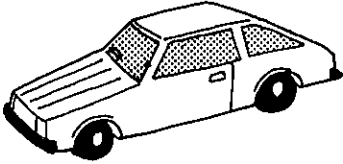


吸光度検出器を用いるイオンクロマトグラフィー

著者	早川 和一, 宮崎 元一
著者別表示	Hayakawa Kazuichi, Miyazaki Motoichi
雑誌名	ぶんせき
巻	193
ページ	47-53
発行年	1991-01-01
URL	http://doi.org/10.24517/00042098



吸光度検出器を用いるイオンクロマト グラフィー



近年、間接吸光度検出法を導入した新しいタイプのイオンクロマトグラフィー (IC) が発展している。本法では、光吸収の大きなイオンを溶離剤として、光吸収のない (又はほとんどない) イオンをイオン交換分離する。このとき、溶出液中の溶離剤イオンに基づく吸光度が変化し、目的イオンを間接的に検出することができる。広い適用性をもつ間接吸光度 IC の基本原理と具体的な実施方法を解説する。

早 川 和 一
宮 崎 元 一

1 はじめに

1975年にSmallらが世に紹介した“イオンクロマトグラフィー (IC)”は、多くのイオンを短時間に一斉分析できることから、それまで異なる方法で多大な時間を要した測定の現場に衝撃を与えた¹⁾。現在では、ICは環境分析をはじめとして様々な領域で不可欠な方法になっている。

初めて開発されたICは電気伝導度検出方式で、現在も広く用いられている。その後、紫外吸収を有する溶離剤を用いて紫外吸収のないイオンを分析する原理が報告され²⁾、これに基づいた吸光度検出ICが開発された。これははん用の高速液体クロマトグラフ (HPLC) で多くのイオンが一斉分析できる方式であり、にわかに注目を集めるようになった³⁾。一口に吸光度検出といっても、1) 紫外吸収を有する化合物を直接検出する、2) 紫外吸収の小さいイオンを紫外可視吸収の大きな化合物に誘導して検出する、3) 紫外吸収の大きな溶離剤イオンを用いて紫外吸収の小さいイオンを間接的に検出する方式とに大別される。これらのうち、1)と2)は一般のHPLCでもよく知られているのに対して、3)は開発の歴史が新しいこともあり、参考書もまだ少ない⁴⁾⁵⁾。そこで、本解説ではこの方式の基本原理と実技を中心に論ずることにする。

2 基本原理

2-1 イオンの吸光度と検出ピークの関係式

陰イオン分析を例にイオン交換モードと吸光度検出の関係を考えよう。カラムが平衡状態にあるとき、イオン交換基上で試料イオン (S^-) と溶離剤イオン (E^-) (いずれも一価イオン) は、1:1の交換反応を繰り返しながらカラム内を移動する。 S^- が溶出されるとき「カラム溶出液中の S^- と E^- の濃度の和 ($C_S + C_E$) は一定である」。ここで、 S^- と E^- の単位濃度当たりの吸光度をそれぞれ A_S , A_E とおくと、 S^- が溶出される時のカラム溶出液の吸光度変化量 (A_{S-E}) は、 S^- を含む溶出液の吸光度 [$C_S A_S + (C_E - C_S) A_E$] と試料を注入する前の吸光度 ($C_E A_E$) の差で表される。すなわち、

$$\begin{aligned} A_{S-E} &= C_S A_S + (C_E - C_S) A_E - C_E A_E \\ &= C_S (A_S - A_E) \dots\dots\dots (1) \end{aligned}$$

図1に S^- と E^- の光吸収スペクトルとクロマトグラムパターンとの関係を示した。まず検出波長が λ_1 のとき、 $A_S > A_E$ であるので式(1)は $A_{S-E} > 0$ 、すなわち正ピークが現れる。検出波長が λ_3 のときは $A_{S-E} < 0$ であるので負ピークが現れる。検出波長が λ_2 のときは $A_{S-E} = 0$ であるのでピークは現れない。従来のHPLCの検出方式は、専ら光吸収のない溶離剤を用いて、光吸収のあるイオン成分を分析する $A_{S-E} > 0$ のパターンである。

図2にその具体例を示した。245 nmより低波長側 (239 nm) でフタル酸イオンより吸光度が大きいが、長

Ion Chromatography with Photometric Detection.
Kazuichi HAYAKAWA 金沢大学薬学部
Motoichi MIYAZAKI 同上

