

## 高速液体クロマトグラフィーにおける誘導体化反応

河合 聡<sup>a)</sup>，宇野文二<sup>a)</sup>

岐薬紀要 (1991) 40 : 1-17

**要約**：高速液体クロマトグラフィーのための誘導体化反応が，カルボキシル基，カルボニル基（ケトン，アルデヒド， $\alpha$ -ケト酸を含む），水酸基（アルコール，フェノール，カテコールを含む），チオール基，アミノ基（アミン，アミノ酸，ポリアミンを含む），その他及び光学異性体に分類して記述されている。

**索引用語**：高速液体クロマトグラフィー，誘導体化反応，カルボキシル基，カルボニル基，水酸基，チオール，アミノ基，光学異性体（文177）

**Derivatization Reactions for High-Performance Liquid Chromatography**SATOSHI KAWAI<sup>a)</sup>，BUNJI UNO<sup>a)</sup>*Anu. Proc. Gifu Pharm. Univ.* (1991) 40 : 1-17

**Abstract** : Description of derivatization reactions for high-performance liquid chromatography classified as carboxylic compounds, carbonyl compounds (including ketones, aldehydes and  $\alpha$ -keto acids), hydroxy compounds (including alcohols, phenols and catechols), thiols, amines (including amines, amino acids and polyamines) and others as well as enantiomers is presented.

**Keyphrases** : high-performance liquid chromatography, derivatization reactions, carboxylic compounds, carbonyl compounds, hydroxy compounds, thiols, amines, enantiomers (Ref 177)

高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography, HPLC) は，1969年，J. J. Kirkland により開発された。HPLC はガスクロマトグラフィーに比べ，試料の不揮発性や熱不安定性といった条件の制約を受けることがないため，カルボキシル基，カルボニル基，水酸基，アミノ基などを有する様々な極性化合物の測定にその応用範囲を急速に広げ，今日では pH メーターに近い一般性を持って各実験室，研究室に普及するに到った。

a) 岐阜薬科大学薬品分析化学教室

岐阜市三田洞東5丁目6-1

a) Department of Pharmaceutical Analytical Chemistry,

Gifu Pharmaceutical University,

6-1, Mitahora-higashi 5 chome, Gifu 502

Received February 4, 1991

The Annual Proceedings of Gifu

Pharmaceutical University,

ISSN 0434-009, CODFN : GYDYA 9

しかし、HPLC がいかに優れた分離測定手段だとはいっても、どんな試料でもそのまま分離管に注入できるわけではない。試料の clean-up 操作と並んで、測定の特異性や分析感度を高めるなどの目的で誘導体化操作を必要とする場合が意外と多く、様々な誘導体化反応が研究報告されている。そして誘導体化反応の選択が適切であるかどうかによって、測定の成否が分かれることも珍しくない。そこで本総説では、従来開発されてきた多数の誘導体化反応を官能基別に分類整理し、また活用に便利なように適当な解説を加えた。誘導体化反応に関する報告はきわめて多く、制限枚数の関係でその全てを紹介することは不可能である。本総説では重要と思われるものに限定し、かつ文献は代表的なものを選んで引用した。既にいくつかの総説<sup>1-4)</sup>があるので、それらも参考にされたい。

### 1. カルボキシル基の誘導体化反応

カルボキシル基の誘導体化反応は大別して、アルキル化剤、ジアゾアルカン類、アミノ化合物及びアルコール類に分類することができる。

#### 1-1 アルキル化剤

$\alpha$ -Bromoacetophenone<sup>5)</sup>(phenacyl bromide, **1a**), *p*-bromophenacyl bromide<sup>6)</sup>, *p*-phenylphenacyl bromide, *p*-(9-anthroyloxy)-phenacyl bromide<sup>7)</sup>(panacyl bromide, **2a**), 1-bromoacetylpyrene<sup>8)</sup>(**3a**), *N*-(9-acridinyl)-bromoacetamide<sup>9)</sup>(**4a**)などが報告されており、何れもプレラベル化剤として、弱アルカリ性条件下で使用される。誘導体化反応には無水条件が望ましいが、数%の水分が含まれていてもエステル化反応は進行する。**2a**は有機リン化合物のエステル化にも利用されている<sup>10)</sup>。4'-Bromophenacyl trifluoromethane sulfonate<sup>11)</sup>(**1b**)が最近報告された。ECD(電気化学検出)用誘導体化剤として 3-bromoacetyl-1,1'-dimethylferrocene<sup>12)</sup>(**5a**), 1-(2,5-dihydroxyphenyl)-2-bromoethanone<sup>13)</sup>が知られているが、**5a**は0.5pmolのカルボン酸の検出が可能といわれる。同じく脱離基として活性ハロゲンをも有するクマリンを母核とするアルキル化剤としては、4-bromomethyl-7-methoxycoumarin<sup>14)</sup>(Br-Mmc), 4-bromomethyl-7-acetoxycoumarin<sup>15)</sup>(**6a**), 4-bromomethyl-6,7-dimethoxycoumarin<sup>16)</sup>(Br-Mdmc), 4-bromomethyl-6,7-methylenedioxcoumarin<sup>17)</sup>(Br-Mdc)などが報告されている。Br-MmcはHPLCに登場した最初の蛍光ラベル化剤であるといわれ、ウラシル等の酸性プロトンのラベル化にも利用されている<sup>18)</sup>。**6a**による誘導体化は、HPLCで分離後、加水分解することによって、カルボン酸の構造の違いによる蛍光強度の差を統一できるという利点がある。クマリン以外を母核とするものには、3-bromomethyl-6,7-dimethoxy-1-methyl-2(1*H*)-quinoxalinone<sup>19)</sup>(Br-DMEQ, **7a**), 3-bromomethyl-6,7-methylenedioxy-1-methyl-2(1*H*)-quinoxalinone<sup>20)</sup>(Br-MMEQ), 9-bromomethylacridine<sup>21)</sup>(9-Br-Ma, **4b**), 9-bromomethylanthracene<sup>22)</sup>などがある。Br-DMEQ(**7a**)はBr-Mmcに比べ100倍の高感度蛍光検出(370→450nm)が可能といわれる。フタルイミド系としては4-nitro-*N*-chloromethylphthalimide<sup>23)</sup>(NCMPI, **8a**), 2-(phthalimino)-ethyl-*p*-toluene sulfonate<sup>24)</sup>(TsO-PE, **8b**), 2-(phthalimino) ethyl trifluoromethane sulfonate<sup>25)</sup>(**8c**), 2-(2,3-naphthalimino)ethyl trifluoromethane sulfonate<sup>26)</sup>が報告されている。最後の2つの試薬は**1b**と類似しており、エステル化反応は容易に進行する。TsO-PE(**8b**)と類似構造の試薬としては、*p*-nitrobenzyl-及び3,5-dinitrobenzyl-*p*-toluene sulfonateがあり、**8b**より反応性が良い。

