

生活環境化学物質を対象とする新規光学検出液体クロマトグラフィーの開発

早川和一

金沢大学薬学部, 〒920 金沢市宝町 13-1

Development of New Photometric Detection in Liquid Chromatography for the Determination of Environmental Compounds

Kazuichi HAYAKAWA

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kanazawa University,
Takaramachi 13-1, Kanazawa 920, Japan*

(Received April 8, 1994)

Recent studies on the three new photometric detection in the liquid chromatographic methods have been reviewed. The detector and systems based on these detection theories and their applications to several fields have been also described.

Differential photometric detection using UV-visible absorbing eluents enabled us to examine the retention and detection mechanism of sample and eluent ions in ion exchange chromatography. Photometric detection in ion chromatography determined transparent ionic compounds using indirect photometric detection mode of this theory. This method was useful for many samples such as environmental water and foods.

Polarized photometric detection method has been developed by introducing two polarizers on either side of the UV-visible absorbance detector flow cell. The monitor determined optically active compounds as the change in absorbance. This method was applied for determining food additives such as sugars and organic compounds.

A HPLC system with a chemiluminescence detector has been developed for the determination of trace levels of mutagenic nitroarenes such as 1,3-, 1,6-, 1,8-dinitropyrenes and 1-nitropyrene. Utilizing this system, their exhaust from vehicles and behavior in air were examined in detail. This system was also used for determining methamphetamines in abuser urine and hair.

Keywords—photometric detection ion chromatography; polarized photometric detection; chemiluminescence detection; HPLC

1. はじめに

ヒトの健康や疾病は大気、水、食品と深く関わっている。これまで、この生活環境中の化学物質分析においては液体クロマトグラフィーが大きな役割を果たしてきた。そこでは、主として化学物質の吸光や蛍光特性などに基づく光学検出法が利用されてきたが、最近深刻な問題となってきた環境汚染物質や食品添加物の中には、これまでの光学検出法では分析が難しいもの

本総説は、平成6年度日本薬学会奨励賞の受賞業績を中心に記述したものである。

が少なくない。例えば、酸性雨や地球温暖化と関連する硫酸や硝酸、炭酸のような無機イオンには光吸収がないか、極めて小さいものが多い。またサリドマイド禍以来注目されている光学異性体の分析は、医薬品のみならず食品の栄養・味覚成分として添加される有機酸などにも及んでいるが、現在の方法は感度、簡便性の点で満足できるものではない。一方、大気中の発ガン物質として知られるニトロ化多環芳香族炭化水素（ニトロアレーン）のように、紫外吸収はあるが極めて低濃度であるために検出できないものもある。

著者は、上述の問題を解決するために、1) 示差吸光度検出法原理を応用した光吸収のないあるいは小さいイオン性物質を対象とする吸光度検出イオンクロマトグラフィー、2) 光学活性物質を対象とする偏光吸光度検出法、3) 化学発光検出 HPLC によるニトロアレーン分析法及び覚せい剤分析法、の3つに大別される新規光学検出液体クロマトグラフィーを開発した。いずれも、方法・原理に関する基礎研究とともに、それに基づく分析機器・システムの開発を行い、さらにそれらの対象領域への応用研究を展開した。以下に、それらを順に概説する。

2. 示差吸光度検出法と吸光度検出イオンクロマトグラフィー

2.1. 示差吸光度検出法 1975年、イオン性化合物を対象として、その電気的性質を利用した電気伝導度検出イオンクロマトグラフィーが開発され、環境試料や食品、医薬品のイオン分析法として普及した。しかし、この方式はバックグラウンド電気伝導度を軽減するためのサプレッサーを必要とした。¹⁾その後、サプレッサーを必要としないシングルカラム方式が開発されたが、電気伝導度検出方式では使用できる溶離液条件に制限が大きく、弱酸のように高感度検出ができない対象がある上、システムの構築や変更が容易でないなどの難点を有している。²⁾

ところで現在、HPLC用の検出器としては吸光度検出器が最も汎用されているが、これを光吸収のない化合物へ適用することは論外とされていた。しかし著者は、光吸収を有する溶離剤をイオン交換クロマトグラフィーに用い、それと試料成分との光吸収の差を利用するならば、試料成分がその光吸収の有無にかかわらず正又は負の吸光度変化として検出できる示差吸光度検出法を提案した。その原理は以下の通りである。

平衡状態にある陰イオン交換カラム内のイオン交換基上では、試料イオン (S^-) は溶離剤イオン (E^-) (いずれも1価陰イオンとする) と1:1の交換反応を繰り返しながら移動してカラムから溶出される。このとき、 S^- の溶出に伴って現れる吸光度変化量（ピーク面積、 PA ）は次式で表される。

$$PA \propto C_S(A_S - A_E) \quad (1)$$

(但し、 C_S, C_E は S^-, E^- の注入量、 A_S, A_E は検出波長 λ における S^-, E^- の単位濃度当たりの吸光度)

S^- 及び E^- が Fig. 1(A) のような光吸収スペクトルを持つとき、得られるクロマトグラムパターンは検出波長により異なる。すなわち (B) のクロマトグラムパターンのように、検出波長が λ_1 のとき、 $A_S > A_E$ であるので式 (1) の右辺 > 0 となり正ピークが現れる。検出波長が λ_3 のときは $A_S < A_E$ で負ピークが現れ、 λ_2 のときは $A_S = A_E$ でピークは現れない。従来の液体クロマトグラフィーの吸光度検出法は、もっぱら光吸収のない溶離剤を用いて光吸収を持つ試料成分を検出する $A_S > A_E$ ($= 0$) のパターンであった。紫外可視吸収がないか、あるいは小さいものが多い無機イオンや有機酸を対象とする場合は、 $A_S < A_E$ の間接的な検出方式が有効である。特に $A_S = 0$ のとき、式 (1) の右辺 $= -C_S A_E$ となり、シグナルの大きさ（負ピークの面積）は C_S と A_E

