

アルコール飲料中の尿素分析用 FIA システム

飯田泰広・佐藤生男

神奈川工科大学工学部：〒243-0292 神奈川県厚木市下荻野 1030

Flow Injection Analysis Systems for Urea in Alcoholic Beverages

Yasuhiro Iida¹ and Ikuo Satoh²

¹Department of Applied Bioscience, Faculty of Engineering, Kanagawa Institute of Technology,
1030 Shimo-Ogino, Atsugi, Kanagawa, 243-0292, Japan

²Department of Applied Chemistry, Faculty of Engineering, Kanagawa Institute of Technology,
1030 Shimo-Ogino, Atsugi, Kanagawa, 243-0292, Japan

In this paper, we summarized flow injection analysis systems for determination of urea in the alcohol beverages. A lot of FIA methods based on the color-forming reactions without enzyme and detection of the hydrolysate of urea with urease were reported. Most of these methods were categorized as spectrophotometry (such as absorptiometry, fluorometry, luminometry), calorimetry, potentiometry and amperometry in combination with gas diffusion devices. The systems for determination of urea in serum, urine, and so on were also described.

1 はじめに

尿素は、人類が初めて無機化合物から合成した有機化合物である。我々哺乳類や両生類が陸上生活において、アンモニアを排出するための代謝において生成するものであり、そのため、尿中の尿素窒素は腎機能の指標となるなど、早くから注目されていた化合物である。尿素は、肥料[1,2]や飼料[3,4]として、あるいは保湿クリームなどを代表とする化粧品[5,6]に用いられている。また、尿素樹脂の原料としての用途や[7-9]、いくつかの疾病のマーカーとなっているので[10-12]広範な分野においてその分析方法が開発されてきている。また、醸造の過程で生成する尿素は、発がん性が示唆されているカルバミン酸エチルの前駆体と考えられており[13-16]、ワインや日本酒などのアルコール飲

料中の尿素濃度を知ることは、非常に重要な課題である。このカルバミン酸エチルは、酸性下での熱処理（蒸留）により生成しやすくなり、また、尿素濃度はもちろん、貯蔵の温度や時間、エタノール濃度などにより生成の度合いが依存することが報告されている[17]。そのため、ワインや日本酒においては、醸造後、酸性ウレアーゼを添加して尿素的の除去が試みられている[17,18]。また、尿素が酵母の有するアルギナーゼによりアルギニンと尿素に分解されることによって生成されるから、遺伝子工学的手法によりアルギナーゼ遺伝子を欠損させた尿素非生成酵母の利用が行われている[19-21]。

通常、市販のワインに含まれる尿素的の濃度は 3 mg/ml であり[22]、一方、市販の日本酒に含まれている尿素的は約

5-80 mg/ml[13]であると報告されており、尿素濃度が過剰に高くないようモニターする必要がある。本報では、アルコール飲料に含まれている尿素の FIA システムを中心に、その他、血中や尿中、環境水中などの尿素の FIA を行っている文献に関して概説することとした。なお、クロマトグラフィーを用いた手法やキットなどを使用する方法を含めワインに含まれる尿素の分析法に関しては Francis [23]、また、本稿でも中心となるアンモニアの FIA に関しては、大島、本水[68]から総説が発表されている。

2 酵素を用いない尿素の分析方法

酵素を用いない尿素の分析方法は早くから報告されており、1939年、William Fearon は高濃度の硫酸存在下において diketone と置換された尿素が反応して、黄色を呈する化合物の生成を報告した (Fig.1-(a))。また、butane-2,3-dione と片方が置換された尿素が反応することにより赤色に、セミカルバジドと反応することにより暗赤色に、ジメチル尿素との反応で紫色に呈色することが報告された[24] (Fig.1-(b))。これらの反応を用いることにより、尿素の吸光光度法による分析手法が各種開発・報告されている[25,26]。これらの、Fearon 反応に基づく方法は高感度な分析が可能であり、臨床において使用されることとなったが、その後、ウレアーゼを用いた酵素法にとって代わられることとなる[26]。

尿素とジアセチルが反応することにより生成する化合物を指標にしたジアセチル[27]および尿素[28,29]の分析法が報告された。Douglas らの土壤中の尿素分析の手法を応用して、Nagel らは、ワイン中の尿素の定量を試みた[30]。この方法は、土壤に肥料として散布された尿素の定量[31]

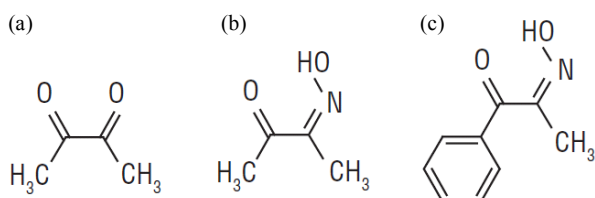


Fig. 1 Reagents for spectrophotometry for urea without enzyme. (a) butane-2,3-dione, (b) butane-2,3-dione monoxime, (c) 1-phenyl-1,2-propanedione-2-oxime.