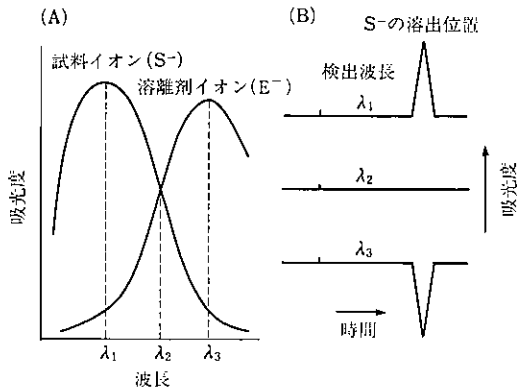


図1 イオンの光吸収スペクトル (A) とクロマトグラムパターン (B) の関係

波長側 (254 nm) で小さいヨウ化物イオンはピークの消失と方向の逆転が見られる。これに対していずれの波長でもフタル酸イオンより吸光度が小さい硝酸イオンと硫酸イオンは常に負ピークが観察される。このように、検出波長を選択すれば、光吸収の大きなイオンと小さなイオンの同時検出や特定 (妨害) ピークの消去ができる³⁾。

2.2 間接吸光度検出法

無機イオンや有機酸には紫外可視吸収がないか小さいものが多い。このような対象に上述式(1)の $A_{S-E} < 0$ の間接的な検出方式が有効である。そこでこの方式をICとして利用するときの定量性や感度を考察しよう。簡単にするために、検出波長で試料イオンに光吸収が全くないとすると $A_S = 0$ であるから、式(1)は次のようになる。

$$A_{S-E} = -C_S A_E \dots\dots\dots (2)$$

式(2)は「溶離剤イオンの吸光度 (A_E) が一定ならば、検出される負ピークの高さ (谷の深さ) は試料イオンの濃度 (C_S) に比例する」ことを表している。 C_S を試料イオンの注入量に置き換えると、ピーク面積法を用いた検量線は直線となることが分かる。又、 C_S は試料イオンの当量濃度であり、 n 価イオンのピーク面積は一価イオンの n 倍になる。

一般にノイズの大きさは溶離液の吸光度に比例する。そこでノイズ $= KC_E A_E$ (ただし、 K は装置にかかわる定数) と表すと、検出感度の指標となるSN比は、

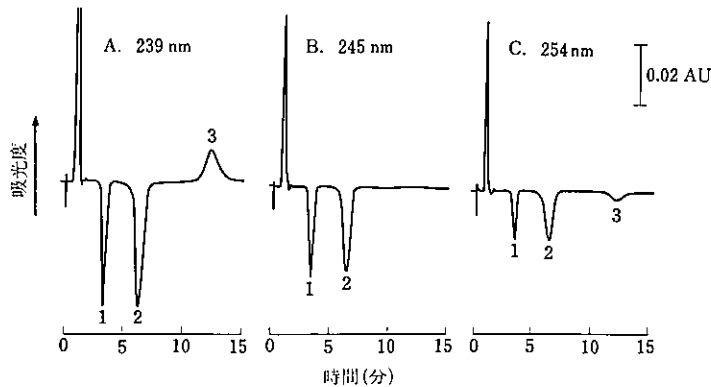
$$S/N = \frac{C_S A_E}{KC_E A_E} \dots\dots\dots (3)$$

と表される。式(3)の値を一定 (例えば2~3) とすると、 C_E が小さいほど C_S が小さくなる。従って、溶離剤濃度を下げれば下げるほど、検出感度は向上する²⁾。以上が「間接吸光度検出IC」の基本原理である。

3 間接吸光度検出ICの最適化

間接吸光度検出ICで分析できるイオン種は、ほとんど電気伝導度検出ICと共通である。又、間接吸光度検出ICによる無機イオンや有機酸の検出下限はおおむね数~数十 pmol の範囲にある。これらをノンサプレッサー型電気伝導度検出ICと比較すると、化合物の種類による若干の違いがあるがほぼ同レベルである^{6)~9)}。