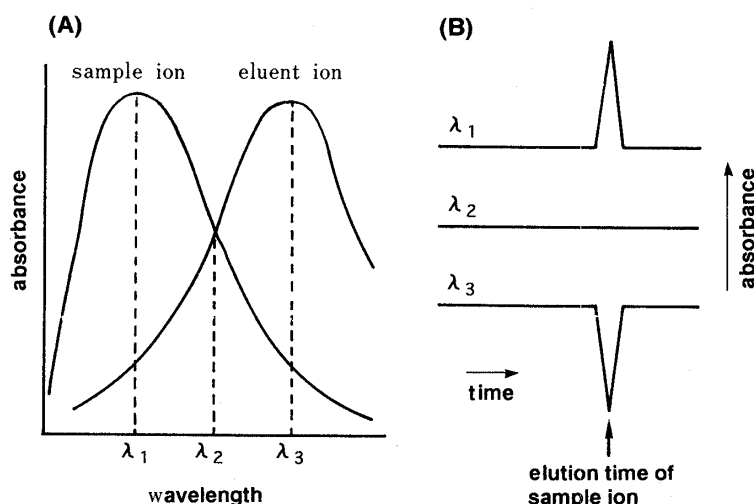


Fig. 1. Absorbance Detection in Ideal Ion Exchange Chromatography

(A) absorbance spectra of sample and eluent ions. (B) chromatograms by absorbance detection at three different wavelength.

に比例する。したがって C_s が等しければ試料成分の種類が異なってもシグナルの大きさは等しい。³⁾

2.2. 試料成分ピーク及びシステムピークの生成機構解明と保持・溶出予測

式 (1) はイオン交換のみが保持分離に関わるとき成立する (Fig. 2 (A)). ところが、例えば酸性 pH の芳香族カルボン酸溶離液を用いると、試料成分の種類に依存しない大きなベースライン変動 (システムピークと呼ばれる) が現れ、しかも試料成分のピークの大きさは式 (1) に従わないことを見出した。すなわち、試料成分ピークはシステムピークより前では正 (吸光度の増加), 後ろでは負 (吸光度の減少) となり、その面積はシステムピークに近いほど大きくなった。段理論に基づいてこのピーク生成機構の解明を行った結果、試料成分の保持はイオン交換平衡に支配されるが、溶離剤の保持は非解離型の吸着平衡に支配されること (Fig. 2(B)), さらに、試料成分ピーク面積 (PA) と試料成分ピーク及びシステムピークの保持比 (k'_s, k'_e) の間には式 (2) が成立することを見出した。

$$PA \propto k'_s / (k'_e - k'_s) \quad (k'_s \neq k'_e) \quad (2)$$

式 (2) に基づくコンピュータシミュレーション結果は実際のクロマトグラムとよく一致した。この理論式は、試料成分ピークあるいはシステムピークの保持を調節することにより、特定ピークの感度増強、抑制が可能であることを示すものであり、これまでの標準条件のみを使用するイオンクロマトグラフィーでしばしば生ずる感度不足や共存ピークの妨害などの問題解消に有効であることが分かった。⁴⁾

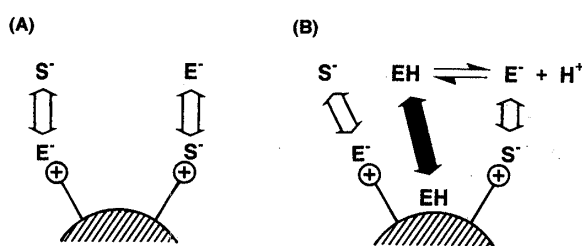


Fig. 2. Retention Mechanisms of Sample and Eluent Species in Anion Exchange Column

(A) ideal ion exchange. (B) ion exchange + adsorption.
 S^- , sample anion; E^- , eluent anion; \oplus , anion exchanger.

次に著者らは、上述のシステムピークの保持比を用いた溶離剤のカラム担体に対する等温吸着線の作成法を考案した。これをシステムピークを生ずる溶離液系に適用した結果、非解離型溶離剤の吸着も **biLangmuir** 式に従うことを見出し、システムピークの溶出挙動を予測可能とした。⁵⁾

イオンクロマトグラフィーのみならず、一般のイオン交換クロマトグラフィーでは多価塩基酸類を成分とする溶離液を用いることが多い。しかし、一価イオンの単成分溶離剤のみの理想状態について導き出された従来のイオン交換式は多価塩基酸のような多成分系の解析には適用できなかった。著者らは、多成分系モデルとして提案された **Hoover** モデル⁶⁾ にさらに溶離剤間分離係数という新たな概念を導入することにより、

多価塩基酸溶離液系における多価試料成分の溶出を初めて予測可能とした。こうして、電気伝導度検出と吸光度検出といった方式の違いによらず、これまで経験に依存せざるを得なかったイオンクロマトグラフィーの最適溶離液条件の理論予測の道を開いた。⁷⁾

2.3. 吸光度検出イオンクロマトグラフィー 上述の理論研究に基づいて開発した吸光度検出イオンクロマトグラフィーは、Fig. 3 に示すような溶離剤イオン種を用いることによって、紫外・可視吸光度検出器を備えた普及型 **HPLC** 装置で、種々の陽イオンと陰イオンが電気伝導度検出方式に劣らぬ感度で分析可能である。⁸⁾ さらに、吸光度検出イオンクロマトグラフィーは電気伝導度検出方式を上回る以下の特長を有している。

