

過酸化水素のフローインジェクション分析法に基づく生体関連物質定量

松原 チヨ

東京薬科大学 生命科学部 〒192-03 東京都八王子市堀之内1432-1

Flow Injection Analysis of Hydrogen Peroxide and
their Application to Determination of Biological Substances

Chiyo MATSUBARA

School of Life Science, Tokyo University of Pharmacy and Life Science
Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-03

Flow injection analysis of hydrogen peroxide using immobilized oxidase enzyme reactors are useful for the determination of trace amounts of biological substances in serum and foods, such as glucose, oxalate. Recent examples of reserch in these areas are presented in this review.

1. はじめに

過酸化水素は、水によく似た分子構造と性質を持ち、生体を含めて自然界のどこにでも少量ではあるが広く存在する物質である。このことは、自然界の多種類の物質が過酸化水素の生成と消滅に関与していることを示しており、過酸化水素量を測定することによる様々な物質の定量の可能性を示している。特に、生体成分、食品成分について、酸化反応を触媒して過酸化水素を生成する酵素が、多く見出だされている。従って、臨床分析や生化学分析あるいは食品分析などの分野では、これらの酵素反応によって生成した過酸化水素を検出する微量成分分析が以前から実用されてきた。所で、臨床分析や食品分析では、その試料の性質上、巨大なマトリックス中に存在する極微量成分を定量することが必要であり、また操作の迅速性が要求される。少量の試料を用い、極微量成分を高感度かつ迅速に測定するために最も適している方法の一つとして、フロー

インジェクション分析法 (F I A) は、近年、生化学、薬学、農芸化学、環境科学などライフサイエンスやバイオ関連分野において応用される例が目立ってきた。F I A は、酸化酵素反応によって生成した過酸化水素を、生成直後に流れの中で測定できるので、不安定な化合物である過酸化水素の検出法として最適であろう。

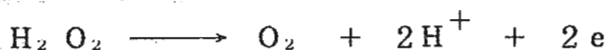
ところで、分離過程を持たない F I A の大きな欠点は、検出法に高い選択性が要求されること、原則として試料中の一成分しか定量出来ないことで、H P L C に比較して不利な点である。これらを克服するためには、選択性の高い過酸化水素の検出反応の開発、特異性の高い酵素反応を組み合わせること、シグナルの検出に時差を設定することなど種々検討されている。

本稿では、過酸化水素の F I A と、主に食品分析及び臨床分析分野における応用について、検出法によって電気化学検出法、化学発光法、吸光光度法に別けて、1990年以降の報告例中、興味深いものを紹介する。

2. 電気化学検出法による過酸化水素の F I A と応用

臨床分析、食品分析分野における電気化学的検出法には過酸化水素電極と酸素電極が広く実用化されている。糖、脂質、アミノ酸など多くの生体あるいは食品成分は、それぞれ固有の酸化酵素の存在下で酸化されるが、その時溶液中の酸素を消費し過酸化水素を生成する。従って、溶存酸素の減少量、あるいは過酸化水素の増加量いずれを検出しても各成分の定量ができる。しかし溶存酸素の減少量を検出する方法は、電極応答に時間がかかり、また、酸素の絶対量を測定する必要がある。この様な繁雑さを避けるために酸素消費量を時間に対して微分し酸素消費速度を求める方法が提出されたが、時間と共に速やかに溶液相が移動する F I A では繁雑さを伴うので、酸素電極を用いる F I A の報告は少ない。

過酸化水素電極は、白金電極 (アノード) を用い、電位を 0.6 V (v s. AgCl/Ag) に設定される。過酸化水素は次式のように酸化され、濃度に比例した酸化電流が流れる。

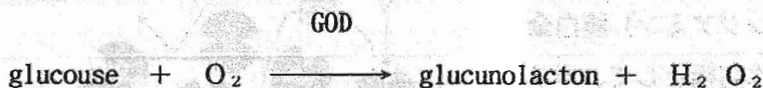


過酸化水素を生成する固定化酵素を、反応カラムとして電極に前置する方法と、酵素膜として電極を被覆する方法があるが、カラムを前置する方法が最近は大勢を占めている。

過酸化水素の電極反応において最も問題になるのは、設定電位以下において酸化され

る共存物質の影響である。臨床分析など生体試料においては尿酸、システイン、アスコルビン酸等の還元性物質が、正誤差を与える事が指摘されている。またタンパク質による表面汚染が、白金電極の感度低下をもたらすことも実用上大きな問題点である。そこで過酸化水素電極に還元性物質や高分子性物質が触れることを避けるためにセロファンなどの透析膜やポリカーボネート、不均質性超濾過膜などで被覆することが検討されている。