や、貯蔵したワイン中の尿素の定量[32]などへ適用された。また、これら呈色反応を用いた尿素の分析は Zoecklein らによる”Wine Analysis and production”の中でも紹介されている[33]。

Almy と Ough は、1-phenyl-1,2-propanedione-2-oxime が尿素と反応し、最大吸収波長を 540 nm に有する発色団を形成することを報告し、尿素の定量へ適用している[34] (Fig.1-(c))。この分析手法を用いて、Ough と他の研究者らは、酵母の代謝による尿素の生成過程や、カルバミン酸エチルが生成する工程などを調べている[35-44]。

酵素を用いない尿素の分析においては、Nagel らの butane-2,3-monoxime を用いた方法よりも、Ough らの 1-phenyl-1,2-propanedione-2-oxime を用いた手法の方が、より安定で、再現性がよいことが報告されている[45,46]。感度に関しては両者とも 1mg/ml であるとされている。また、尿素と次亜臭素酸塩を組み合わせることにより、化学発光検出を行えることが報告されており、当該方法では、僅か 0.5 μM の尿素を計測できることが示された[47]。

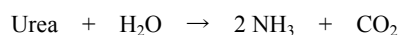
3 酵素を用いた尿素の分析方法

現在、尿素の分析の主流は酵素を用いた分析であり、F-kit に代表される診断薬の類や、FIA における利用など様々な報告がある。基本的には、ナタ豆由来のウレアーゼ (EC3.5.1.5) を用いて尿素を加水分解し、生成したアンモニアあるいは二酸化炭素を直接および間接的に計測するものである。計測に当たっては、インドフェノールブルーに誘導後、吸光光度計を用いて計測するもの、pH 呈色試薬を用いるもの、OPA (オルトフタルアルデヒド) 試薬を用いて蛍光計測するもの、pH 変化を電流あるいは電位差に変換して計測するもの、熱量計測を行うものなどである。

3.1 ウレアーゼおよび酸性ウレアーゼ

ウレアーゼは史上、最初に結晶化された酵素であり[48]、活性中心にニッケルを有している[15,49-52]。触媒反応は以下に示すように、尿素を加水分解することにより、二分

子のアンモニアと一分子の二酸化炭素を生じる。



細菌由来のウレアーゼも植物由来のものと同様に活性中心にニッケルを有している。ウレアーゼは尿素に対する特異性は高いものの、アラニンやグルタミン酸をはじめとした、複数の化合物を基質とすることや、重金属イオンなどにより活性が阻害されてしまうことも報告されている[49,53,54]。

ウレアーゼの最適 pH は、微生物由来も植物由来のものも中性から弱アルカリ性にある[49]。一方、腸内細菌の一種である乳酸菌(*Lactobacillus fermentum*)から取得した酸性ウレアーゼは、その最適 pH が 2-4 にあり、酸性下で強い活性を有することが知られている[55]。この性質は、アルコール飲料に含まれている尿素をその生成工程において除去する際に有利な性質であり、酸性ウレアーゼが広く利用されるようになってきている。近年では、土壌由来の好気性菌である *Arthrobacter mobilis* 由来の酸性ウレアーゼが見出され[15]、乳酸菌由来のものに比べ、アルコール飲料の滅菌中に酵素を失活させやすい利点から、主流となっている。いずれにせよ、ウレアーゼおよび酸性ウレアーゼは尿素分析に用いられている。また、分析の際、着目すべき点は、その活性(ユニット)である。ナタ豆由来のウレアーゼが大体 1000-5500 U/mg であるのに対し、乳酸菌由来の酸性ウレアーゼでは約 350-450 U/mg である[15]。

ところで、ナタ豆由来のウレアーゼに対する阻害剤の研究は広く行われており、特に、農産物の生産性と薬学における観点からなされている[49,53,56,57]。醸造の分野においても、ワイン中に含まれている尿素を除去するために問題となるウレアーゼの阻害物質の研究がなされている[44]。酸性ウレアーゼは、ナタ豆由来のウレアーゼが阻害される、酒石酸やコハク酸に耐性があることや 10%のエタノール中においても活性が 80%以上保持されていることが報告されている[44]。しかし、酸性ウレアーゼの阻害

剤として、リンゴ酸、乳酸、ピルビン酸、 α -ケトグルタル酸、酢酸、種々の金属イオン、フェノール化合物、二酸化硫黄[44]が知られ、ブドウ園で使用される殺虫剤として使用されるフッ化物(Cryolite)は酸性ウレアーゼ、ウレアーゼともに阻害する[58,59]。Table.1 に示すように、酸性ウレアーゼはウレアーゼに比べて、アルギニンなどいくつかのアミノ酸存在下で尿素に対する選択性が高いことも報告されている[60]。

Table 1 Selectivity of OPA reagent and substrate specificity of the acid urease and urease

| Sample | Relative activity (%) | | | Contents in rice wine (mM) |
|--------------------|-----------------------|-------------|--------|----------------------------|
| | OPA reagent | Acid Urease | Urease | |
| Urea | - | 100 | 100 | 0.2-0.5 |
| NH ₄ Cl | 100 | - | - | 1-5 |
| Ala | - | - | 3.1 | 3.5 |
| Arg | - | 10.6 | 1.9 | 2.2 |
| Asn | - | 1.4 | 2.0 | n.d. |
| Asp | - | 1.0 | 1.8 | 2.2 |
| Gln | 0.27 | 1.1 | 1.5 | n.d. |
| Glu | - | - | 2.2 | 2.9 |
| Gly | - | - | 5.1 | 3.9 |
| His | - | 1.2 | 5.4 | 0.5 |
| Ile | - | - | 1.8 | 1.6 |
| Leu | 0.14 | - | 2.5 | 2.4 |
| Lys | - | - | n.d. | 1.2 |
| Phe | - | - | 4.8 | 1.4 |
| Ser | - | - | n.d. | 1.9 |
| Thr | 0.25 | - | n.d. | 1.1 |
| Tyr | - | - | n.d. | 1.3 |
| Val | - | - | 4.7 | 2.7 |
| Pro | - | - | n.d. | 3.5 |
| Met | - | n.d. | n.d. | 0.27 |
| Trp | - | n.d. | n.d. | 0.049 |

- = not detected; n.d.: no data.