間接吸光度検出ICの最適条件を得るためには幾つかの留意点がある。電気伝導度検出方式と共通な点も多いが、検出原理が違うために異なることも少なくない。



分析カラム: DuPont Zipax SAX (内径 4.6 mm × 長さ 15 cm), 溶離液: 5×10^{-4} M フタル酸二ナトリウム, 流量 1.5 ml/分, 試料イオン: 1) 硝酸, 2) 硫酸, 3) ヨウ化物 (いずれも 5×10^{-4} M), 注入量: 20 μ l

図2 検出波長の移動とクロマトグラムの変化³⁾

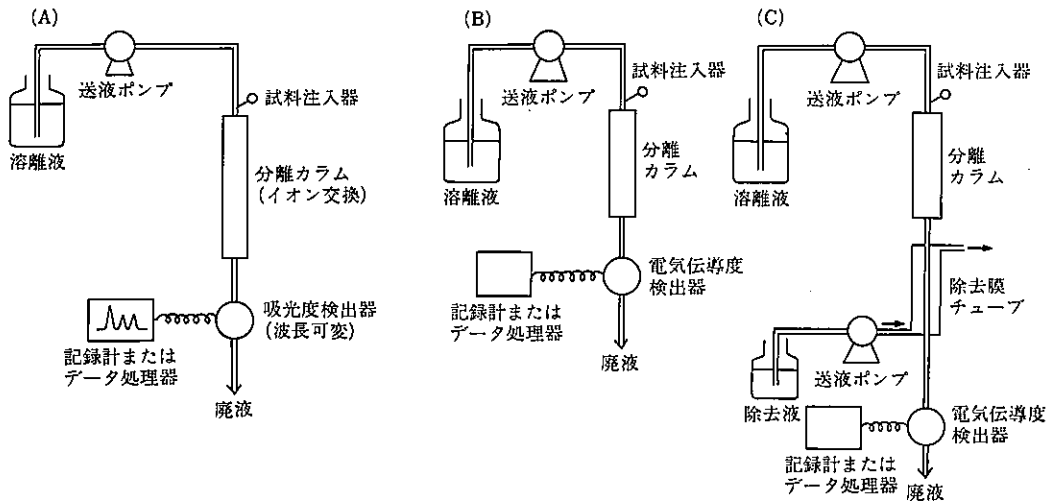


図3 吸光度検出 IC (A), ノンサプレッサー型電気伝導度検出 IC (B) 及びサプレッサー型電気伝導度検出 IC (C) の装置構成

3・1 装置

電気伝導度検出器の用途は専ら IC に限られ、しかもサプレッサー型はイオン交換除去膜チューブあるいはカラムを必要とするなど、この方式の IC は事実上専用装置の感がある。これに対して吸光度検出 IC は、直接、間接のいずれも波長可変紫外可視吸光度検出器を備えた普及型の HPLC 装置で行うことができる。電気伝導度検出器に比べて紫外可視吸光度検出器ははるく用性が大きいので、分析カラムと移動相を交換するだけで、他の多くの HPLC 条件に適用できることは言うまでもない (図 3)。

3・2 分析カラム

式(3)から、溶離剤の濃度が低いほど検出感度は向上

することが分かる。しかしカラム充てん剤のイオン交換容量を変えずに溶離剤濃度を下げると、試料イオンの溶出が遅れるためにピーク高さ(深さ)も低下し(浅くなり)、感度の向上にはつながらない。溶出が早く分離も良好なクロマトグラムを得るには、イオン交換容量が小さくて理論段数が高いカラムが必要である。

現在 IC 用分析カラムとして、陰イオン用、陽イオン用それぞれ 20 余種が市販されている。詳細は IC の参考書やメーカーカタログなどを参照することをお勧めする。基材で分類すると、1) 表層薄膜型(スチレン-ジビニルベンゼン共重合体)、2) 全多孔性ポリアクリレート型、3) 全多孔性シリカ型に大別される。これらに陰イオン分析用は四級アンモニウム基が、陽イオン分析用はスルホン酸基がそれぞれ導入されている。イオン