#### 1-2 ジアゾアルカン類

9-Anthranyldiazomethane<sup>27-29)</sup>はADAMの愛称で広く脂肪酸の蛍光ラベル化剤(365→412nm)として利用さ

れているが、低級脂肪酸の ADAM 誘導体の HPLC ピークが ADAM の分解物に基因するブランクピークと重なるため低級脂肪酸のラベル化には難点がある。これに対して、1-pyrenyldiazomethane<sup>30-31)</sup> (PDAM, **3b**) は、ADAM に比べ試薬の安定性も良く、蛍光強度も 4~5 倍と大きく、優れている。3-(9-Anthryl) diazo-2-propane<sup>32)</sup> (**2b**) は有機リン酸基の誘導体化に利用されている。

### 1-3 アミノ化合物

アミノ化合物の代表例として 9-aminophenanthrene<sup>33)</sup> (9AP) が上げられるが、アミノ化合物をラベル化剤として利用するときは、次項のアルコール類と同じく対応化合物のカルボキシル基を活性化する必要がある。9AP の例では thionyl chloride (SOCl<sub>2</sub>) でトリエチルアミン (TEA) 触媒下、酸クロリドに変えた後、9AP を作用させ、酸アミド(303→376nm)を生成させている、この反応は -10~-5°C の低温で収率よく進行する。2,4-Dimethoxyaniline<sup>34)</sup> によるアミド化には 1-ethyl-3(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDC) を、monodansyl cadaverine<sup>35)</sup> (**9a**) によるアミド化には diethyl phosphorocyanide を縮合剤として用いている。2-Nitrophenylhydrazine によるヒドラジド生成<sup>36)</sup> や ECD 用アミド化剤としての 2-ferrocenylethylamine<sup>37)</sup> (**5b**) も縮合剤として EDC が用いられる。その他のアミド化剤として、*p*-(5,6-methylenedioxy-2*H*-benzotriazol-2-yl)benzylamine<sup>38)</sup> (**10a**), 2-(*p*-aminomethylphenyl)-*N,N*-dimethyl-2*H*-benzotriazolyl-5-amine<sup>39)</sup> (**10b**) がある。カルボキシル基を含む光学異性体を分離する目的で各種のキラルな誘導体化試薬も開発されている。アミノ酸誘導体としては、L-leucineamide<sup>40)</sup> (**11**), L-alanine- $\alpha$ -naphthylamide<sup>41)</sup>。エチルアミン誘導体としては、S(-)-1-(naphthen-1-yl)ethylamine<sup>42)</sup> (**12**), S(-)-1-(1-anthryl)ethylamine<sup>43)</sup>, S(-)-2-[4-(1-aminoethyl)naphthyl]-6-methoxy-*N*-methyl-2*H*-benzotriazolyl-5-amine<sup>44)</sup> (**13**) などが報告されている。ジアミノ系試薬の例では 9,10-diaminophenanthrene<sup>45)</sup> があり、フェナンスルイミダゾール (367→382nm) を生成する。この生成物は Br-Mmc の 12 倍の蛍光強度を示すという。Phenylenediamine は水溶液中でギ酸と反応する<sup>46)</sup>。

### 1-4 アルコール類

アルコール類の例として 9-hydroxymethylanthracene<sup>47)</sup> があり、縮合剤として 2-bromo-1-methylpyridinium iodide が用いられている。Benzylalcohol<sup>48)</sup> によるエステル化の例もある。

### 1-5 その他

その他のカルボキシル基の誘導体化試薬としては、*o*-(*p*-nitrobenzyl)-*N,N*-(diisopropyl)-isourea<sup>49)</sup> (**14**) がある。

## 2. カルボニル基の誘導体化

### 2-1 ヒドラジン類

カルボニル基の誘導体化試薬として、ヒドラジン類が最も一般的である。Phenylhydrazine<sup>50)</sup>, 2,4-dinitrophenylhydrazine<sup>51-52)</sup>, dabsylhydrazine<sup>53)</sup> (**15**), dansylhydrazine<sup>54-55)</sup> (**9b**), 7-hydrazino-4-nitrobenzo-2,1,3-oxadiazole<sup>56,57)</sup> (**16a**), anthracene-2-carboxylic acid hydrazide<sup>58)</sup> (**2c**) などが知られているが、**9b**, **16a**, **2c** は何れも蛍光ラベル化剤として有望である。なお、ヒドラジン類はアセチルアセトンのような  $\beta$ -ジケトンと反応してピラゾール環を容易に生成する。この反応は脂質過酸化の 1 つの指標とみられるマロンジアルデヒド (MDA) の誘

誘導体化に利用され、例えば 2,4-dinitrophenylhydrazine<sup>59)</sup> は MDA と反応して 1-(2,4-ジニトロフェニル)ピラゾール (17) を生成する。

## 2-2 その他

アルコキシルアミンとして *o*-(2-anthrylmethyl)hydroxylamine<sup>58)</sup> (2d) が知られており、検出限界は 20fmol といわれる。ホルムアルデヒドやアセトンのように対称性のカルボニル化合物でない場合、オキシム誘導体は一般に *syn*-, *anti*-異性体に基づく 2 本のピークを与えるのが欠点である。2-Diphenylacetyl-1,3-indandione-1-hydrazone<sup>60)</sup> (18) や benzamidine<sup>61)</sup> (1c) はコルチゾンなどのケトステロイドの誘導体化反応に用いられている。1c はアスコルビン酸にも応用されている<sup>62)</sup>。

## 2-3 アルデヒドの誘導体化

カルボニル基対象の一般的ラベル化剤の他にアルデヒドの誘導体化試薬としては、ルチジン反応を利用した acetylacetone<sup>63)</sup> や 1,3-cyclohexanedione<sup>64)</sup> があるが、その他に methylbenzothiazolone hydrozone<sup>65)</sup> (19) によるホルムアルデヒドの誘導体化が知られている。芳香族アルデヒドに選択的な試薬として *o*-aminobenzenethiol<sup>66)</sup> が報告されているが、2,2'-dithiobis (1-aminonaphthalene)<sup>67,68)</sup> (DTAN, 20) は *o*-aminobenzenethiol よりはるかに緩和な条件で反応し、生成物の蛍光強度も強い。フェニレンジアミン類の芳香族アルデヒドのラベル化剤としては 1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene<sup>69)</sup> (DDB), 1,2-diamino-4,5-methylenedioxybenzene<sup>70)</sup> (DMB), 1,2-diamino-4,5-ethylenedioxybenzene<sup>71)</sup> (DEB, 21), 1,2-diamino-4,5-dimethylbenzene<sup>72)</sup>, 1,2-diaminonaphthalene<sup>73)</sup> (DN) などが開発報告されている。この内、DDB<sup>74)</sup>, DN<sup>73)</sup> はフェニルアセトアルデヒドのような芳香族性脂肪族アルデヒドとも反応する。DEB は芳香族アルデヒド、特にフェノール基を共有するものと反応して最も強い蛍光性誘導体を生成する。この蛍光性誘導体化反応を活用する目的でフェノール性化合物を強アルカリ性下クロロホルムを作用させて (Reimer-Tiemann 反応) グアヤコール核に変えた後、DDB で誘導体化する方法<sup>75)</sup> は有用である。