第一に、溶離液を高 **pH** に維持することにより、弱酸イオンを強酸イオンと同条件、同感度で分析できる。例えば、食品の栄養・味覚成分として重要な有機酸と他の無機陰イオンの同時一斉分析に威力を発揮している。⁹⁾ さらに、大気中から混入する二酸化炭素の妨害を溶離液を窒素パージして除くことにより、環境分析で課題とされてきた炭酸の微量分析を可能とした。¹⁰⁾

第二に、多様な溶離剤の選択が可能で新しい分離・検出様式が開拓できる。例えば、金属との錯体形成能を持たせた溶離液を用いることによって陰イオンと多価金属イオンの同時分析 (Fig. 4) を、¹¹⁾ 金属との配位子交換反応を利用して光学異性有機酸の直接分離分析を可能とし (Fig. 5),¹²⁾ それぞれ、環境水や食品の分析に応用した。

第三に、高性能化のためのシステムの組替え・接続が容易である。¹³⁾ 例えば、エステラーゼ固定化カラムの導入による有機酸エステル分析システム、¹⁴⁾ 濃縮カラムの導入による ppt レベルの有機酸と無機陰イオンの高感度同時分析システム、¹⁵⁾ さらにクリーンアップカラム導入による妨害成分のオンライン除去システム¹⁶⁾ などを考案し、いずれも実試料分析に効果を発揮している。

以上の研究成果に裏付けされた吸光度検出イオンクロマトグラフィーは、既にいくつかの公定法に記載されている。

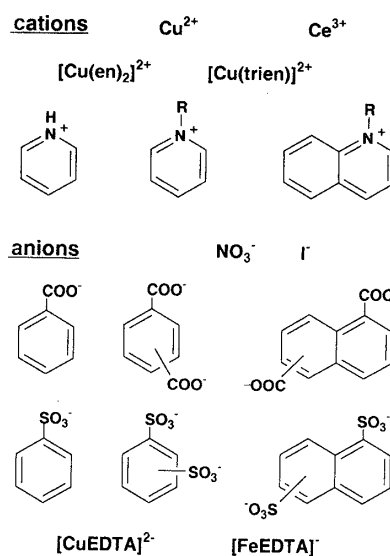


Fig. 3. Eluent Ions for Indirect Photometric Detection Ion Chromatography

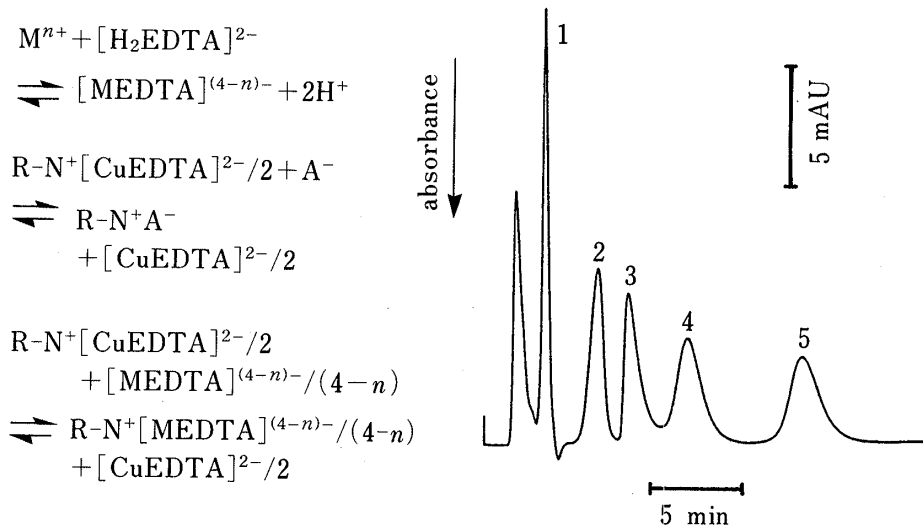


Fig. 4. Chromatogram of Inorganic Anions and Metal Ions Using Metal Complex Eluent

Eluent, $5 \times 10^{-4} M Na_2[Cu(EDTA)] - 5 \times 10^{-5} M Na_2H_2EDTA$; Detection wavelength, 290 nm. Peaks: 1, Cl^- (8 nmol); 2, Ca^{2+} (4 nmol); 3, NO_3^- (8 nmol); 4, Mg^{2+} (4 nmol); 5, SO_4^{2-} (4 nmol).

3. 偏光吸光度検出法

3.1. 偏光吸光度検出法の原理

光学異性体が存在するとき、その違いによって薬効や毒性が異なる場合がある。このため、医薬品のみならず食品添加物についても光学異性体分析の重要性が増している。これまでクロマトグラフィーによる光学異性体分析法に関する研究は、ジアステレオマーへの誘導化試薬や光学活性固定相の開発を中心に進められてきた。しかし、これらの方法は誘導化に伴う煩雑さや多岐にわたる固定相の選択などの欠点を有している。これに対して、検出器側からの研究は、光学活性物質による旋光現象に基づくファラデー方式の旋光計が市販されているものの、感度や操作性の点で満足できるものではない。

著者は、光源を偏光とし、光学活性物質を透過した光を偏光子を通してから受光すれば、旋光を透過光の強度変化に変換することができると考え、以下の偏光吸光度検出法を明らかにした。

本原理に基づく光学系の概略を Fig. 6 に示したが、フローセルの直後に偏光子を配置する。光源光（偏光）がフローセルを通過するとき、この中に光学活性物質が存在すると、それに由来して透過光の偏光面が回転する。偏光子を通過する透過光の強度はその偏光面と偏光子軸の成す角度に依存して決まる。いま、基本光学系に普及型の紫外・可視吸光度検出器を考えると、光源光は自然光であるので、フローセルの直前にもう 1 枚偏光子を挿入することにより、