表1 間接吸光度検出 IC の分析対象と主な溶離剤

分析対象	溶離剤	参考文献
無機陰イオン, 有機酸	芳香族カルボン酸類 (pH 5 ~ 8): フェル酸, 安息香酸, トリメシン酸, トリメリット酸	2) 3) 14)
	芳香族スルホン酸類 (pH 6 ~ 7): ベンゼンスルホン酸, ナフタレンスルホン酸, ベンゼンジスルホン酸	2) 3) 14)
アルカリ金属イオン, アンモニウムイオン, アルカリ土類金属イオン	硫酸銅(II), 過塩素酸銅(II), 硫酸セリウム(III)	2) 3) 17)
	ピリジン類: ジメチルピリジン, メチルピリジン	9)
	ベンジルアミン類: メチルベンジルアミン, ベンジルアミン, フェニルエチルアミン	9)
	金属錯体類: エチレンジアミン銅(II), トリエチレンテトラミン銅(II)	18)
陽イオン (遷移金属イオン)+陰イオン (無機陰イオン, 有機酸)	エチレンジアミンテトラ酢酸銅(II)-エチレンジアミンテトラ酢酸二ナトリウム	18)
無機陽イオン+無機陰イオン	o-スルホ安息香酸	26)

交換容量は 0.005~0.3 meq/g の範囲にある¹⁰⁾。これらの多くは電気伝導度検出 IC 用に市販されているが、ほぼ同様なイオン交換容量範囲が適当な吸光度検出 IC にも有効である。又、通常の HPLC 用に市販されている製品にもこの範囲のものが活用することができる。基材やイオン交換容量の違いによって分離溶出挙動が異なることがあるので、あらかじめカラム添付資料を読み、必要があればメーカーに問い合わせるなど、カラムの性状をよく知って使うのがよい。

3.3 溶離剤種

表 1 に対象イオン別に主な溶離剤種をまとめた。陰イオン分析には、安息香酸、フタル酸、トリメシン酸、ベンゼンスルホン酸、ナフタレンジスルホン酸、スルホ安息香酸などが用いられる。一般に、カルボキシル基やスルホン酸基の数が多いほど溶出力が強く、芳香環の数が多いほど吸光度は大きい^{213)11)~16)}。一方陽イオン分析には、銅(II)、セリウム(III)などの金属イオンが主に用いられる²¹¹⁾⁷⁾。ビスエチレンジアミン銅(II)やトリエチレントラミン銅(II)などの陽イオン性金属錯体は銅(II)イオンより溶出力が強く吸光度も大きい¹⁸⁾¹⁹⁾。又、フェニルエチルアミンなどのアミン類も陽イオン分析に用いられる⁹⁾。更に、エチレンジアミン四酢酸と銅(II)の混合溶液で金属イオンと陰イオンの同時分析が可能である¹⁸⁾。

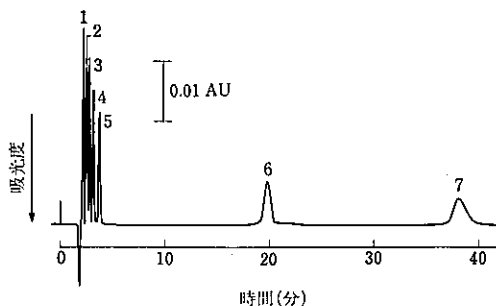
間接吸光度検出 IC による主な陽イオンと陰イオンの標準クロマトグラム例をそれぞれ図 4、図 5 に示した。

3.4 溶離剤濃度

イオン交換クロマトグラフィーでは、溶離剤濃度を高めると試料イオンの保持容量(キャパシティーファクター、 k')が減少する。陰イオンを例に、溶離剤(E)イオンの価数を x 、試料イオンの価数を y 、 C を定数とすると溶離剤濃度と k' の関係は次式で表される。

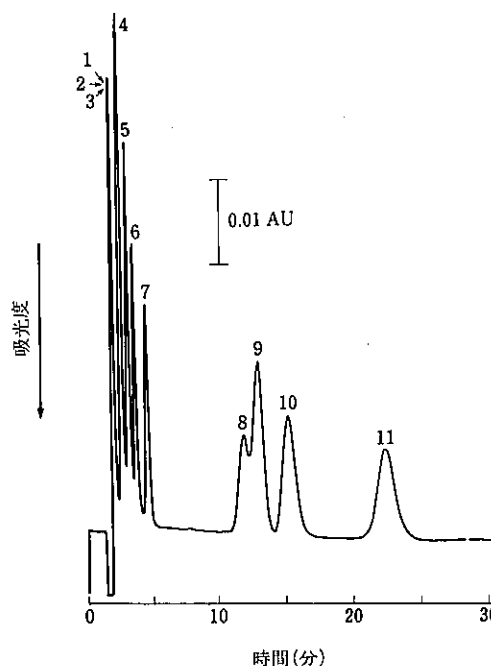
$$\log k' = C - y/x \log [E^{x-}] \dots\dots\dots (4)$$