## 2-4 $\alpha$ -ケト酸の誘導体化

各種  $\alpha$ -ケト酸は生体成分として重要なものが多い。誘導体化試薬としては、4'-hydrazino-2-stilbazole<sup>76)</sup> (4H2S, 22), 2,4-dinitrophenylhydrazine<sup>77)</sup> が使われているが、 $\alpha$ -ケト酸特有のラベル化剤としては、*o*-phenylenediamine<sup>78,79)</sup> (OPD) に代表される *o*-ジアミン系試薬が注目される。この系統の試薬として、1,2-diaminonaphthalene<sup>73)</sup>, 2,3-diaminonaphthalene<sup>80)</sup>, DDB<sup>81)</sup>, DMB<sup>82)</sup> (前項 2-3 参照) などがある。D-乳酸を乳酸脱水素酵素でピルビン酸に変えた後、OPD で誘導体化する<sup>83)</sup> のは 1 つの工夫である。DMB による誘導体化は OPD 誘導体化に比べ 150 倍の蛍光強度を有するといわれ<sup>82)</sup>, グリオキサールともよく反応する<sup>84)</sup>。コルチゾンのような 21-ヒドロキシコルチコステロイド類を  $\text{Cu}^{2+}$  で酸化して  $\alpha$ -ケトアルデヒドに変えて DMB を作用させる報告<sup>85)</sup> もある。なお、 $\alpha$ -ケト酸との反応条件は、一般に芳香族アルデヒドに対するより苛酷であり、強酸性下、OPD は 100°C, 30分, DDB は 100°C, 2時間, DMB は 100°C, 50分の反応条件を必要とする。

## 3. 水酸基の誘導体化

### 3-1 酸クロリド

UV ラベル化剤には benzoyl chloride<sup>86)</sup>，*p*-nitrobenzoyl chloride<sup>87)</sup> が用いられている。蛍光ラベル化剤としては，dansyl chloride<sup>88)</sup>，2-(5-chlorocarbonyl-2-oxazolyl)-5,6-methylenedioxybenzofuran<sup>89)</sup> (**23**)，anthracene-9-carbonyl chloride<sup>90)</sup> がある。**23**は fmol の測定が可能であるという。

### 3-2 カルボニルニトリル

1-Anthroyl nitrile<sup>91,92)</sup> (**2e**) は胆汁酸に応用されている。Pyrene-1-carbonyl nitrile<sup>93)</sup> (**3c**) は第1，第2水酸基と定量的に反応し，数 fmol の検出感度を有するという。最近，軸性不斉誘導体化剤 2-methyl-1,1'-binaphthalene-2'-carbonyl cyanide<sup>94)</sup> (**24**) が開発され，水酸基を含む光学異性体化合物の *dI* 分離に用いられている。

### 3-3 カルボニルアジド

カルボニルアジド系試薬は，水酸基と反応してウレタン誘導体を生成する。3,4-Dihydro-6,7-dimethoxy-4-methyl-3-oxoquinoxaline-2-carbonyl azide<sup>95,96)</sup> (**7b**) は第1，第3，第3アルコールと反応し，7-デヒドロコレステロールに用いられている。ヒドロキシカルボン酸やフェノールとは反応しない。7-Methoxycoumarin-3-carbonyl azide<sup>97)</sup>，anthracene-1-carbonyl azide<sup>98)</sup>，pyrene-1-carbonyl azide<sup>99)</sup> などが知られており，ECD に高感度の試薬としては ferrocenonyl azide<sup>100)</sup> があり，フェロセン誘導体は容易に酸化されるため，フェノール，カテコールアミンなどの共存下でも選択的検出が可能といわれる。

### 3-4 その他

その他の誘導体化試薬として，酸無水物<sup>101)</sup> と phenylisocyanate<sup>102)</sup> を上げておきたい。

### 3-5 フェノールの誘導体化

4-Aminoantipyrine<sup>103)</sup> は古くより知られる反応を利用したものだが，1-(dichloro-1,3,5-triazinyl)-2-methyl-isoindole<sup>104)</sup> (**25**) や 1-(ethylthio)-3-(difluoro-1,3,5-triazinyl)-2-*n*-propylisoindole<sup>105)</sup> が開発され，エストロジェン類に応用されている。

### 3-6 カテコール核の誘導体化

カテコール化合物に選択的な誘導体化剤として *meso*-1,2-diphenylethylenediamine<sup>106,107)</sup> が開発され注目されたが，生成物の構造は解明されていない。その後，*meso*-1,2-bis(4-methoxyphenyl) ethylenediamine<sup>108)</sup> が開発され，尿，血漿中のカテコールアミン類の定量に用いられた。

## 4. チオールの誘導体化

### 4-1 マレイミド類

マレイミドはチオールと緩やかな条件で反応するので，*N*-[4-(2-phthalimidyl)phenyl]maleimide<sup>109)</sup> (**26**)，*N*-[4-(6-dimethylamino-2-benzofuranyl) phenyl] maleimide<sup>110)</sup> (**27**)，*N*-(7-dimethylamino-4-methyl-3-coumarinyl)-maleimide<sup>111)</sup> (**28**)，pyrene-1-maleimide<sup>112)</sup> などが開発されている。シスチンもチオールに還元すれば誘導体化が可能である<sup>110)</sup>。ECD 用ラベル化剤としては，*N*-(ferrocenyl)-maleimide<sup>113)</sup> なども開発されている。

#### 4-2 ベンゾキサジアゾール類

この系統のラベル化剤は、7-fluoro-4-sulfamoyl-2,1,3-benzoxadiazole<sup>114)</sup> (**16b**), ammonium 4-chloro-7-sulfobenzofurazan<sup>115)</sup>, 4-(fluorosulfonyl)-7-phenoxy-2,1,3-benzoxadiazole<sup>116)</sup> などが知られている。

#### 4-3 その他

Bromobimane<sup>117)</sup> (**29**) はチオール基のラベル化剤として開発され、10pmol の蛍光検出が可能である。2-Nitro-5-thiosulfobenzoate<sup>118)</sup> (**30**) は吸光ラベル化剤であり、3,5-di-*tert*-butyl-1,2-benzoquinone<sup>119)</sup> は ECD に高感度な生成物を与える。*N*-Chlorodansylamide<sup>120)</sup> はポストラベル法として用いられて興味深い。

### 5. アミノ基の誘導体化

#### 5-1 ニンヒドリン

吸光ラベル化剤としてアミノ酸<sup>121)</sup> やポリアミン<sup>122)</sup> などに用いられたが、最近の報告には余り登場しない。

#### 5-2 スルホン酸クロリド

Dansyl chloride (DSN-Cl) は最も早く開発されたアミノ基の蛍光ラベル化剤の一つであり、アミノ酸<sup>123)</sup>, イミノ酸<sup>124)</sup>, ポリアミン<sup>125)</sup> などに広く利用されてきたが、試薬及びその分解物も蛍光を有するためもっぱらプレラベル法で用いられる。また、試薬は湿度に不安定で分解し易い欠点がある。その他のスルホン酸クロリドとして, tosyl chloride<sup>126)</sup> (*p*-toluenesulfonyl chloride) は安価で安定で、取り扱い易い。反応もアルカリ性条件下で容易に進行する。2-Naphthalenesulfonyl chloride も同様に反応し<sup>127)</sup>, アミノ基を含む抗生物質ネオマイシンに応用されている。4-Dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride (dabsyl chloride) も同様にアミノ酸<sup>128)</sup> やポリアミン<sup>129)</sup> に用いられている。4-(*N*-Phthalimidyl) benzenesulfonyl chloride<sup>130)</sup> (**31**) はアミノ酸と50°C, 15分で反応し, DNS 誘導体の3倍以上の蛍光強度を示すという。