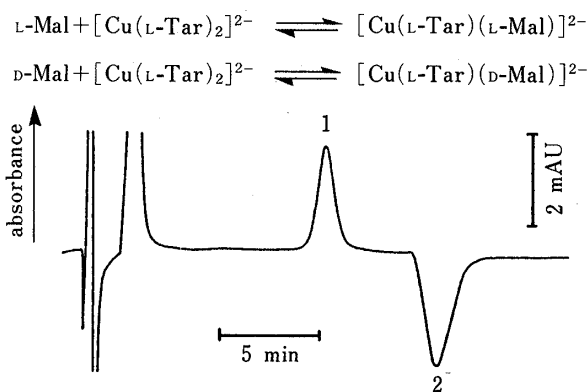


Fig. 5. Chromatogram of Malate Enantiomers Using Ligand Exchange Metal Complex

Eluent, 1.5 mM $Cu(OH)_2 - 3 mM L\text{-tartrate}$ (pH 4.7); Detection wavelength, 283 nm. Peaks: 1, L-malate; 2, D-malate (each 0.1 μmol).

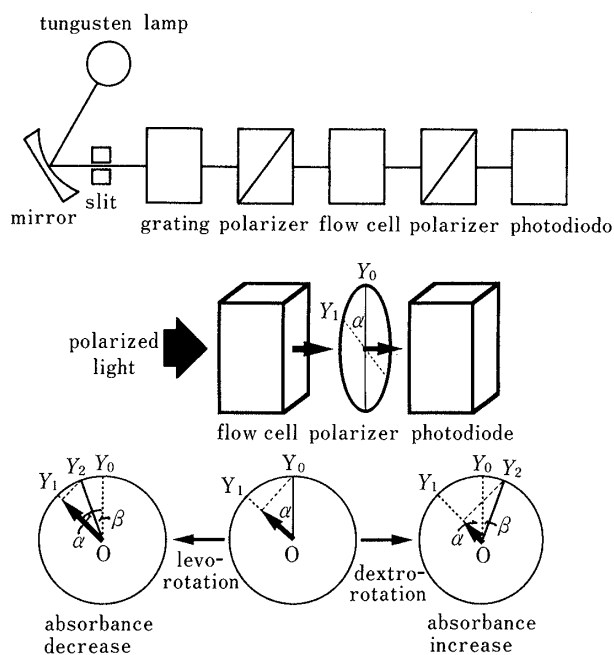


Fig. 6. Principle of Polarized Photometric Detection

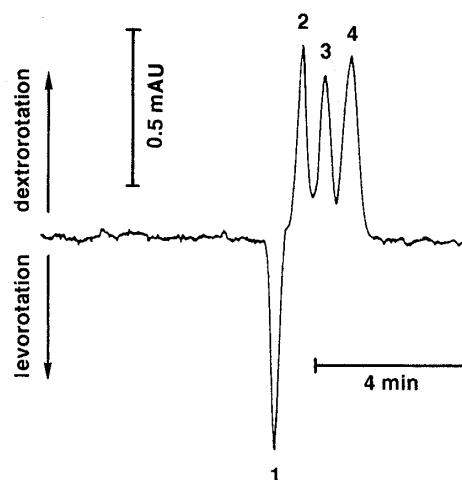


Fig. 7. Chromatogram of Saccharides by Polarized Photometric Detection

Detection wavelength, 490 nm. Peaks: 1, fructose ($3.3 \mu\text{mol}$); 2, glucose ($2.8 \mu\text{mol}$); 3, sucrose ($0.9 \mu\text{mol}$); 4, maltose ($1.1 \mu\text{mol}$).

偏光光源を得ることができ、本原理が適用される。このとき、吸光度変化量 (ΔAbs) と旋光度 (β) の間に次式が成立することを導き出した。

$$\Delta\text{Abs} = 2 \log e \cdot \tan \alpha \cdot \beta \quad (3)$$

(但し、 α は 2 枚の偏光子の軸間角度、 $|\alpha| \gg |\beta|$ とする)

本法は、吸光度の増加と減少の両方を検出情報とする前述の示差吸光度検出法をさらに旋光現象に応用発展させた原理である。¹⁷⁾

3. 2. 偏光吸光度検出器 上述の基礎理論に基づいて開発した偏光吸光度検出器は、数マイクロリットルという少試料量で、左、右旋光の区別とその角度が高感度測定できる。いま、Fig. 6 のように一枚目 (光源側) の偏光子に対して二枚目 (受光器側) の偏光子軸をあらかじめ左に回転したとき、式 (3) より左旋光性物質 ($\beta < 0$) は吸光度の減少 ($\Delta\text{Abs} < 0$)、右旋光性物質 ($\beta > 0$) は吸光度の増加 ($\Delta\text{Abs} > 0$) を生ずることが示される。¹⁸⁾ 一例として、Fig. 7 には本検出器による左旋光性の果糖及び右旋光性のブドウ糖、ショ糖、麦芽糖の分析クロマトグラム例を示した。

基本光学系として普及型の紫外・可視吸光度検出器をそのまま用いて、 α を 45° (本法による最大シグナル/ノイズ比を与える理論値) に定め、さらに検出波長を $500\text{--}600\text{ nm}$ としたとき、約 7.5×10^{-5} の検出下限 (シグナル/ノイズ比=3) が得られた。この値は、光源強度を増すほど、またセル長 (光路長) を長くするほど改善される。¹⁹⁾ これらの基礎研究に基づいて、専用偏光吸光度検出器の試作開発が進められている。さらに、流路を二分したスプリット型フローセルを用いることによる着色成分の旋光度測定、²⁰⁾ あるいは円二色性測定など、従来の旋光度検出器を上回る特長と有望性を有している。

以上の本検出法とその検出器に関する開発研究はまだ開始されて日が浅いものの、既に食品に添加された糖²¹⁾ や光学活性有機酸²²⁾ の検出に威力を発揮しており、さらに医薬品への適用な