3.2 分光学的計測器とウレアーゼを組み合わせた尿素の分析

ウレアーゼの触媒作用によって生成するアンモニアが次亜塩素酸塩と反応しモノクロラミンを生成し、次いでこのモノクロラミンとフェノールが反応して生ずるインドフェノールブルーの吸光度を測定することでアンモニアを定量する方法は早くから報告されている[61,62]。このフェノールを使用する反応では呈色が不安定であるため、Muraki ら、樋口、本水らにより、サリチル酸を用いる改

良法が報告されている[63-66]。また、J. Gonzalez-Rodriguezら[67]は、上記の方法を尿素の分析に適用している。まず、ウレアーゼ溶液と尿素を注入、生成するアンモニウムイオンをアルカリ溶液でアンモニアへ変換し、気化させる。そのアンモニアは、平膜型のガス拡散膜を透過し、反応液(サリチル酸、ニトロプルシド、次亜塩素酸の混合液)に吸収され、ジアゾニウム塩を形成するので、その吸光波長である 647nm での吸光度を計測することにより、尿素の定量を行った (Fig. 2)。

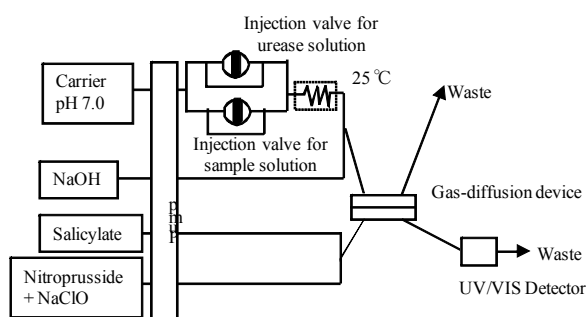


Fig. 2 Schematic diagram of FIA system for urea reported by Gonzalez-Rodriguez.

ここで用いられているようなガス拡散膜は、室温で気体になりやすい化学種が少ないため、非常に選択性の高い有用な方法である[68]。このガス拡散装置は多く開発されており、石井らにより、平膜型のガス拡散膜を用いて血中および尿中のアンモニアや尿素をガスクロマトグラフにより検出した[69-71]ことをはじめとして、その改良型、尿素計測への応用が数多く報告されている。

Aoki らはテフロン膜管とガラス管を用いて二重管構造のガス拡散デバイスを開発し、*o*-フタルアルデヒドとの反応を利用して水や血液および尿中のアンモニアの蛍光検出 FIA を報告している[72,73]。Narinesigh らは、同様に *o*-フタルアルデヒドを用い、FIA システム内に固定化ウレアーゼカラムを導入、尿素の計測に適用している[74]。OPA 試薬を用いるときには、メルカプトエタノールを用いる場合が多いが、亜硫酸を用いたもの[75]やチオグリコール酸を用いたもの[60,76-78]なども報告されている。特に、チオグリコール酸を用いるとメルカプトエタノールを用い

た場合に比べ感度は若干低下するものの、形成されるイソインドール化合物がより長時間蛍光を示すことから、FIA において安定な結果を得ることができると考えられる。

これまでの方法は、アンモニアを特異的に検出する方法に特定化したものであったが、一般に、常温で気体であるアルカリ性のガスがアンモニア以外にないことに着目すると、前述のガス拡散膜と組み合わせることにより、pH 変化を指標とするなど、アンモニアを間接的に評価することが可能となり、簡便な試薬で評価することが可能となる。本水らは、二重管構造のガス拡散デバイスを開発しており[79,80]、そのガス拡散膜には内径 1.0 mm, 外径 1.8 mm, 最大孔径 2.0 μm の多孔質 PTFE チューブを用いている。このデバイスを用いて pH 変化に伴う pH 指示薬の呈色変化を吸光光度計により評価している。呈色試薬として、チモールブルー[79]や、クレゾールレッド[80]を用いてアンモニアの計測を行っている。筆者らも同一のシステムを用いて、微細孔性ガラス上に酸性ウレアーゼを固定化し、呈色液をチモールブルーとした FIA を構築、日本酒中の尿素の分析に適用している[81,82](Fig. 3-(a))。実際の日本酒を測定することを念頭に置くと、日本酒に含まれているアンモニアが測定に影響することを考慮し、イオン交換樹脂を用いた内因性アンモニアの除去[81]、日本酒に含まれるアミノ酸の影響[82]、エタノールの酸性ウレアーゼへの影響[81]、エタノールのガス拡散膜への影響[82]などを調べ、対処を施し、実際の日本酒中の尿素を計測、F-kit 法と比較してよい相関を得ている[82]。また、OPA 試薬を用いた蛍光計測も行っている[60]。OPA 試薬がアンモニアと特異的に反応できることからガス拡散膜を使用しないで行った ((Fig. 3-(b))が、ガス拡散膜を使用した方が、ノイズを削減でき、機器の感度を上げてより感度良く計測できることが確認された[83]。尿素の計測では、固定化酵素と尿素を反応させるためのキャリアーの pH を酵素の最適 pH に合わせて中性付近に調整し、得られたアンモニウムイオンをガス化させるために高アルカリ側にする必要があった。しかし、酸性ウレアーゼを用いることで、キャリアーを低

pH に調整することにより、二酸化炭素をガス状で生成させることが可能となることから、ガス化のためのキャリヤー流路を省略できる、より簡易なシステムを構築できるようになった[83](Fig. 3-(c)。ここでの呈色液には BTB (プロモチモールブルー) を用いた。