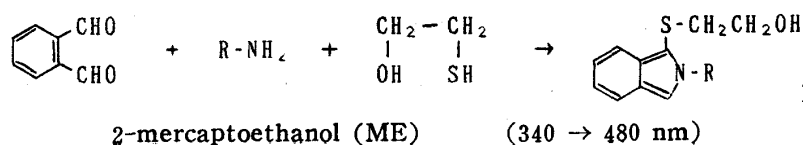
#### 5-3 フルオレスサミン

Fluorescamine (**32**) は pH8-9 で第1アミンとのみ反応することからカテコールアミン<sup>131)</sup>, ポリアミン<sup>132)</sup>, その他の第1アミン<sup>133)</sup> の誘導体化に用いられている。第2アミンとの反応も考案されている<sup>134)</sup>。32自体もその分解物も無蛍光性であるため、プレラベル化、ポストラベル化共に可能であり、反応も室温で容易に進行する有用なラベル化剤であるが高価なことが欠点である。

#### 5-4 オルトフタルジアルデヒド

今日、最も広く用いられているアミンの蛍光ラベル化剤は *o*-phthaldialdehyde (OPA) である。この試薬はチオール (一般に 2-mercaptoethanol, ME) の共存下, アミンと次のように反応する。

アミノ酸<sup>135-137)</sup>, カテコールアミン<sup>138)</sup>, ポリアミン<sup>139)</sup> などに広く用いられ, 生成物は ECD にも鋭敏である。



OPA は試薬自体無蛍光性であり，プレラベル化，ポストラベル化の両方が可能であり，かつ安価で，反応は2—3分で完了する。しかも誘導体化反応は水溶液中で進行するなどの優れた利点を有している。蛍光強度は fluorescamine に劣らず，ninhydrin の100倍である。但し第1アミンとのみ反応するので，アミノ酸ではプロリンとは反応せず，ペプチドの発蛍光は著しく低く，システインは弱い。グリシン，リジンとの反応生成物は不安定である。ペプチドもときには fluorescamine の10倍の感度を示すことがあるが，おそらくリジン残基との反応に起因するものと考えられている<sup>140)</sup>。縮合付加剤として ME の代わりに 3-mercaptopropionic acid を用いると生成誘導体はより安定であるといわれる<sup>141)</sup>。また，*N*-acetyl-L-cysteine を用いると，アミノ酸の *dl* 分離が可能となる<sup>142,143)</sup>。OPA で第2アミンを測定する方法も工夫されている<sup>144)</sup>。Naphthalene-2,3-dicarboxylaldehyde は CN<sup>-</sup> を縮合付加剤として OPA と同様に反応し，OPA より安定で高感度の誘導体を与える<sup>145,146)</sup>。3-(2-Furoyl)-quinoline-2-carbaldehyde<sup>147)</sup> (33) も OPA と同様に反応し，fmol レベルの第1アミンを検出できる。

#### 5-5 クロロホルメート

Fluorescamine (32) や OPA が第1アミンとのみ反応するのに対して，9-fluorenylmethyl chloroformate (34a) は第1，第2アミンと反応し安定した誘導体を与える。アミノ酸<sup>148)</sup> やポリアミン<sup>149)</sup> などのラベル化に用いられている。しかし，試薬自体が蛍光性であるため，ペンタンで過剰の 34a を除去することが望ましい。第1アミンを OPA でラベル化した後，第2アミンを 34a でラベル化することも可能である<sup>150)</sup>。S (+)-1-(9-Fluorenyl) ethyl chloroformate<sup>151)</sup> (34b) はアミノ酸の *dl* 分離に開発された。Benzyl chloroformate<sup>152)</sup> も同様に反応する。

#### 5-6 ベンゾキサジアゾール

4-Chloro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole<sup>153)</sup> (NBD-Cl, 16c) は第2アミンとよく反応するが，第1アミンとの反応性は低いといわれる。4-Fluoro-7-nitrobenzo-2-oxa-1,3-diazole<sup>154)</sup> (NBD-F) は NBD-Cl (16c) より10倍の反応性を示し，アミノ基，イミノ基共に反応する。

#### 5-7 カルボン酸クロリド

3,4-Dihydro-6,7-dimethoxy-4-methyl-3-oxoquinoxaline-2-carbonyl chloride<sup>155)</sup> (7c)，類似構造の 7-methoxycoumarin-3-carbonyl fluoride<sup>156)</sup> (6b) などは塩基 (TEA) を触媒にして第1アミンとよく反応する。3-(7-Methoxycoumarin-3-carbonyl)-2-oxazolone<sup>157)</sup> (35) は第1アミン，第2アミンと反応するが 6b よりやや反応性が劣る。benzoyl chloride を用いた報告もある<sup>158)</sup>。S (-)-*N*-1-(2-Naphthylsulfonyl)-2-pyrrolidine-carbonyl chloride<sup>159)</sup> (36) は *dl* 分離に用いられている。

#### 5-8 フルオロベンゼン

1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene<sup>160)</sup> は古くから知られたアミンのラベル化剤であるが，*N,N*-diethyl-2,4-dinitro-5-fluoroaniline<sup>161)</sup> (37) や 3-(4,6-difluorotriazinyl) amino-7-methoxycoumarin<sup>162)</sup> (38) も同様に反応する。

#### 5-9 イソシアネート

Phenylisothiocyanate<sup>163)</sup> はアミノ酸<sup>164)</sup> と反応してチオヒダントインを生成するが，第1アミン<sup>165)</sup> とはチオ尿素誘導体を生成する。3-Ethylphenylisocyanate<sup>166)</sup> や 1-naphthylisocyanate<sup>167)</sup> のようなイソシアネートは同様

に尿素誘導体を生成する。Ferrocenylisothiocyanate<sup>168)</sup>はECDに高感度なプレラベル化剤として50fmolの $\gamma$ -アミノ酪酸の検出が可能である。S(-)Phenylethylisocyanate<sup>169)</sup>(1d)はイミノ基を含むメトプロロールのdl分離用に開発された。

#### 5-10 カルバメート

Succinimido- $\alpha$ -naphthylcarbamate<sup>170)</sup>(39)はアミノ酸と室温で容易に反応して蛍光性尿素誘導体を生成する。検出感度は数pmolといわれる。

#### 5-11 その他

$\beta$ -Naphthoquinone-4-sulfonate<sup>171)</sup>は第1,第2アミンと反応し,1-phenylsulfonyl-3,3,3-trifluoropropene<sup>172)</sup>(40)はポリアミン類の測定に利用されている。