ど、将来の発展が大いに期待できる。

4. 化学発光検出法

4.1. ニトロアレーン分析法 自動車は現代の主要交通輸送手段の1つであるが、大気環境の悪化に伴う肺ガンや喘息などの呼吸器系疾患との関連も指摘されている。特に近年、大気変異原性の増加が問題となっており、年々増加の一途をたどる自動車はその主要原因と疑われている。既に、動物細胞や微生物を用いた研究では、大気浮遊粉塵に含まれるベンゾ[a]ピレンのような多環芳香族炭化水素のいくつかに発ガン性や変異原性のあることが知られているが、最近、ニトロアレーンにより強い活性が見い出された。中でも、ジニトロピレンやニトロピレンに特に強い活性が認められ、これらの化合物の環境動態と生体影響の把握が急務になった。²³⁾ しかし、これまでの生物学的試験法では化合物の同定と定量ができず、HPLCやGC/MSといった機器分析法では大気中濃度が極めて低いこれらの化合物を分析するには甚だ感度不足であった。このため、いまだに大気内動態はおろか自動車排出量すら満足に測定されていない。

ニトロアレーンを還元するとアミノアレーンが生成し、その強い蛍光性を利用した蛍光検出HPLCが報告されている。²⁴⁾ 一方、いくつかの蛍光物質が蛍光検出よりはるかに高い感度で検出できる過シュウ酸エステル化学発光がHPLCの検出法としてにわかに注目されるようになった。²⁵⁾ そこで著者らは、上述の問題点を解決したニトロアレーン分析法の確立を目的として、Chart 1に示すような還元反応と化学発光反応とを組み込んだHPLC法並びにそのシステ

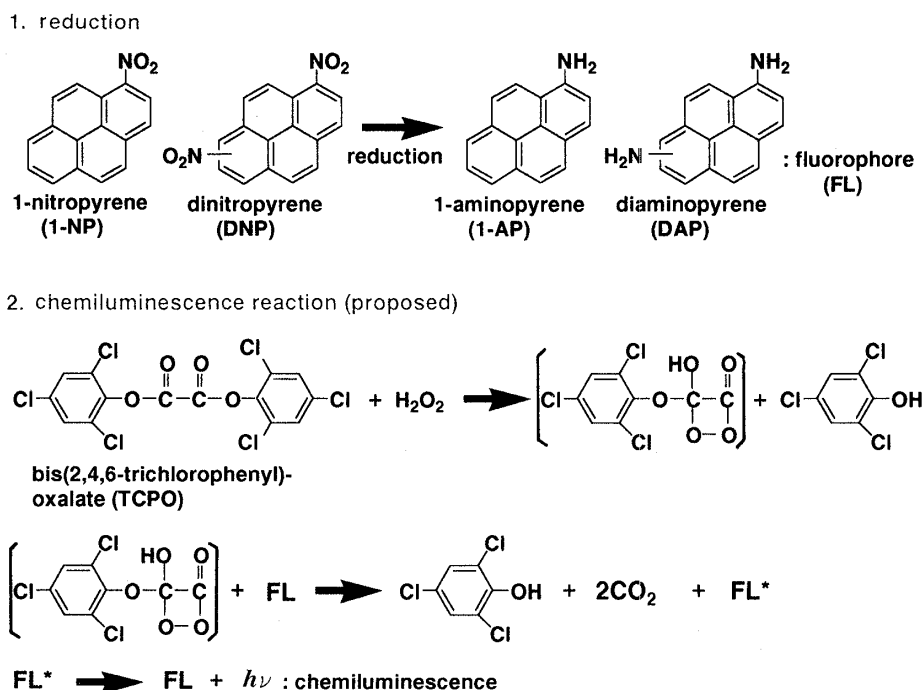


Chart 1. Reduction and Chemiluminescence Reaction Mechanisms of Nitroarene Determination

ムの構築をはかった。まず、過シュウ酸エステル化学発光検出システムの簡便化とノイズ軽減化に関する改良をはかるとともに、²⁶⁾ ニトロアレーンの還元法として、当初は水酸化ナトリウム存在下、オフラインで行う還流法を用いたが、その後、電気化学還元器、²⁷⁾ さらに亜鉛などの金属触媒カラムのインライン化を可能とし、ニトロアレーン分析システムを完成させた。そ

の結果、大気粉塵抽出試料をオフラインで還元してから基本システムに注入するか、あるいは分析カラムの直前に還元部を組み込んだシステムに試料を直接注入すると、1,3-, 1,6-, 1,8-ジニトロピレンや1-ニトロピレンが分離分析可能となった (Fig. 8).²⁸⁾ 一方、分析カラムの直後に還元部を組み込んだシステムでは、ニトロアレーンとそのニトロソ体、アミノ体などの還元成績体の一斉分析ができた。²⁹⁾ これらのシステムによる検出下限はサブフェムトモルレベルであり、蛍光検出 HPLC や CG/MS より約2桁高感度化が達成された。しかも化学発光検出法は選択性が高いため、比較的簡便な前処理で大気試料や生体試料への適用が可能となった。

上述の高い感度と選択性を有する本法をニトロアレーンの大気内動態解析に応用した。まず、都市大気中の1,3-, 1,6-, 1,8-ジニトロピレン濃度は1-ニトロピレン濃度より約2桁近く低いレベルで、いずれも朝晩に高く深夜に低い日内変動を呈した (Fig. 9)。これらの推移は交通量などと強い相関を示したことから、主要発生源は自動車であることが分かった。³⁰⁾ また、大気中濃度には夏低冬高を示す季節変動があり、その推移には気象因子の影響と二次反応の関与が推定された。³¹⁾