ガス拡散デバイスにおいて、ガス拡散膜の内径をより小さくすることにより、流路体積あたりの表面積を増大させることが可能となった。その結果、ガス透過効率の向上とともに、デバイスの微小化も可能となり、ひいては試料液の希釈を最小限にとどめることができることに着目し、我々は更なる改良を行った。ガス拡散膜に内径 190 μm 、外径 250 μm 、最大孔径 1.0 μm の多孔質 poly-4-Methyl-1-pentene (大日本インキ(株)製中空糸膜) のチューブを用い、外管には通液用の PTFE チューブ[84]あるいはヒューズドシリカキャピラリー[85]を適用した。当

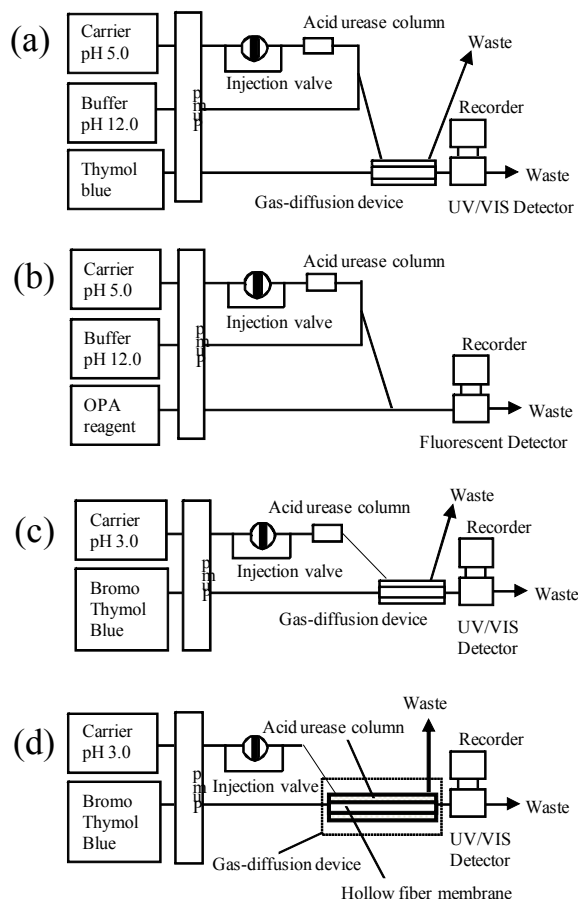


Fig. 3 Schematic diagram of FIA system for urea with or without gas diffusion device.

該ガス拡散膜を利用することにより、試料溶液の希釈を可及的に抑えられるようになり、試料液量を以前の 100 μL から 20 μL と著しく減少させることができた。また、ガス拡散デバイスが微小化されたことにより、酵素カラムの体積の微小化が課題となり、モノリスシリカカラムをガラスキャピラリー内に形成し、酵素固定化担体として使用した。この際、液状で注入して作成できるモノリスシリカの優位性を生かして、ガス拡散膜と外管の間にモノリスシリカを形成することにより、酵素カラムとガス拡散領域を一体化したシステムを構築し、試料液の希釈を最大限に抑制することに成功した[86-88] (Fig. 3-(d), Fig. 4)。

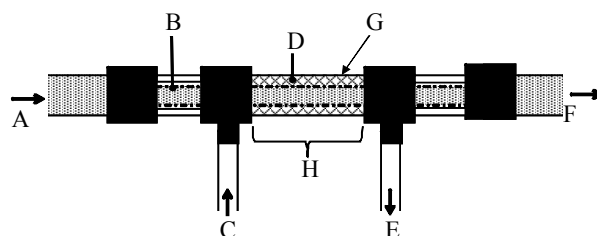


Fig. 4 Schematic diagram of the gas-diffusion device

A) BTB (pH 7.6, 0.05 mM, 0.2 mL/min) solution, B) hollow fiber membrane, C) Carrier and injected sample solution, D) Immobilized histidine decarboxylase onto novelsilica monolith, E) Waste, F) Detector, G) Silica capillary, H) Gas diffusion area.

以上述べてきた分光光度法以外にも、化学発光による検出も行われている。ウレアーゼ、グルタミン酸オキシダーゼ、ペルオキシダーゼの三種の酵素を固定化し、尿素計測に適用している。ここでは、ウレアーゼにより生成するアンモニウムイオンと α -オキソグルタル酸、NADPH と混合後、グルタミン酸デヒドロゲナーゼを作用させることによりグルタミン酸を生成させた。そのグルタミン酸をグルタミン酸オキシダーゼにより酸化し、生成する過酸化水素をルミノールと反応させる段階を経ることにより約 4mM の尿素の検出を可能にしている[89]。

3.3 カロリメトリーを用いた尿素の分析

カロリメトリーに基づいた酵素センサーは、酵素の触媒

反応により生成する熱量変化を計測するため、測定対象をラベルせずに計測することが可能であり、極めて汎用的方法である。そのため、尿素の計測においても複数報告がなされている。Sato^hらは、酸性ウレアーゼを用いた熱量計測システム(酵素サーミスター)を構築した(Fig. 5)。50 μM の濃度まで計測することを可能とした[90]。また、Danielsson^らは、微小な酵素サーミスターを開発、1 μL のサンプル(血液試料)から200 μM の濃度まで(計測下限)計測できることを報告している[91]。また、グルコース、尿素、ペニシリン G のシーケンシャル分析(SIA)をカロリメトリーにより行う方法も報告されている[92]。