横軸に溶離剤イオン濃度の対数、縦軸に試料イオンの k' の対数をプロットすると、式(4)は両者の間に直線関係が成立し、その傾きは試料イオンの価数と溶離剤イオンの価数の比 (y/x) で定まることを示している¹⁰⁾。図 6 は陰イオンの例を示した。中性以上の pH では溶離剤種のフタル酸 ($pK_{a1}=2.95$, $pK_{a2}=5.41$) は主として二価陰イオン ($x=2$) である。一価陰イオン ($y=1$) の塩化物イオン、亜硝酸イオン、臭化物イオン、硝酸イオン、ヨウ化物イオンは傾き $-1/2$ 、二価陰イオン ($y=$



分析カラム：MC1 SCK-01 (内径 4.6 mm×長さ 25 cm)、溶離液： 1×10^{-3} M 硫酸銅(II)、流量 1 ml/分、検出波長：220 nm、試料イオン：1) ナトリウム、2) アンモニウム、3) カリウム、4) ルビジウム、5) セシウム、6) マグネシウム、7) カルシウム (いずれも 4×10^{-4} M)、注入量：20 μ l

図 4 間接吸光度検出 IC による無機陽イオンの分析例⁹⁾

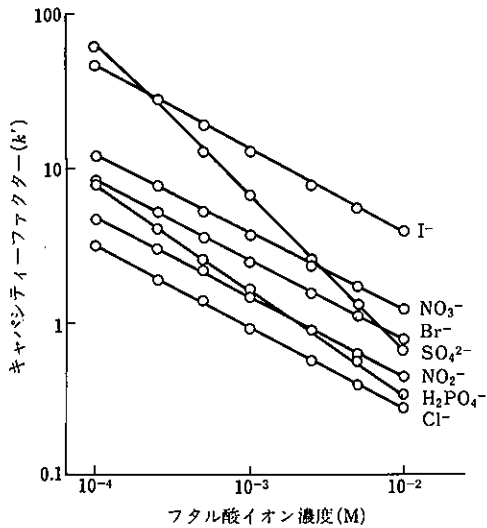


分析カラム：MC1 SCA-01 (内径 4.6 mm×長さ 25 cm)、溶離液： 5×10^{-4} M フタル酸二ナトリウム、流量 2 ml/分、検出波長：254 nm、試料イオン：1) 酢酸、2) 乳酸、3) ギ酸、4) レブリン酸、5) 塩化物、6) 亜硝酸、7) リン酸、8) コハク酸、9) L-リンゴ酸、10) 酒石酸、11) 硫酸 (いずれも $1 \sim 3 \times 10^{-4}$ M)、注入量：80 μ l

図 5 間接吸光度検出 IC による無機陰イオンと有機酸の分析例²¹⁾

2) の硫酸イオンは傾き -1 の直線で、いずれも式(4)を満たしている³⁾。

この関係式は次のような活用が期待できる。1) 目的イオンの最適 k' を与える溶離剤濃度を推定できる、2) 分離が不十分なイオンどうしても価数が異なれば分離可



分析カラム：DuPont Zipax SAX (内径 4.6 mm × 長さ 25 cm), 溶離液： 5×10^{-4} M フタル酸二ナトリウム

図 6 溶離剤の濃度と k' ²⁰⁾

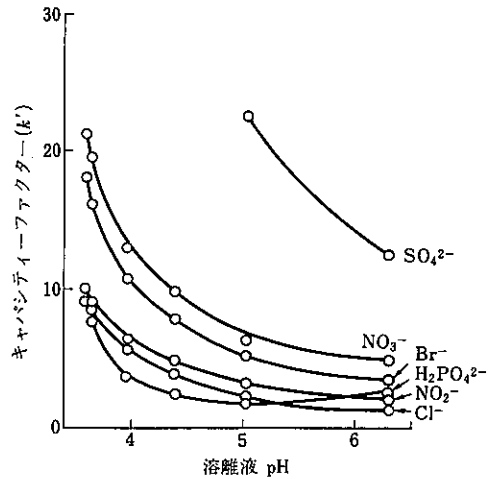
能な溶離剤濃度を推定できる, 3) 未知成分のイオン価数を直線の傾きから推定できるなどである。