次に、いずれのジニトロピレン異性体もディーゼル粉塵のみならずガソリン粉塵中でも、異性体間の差は小さく同程度の濃度で存在したが、1-ニトロピレンはディーゼル粉塵の方が高濃度であった。³²⁾ 粉塵排出量はガソリン車よりディーゼル車の方が圧倒的に多いので、その結果、いずれの化合物も大気中への排出量はディーゼル車の方がガソリン車より多い事実が判明した (Fig. 10).³³⁾ ディーゼル粉塵、ガソ

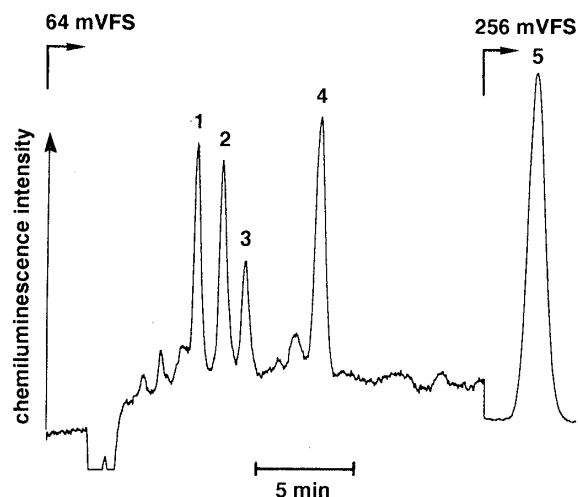


Fig. 8. Chromatogram of 1,3-Dinitropyrene (1,3-DNP), 1,6-DNP, 1,8-DNP and 1-Nitropyrene (1-NP) in Benzene/Ethanol Extract from 4.2 mg of Airborne Particulates after Refluxing with Sodium Sulfide

Peaks: 1, 1,6-DNP (55 fmol/mg); 2, 1,8-DNP (38 fmol/mg); 3, 1,3-DNP (60 fmol/mg); 4, 2-fluoro-7-nitrofluorene (internal standard); 5, 1-NP (1.4 pmol/mg).

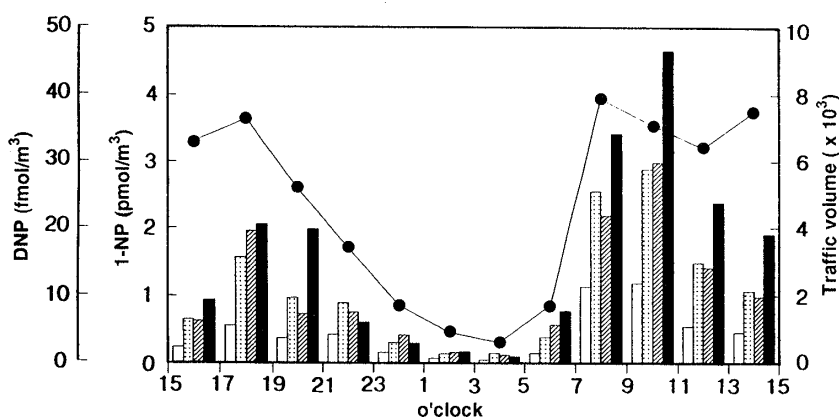


Fig. 9. Time Courses of 1,3-Dinitropyrene (1,3-DNP), 1,6-DNP, 1,8-DNP and 1-Nitropyrene (1-NP) Concentrations in Urban Air as well as Traffic Volume

Sampling site, heavy traffic road-side, Kanazawa; Sampling date, February 2-3, 1993.
Columns and symbol: □, 1,3-DNP; ▨, 1,6-DNP; ▩, 1,8-DNP; ■, 1-NP; ●, traffic volume.

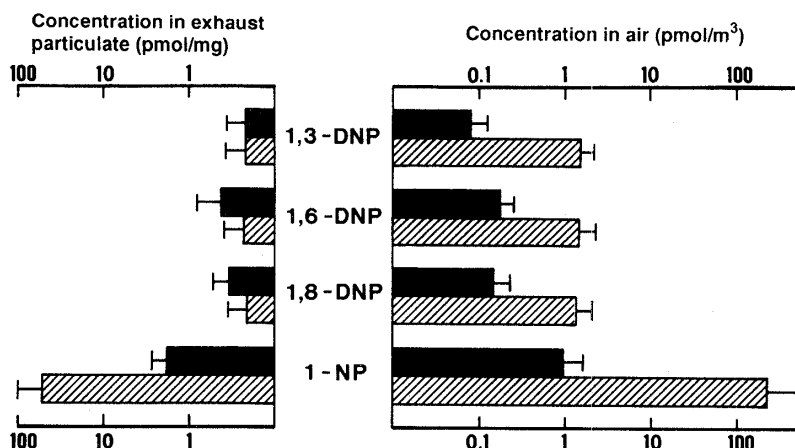


Fig. 10. A Comparison of Gasoline and Diesel Engine Exhausts

Columns: ■, gasoline exhaust (n=8); ▨, diesel exhaust (n=7). Each column and horizontal bar represent the mean and S.D.

リン粉塵及び大気浮遊粉塵中に含まれるこれらの化合物の濃度比の違いに基づいて計算した結果, Fig. 9 の都市大気中に存在する1-ニトロピレンのほとんどはディーゼル車から, ジニトロピレン異性体の8割はディーゼル車, 2割はガソリン車から排出されていることが明らかとなった.³⁴⁾

さらに, 本分析法と生物試験法の1つとして Ames 試験法とを併用したところ, 上述したように大気中の各ジニトロピレン異性体濃度はいずれも1-ニトロピレン濃度よりはるかに低いものの, それぞれの濃度で発現される変異原性の程度は1-ニトロピレンに匹敵するか, それ以上であることが明らかとなった.³¹⁾

このように, 開発したニトロアレン分析法により, 生物学的試験法のみではできなかったニトロアレンの大気内動態を追跡し, さらに変異原性との関連を定量的に解析した結果, 都市大気変異原性の増加がディーゼル車増加に深く関連している可能性がますます高くなった. ニトロアレンの発ガン性, 変異原性発現機序には複数の説が報告されているが, 開発したニトロアレン分析法は代謝物分析にも有用であり, これによりニトロアレンの代謝活性化過程の定量的解析が進むものと期待される.