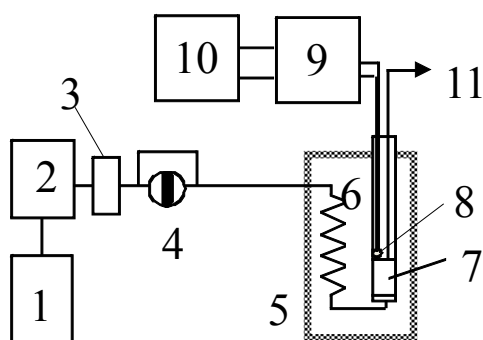


Fig. 5 Schematic drawing of the calorimetric FIA system for urea.

1) Carrier reservoir, 2) Double-Plunger pump (flow rate 1.0 ml/min), 3) Pulse damper, 4) Rotary injection valve, 5) Thermostated aluminum cylinder, 6) heat exchanger, 7) acid urease column (0.5 ml), 8) temperature probe, 9) DC-type Wheatstone bridge with a chopper-stabilized operational amplifier, 10) Pen recorder, 11) Waste.

3.4 電気化学計測を用いた尿素の FIA

ウレアーゼにより生成および変化するアンモニウムイオンや電位、pH (H^+ 濃度)などを計測する手法も早くから開発されており、インドフェノールブルー法と同様、J. Ruzicka^らにより報告されている[93]。J. Ruzicka^らは、キャリアにウレアーゼ溶液、インジェクションバルブより尿素を注入し、pH 電極を検出部に用いてその電流応答より血液中の尿素の FIA システムを開発している。これに

対して、R. Koncki^らは、pH 電極を PVC (polyvinyl chloride) や cellulose trinitrate 膜で覆ってウレアーゼを固定化し、尿素の定量を行った[94]。他にも pH 変化を指標にしたものとして、pH 電極上にポリアニリン-ナフィオン複合膜を形成し、その膜上にグルタルアルデヒド架橋法によりウレアーゼを固定化して尿素の FIA に適用したもの[95]、トルイジンブルーをカーボン電極上に電解重合しフィルムを形成、ウレアーゼと組み合わせて尿素の計測を行ったもの[96]などが報告されている。

この様に pH の変化を指標にする方法が多いが、逆に、酵素反応による pH の変化を、別の流路でキャリアを電解し、生じた H^+ により打ち消す(中和させる)ことにより、電解に要した電流値からアンモニアの濃度を間接的に評価し、尿素の定量を行う pH スタット法が報告された[97-102]。ここでの検出は、ISFET(Ion Sensitive Field Effect Transistor; イオン感応性電界効果型トランジスター)電極により行っており、イオン透過膜でゲート表面上を覆った FET で、膜を透過してきたイオンが吸着することによって電位が発生するので、その表面電位を検出し、評価している。さらに電解するためのセルの塩橋にナフィオン膜を配してより効率化が行われ[103-106]、報告されている[107](Fig. 6)。

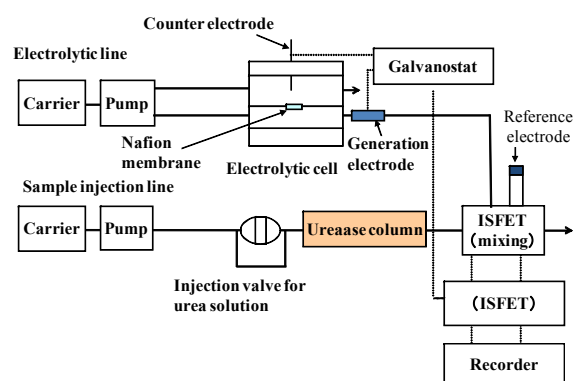


Fig. 6 Schematic drawing of the pH-stat FIA amperometric sensing system with the ISFET as a pH detector

最後に、これまで紹介してきた手法の主だったものをまとめて Table 2 に示す。

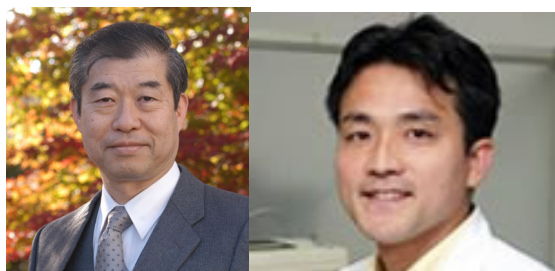
Table 2 Summary of the FIA systems and the detection limits for urea