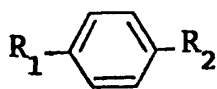
### 6. その他

9,10-Phenanthraquinone<sup>173)</sup>(PQ, 41)とPQ sulfonate<sup>174)</sup>(PQS)はグアニジド基と反応して閉環する。PQは水に溶けないので、プレラベル法として、PQSは水に溶けるのでポストラベル法として利用できる。Bromoacetaldehyde<sup>175)</sup>はアデニンヌクレオチドのプレ、ポスト蛍光ラベル化剤として開発された。4-(1-Pyrenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dione<sup>176)</sup>(42)は7-デヒドロコレステロールの特異的な蛍光誘導体化剤であり、2.4pmolの検出が可能である。

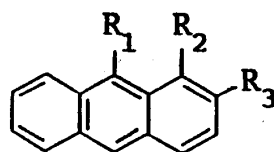
### 7. 光学異性体の分離用ラベル化剤

光学対掌体のHPLC分離法の開発は精力的に進められているが、大別してキラル誘導体化法、キラル移動相法、キラル固定相法の3つの流れがある。キラル誘導体化法は、dl体と光学活性試薬を反応させてジアステレオマーを生成させ、一般カラムで分離する方法である。本総説の中でも既に11, 12, 13を用いたdl-カルボン酸類の分離, 24を用いたdl-アルコール類の分離, 34bを用いたdl-アミノ酸の分離などの例を紹介したが、二村氏の総説<sup>177)</sup>をぜひ参照されたい。

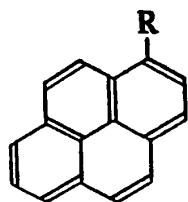




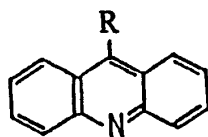
- 1a:  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{COCH}_2\text{Br}$   
 1b:  $R_1 = \text{Br}$ ,  $R_2 = \text{COCH}_2\text{OSO}_2\text{CF}_3$   
 1c:  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{C}(\text{NH}_2)=\text{NH}$   
 1d:  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{CH}(\text{CH}_3)\text{NCO}$



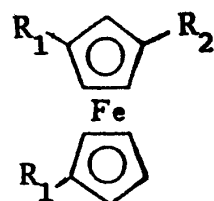
- 2a:  $R_1 = \text{COO}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{COCH}_2\text{Br}$ ,  $R_2 = R_3 = \text{H}$   
 2b:  $R_1 = \text{CH}=\text{CH}-\text{CHN}_2$ ,  $R_2 = R_3 = \text{H}$   
 2c:  $R_1 = R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{CONHNH}_2$   
 2d:  $R_1 = R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{CH}_3\text{ONH}_2$   
 2e:  $R_1 = R_3 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{COCN}$



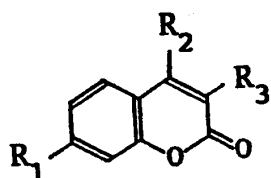
- 3a:  $R = \text{COCH}_2\text{Br}$   
 3b:  $R = \text{CHN}_2$   
 3c:  $R = \text{COCN}$



- 4a:  $R = \text{NHCOCH}_2\text{Br}$   
 4b:  $R = \text{CH}_2\text{Br}$



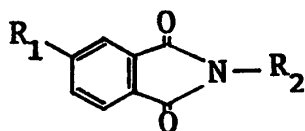
- 5a:  $R_1 = \text{CH}_3$ ,  $R_2 = \text{COCH}_2\text{Br}$   
 5b:  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$



- 6a:  $R_1 = \text{CH}_3\text{COO}$ ,  $R_2 = \text{CH}_2\text{Br}$ ,  $R_3 = \text{H}$   
 6b:  $R_1 = \text{CH}_3\text{O}$ ,  $R_2 = \text{H}$ ,  $R_3 = \text{COF}$



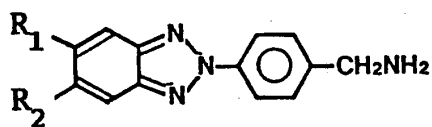
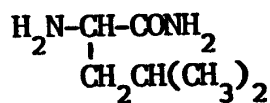
- 7a:  $R = \text{CH}_2\text{Br}$   
 7b:  $R = \text{CON}_3$   
 7c:  $R = \text{COCl}$



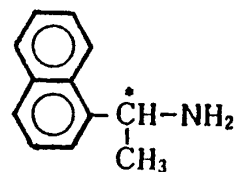
- 8a:  $R_1 = \text{NO}_2$ ,  $R_2 = \text{CH}_2\text{Cl}$   
 8b:  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OSO}_2-\text{C}_6\text{H}_4-\text{CH}_3$   
 8c:  $R_1 = \text{H}$ ,  $R_2 = \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OSO}_2\text{CF}_3$



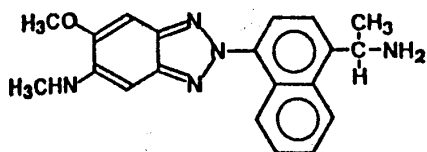
- 9a:  $R = \text{NH}(\text{CH}_2)_5\text{NH}_2$   
 9b:  $R = \text{NHNH}_2$

10a:  $R_1 + R_2 = \text{OCH}_2\text{O}$ 10b:  $R_1 = \text{H}, R_2 = \text{N}(\text{CH}_3)_2$ 

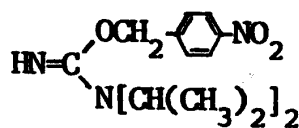
11



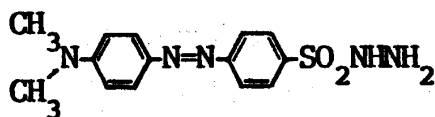
12



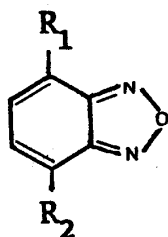
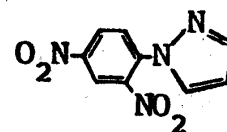
13



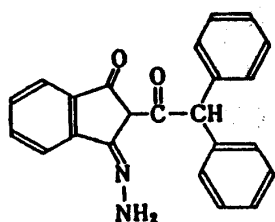
14



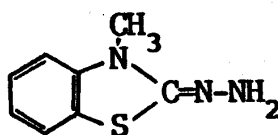
15

16a:  $R_1 = \text{NHNH}_2, R_2 = \text{NO}_2$ 16b:  $R_1 = \text{F}, R_2 = \text{SO}_2\text{NH}_2$ 16c:  $R_1 = \text{Cl}, R_2 = \text{NO}_2$ 