Sassoらは、このような難点を解決するために、白金で被覆した炭素電極をグルコースオキシダーゼ酵素膜、更にポリ(オ-フェニレンジアミン)の電解重合膜で被覆したグルコース電極を作製し、血清中グルコース定量に応用した¹⁾。次式に示した反応によって生成した過酸化水素が検出される。



GOD : グルコースオキシダーゼ

ポリ(オ-フェニレンジアミン)電解重合膜で被覆した場合(Fig. 1)と、被覆しない場合(Fig. 2)に得られたフローシグナルを示す。ポリ(オ-フェニレンジアミン)電解重合膜によって被覆された過酸化水素電極では、グルコース測定感度が上昇し、アスコルビン酸等還元性物質の影響を避けることができた。標準血清のグルコース定量値は、 $6.46 \pm 0.18 \text{ mM}$ であり表示値 $6.41 \pm 0.39 \text{ mM}$ とよく一致している。60回の血清試料の注入後も感度の低下がみられず、タンパク質汚染による電極活性の低下を防ぐことに成功している。この電極は、毎日使用して3ヶ月の寿命を保った。この電極の表面状態は明らかでないが、Ohnukiらはこのフィルムの厚みが 10 nm 以下であることを報告している²⁾。グルコースオキシダーゼの直径は 8.6 nm であり、従って

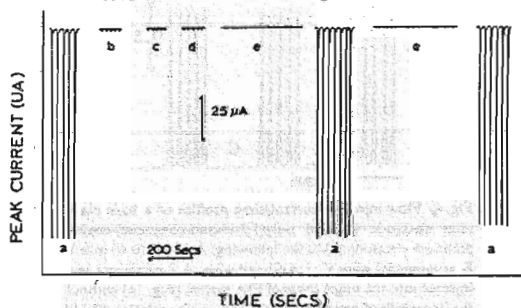


Figure 1. Current response of a poly(1,2-diaminobenzene)-coated platinumized RVC electrode to the following: a, H_2O_2 (1 mM); b, L-ascorbic acid (1 mM); c, uric acid (1 mM); d, L-cysteine (1 mM); and e, control human serum.

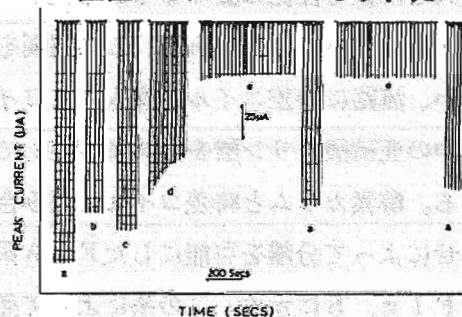
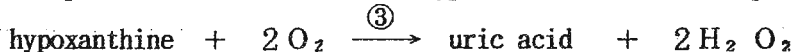
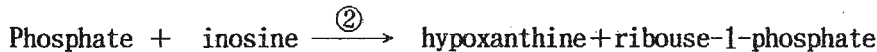
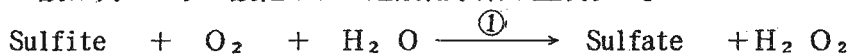


Figure 2. Current response of a platinumized RVC electrode (unpolymerized) to the following: a, H_2O_2 (1 mM); b, L-ascorbic acid (1 mM); c, uric acid (1 mM); d, L-cysteine (1 mM); and e, control human serum.

ポリマーは活性部位を覆っておらず、グルコースは酵素の活性部位に到達できると考えられた。推測された電極表面状態を Fig. 3 に示す。八尾らは、ポリ(*o*-フェニレンジアミン) 電解重合膜で被覆した白金電極を用い、酸化酵素カラムで生成した過酸化水素を検出する、ワイン中の亜硫酸とリン酸の FIA を報告している³⁾。亜硫酸及びリン酸は次のように酸化されて過酸化水素を生成する。