3.5 溶離液 pH

弱酸は pH の違いによって解離の程度 (イオンの割合) が異なる。そのため, 溶離剤がフタル酸のようなカルボン酸の場合, 溶離液 pH によって k' が異なる。すなわち, フタル酸溶離液は pH の上昇に伴って溶出力の強い二価イオンの割合が増加するので, 塩化物イオン, 臭化物イオン, 硝酸イオン, 硫酸イオンのような強酸性陰イオンの k' は小さくなる。しかしリン酸イオン ($pK_{a1}=2.10$, $pK_{a2}=6.71$, $pK_{a3}=11.8$) は二価イオンの割合が増し逆に k' が増加する (図 7)²⁰⁾。

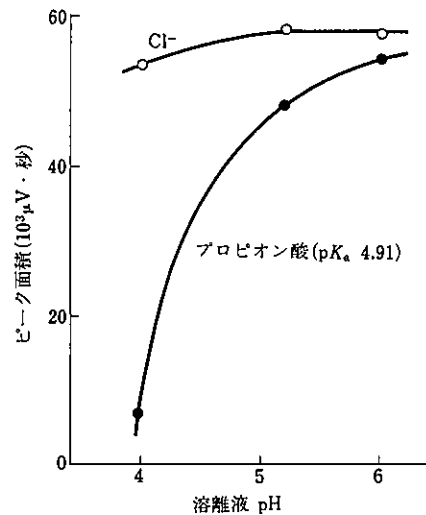
分析対象が弱酸の場合は, 溶離液 pH によってピーク面積が異なり検出されない場合もある。図 8 はイオン交換が支配的な pH 領域における溶離液 pH とピーク面積の関係を示している。どの pH でも完全解離している塩化物はピーク面積が一定であるが, プロピオン酸 ($pK_a=4.91$) は低 pH で解離が小さいためにピーク面積は小さい²¹⁾。炭酸はピークが観察されなくなる (図 9)。

又, 低 pH の溶離液を使用すると, 試料成分とは無関係なピークが吸光度検出でも電気伝導度検出でも現れる。これは“システムピーク”と呼ばれ, 溶離液成分と充てん剤のイオン交換とは異なる吸着平衡が生ずるためと考えられている。このピークの出現は, 目的成分のピークと重なったり, 迅速分析を妨げる場合がある。吸光度検出方式では, 溶離液 pH を中性以上に保つことに



pH 以外の条件は図 6 に同じ。

図 7 溶離液の pH と k' ²⁰⁾



pH 以外の条件は図 6 に同じ。

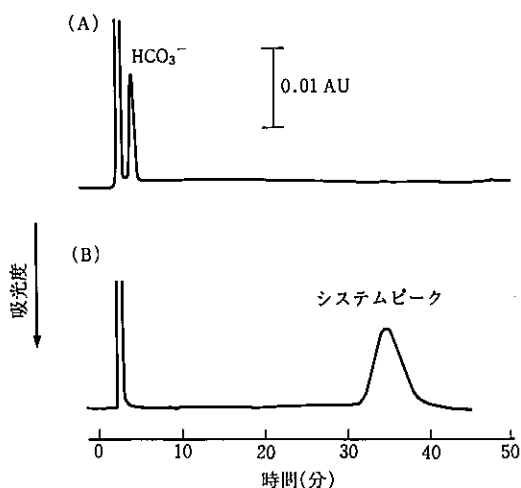
図 8 溶離液の pH とピーク面積²¹⁾

よって, システムピークを消滅できる (図 9)²⁰⁾。

以上の理由から, 間接吸光度検出 IC では, 一般に溶離液の pH を中性領域に設定するが多い。しかし最近, 更に低い pH で, システムピークの近傍ほど試料ピークが増感されることを利用した新しい研究も見られる²²⁾。

3.6 検出波長

間接吸光度検出 IC は, いつも溶離剤の吸収極大波長で検出できるというわけではない。分光光度計でもそうであるように, HPLC 用の吸光度検出器でも, 溶離液の吸光度が大きくなりすぎるとベースラインのノイズレベ