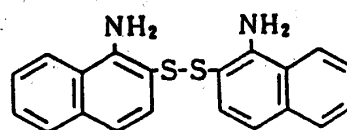
17



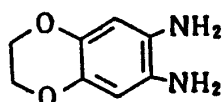
18



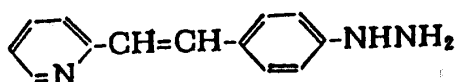
19



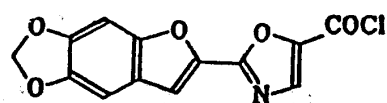
20



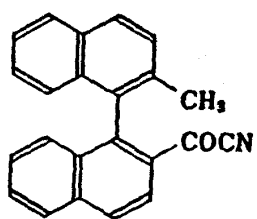
21



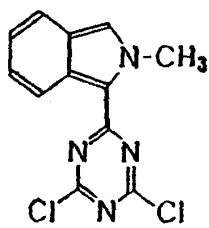
22



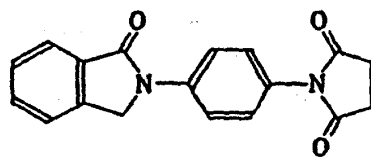
23



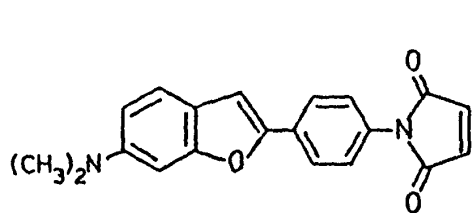
24



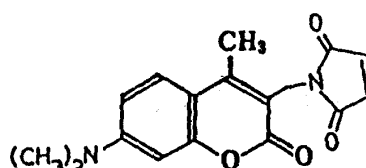
25



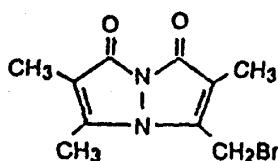
26



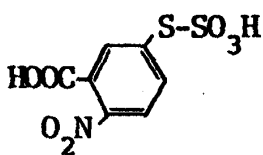
27



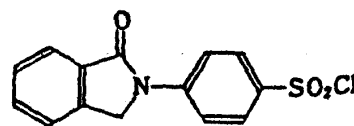
28



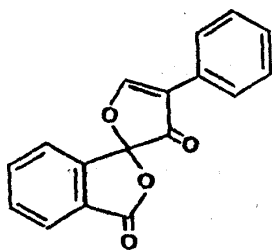
29



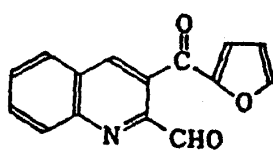
30



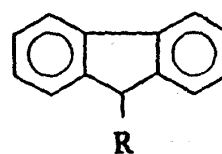
31



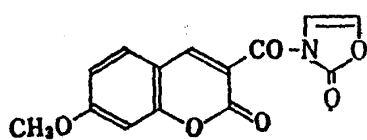
32



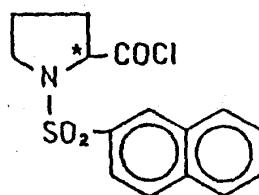
33



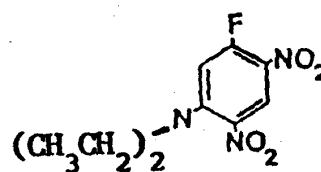
34a: R= CH<sub>2</sub>OCOC1  
34b: R= CH(CH<sub>3</sub>)OCOC1



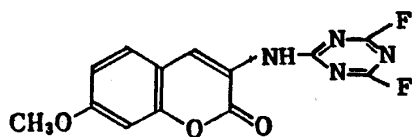
35



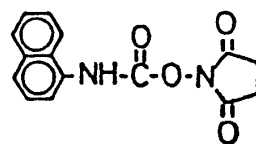
36



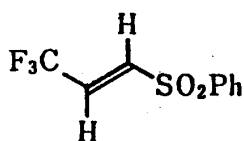
37



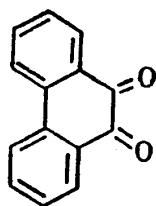
38



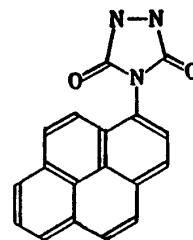
39



40



41



42

## 引用文献

- 1) 鈴木義仁, *ぶんせき*, **1987**, 100.
- 2) N. D. Danielson, M. A. Targove, and B. E. Miller, *J. Chromatogr. Sci.*, **26**, 362, (1988).
- 3) Y. Ohkura, *Anal. Sic.*, **5**, 371 (1989).
- 4) 後藤順一, *ぶんせき*, **1990**, 888.
- 5) T. Hanis, M. Smrz, P. Klir, K. Macek, J. Klima, T. Base, and Z. Deyl, *J. Chromatogr.*, **452**, 443 (1988).
- 6) H. G. Dean, J. C. Bonser, and J. P. Gent, *Clin. Chem.*, **35**, 1945 (1989).
- 7) W. Engels, M. A. F. Kamps, P. J. M. R. Lemmens, G. J. van der Vusse, and R. S. Reneman, *J. Chromatogr.*, **427**, 209 (1988).
- 8) S. Ikawa, M. Miyake, T. Mura, and M. Ikeguchi, *J. Chromatogr.*, **400**, 149 (1987).
- 9) S. Allenmark, M. Chelminska-Bertilsson, and R. A. Thompson, *Anal. Biochem.*, **185**, 279 (1990).
- 10) M. C. Roach, L. W. Ungar, R. N. Zare, L. M. Reimer, D. L. Pompliano, and J. W. Frost, *Anal. Chem.*, **59**, 1056 (1987).
- 11) P. E. Minkler, S. T. Ingalls, and C. L. Hoppel, *Anal. Biochem.*, **186**, 29 (1990).
- 12) K. Shimada, C. Sakayori, and T. Nambara, *J. Liq. Chromatogr.*, **10**, 2177 (1987).
- 13) R. K. Munns, J. E. Roybal, W. Shimoda, and J. A. Hurlbut, *J. Chromatogr.*, **442**, 209 (1988).
- 14) J. H. Wolf and J. Korf, *J. Chromatogr.*, **502**, 423 (1990).
- 15) H. Tsuchiya, T. Hayashi, M. Sato, M. Tatsumi, and N. Takagi, *J. Chromatogr.*, **309**, 43 (1984).
- 16) S. Yoshida, T. Adachi, and S. Hirose, *J. Chromatogr.*, **430**, 156 (1988).
- 17) H. Naganuma and Y. Kawahara, *J. Chromatogr.*, **530**, 387 (1990).
- 18) H. C. Michaelis, H. Foth, and G. F. Kahl, *J. Chromatogr.*, **416**, 176 (1987).
- 19) M. Yamaguchi, O. Takehiro, J. Ishida, and M. Nakamura, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 2846 (1989).

