J., Lindberg C., *J. Chromatogr.*, **554**, 149 (1991).
- 76) Yamane M., Abe A., *J. Chromatogr.*, **568**, 11 (1991).
- 77) Lu Z., Veening H., Coutant J. E., *J. Chromatogr.*, **540**, 199 (1991).
- 78) Suzuki S., Kakehi K., Honda S., *Anal. Chem.*, **68**, 2073 (1996).
- 79) Galimberti R., Lecchi P., De Angelis L., Caruso D., Toia A., Volterra A., Racagni G., Galli G., *Anal. Biochem.*, **201**, 356 (1992).
- 80) Yoshino K., Takao T., Murata H., Shimonishi Y., *Anal. Chem.*, **67**, 4028 (1995).
- 81) Wang K., Davis P. P., Crew T., Gabriel L., Edom R. W., *Anal. Biochem.*, **243**, 28 (1996).