4. 2. 覚せい剤分析法 薬物汚染は大きな社会問題の1つであり, 日本ではとりわけ覚せい剤事犯が多い. 著者は, 上述の化学発光検出 HPLC 法を覚せい剤及びその代謝物の分析にも応用した. すなわち, メタンフェタミン及びその代謝物のアミノ基をダンシル誘導体化あるいはシアノベンゾイソインドール誘導体化することにより, 化学発光検出に対して高い感受性を

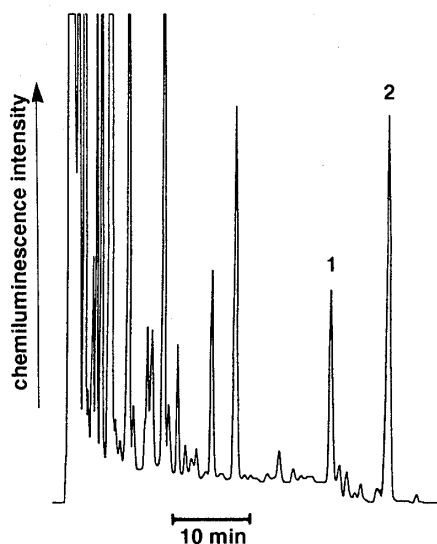


Fig. 11. Chromatogram of Methamphetamine and Amphetamine in Abuse's Hair after Dan-sylation

Sample hair; 0.3 mg (5.3 cm). Peaks: dan-sylated (1) amphetamine (3.3 ng/hair) and (2) methamphetamine (7.4 ng/hair).

発現させ、これをニトロアレーン分析法と同様の過シュウ酸エステル化学発光検出 HPLC システムに適用するものである。本法は、フェムトモルレベルのメタンフェタミン類が分析可能であり、³⁵⁾ その感度は GC や GC/MS を上回った。³⁶⁾

本法により、まず被疑者尿中から従来法では不可能であった低レベルのメタンフェタミンとアンフェタミンが分析できた。³⁷⁾ さらに、ノルエフェドリンを加えたこれらの *p*-水酸化体の一斉分析を可能とし、 β -グルクロニダーゼ処理を組み合わせることによりそれらのグルクロン酸抱合体も分析可能とした。これを用いて、被疑者尿中のメタンフェタミン排泄の特徴を明らかにすることができた。³⁸⁾ また、本法により毛髪1本からのメタンフェタミンとアンフェタミンの検出を可能とし、超高感度スクリーニング法としての本法の有用性が示された (Fig. 11)。³⁹⁾ 本法は覚せい剤以外のいくつかの乱用薬物にも応用可能であり、その活用が期待できる。

謝辞 本研究は、主に金沢大学薬学部において行ったものであります。研究を遂行するにあたり、終始御指導、御鞭撻いただいた同学部衛生化学教室 宮崎元一先生に心より感謝申し上げます。また、本研究は共に実験、討論をしていただいた多くの旧、現教室員並びに同学部内外の共同研究者、さらに貴重な御助言を頂いた多くの方々の協力の賜物であり、深謝致します。研究費の一部は文部省科学研究費並びに薬学研究奨励財団研究助成金、島津科学技術振興財団研究開発助成金によりました。ここに記して感謝します。

引用文献

- 1) H. Small, T. S. Stevens, W. C. Bauman, *Anal. Chem.*, **47**, 1801 (1975).
- 2) D. T. Gjerde, J. S. Fritz, G. Schmuckler, *J. Chromatogr.*, **186**, 509 (1979).
- 3) H. Small, T. E. Miller, Jr., *Anal. Chem.*, **54**, 462 (1982).
- 4) A. Yamamoto, A. Matsunaga, M. Ohto, E. Mizukami, K. Hayakawa, M. Miyazaki, *J. Chromatogr.*, **482**, 145 (1989); A. Yamamoto, A. Matsunaga, E. Mizukami, K. Hayakawa, M. Miyazaki, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **36**, 332 (1990); K. Hayakawa, A. Kato, A. Yamamoto, M. Miyazaki, *Anal. Sci.*, **8**, 25 (1992).
- 5) A. Yamamoto, A. Matsunaga, E. Mizukami, K. Hayakawa, M. Miyazaki, *J. Chromatogr.*, **644**, 183 (1993).
- 6) T. B. Hoover, *Sep. Sci. Technol.*, **17**, 259 (1982).
- 7) A. Yamamoto, K. Hayakawa, A. Matsunaga, E. Mizukami, M. Miyazaki, *J. Chromatogr.*, **627**, 17 (1992).
- 8) M. Miyazaki, K. Hayakawa, S.-G. Choi, *J. Chromatogr.*, **323**, 443 (1985); 早川和一, 宮崎元一, *衛生化学*, **34**, 210 (1988); 中村誠治, 今泉範子, 早川和一, 宮崎元一, *分析化学*, **38**, 573 (1989); 早川和一, 平木博美, 宮崎元一, *分析化学*, **32**, 504 (1983).
- 9) 吉田育世, 早川和一, 宮崎元一, *衛生化学*, **31**, 317 (1985).
- 10) K. Hayakawa, S. Kitamoto, N. Okubo, S. Nakamura, M. Miyazaki, *J. Chromatogr.*, **481**, 323 (1989); K. Hayakawa, K. Nomura, M. Miyazaki, *Anal. Sci.*, **8**, 111 (1992).
- 11) K. Hayakawa, T. Sawada, K. Shimbo, M. Miyazaki, *Anal. Chem.*, **59**, 2241 (1987); K. Hayakawa, M. Miyazaki, *LC·GC*, **6**, 508 (1988).
- 12) A. Yamamoto, K. Hayakawa, A. Matsunaga, E. Mizukami, M. Miyazaki, *Anal. Sci.*, **7**, 149 (1991); A. Yamamoto, A. Matsunaga, E. Mizukami, K. Hayakawa, M. Miyazaki, *J.*