| Method | Gas diffusion device | Detection limit / mM | Reference |
|--|--|-----------------------------|------------------|
| Methods involving non-enzymatic colour-forming reactions | | | |
| Spectrophotometry based on a reaction with acidic solution of diacetyl monoxime in boiling water | W/O | 0.017 | [30] |
| Spectrophotometry based on a reaction with an acid solution of 1-phenyl-1,2-propanedioine-2-oxime in boiling water | W/O | 0.017 | [34] |
| Chemiluminometry based on a reaction between urea and hypobromite in alkaline solution | W/O | 0.0005 | [47] |
| Methods based on enzyme catalysed hydrolysis | | | |
| Spectrophotometry with use of indophenol blue method | W | 0.015 | [67] |
| Fluorometry with use of OPA reagent | W | 1.7 | [74] |
| Fluorometry with use of OPA reagent containing sodium sulfite | W/O | 1 | [75] |
| Fluorometry with use of OPA reagent containing thioglycolate | W/O | 0.008 | [60] |
| Spectrophotometry with use of thymolblue as a coloring reagent. | W | 0.008 | [81,82] |
| Spectrophotometry with use of bromothymol blue as a coloring reagent to detect CO ₂ . | W | 0.008 | [83] |
| Spectrophotometry with use of bromothymol blue as a coloring reagent to detect CO ₂ . | W (microfluidic gas diffusion unit) | 0.01 | [84] |
| Spectrophotometry with use of bromothymol blue as a coloring reagent to detect CO ₂ . | W (acid urease integrated into a microfluidic gas diffusion unit) | 0.001 | [86] |
| Chemiluminometry based on detection of luminol with use of three-enzyme coupled reaction | W/O | 3.5 | [89] |
| Calorimetry | W/O | 0.05 | [90] |
| Calorimetry (miniaturized system) | W/O | 0.2 | [91] |
| Detection with use of pH electrodes | W/O | 4 | [93] |
| Detection with use of pH electrodes on which urease was immobilized | W/O | 0.1 | [94] |
| Amperometry based on polyaniline-Nafion membrane on which urease was immobilized | W/O | 0.0005 | [95] |
| Amperometry based on a pH-stat method | W/O | 0.1 | [102] |