- 20) M. Yamaguchi, S. Hara, Y. Takemori, and M. Nakamura, *Anal. Sci.*, **5**, 35 (1989).
- 21) F. A. L. van der Horst, M. H. Post, J. J. M. Holthuis, and U. A. Th. Brinkman, *J. Chromatogr.*, **500**, 443 (1990).
- 22) I. Braunmiller and K. Ballschmiter, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **333**, 764 (1989).
- 23) T. Iida, T. Shinohara, T. Momose, F. C. Chang, J. Goto, and T. Nambara, *J. Chromatogr.*, **438**, 423 (1988).
- 24) K. Funazo, M. Tanaka, Y. Yasaka, H. Takigawa, and T. Shono, *J. Chromatogr.*, **481**, 211 (1989).
- 25) Y. Yasaka, M. Tanaka, T. Matsumoto, J. Katakawa, T. Tetsumi, and T. Shono, *Anal. Sci.*, **6**, 49 (1990).
- 26) Y. Yasaka, M. Tanaka, T. Shono, T. Tetsumi, and Katakawa, *J. Chromatogr.*, **508**, 133 (1990).
- 27) N. Nimura and T. Kinoshita, *Anal. Lett.*, **13**, 191 (1980).
- 28) 清水一広, 長瀬英生, 荒木宏昌, *薬学雑誌*, **109**, 163 (1989).
- 29) G. Kargas, T. Rudy, T. Spennetta, K. Takayama, N. Querishi, and E. Shrago, *J. Chromatogr.*, **526**, 331 (1990).
- 30) N. Nimura, T. Kinoshita, T. Yoshida, A. Uetake, and C. Nakai, *Anal. Chem.*, **60**, 2067 (1988).
- 31) T. Yoshida, A. Uetake, C. Nakai, N. Nimura, and T. Kinoshita, *J. Chromatogr.*, **456**, 421 (1988).
- 32) K. Yamada, S. Abe, K. Katayama, and T. Sato, *J. Chromatogr.*, **424**, 367 (1988).
- 33) M. Nakajima, A. Sato, and K. Shimada, *Anal. Sci.*, **4**, 385 (1988).
- 34) J. Knospe, D. Steinhilber, T. Herrmann, and H. J. Roth, *J. Chromatogr.*, **442**, 444 (1988).
- 35) Y. -M. Lee, H. Nakamura, and T. Nakajima, *Anal. Sci.*, **5**, 681 (1989).
- 36) H. Miwa, M. Yamamoto, T. Nishida, K. Nunoi, and M. Kikuchi, *J. Chromatogr.*, **416**, 237 (1987);  
H. Miwa, M. Yamamoto, and T. Asano, *Anal. Biochem.*, **185**, 17 (1990).
- 37) K. Shimada, F. Xie, T. Niwa, T. Wakasawa, and T. Nambara, *J. Chromatogr.*, **400**, 215 (1987).
- 38) S. Narita and T. Kitagawa, *Anal. Sci.*, **5**, 31 (1989).
- 39) S. Narita and T. Kitagawa, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 831 (1989).
- 40) H. Spahn, *J. Chromatogr.*, **423**, 334 (1987).
- 41) Y. Fujimoto, K. Ishii, H. Nishi, N. Tsumagari, T. Kakimoto, and R. Shimizu, *J. Chromatogr.*, **402**, 344 (1987).
- 42) A. J. Hutt, S. Fournel, and J. Caldwell, *J. Chromatogr.*, **378**, 409 (1986).
- 43) J. Goto, M. Ito, S. Katsuki, N. Saito, and T. Nambara, *J. Liq. Chromatogr.*, **9**, 683 (1986).
- 44) S. Narita and T. Kitagawa, *Anal. Sci.*, **5**, 361 (1989).
- 45) J. B. F. Lloyd, *J. Chromatogr.*, **189**, 359 (1980).
- 46) S. Ohmori, I. Sumii, Y. Toyonaga, K. Nakata, and M. Kawase, *J. Chromatogr.*, **426**, 15 (1988).
- 47) J. D. Baty, S. Pazouki, and J. Dolphin, *J. Chromatogr.*, **395**, 403 (1987).
- 48) W. W. Christie, K. Connor, R. C. Noble, H. Shand, and P. J. Wagstaffe, *J. Chromatogr.*, **390**, 444 (1987).
- 49) Z. L. Bandi and E. S. Reynolds, *J. Chromatogr.*, **329**, 57 (1985).

- 50) M. Petrarulo, S. Pellegrino, O. Bianco, M. Marangella, F. Linari, and E. Mentasti, *J. Chromatogr.*, **465**, 87 (1989).
- 51) E. Mentasti, M. Savigliano, M. Marangella, M. Petrarulo, and F. Linari, *J. Chromatogr.*, **417**, 253 (1987).
- 52) D. F. Smith, T. E. Kleindienst, and E. E. Hudgens, *J. Chromatogr.*, **483**, 431 (1989).
- 53) J.-K. Lin and S. -S. Wu, *Anal. Chem.*, **59**, 1320 (1987).
- 54) T. Kawasaki, M. Maeda, and A. Tsuji, *J. Chromatogr.*, **272**, 261 (1983).
- 55) W. Schmied, M. Przewosnik, and K. Bächmann, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **335**, 464 (1989).
- 56) H. Koizumi and Y. Suzuki, *J. Chromatogr.*, **457**, 299 (1988).
- 57) S. Uzu, S. Kanda, K. Imai, K. Nakashima, and S. Akiyama, *Analyst*, **115**, 1477 (1990).
- 58) J. Goto, Y. Saisho, and T. Nambara, *Anal. Sci.*, **5**, 399 (1989).
- 59) S. Kawai, K. Kasashima, and M. Tomita, *J. Chromatogr.*, **495**, 235 (1989).
- 60) M. A. Heindorf and V. L. McGuffin, *J. Chromatogr.*, **464**, 186 (1989).
- 61) H. E. van Ingen and E. Endert, *J. Chromatogr.* **430**, 233 (1988).
- 62) T. Seki, Y. Yamaguchi, K. Noguchi, and Y. Yanagihara, *J. Chromatogr.*, **385**, 287 (1987).
- 63) A. Okayama, *J. Chromatogr.*, **426**, 365 (1988) : W. R. Summers, *Anal. Chem.*, **62**, 1397 (1990).
- 64) M. Takayanagi, S. Goto, Y. Kokubo, M. Suzuki, and T. Yashiro, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 200 (1989).
- 65) G. Chiavari, M. C. Laghi, and G. Torsi, *J. Chromatogr.*, **475**, 343 (1989).
- 66) 宇野豊三, 谷口寛一, *分析化学*, **21**, 76 (1972).
- 67) Y. Ohkura, K. Ohtsubo, K. Zaitso, and K. Kohashi, *Anal. Chim. Acta*, **99**, 317 (1978).
- 68) H. Nohta, M. Yamaguchi, K. Zaitso, and Y. Ohkura, *J. Chromatogr.*, **233**, 324 (1982).
- 69) M. Nakamura, M. Toda, H. Saito, and Y. Ohkura, *Anal. Chim. Acta*, **134**, 39 (1982).
- 70) W. -F. Chao, M. Kai, J. Ishida, Y. Ohkura, S. Hara, and M. Yamaguchi, *Anal. Chim. Acta*, **215**, 259 (1988).
- 71) W. -F. Chao, M. Kai, and Y. Ohkura, *J. Chromatogr.*, **430**, 361 (1988).
- 72) M. Katayama, Y. Mukai, and H. Taniguchi, *Analyst*, **115**, 9 (1990).
- 73) K. Zaitru and Y. Ohkura, *Chem. Pharm. Bull.*, **23**, 1057 (1975).
- 74) J. Ishida, M. Yamaguchi, M. Kai, and Y. Ohkura, *J. Chromatogr.*, **305**, 381 (1984).
- 75) M. Kai, J. Ishida, and Y. Ohkura, *J. Chromatogr.*, **430**, 271 (1988).
- 76) T. Hirata, M. Kai, K. Kohashi, and Y. Ohkura, *J. Chromatogr.*, **226**, 25 (1981).
- 77) B. C. Hemming and C. J. Gubler, *Anal. Biochem.*, **92**, 31 (1979).
- 78) C. R. Krishnamurti and S. M. Janssens, *J. Liq. Chromatogr.*, **10**, 2265 (1987).
- 79) T. C. Smeaton, J. A. Owens, and J. S. Robinson, *J. Chromatogr.*, **487**, 434 (1989).
- 80) T. Hayashi, T. Sugiura, H. Terada, S. Kawai, and T. Ohno, *J. Chromatogr.*, **118**, 403 (1976).
- 81) S. Hara, Y. Takemori, M. Yamaguchi, M. Nakamura, and Y. Ohkura, *J. Chromatogr.*, **344**, 33 (1985).
- 82) T. Yoshitake, S. Hara, M. Yamaguchi, M. Nakamura, Y. Ohkura, and S. Görög, *J. Chromatogr.*,