① sulfite oxidase ② purine nucleoside

phosphorylase ③ xanthine oxidase

ポリ(*o*-フェニレンジアミン) 膜白金電極は、白金電極を作用極として、ポリ(*o*-フェニレンジアミン) 溶液の流れの中で印荷電圧 1.0V (vs. Ag/AgCl) をかけて電解重合して得た。膜処理をしない白金電極は、ワイン中の電極反応活性物質と反応し、タンパク質による汚れによって感度低下を生じている (Fig. 4 a)。一方、重合膜で被覆された白金電極は、感度はやや低い還元性共存物質の影響は認められず、ワインを繰返し注入した後も性能は変わらなかった (Fig. 4 b)。八尾らは、この電極を用い、流路に時差コイルを挿入してワイン中の亜硫酸とリン酸を同時に測定している。酵素カラムと時差コイルの組み合わせによって分離を可能にした FIA 系を Fig. 5 に示す。この系によって亜

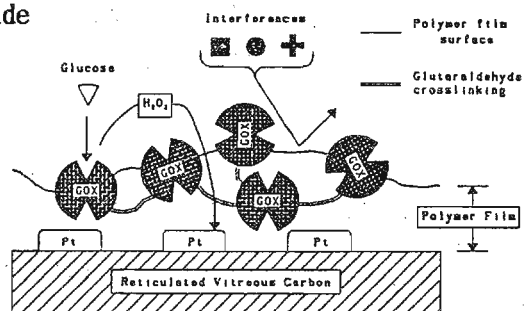


Figure 3 Schematic representation of a possible morphology of the biosensor surface.

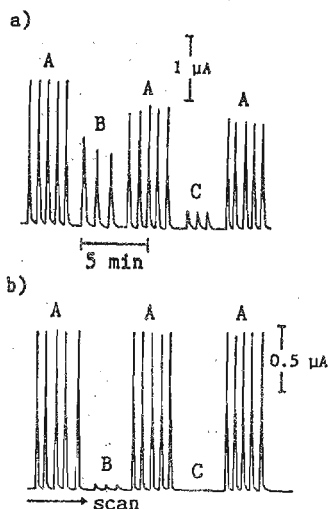


Fig. 4 Flow-injection current/time profiles of a bare platinum electrode (a) and poly(1,2-dianinobenzene)-coated platinum electrode (b) to the following: A, H_2O_2 (0.45 mM); B, commercial wine; C, 1:4 diluted wine. A 5- μl aliquot was injected into the single channel FIA system (Fig. 1a) without the immobilized enzyme reactor. The carrier solution (0.1M phosphate buffer, pH 7.5) was pumped at a flow rate of 1.0 ml/min.

硫酸 0.001–2mM、リン酸 0.002–5mM
の範囲でよい直線性が得られている。

この系は、食品中のスクロース、ラク
トース、マルトース、またイノシン酸、グ
ルタミン酸、グアニル酸のそれぞれ分別
定量に応用されている⁴⁾。

平行に並べて設置されたそれぞれの酸
化酵素カラムに、バルブを切り替えて試
料を流し、試料中の複数成分を分別定量
した例もある。アルコール性飲料や血清
中グルコース、乳酸、およびエタノール
をグルコースオキシダーゼ、乳酸オキシ
ダーゼ、アルコールオキシダーゼカラム
によってそれぞれ酸化し、生じた過酸化
水素を透析膜で覆った白金電極で検出し
ている⁵⁾。アスコルビン酸などの妨害
は、前置したそれぞれのオキシダーゼ及
びカタラーゼカラムによって除いた。

グルコース0.02–10mM、乳酸 0.005–1
mM、エタノール 5×10^{-4} –0.1%の範囲
でrsdl. 4%以下のよい直線性が得られて
いる。

また固定化酵素なしのカラムを酵素カ
ラムと並列に設置し、酵素なしカラムに
よって得られた電流値をブランク値とし
て差し引く方法が報告されている⁶⁾。
醤油や市販のスープ中のグルタミン酸の
定量に応用し好結果が得られている。流
路のダイアグラムをFig. 6に、得ら

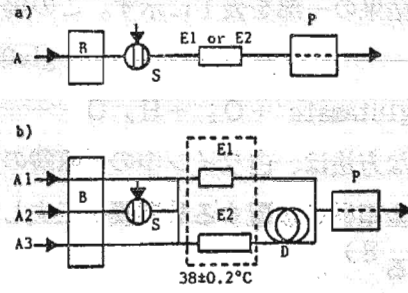


Fig. 5 (a) Single channel FIA manifold used for optimization of parameters. (b) FIA manifold used for the simultaneous determination of sulfite and phosphate. A, A1, A2 and A3: carrier solution; B: pump; S: injector; D: delay coil; E1: sulfite oxidase immobilized reactor; E2: purine nucleoside phosphorylase/xanthine oxidase co-immobilized reactor; P: poly(1,2-diaminobenzene)-coated platinum electrode.