参考文献

- [1] J. Novillo, M. I. Rico, J. M. Alvarez : *J. Agric. Food Chem.*, **49**, 1298 (2001)
- [2] B. B. Jana, P. Chakraborty, J. K. Biswas, S. Ganguly : *J. Appl. Microbiol.*, **90**, 733 (2001)
- [3] S. L. Archibeque, J. C. Burns, G. B. Huntington : *J. Anim. Sci.*, **79**, 1937 (2001)
- [4] Y. Dersjant-Li, M. W. Versteegen, H. Schulze, T. Zandstra, H. Boer, J. W. Schrama, J. A. J. Verreth : *J. Anim. Sci.*, **79**, 1840 (2001)
- [5] P. Dallet, L. Labat, E. Kummer, J. P. Dubost : *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, **742**, 447 (2000)
- [6] K. I. O'Goshi, N. Tabata, Y. Sato, H. Tagami : *Skin Pharmacol. Appl. Skin. Physiol.*, **13**, 120 (2000)
- [7] E. Sottofattori, M. Anzaldi, A. Balbi, G. Tonello : *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **18**, 213 (1998)
- [8] A. Gopalsamy, H. Yang : *J. Comb. Chem.*, **3**, 278 (2001)
- [9] V. Vargha : *Acta Biol. Hung.*, **49**, 463 (1998)
- [10] F. Kronenberg, E. Kuen, E. Ritz, P. Konig, G. Kraatz, K. Lhotta, J. F. Mann, G. A. Muller, U. Neyer, W. Riegel, P. Riegler, V. Schwenger, A. Eckardstein : *J. Am. Soc. Nephrol.*, **13**, 461 (2002)
- [11] Z. Cao, L. M. Burrell, I. Tikkanen, F. Bonnet, M. E. Cooper, R. E. Gilbert : *Kidney Int.*, **60**, 715 (2002)
- [12] R. Vanholder : *Technol. Health Care*, **8**, 373 (2000)
- [13] K. Matsumoto : *Bioprocess Technology*, **16**, 255 (1993)
- [14] M. Esti, M. Fidaleo, M. Moresi, P. Tamborra : *J. Agric. Food Chem.*, **55**, 2590 (2007)
- [15] K. Miyagawa, M. Sumida, M. Nakao, M. Harada, H. Yamamoto, T. Kusumi, K. Yoshizawa, T. Amachi, T. Nakayama : *J. Biotechnol.* **68**, 227 (1999)
- [16] I. S. Woo, I. H. Kim, U. J. Yun, S. K. Chung, I. K. Rhee, S. W. Choi, S. W., H. D. Park, *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 363 (2001)
- [17] K. Matsumoto : *Industrial Application of Immobilized Biocatalysts*, Marcel Dekker, Inc., New York·Basel·Hong Kong, p. 255 (1992)
- [18] K. Kobashi, S. Takebe, T. Sakai : *J. Appl. Toxicol.*, **8**, 73 (1988)
- [19] K. Kitamoto, K. Oda, K. Gomi, K. Takahashi : *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 301 (1991)
- [20] V. D. Marks G. K. Merwe, H. J. Vuuren : *FEMS Yeast Res.* **3**, 269 (2003)
- [21] K. Kitamoto, K. Oda, K. Gomi, K. Takahashi : *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 301 (1991)
- [22] S. Fujinawa, G. Burns, P. D. Teja : *J. Enol. Viticul.*, **41**, 350 (1990)
- [23] P. S. Francis : *Aust. J. Grape Wine Res.* **12**, 97 (2006)
- [24] W. R. Fearon, *Biochemical Journal*, **33**, 902 (1939)
- [25] R. G. Martinek, *J. American Med. Technol.*, **31**, 678 (1969)
- [26] A. J. Taylor, P. Vadgama, (1992) *Annal. Clin. Biochem.* **29**, 24 (1992)
- [27] W. H. Marsh, B. Fingerhut, E. Kirsch : (1968) *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 681 (1957)
- [28] L. A. Douglas, J. M. Bremner : *Anal. Lett.*, **3**, 79 (1970)
- [29] L. A. Douglas, J. M. Bremner : *Soil Sci. Soc. Am., Proc.* **34**, p.859 (1970)
- [30] C. W. Nagel, K. M. Weller : *Am. J. Enol. Vitic.*, **40**, 143 (1989)
- [31] S. E. Spayd, R. L. Wample, R. G. Evans, R. G. Stevens, B. J. Seymour, C. W. Nagel : *Am. J. Enol. Vitic.*, **45**, 34 (1994)
- [32] S. Hasnip, A. Caputi, C. Crews, P. Brereton : *Food Additives and Contaminants* **21**, 1155 (2004)
- [33] B. W. Zoecklein, K. C. Fugelsang, B. H. Gump, F. S. Nury : *Wine Analysis and Production*. (Chapman & Hall: New York) pp.51 (1995)
- [34] J. Almy, C. S. Ough : *J. Agric. Food Chem.*, **37**, 968 (1989)
- [35] I. M. Tegmo-Larsson, T. Henick-Kling : *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**, 189 (1990)
- [36] K. Kobashi, S. Takebe, T. Sakai : *Chem. Pharm. Bull (Tokyo)*, **38**, 1326 (1990)
- [37] P. A. Henschke, C. S. Ough : *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**, 317 (1991)
- [38] F. F. Monteiro, L. F. Bisson : *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**, 199 (1991)
- [39] C. S. Ough, Z. Huang, D. An, D. Stevens : *Am. J. Enol. Vitic.*, **42**, 26 (1991)
- [40] C. E. Daudt, C. S. Ough, D. Stevens, T. Herraiz : *Am. J. Enol. Vitic.*, **43**, 318 (1992)
- [41] D. An, C. S. Ough : *Am. J. Enol. Vitic.*, **44**, 35 (1993)
- [42] D. F. Stevens, C. S. Ough : *Am. J. Enol. Vitic.*, **44**, 309 (1993)
- [43] C. N. Pereira, C. E. Daudt : *Ciencia e Tecnologia de Alimentos* **15**, 40 (1995)
- [44] G. Trioli, C. S. Ough, *Am. J. Enol. Vitic.*, **40**, 245 (1989)
- [45] A. R. Butler, D. Walsh, *Tren. Anal. Chem.*, **1**, 120 (1982)
- [46] W. K. Paik, S. Kim, *Anal. Biochem.* **122**, 194 (1982)
- [47] X. Hu, N. Takenaka, M. Kitano, H. Bandow, Y. Maeda : *Analyst*, **119**, 1829 (1994)
- [48] K. Hanabusa : *Nature*, **193**, 1078 (1962)
- [49] H. L. T. Mobley, R. P. Hausinger, *Microbiological Reviews* **53**, 85 (1989)
- [50] N. R. Dixon, R. L. Blakeley, B. Zerner : *Can. J. Biochem.*, **58**, 481 (1980)
- [51] Y. Qin, J. M. S. Cabral : *Biocatal. Biotrans.*, **20**, 1 (2002)
- [52] H. Carlsson, M. Haukka, A. Bousseksou, J. M. Latoru, E. Nordlander : *Inorg. Chem.*, **43**, 8252 (2004)
- [53] C. J. Watson, *Proceedings – International Fertiliser Society* **454**, 1 (2000)
- [54] A. Ashiralieva, D. Kleiner : *FEBS Letters* **555**, 367 (2003)
- [55] S. Kodama, F. Yotsuzuka : *Journal of Food Science* **61**, 304 (1996)
- [56] Y. Ito, A. Hongo, M. Kinoshita, H. Tamaki : *Biol. Pharm. Bull.*, **18**, 850 (1995)
- [57] Z. Amtul, A. Rahman, R. A. Siddiqui, M. I. Choudhary : *Curr. Med. Chem.*, **9**, 1323 (2002)
- [58] O. O. Famuyiwa, C. S. Ough : *Am. J. Enol. and Vitic.*, **42**, 79 (1991)
- [59] P. S. Francis, S. W. Lewis, K. F. Lim : *Tren. Anal. Chem.*, **21**, 389 (2002)
- [60] Y. Iida, M. Ikeda, M. Aoto, I. Satoh : *Talanta*, **64**, 1278 (2004)
- [61] J. W. B. Stewart, J. Ruzicka : *Anal. Chim. Acta*, **82**, 137 (1976)
- [62] 石黒忠文, 岩村直美 : *技術論文集(J. Flow Injection Anal. Vol. 16)*, p.44 (2000)