溶離液: 1×10^{-3} M フタル酸-水酸化ナトリウム, 溶離液 pH: (A) 6.7, (B) 4.3, その他の条件は図6に同じ

図9 溶離液 pH とシステムピーク²⁰⁾

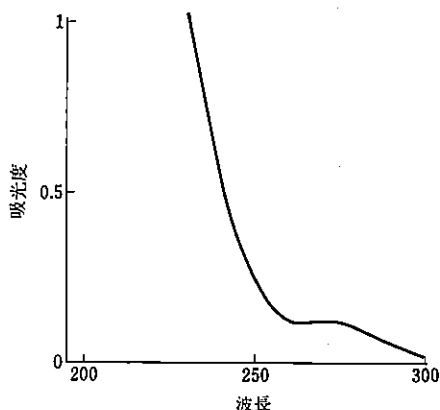


図10 1×10^{-4} M フタル酸二ナトリウムの紫外吸収スペクトル

ルが著しく大きくなる。吸光度を小さくするためには、溶離液の濃度を下げると k' が増加してしまうので、検出波長を移動する必要がある。実用的には、あらかじめ測定した紫外可視吸収スペクトルから溶離液の吸光度が約 1 以下になるように波長を選ぶのがよい。例えばフタル酸二ナトリウムの場合、 1×10^{-4} M ならば 230 nm 以上で検出可能であるが、 1×10^{-3} M では 280 nm まで検出波長を移動させる必要がある(図10)。この場合、吸光度を小さくするように波長を移動することは、ピーク高さ(深さ)が低く(浅く)なることを意味している。

4 装置の運転及び維持管理

IC では、装置の運転及び維持管理に関し、1) 水及

び溶離液の調製, 2) 試料の前処理, 3) 容器, 4) 分析カラムのコンディショニングと保存, 5) ステンレス鋼製のポンプ・配管からの金属汚染, 6) 反転ピーク処理など幾つかの留意点がある。電気伝導度検出方式にも共通する事項も多いので、ここでは特に間接吸光度検出方式で注意すべき点について述べる。

4.1 溶離液の調製と脱気

間接吸光度検出 IC に用いる溶離液は中性 pH 領域の有機酸水溶液が多い。これらは微生物が繁殖しやすく、カラムフィルターの目詰まりの原因となる。従って溶離液は必ず使用時に調製し、メンブランフィルター (0.2 ~ 0.5 μm) でろ過してから使用するのがよい。

一方、空気中の二酸化炭素は溶離液に溶解しやすく、その結果 pH を変動させ陰イオンの分離溶出挙動も変化させることがある。炭酸水素イオンの分析ができることは間接吸光度検出 IC の特徴の一つであるが、溶離液に溶け込んだ二酸化炭素はその微量分析を妨害する。窒素ガスなどによる溶離剤の連続パージを施すとこれらの問題を解決することができる²³⁾。

4.2 分析カラムのコンディショニングと保存

分析カラムはあらかじめ溶離液で数時間流してコンディショニングする必要がある。又、カラムを初めて使用する場合には、通常より 10 倍以上高い濃度の溶離液で数時間以上流してから、使用濃度の溶離液でコンディショニングするのがよい。前述のように溶離液は微生物が繁殖しやすいので、使用後のカラム及び配管内の溶離液を必ず水に置換しておく。又、長期間使用しないときは、0.1% アジ化ナトリウム水溶液に置換するのがよい。

分析カラムは長い間使用するうちに、保持の強いイオンやタンパク質を含む有機物の汚染によって性能が劣化し、 k' の減少、理論段数の低下、ピーク形状の変化が現れる。カラムの洗浄再生に、一般に高濃度溶離液が使用されるが、有機溶媒やアルカリが有効な場合もある。

4.3 検出器と記録計・データ処理装置の接続

式(2)から分かるように、間接吸光度検出方式では試料イオンの溶出は吸光度の減少を伴うので、負ピークが記録される。ピーク高さ(谷の深さ)法を用いて定量する場合は負ピークでも測定が可能であるが、ピーク面積法を用いる場合は、データ処理装置によっては反転ピーク処理ができないものがある。このようなときは、入力(又は出力)信号の極性(正負)を逆に接続するとよ

い。

4.4 システムの高性能化

分析時間の短縮と前処理の自動化は IC の重要な課題である。システムコントローラーで自動制御できる HPLC システムは間接吸光度検出 IC でも有用である。既に、交換容量が大きいカラムと小さいカラムの切り換えによる一価、二価陽イオンの一斉迅速分析²⁴⁾やエステルゼ固定化カラムを導入したカルボン酸類とそのエステル類の同時分析などが報告され、今後自動制御システムを用いた間接吸光度検出 IC の高性能化が期待される²⁵⁾。