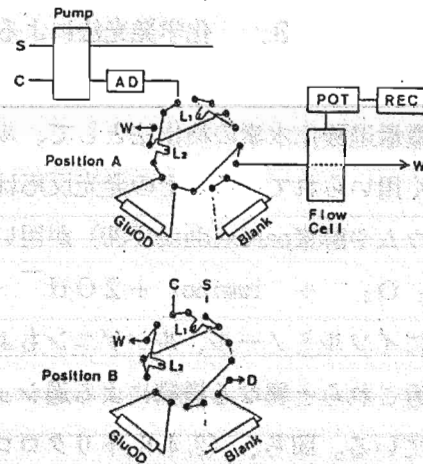


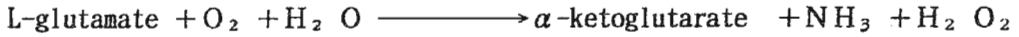
Fig. 6 Schematic diagram of the flow system and the connection of the sample loops, GluOD reactor and blank column to the sixteen-way switching valve. L₁, L₂, sample loops; GluOD, GluOD reactor; Blank, blank column; C, carrier solution (0.1 M phosphate buffer, pH 7); S, sample; D, detector; W, waste.

TABLE 1

Results for samples analysed by the proposed method and L-glutamate kit method

Sample	L-Glutamic acid found (%)	
	Proposed method	L-Glutamate kit method
Soup for "Tamago-dofu"	1.27	1.25
Soup for buckwheat noodle	0.48	0.50
Soup for Japanese noodle	0.40	0.44
"Ponzu"	1.05	1.06
Soy sauce (common)	0.88	0.88
"Gyosho"	1.01	1.12
"Gyosho" plus soy sauce	0.92	0.93
Soy sauce (light colour)	1.59	1.64

れた結果の一部を表1に示す。この場合の酵素反応は次のように示される。



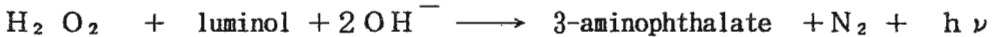
同様な方法は、白ワイン中の亜硫酸の定量にも応用されている⁷⁾。

白金電極を被覆する酵素膜を工夫して、乳中の乳糖とグルコースを分別定量した報告もある⁸⁾。

電気化学検出法を用いる過酸化水素のFIAは、濁ったり着色した溶液試料においてもその影響を受けずに測定できる優れた方法である。食品分析や生化学分析の分野における発展が期待される。

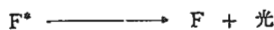
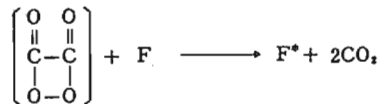
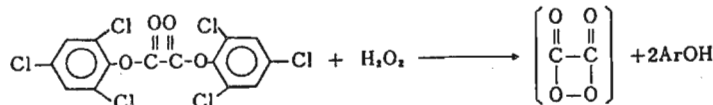
3. 化学発光法による過酸化水素のFIAと応用

極微量過酸化水素の検出法として、ルミノールによる化学発光は古くから知られており広く用いられている。その発光反応は次のように記され、触媒としてフェリシアン化カリウムや酵素peroxidase(POD) が用いられる場合が多い。



同様にイソルミノール、ルシゲニンもよく用いられている。

最近これらと異なる機構による過シュウ酸エステル化学発光が見出だされ、広く実用されている。即ち、(2,4,6-トリクロロフェニル)オキザレートに代表されるシュウ酸のジエステルと過酸化水素による化学発光系であり、蛍光物質を選ぶことにより高感度を得られる。その反応は次のように示される⁹⁾。