- Chromatogr.*, **585**, 315 (1991).
- 13) 吉田育世, 早川和一, 宮崎元一, 日化, **1986**, 1046.
 - 14) K. Hayakawa, S. Nakamura, K. Inaki, M. Miyazaki, *Anal. Sci.*, **5**, 691 (1989)
 - 15) K. Hayakawa, J. Kobayashi, M. Ohmori, M. Ohya, A. Kato, M. Miyazaki, *Anal. Sci.*, **9**, 419 (1993).
 - 16) K. Hayakawa, K. Nomura, M. Miyazaki, *Anal. Sci.*, **7**, 967 (1991).
 - 17) A. Yamamoto, A. Matsunaga, K. Hayakawa, E. Mizukami, M. Miyazaki, *Anal. Sci.*, **7**, 719 (1991).
 - 18) K. Hayakawa, A. Yamamoto, A. Matsunaga, E. Mizukami, M. Nishimura, M. Miyazaki, *Biomed. Chromatogr.*, **8**, 130 (1994).
 - 19) 綿谷敏彦, 早川和一, 宮崎元一, 山本 敦, 松永明信, 水上英一, 西村雅之, 北岡光夫, 藤田登美雄, 日本薬学会第114年々会, 東京, 1994年3月.
 - 20) 山本 敦, 松永明信, 水上英一, 早川和一, 宮崎元一, 西村雅之, 北岡光夫, 藤田登美雄, 日本薬学会第114年々会, 東京, 1994年3月.
 - 21) 山本 敦, 松永明信, 水上英一, 食品衛生学雑誌, **33**, 301 (1992).
 - 22) A. Yamamoto, A. Matsunaga, E. Mizukami, K. Hayakawa, M. Miyazaki, *J. Chromatogr. A.*, **667**, 85 (1994).
 - 23) H. Tokiwa, R. Nakagawa, Y. Ohnishi, *Mutat. Res.*, **91**, 321 (1981); H. S. Rosenkranz, R. Mermelstein, *Mutat. Res.*, **114**, 217 (1983).
 - 24) 田辺 潔, 松下秀鶴, 郭 錦堂, 今宮俊一郎, 大気汚染学会誌, **21**, 535 (1986).
 - 25) S. Kobayashi, K. Imai, *Anal. Chem.*, **52**, 424 (1980); K. W. Sigverdson, J. M. Kennish, J. W. Birks, *Anal. Chem.*, **56**, 1096 (1984).
 - 26) N. Imaizumi, K. Hayakawa, M. Miyazaki, K. Imai, *Analyst (London)*, **114**, 161 (1989); K. Imai, A. Nishitani, Y. Tsukamoto, W.-H. Wang, S. Kanda, K. Hayakawa, M. Miyazaki, *Biomed. Chromatogr.*, **4**, 100 (1990); K. Hayakawa, N. Imaizumi, M. Miyazaki, *Biomed. Chromatogr.*, **5**, 148 (1991); K. Hayakawa, E. Minogawa, T. Yokoyama, M. Miyazaki, K. Imai, *Biomed. Chromatogr.*, **6**, 84 (1992).
 - 27) N. Imaizumi, K. Hayakawa, Y. Suzuki, M. Miyazaki, *Biomed. Chromatogr.*, **4**, 108 (1990).
 - 28) K. Hayakawa, R. Kitamura, M. Butoh, N. Imaizumi, M. Miyazaki, *Anal. Sci.*, **7**, 573 (1991); K. Hayakawa, M. Miyazaki, *Anal. Sci.*, **7** (suppl.), 1045 (1991).
 - 29) K. Hayakawa, N. Terai, K. Suzuki, P. G. Dinning, M. Yamada, M. Miyazaki, *Biomed. Chromatogr.*, **7**, 262 (1993).
 - 30) 村橋 毅, 早川和一, 宮崎元一, 第34回大気汚染学会, 千葉, 1993年3月.
 - 31) 寺井規子, 早川和一, 宮崎元一, 第34回大気汚染学会, 千葉, 1993年3月.
 - 32) K. Hayakawa, M. Butoh, M. Miyazaki, *Anal. Chim. Acta*, **266**, 251 (1992).
 - 33) K. Hayakawa, M. Butoh, Y. Hirabayashi, M. Miyazaki, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **40**, 20 (1994).
 - 34) 村橋 毅, 早川和一, 宮崎元一, 日本薬学会第114年々会, 東京, 1994年3月.
 - 35) K. Hayakawa, K. Hasegawa, N. Imaizumi, O. S. Wong, M. Miyazaki, *J. Chromatogr.*, **464**, 343 (1989).
 - 36) 高山成明, 早川和一, 小林 博, 宮崎元一, 衛生化学, **37**, 14 (1991).

- 37) K. Hayakawa, N. Imaizumi, H. Ishikura, E. Minogawa, N. Takayama, H. Kobayashi, M. Miyazaki, *J. Chromatogr.*, **515**, 459 (1990).
- 38) K. Hayakawa, Y. Miyoshi, H. Kurimoto, Y. Matsushima, N. Takayama, S. Tanaka, M. Miyazaki, *Biol. Pharm. Bull.*, **16**, 817 (1993).
- 39) 高山成明, 田中星司, 早川和一, 松永卓也, 宮崎元一, 日本薬学会第114年々会, 東京, 1994年3月.