5 おわりに

本解説では試料の前処理は割愛した。実際試料に IC が適用できるか否かは検出法の違いにかかわらず、“妨害成分が除けるか否か”にかかると言っても過言ではないが、現状は経験に頼っている部分が少なくない。一般に電気伝導度検出 IC で用いられる前処理法の多くは、間接吸光度検出 IC にも当てはまるので参考にするのがよい。

間接吸光度検出法はイオン交換モードに適用されて大きく発展した。しかし、移動相に検出器に応答する化合物を添加して、試料成分の溶出に伴うカラム溶出液の応答変化量を記録することは、イオン交換モードだけに適用されるわけではない。最近、同様の考え方が逆相モードや吸光度以外の検出法にも適用され始めており、この検出法の展開は新たな段階に入ったと言えるであろう。

文 献

- 1) H. Small, T. S. Stevens, W. C. Bauman : *Anal. Chem.*, **47**, 1801 (1975).
- 2) H. Small, T. E. Miller, Jr. : *Anal. Chem.*, **54**, 462 (1982).
- 3) 宮崎元一, 早川和一: “新しいイオンクロマトグラフィーの手ほどき—吸光度検出法の活用”, (1986), (南江堂).
- 4) 宮崎元一, 早川和一: *LC Family*, **21**, 1 (1986).
- 5) 早川和一, 宮崎元一: *衛生化学*, **34**, 210 (1988).
- 6) R. A. Cochrane, D. E. Hillman : *J. Chromatogr.*, **241**, 392 (1982).
- 7) P. R. Haddad, A. L. Hechenberg : *J. Chromatogr.*, **252**, 177 (1982).
- 8) 中村誠治, 今泉範子, 早川和一, 宮崎元一: *分析化学*, **38**, 573 (1989).
- 9) P. R. Haddad, R. C. Foley : *Anal. Chem.*, **61**, 1435 (1989).
- 10) 武藤義一ほか: “イオンクロマトグラフィー”, 日本分析化学会編, 機器分析実技シリーズ, (1988), (共立出版).
- 11) 早川和一, 平木博美, 宮崎元一: *分析化学*, **32**, 504, (1983).
- 12) T. Okada, T. Kuwamoto : *J. Chromatogr.*, **325**, 327 (1985).
- 13) P. J. Naish : *Analyst* (London), **109**, 809 (1984).
- 14) 本水昌二, 沢谷郁夫, 弘中孝志, 大島光子, 桐柴恭二, *分析化学*, **36**, 77 (1987).
- 15) 山本 敦, 松永明信, 牧野正雄, 早川和一, 宮崎元一: *衛生化学*, **32**, 174 (1987).
- 16) P. E. Jackson, P. R. Haddad : *J. Chromatogr.*, **355**, 87 (1986).
- 17) J. H. Sherman, N. D. Danielson : *Anal. Chem.*, **59**, 490 (1987).
- 18) K. Hayakawa, T. Sawada, K. Shimbo, M. Miyazaki : *Anal. Chem.*, **59**, 2241 (1987).
- 19) K. Hayakawa, M. Miyazaki : *LC-GC*, **6**, 508 (1988).
- 20) 早川和一, 平木博美, 宮崎元一: *分析化学*, **34**, T77 (1985).
- 21) 吉田育世, 早川和一, 宮崎元一, *衛生化学*, **31**, 317 (1985).
- 22) A. Yamamoto, A. Matsunaga, M. Ohto, E. Mizukami, K. Hayakawa, M. Miyazaki : *J. Chromatogr.*, **482**, 145 (1989).
- 23) K. Hayakawa, S. Kitamoto, N. Okubo, S. Nakamura, M. Miyazaki : *J. Chromatogr.*, **481**, 323 (1989).
- 24) 吉田育世, 早川和一, 宮崎元一: *日化*, **1986**, 1046.
- 25) K. Hayakawa, S. Nakamura, K. Inaki, M. Miyazaki : *Anal. Sci.*, **5**, 691 (1989).
- 26) Z. Iskandarani, T. E. Miller : *Anal. Chem.*, **57**, 1591 (1985).