過シュウ酸エステル化学発光反応

TCPO: ビス(2,4,6-トリクロロフェニル)オキザレート

F: 蛍光物質

F*: 励起された蛍光物質

化学発光は、吸光光度法、蛍光法あるいは電気化学検出法等に比較して検出感度が高く微量成分分析に有効である。しかし高感度ゆえに発光強度は、その条件（温度、pH、触媒）によって大きな影響を受けやすいことが欠点である。従って、反応条件の精密な制御に適したFIAは、化学発光を用いる測定に最も適した方法と言えよう。一方、化学発光は、アスコルビン酸、クレアチニン、尿酸など還元性物質の影響を受けやすいことが指摘されており、特に、食品分析や生化学分析では、マトリックス中に多量に存在するタンパク質の影響も大きい。化学発光によるFIAの構築に当たっては、酵素カラムをも含めて、反応条件の設定と共存物質による妨害の除去への配慮が重要である。

Puchadesらは、固定化ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ及びビムタロターゼリアクターを設置した乳中のラクトースのFIAを報告している¹⁰⁾。生成した過酸化水素の検出にはフェリシアン化カリウムを触媒とするルミノール化学発光が用いられた。流路内に透析器を組み込んで共存物質による影響の除去に成功している。流路をFig. 7に、条件を表2に示す。本法により前処理なしに20-200mMの範囲のラクトースを測定可能であり、時間当たり20試料を処理できた。

尿中のシュウ酸をルミノール化学発光FIAによって測定する場合、アスコルビン酸の影響を除くために亜硝酸ナトリウムの添加が検討された¹¹⁾。

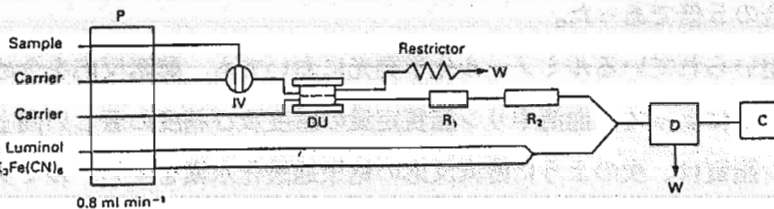
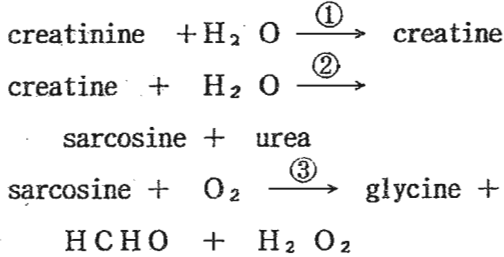


Fig. 7 Manifold for the enzymic determination of lactose in milk. P, Pump; IV, injection valve; DU, dialysis unit; R₁, immobilized β -galactosidase reactor; R₂, co-immobilized GOD-mutarotase reactor; D, detector; W, waste; and C, computer.

Table 2 Optimum conditions for the chemiluminescence enzymic FI determination of lactose

Parameter	Optimum condition
Phosphate buffer concentration	0.06 mol l ⁻¹
Phosphate buffer pH	7.6
Luminol concentration	1 × 10 ⁻³ mol l ⁻¹
Hexacyanoferrate(III) concentration	8 × 10 ⁻³ mol l ⁻¹
Sample loop size	70 μ l
Flow rate	0.8 ml min ⁻¹
Restrictor length	4.0 m

前述のように化学発光は、条件によってその感度、精度は大きく変化する。FIAにおいては、過酸化水素を生成する酵素カラムの作製法も検出感度に影響を与える。多段階の酵素反応を行う場合、流路内での設置順序は、反応効率に影響を与える。流路内で溶液は常に一方方向に流れており、原則として逆流や滞留は無いからである。検討された一例を紹介しよう^{1 2)}。血清中のクレアチニン^{1 2)}は、次の3段階の酵素反応によって酸化され過酸化水素を生成し測定される。



①CNH : creatininase,

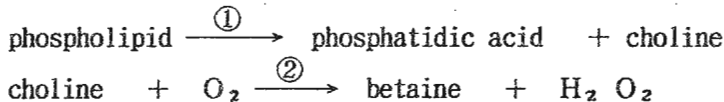
②CRH : creatinase

③SAO : sarcosine oxidase

検出は、ルミノール（触媒フェリシアン化

カリウム）発光系に拠った。結果をFig. 8に示す。①②③の3種の酵素を同時に共固定化したカラムが最も高い反応効率を示し、それぞれ固定化したガラスビーズを混合充填した場合の5倍であった。

古くから用いられているルミノール化学発光においても、酵素反応を含めた至適条件を設定することによって、血清中リン脂質定量の感度及び精度の著しい向上が得られた^{1 3)}。リン脂質は、次のように酵素反応の結果過酸化水素を生じ、ルミノール発光によって検出される。