- [63] H. Muraki, K. Higuchi, M. Sasaki, T. Korenaga, K. Toei: *Anal. Chim. Acta*, **261**, 245 (1992)
- [64] T. Tsuboi, Y. Hirano, M. Oshima, S. Motomizu: *J. Flow Injection Anal.* **17**, 77 (2000)
- [65] 樋口慶郎, 小川祐子: 技術論文集(*J. Flow Injection Anal. Vol. 16*), p.48 (2000)
- [66] 馬 蘭, 坪井知則, 服部隆康, 大島光子, 高柳俊夫, 本水昌二: *J. Flow Injection Anal.* **16**, 79 (1999)
- [67] J. González-Rodríguez, P. Pérez-Juan, M.D. Luque de Castro: *Anal. Chim. Acta*, **471**, 105 (2004)
- [68] 大島光子, 本水昌二: *J. Flow Injection Anal.* **19**, 9 (2002)
- [69] 石井幹太, 梶 敬治: 杏林医学会雑誌, **13**, 411 (1982)
- [70] 石井幹太, 鈴木繁喬: 分析化学, **31**, 146 (1982)
- [71] 石井幹太: 技術論文集(*J. Flow Injection Anal. Vol. 16*), p.42 (2000)
- [72] T. Aoki, S. Uemura, M. Munemori: *Anal. Chem.*, **55**, 1620 (1983)
- [73] 青木豊明, 植村 哲, 宗森 信: 分析化学(*Bunseki Kagaku*), **33**, T81 (1987)
- [74] D. Narinesingh, R.Mungal, T.T. Ngo: *Anal. Biochem.*, **188**, 325 (1990)
- [75] M. S. Abdel-Latif, G. G. Guilbault: *J. Biotechnology*, **14**, 53 (1990)
- [76] H. Mana, U. Spohn: *Fresenius. J. Anal. Chem.*, **64**, 1278 (2004)
- [77] Y. Iida, N. Hara, T. Sano, M. Aoto, I. Satoh: *Chemical Sensors*, **18B**, 10 (2002)
- [78] Y. Iida, M. Aoto, I. Satoh: *Chemical Sensors*, **19A**, 88 (2003)
- [79] 桑木 亨, 秋庭正典, 大島光子, 本水昌二: 分析化学(*Bunseki Kagaku*), **36**, T81 (1987)
- [80] 真田昌宏, 大島光子, 本水昌二: 分析化学(*Bunseki Kagaku*), **42**, T123 (1993)
- [81] Y. Iida, A. Koga, N. Hara, K. Matsumoto, I Satoh: *J. Flow Injection Anal.*, **19**, 133 (2002)
- [82] Y. Iida, N. Hara, K. Matsumoto, I Satoh: *IEEJ Trans. SM*, **123**, 306 (2003)
- [83] Y. Iida, Y. Suganuma, I. Satoh: *Chemical Sensors*, **19B**, 94 (2003)
- [84] Y. Iida, Y. Suganuma, I. Satoh: *Technical Digest of The 10th International Meeting on Chemical Sensors*, **20**, Sup.B, pp.332 (2004)
- [85] Y. Iida, Y. Tsukada, I. Satoh: *Chemical Sensors*, **22B**, 25 (2006)
- [86] Y. Iida, Y. Chiba, I. Satoh: *Chemical Sensors*, **21B**, 28 (2005)
- [87] Y. Iida, Y. Chiba, I. Satoh: *Technical Digest of The 6th East Asia Conference on Chemical Sensors.*, Guilin (China), p. 334 (2005)
- [88] Y. Iida, Y. Suganuma, K. Matsumoto, I. Satoh: *Anal. Sci.*, **22**, 173-176 (2006)
- [89] M. Tabata, T. Murachi: *J. Biolumi. Chemilumi.*, **2**, 63 (1988)
- [90] I. Satoh, M. Akahane: *Sens. Actuators B*, **5**, 241 (1991)
- [91] B. Xie, U. Harborn, M. Mecklenburg, B. Danielsson: *Clin. Chem.*, **40**, 2282 (1994)
- [92] A. Wolf, A. Weber, R. Huttli, J. Lerchner, G. Wolf: *Thermochim. Acta*, **382**, 89 (2002)
- [93] J. Ruzicka, E. H. Hansen, A. K. Ghose, H. A. Mottola: *Anal. Chem.*, **51**, 199 (1979)
- [94] R. Koncki, P. Leszczynski, A. Hulanicki, S. Glab: *Anal. Chim. Acta*, **257**, 67 (1992)
- [95] W.-J. Cho, H.-J. Huang: *Anal. Chem.*, **70**, 3946 (1998)
- [96] I. Vostiar, J. Tkac, E. Sturdik, P. Gemeiner: *Bioelectrochem.*, **56**, 113 (2002)
- [97] S. Komaba, M. Syama, Y. Fujino, T. Osaka: *Chemical Sensors*, **13B**, 28 (1997)
- [98] Y. Fujino, K. Yoneyama, T. Osaka, I. Satoh: *Chemical Sensors*, **15A**, 151 (1999)
- [99] K. Yoneyama, Y. Yamada, I. Koiwa, T. Osaka, I. Satoh: *Chemical Sensors*, **16B**, 4 (2000)
- [100] K. Yoneyama, Y. Yamada, I. Koiwa, T. Osaka, I. Satoh: *Chemical Sensors*, **16B**, 7 (2000)
- [101] K. Yoneyama, Y. Yamada, I. Koiwa, T. Osaka, I. Satoh: *Chemical Sensors*, **17A**, 148 (2001)
- [102] K. Yoneyama, Y. Yamada, I. Koiwa, T. Osaka, I. Satoh: *Sens. Actuators B*, **76**, 152 (2001)
- [103] Y. Iida, T. Kikuchi, I. Satoh: *Sens. Actuators B*, **91**, 175 (2003)
- [104] Y. Iida, T. Satoh, T. Kikuchi, I. Satoh: *5th East Asia Conference on Chemical Sensors*. p. 457 (2001)
- [105] Y. Iida, T. Kikuchi, I. Satoh, *Chemical Sensors*, **18A**, 124 (2002)
- [106] Y. Iida, K. Akiba, R. Yoshimura, I. Satoh: *The Papers of Technical Meeting on Chemical Sensor IEE Japan*, **CHS-03**, 123 (2003)
- [107] 佐野友一、飯田泰広、松本邦男、佐藤生男: 第42回フローインジェクション分析研究懇談会要旨集, p.72, (2002)



佐藤 生男

飯田 泰広