① phospholipase D: PL-D

② choline oxidase : COD

PL-D、COD 酵素を同時に担体上に固定したカラムを用い、測定時間は1/3に短縮された。また発光反応時の温度を5℃に保つ等、条件を一定にすることにより、過酸化水素を0.1 pmolまで、リン脂質 2pmolまで定量が可能になり、血清試料の微量化（5 μl）に成功している。そのフローダイアグラムとシグナルをFig. 9と10に示す。

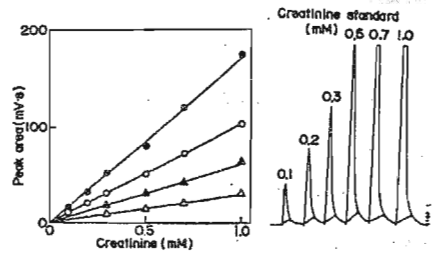


Fig. 8 Calibration graph (left) and recorder trace (co-immobilized CNH-CRH-SAO column) (right) for creatinine obtained with a FIA chemiluminescence system using immobilized enzyme columns. ● = Co-immobilized CNH-CRH-SAO column; ○ = sequential CNH-CRH-SAO column; ▲ = mixed-bed CNH-CRH-sequential SAO column; △ = mixed-bed CNH-CRH-SAO column.

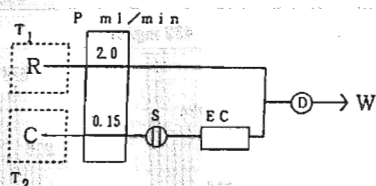


Fig. 9 Schematic Diagram of FIA System for Determination of Phospholipids

R, luminol reagent (10 μ M luminol and 40 U/l POD in 20 mM borate buffer, pH 9.4); C, carrier solution (0.2% Triton X-100 and 30 mM CaCl_2 in 2 mM borate buffer, pH 8.4); P, pump; S, sample injector (20 μ l); EC, enzyme column; D, chemiluminescence detector; T₁, thermostat bath (5°C); T₂, thermostat bath (38°C); W, waste.

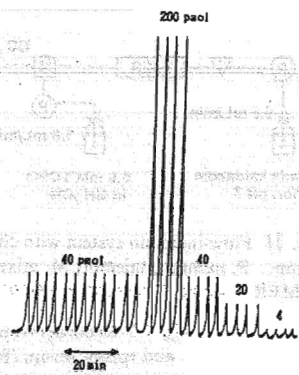


Fig. 10 Typical Chromatogram for the Standard Phospholipid Solution

酵素カラムを組み合わせたFIAでは、酵素反応の効率や選択性が、定量方法全体の感度や精度そして迅速性に影響を与える。血清中グルコースの定量には、グルコースオキシダーゼ (GOD) が広く用いられているが、GODは35%存在している α -グルコースを酸化しない。そこで酵素ムタロターゼによってこれを β -グルコースに変化させる必要がある。しかし一般に酵素反応の段階が増すと反応率は低下する。Kibaらは、ピラノース環C-2位のヒドロキシル基を酸化するピラノースオキシダーゼカラムを用いた血清グルコースのFIAを報告している¹⁴⁾。この酵素は、GODに比較して選択性はやや劣るが、 α 、 β 両グルコースに反応し、反応速度が大きいので感度が2倍以上になり、簡易迅速な測定を可能にした。

ルミノール発光法よりさらに高感度な方法として、過シュウ酸エステル化学発光法によるFIAが報告されている。中でも蛍光収率の高い蛍光体である2,4,6,8-tetrathiomorpholinopyrimido[5,4,-d]pyrimidine (TMP) とシュウ酸エステルとしてbis(2,4,6-trichlorophenyl)oxalate (TCPO) を用いた例を紹介したい。過酸化水素との反応については前述した。Nakashimaらは、グルコースオキシダーゼ及びウリカーゼカラムと組み合わせて血清中グルコース及び尿酸定量に応用している¹⁵⁾。流路系をFig. 11に、得られたシグナル例をFig. 12に示す。尿酸では0.5 μ M (10 pmol / 20 μ l injection)から10 μ M (0.2 nmol / 20 μ l injection)、グルコースでは0.5 μ M (10 pmol / 20 μ l injection)から300 μ M (6 nmol / 20 μ l injection)の範囲で濃度と良い直線関係が示された。繰返し測定のrsdは2%以下であり、1時間に60試料の測定が可能であった。この発光法は、FIAに応用することにより、バッチ法に比較して格段に精度が向上しており、臨床分析などにおいて高い応用性が期待される。

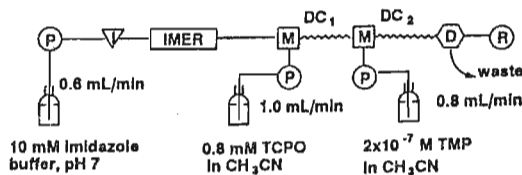
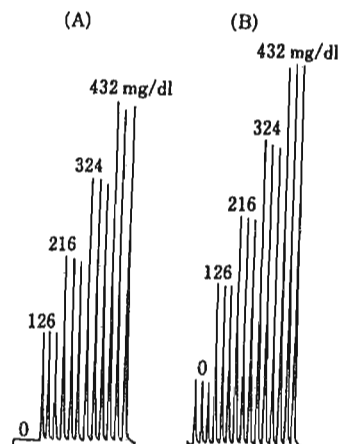


Fig. 11 Flow-injection system with chemiluminescence detection. P, pump; I, injector; M, mixing tee; D, detector; and IMER, immobilized enzymic reactor.

Fig. 12 Recorder responses for a standard glucose solution (A) and spiked serum (B). Numbers on the signals indicate the concentrations of standard glucose solutions (A) or those spiked in serum (B).



4. 吸光光度法による過酸化水素のFIAと応用

過酸化水素の吸光光度法による定量は、バッチ法によって古くから実用されてきた。従って、それらの反応を基礎として、吸光光度法による過酸化水素のFIAも多くの検討がなされている。化学発光や電気化学検出法に比較して、一般的に感度は劣るが、再現性に優れ、操作が容易であることから臨床分析や食品分析において実用化されている。これらの方法の多くは、ペルオキシダーゼ (POD) 存在下に過酸化水素によって、4-アミノアンチピリン (AAP) とフェノールを酸化縮合させ、反応の結果生じた色素の吸光度を測定するものであり、さらに感度を高めるために、AAP及びフェノールに代わる、吸光係数の大きい色原体が開発され、実用化されている。汎用されている一例を挙げる。

POD



DCPS : 3,5-dichloro-2-hydroxybenzenesulfonic acid

生化学分析や食品分析においては、このFIA系に、分析対象物質に対して特異性の高い酸化酵素カラムを設置し、生成する過酸化水素を検出している。しかし上に述べた化学発光や電気化学検出法と同様に、この方法においても過酸化水素を生成する酵素反応の選択性、反応効率は、定量結果に大きな影響を与える。従って、反応条件の検討などが行われており、AAP-DCPS発色系に、基質特異性の高いグルタミン酸オキシダーゼ酵素カラムを作製して組み込み、食品及び薬品中のグルタミン酸を0.01-0.5 mMの範囲まで測定できた報告¹⁶⁾、グルコースオキシダーゼ酵素カラムを設置して、ワイン中のグルコースなどの定量に応用した例などが挙げられる¹⁷⁾。

PODを用いる発色系では、PODの水素供与体に対する選択性が低いために、呈色反応に対する還元性共存物質の影響は避けられない。そこで新しい見地から考案された過酸化水素の呈色試薬Ti-TPyPを用いるFIAが提案された^{18, 19, 20}。Ti-TPyP試薬は、oxo[5, 10, 15, 20-tetra(4-pyridyl)porphyrinato]titanium(IV)の水溶液であり、過酸化水素と反応してTi(IV)-TPyP-H₂O₂錯体(λ_{max} 450nm)を生成する。この錯体の吸光度を測定して過酸化水素を定量できる。呈色反応は錯体生成反応なのでPODを必要とせず、従って還元生物質の影響は極く小さい。また吸光係数が大きいので高感度測定が期待される。Ti-TPyP試薬を用いたFIAでは、過酸化水素10nM-10μM(1-1000pmol/test)の範囲で良い直線性が得られている。このFIAにシュウ酸オキシダーゼカラムを設置して、食品中のシュウ酸定量に応用している。シュウ酸0.5-250μMの範囲で良い直線性が得られ、還元性共存物質の影響は殆ど見られない。FIAのフローダイアグラム(Fig. 13)とフローシグナル(Fig. 14)を示す。尚、酵素反応を次に示す。

oxalate oxidase

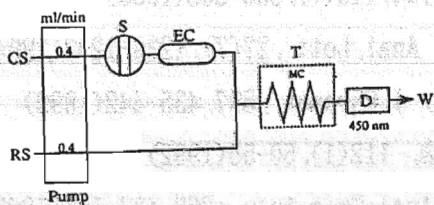


Fig. 13 Flow diagram of the FIA system for oxalate determination using an immobilized oxalate oxidase column reactor. CS, 0.05 M succinate buffer (pH 3.0); RS, 30 μM Ti-TPyP reagent; S, 6-way sampling valve (20 μl); T, thermostat bath (75°); MC, mixing coil (0.5 mm i.d., 15 m long); D, spectrophotometer (450 nm).

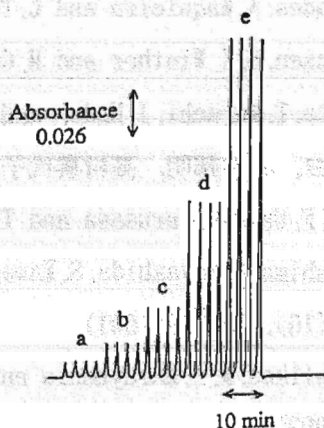


Fig. 14 Typical response curve for oxalate. The injection volume of each sample was 20 μl. a, 5 μM; b, 10 μM; c, 20 μM; d, 50 μM; e, 100 μM.

5. おわりに

酵素科学の発達に伴ってさらに多くの物質に対する酸化酵素が見出だされるであろう。生成される過酸化水素をFIAによって高感度に測定することにより、さらに多くの物質の定量が可能となろう。

引用文献

- 1) S. V. Sasso, R. J. Pierce, R. Walla, and A. M. Yacynych, *Anal. Chem.*, 62(11) 1111-1117(1990)
- 2) Y. Ohnuki, H. Matsuda, T. Osaka, and N. Oyama, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, 1983, 158, 55-67
- 3) T. Yao, M. Satomura, and T. Nakahara, *Talanta*, 41(12), 2113-2119(1994)
- 4) 八尾俊男, 鈴木清太, 和佐保, 日本分析化学会台42年会講演要旨集 p. 105(1993)
- 5) K. Matsumoto, H. Matsubara, M. Hamada, H. Ukeda and Y. Osajima, *J. Biotechnol.*, 14, 115-126(1990)
- 6) K. Matsumoto, K. Sakoda and Y. Osajima, *Anal. Chim. Acta*, 261(1992)155-159
- 7) K. Matsumoto, H. Matsubara H. Ukeda and Y. Osajima, *Agric. Biol. Chem.*, 53(9), 2347-2353(1989)
- 8) R. Pilloton, and M. Mascini, *Food Chem.*, 36, 213-222(1990)
- 9) 今井一洋, "生物発光と化学発光" p. 221 広川書店, 1989
- 10) R. Puchades, A. Maquieira and L. Torro, *Analyst*, 118(7), 855-858(1993)
- 11) E. H. Hansen, S. K. Winther and M. Gundstrup, *Anal. Lett.*, 27(7), 1239-1253(1994)
- 12) M. Tabata, T. Murachi, J. Endo, and M. Totani, *J. Chromat.*, 597, 435-442(1992)
- 13) 松原チヨ, 石井邦明, 高村喜代子, *薬学雑誌*, 112(1), 50-55(1992)
- 14) N. Kiba, F. Ueda, M. Furusawa and T. Yamane, *Anal. Chim. Acta*, 269, 187-191(1992)
- 15) K. Nakashima, N. Hayashida, S. Kawaguchi, S. Akiyama, Y. Tsukamoto and K. Imai, *Anal. Sci.*, 7(10), 715-718(1991)
- 16) C. D. Stalikas, M. I. Karayannis and S. M. Tzouwara-Karayanni, *Analyst*, 118(6)723-726(1993)
- 17) S. M. Tzouwara-Karayanni and S. R. Crouch, *Food Chem.*, 35, 109-116(1990)
- 18) C. Matsubara, N. Kawamoto, and K. Takamura, *Analyst*, 117(11)1781-1784(1992)
- 19) 松原チヨ, 中道典宏, 河本直樹, 高村喜代子, *分析化学*, 42, 363-367(1993)
- 20) C. Matsubara, Y. Yokoi, M. Tsuji and K. Takamura, *Anal. Sci.*, 11, 245-249(1995)