- 489, 364 (1989).
- 83) S. Ohmori and T. Iwamoto, *J. Chromatogr.*, **431**, 239 (1988).
- 84) S. Hara, M. Yamaguchi, Y. Takemori, T. Yoshitake, and M. Nakamura, *Anal. Chim. Acta*, **251**, 267 (1988).
- 85) T. Yoshitake, S. Hara, M. Yamaguchi, M. Nakamura, Y. Ohkura, and S. Görög, *J. Chromatogr.*, **489**, 364 (1989).
- 86) B. Risch, R. Galensa, and K. Herrmann, *J. Chromatogr.*, **448**, 291 (1988).
- 87) 松本宏治郎, 加野象次郎, 入 久巳, 松尾宣武, *臨床化学*, **15**, 330 (1986).
- 88) C. de Ruiter, J. -H. W. Brinkman, R. W. Frei, H. Liugeman. U. A. Th. Brinkman, and P. van Zoonen, *Analyst*, **115**, 1033 (1990).
- 89) H. Nagaoka, H. Nohta, Y. Kaetsu, M. Saito, and Y. Ohkura, *Anal. Sci.*, **5**, 525 (1989).
- 90) M. A. J. Bayliss, R. B. Homer, and M. J. Shepherd, *J. Chromatogr.*, **445**, 393 (1988).
- 91) J. Goto, T. Chikai, and T. Nambara, *J. Chromatogr.*, **415**, 45 (1986).
- 92) J. Goto, G. Shao, H. Miura, and T. Nambara, *Anal. Sci.*, **5**, 19 (1989).
- 93) J. Goto, S. Komatsu, M. Inada, and T. Nambara, *Anal. Sci.*, **2**, 585 (1986).
- 94) J. Goto, N. Goto, G. Shao, M. Ito, A. Hongo, S. Nakamura, and T. Nambara, *Anal. Sci.*, **6**, 261 (1990).
- 95) T. Iwata, M. Yamaguchi, and M. Nakamura, *J. Chromatogr.*, **421**, 43 (1987).
- 96) T. Iwata, H. Hanazono, M. Yamaguchi, M. Nakamura, and Y. Ohkura, *Anal. Sci.*, **5**, 671 (1989).
- 97) A. Takadate, M. Irikura, T. Suehiro, H. Fujino, and S. Goya, *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, 1164 (1985).
- 98) 藤野博之, 飛高光治, 合屋周次郎, *薬学雑誌*, **109**, 606 (1989).
- 99) 藤野博之, 竹田光宏, 合屋周次郎, *薬学雑誌*, **110**, 457 (1990).
- 100) K. Shimada, C. Sakayori, and T. Nambara, *J. Liq. Chromatogr.*, **10**, 2177 (1987).
- 101) N. K. Karamanos, A. Hjerpe, T. Tsegenidis, B. Engfeldt, and C. A. Antonopoulos, *Anal. Biochem.*, **172**, 410 (1988).
- 102) 藤野博之, 江口充宏, 合屋周次郎, *薬学雑誌*, **110**, 155 (1990).
- 103) C. Y. Li, and M. W. Kemp, *J. Chromatogr.*, **455**, 241 (1988).
- 104) 藤野博之, 合屋周次郎, *薬学雑誌*, **108**, 665, 801 (1988).
- 105) H. Fujino and S. Goya, *Anal. Sci.*, **5**, 105 (1989).
- 106) H. Nohta, A. Mitsui, Y. Umegae, and Y. Ohkura, *Anal. Sci.*, **2**, 303 (1986).
- 107) H. Nohta, E. Yamaguchi, Y. Ohkura, and H. Watanabe, *J. Chromatogr.*, **493**, 15 (1989).
- 108) Y. Umegae, H. Nohta, M. Lee, and Y. Ohkura, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2293 (1990).
- 109) Y. Tsuruta, H. Tomida, and K. Kohashi, *Anal. Sci.*, **4**, 531 (1988).
- 110) K. Nakashima, C. Umekawa, H. Yoshida, S. Nakatsuji, and S. Akiyama, *J. Chromatogr.*, **414**, 11 (1987).
- 111) B. Kagedal, T. Andersson, M. Carlsson, T. Denneberg, and Hoppe, *J. Chromatogr.*, **417**, 261 (1987).

- 112) M. Johansson and D. Westerlund, *J. Chromatogr.*, **385**, 343 (1987).
- 113) K. Shimada, T. Oe, and T. Nambara, *J. Chromatogr.*, **419**, 17 (1987).
- 114) T. Toyo'oka and K. Imai, *Anal. Chem.*, **56**, 2461 (1984).
- 115) G. R. Rhodes, M. J. Rubenfield, and C. T. Garvie, *J. Chromatogr.*, **488**, 456 (1989).
- 116) T. Toyo'oka, T. Suzuki, Y. Saito, S. Uzu, and K. Imai, *Analyst*, **114**, 1233 (1989).
- 117) R. A. Maiorino, G. L. Weber, and H. V. Aposhian, *J. Chromatogr.*, **374**, 297 (1986).
- 118) J. C. Crawhall and D. Kalant, *Anal. Biochem.*, **172**, 479 (1988).
- 119) Y. Imai, S. Ito, and K. Fujita, *J. Chromatogr.*, **420**, 404 (1987).
- 120) K. Murayama and T. Kinoshita, *J. Chromatogr.*, **205**, 349 (1981).
- 121) J. D. Ford and J. R. Baker, *Anal. Biochem.*, **84**, 539 (1978).
- 122) C. W. Gehrke, K. C. Kuo, R. L. Ellis, and T. P. Waalkes, *J. Chromatogr.*, **143**, 345 (1977).
- 123) A. Negro, S. Garbisa, L. Gotte, and M. Spina, *Anal. Biochem.*, **160**, 39 (1987).
- 124) H. Tsuchiya, T. Hayashi, M. Tatsumi, T. Fukita, and N. Takagi, *J. Chromatogr.*, **339**, 59 (1985).
- 125) S. C. Minocha, R. Minocha, and C. A. Robie, *J. Chromatogr.*, **511**, 177 (1990).
- 126) S. Kawai, B. Uno, and M. Tomita, *J. Chromatogr.*, **540**, 411 (1991).
- 127) K. Tsuji and K. M. Jenkins, *J. Chromatogr.*, **369**, 105 (1986).
- 128) D. A. Malencik, Z. Zhao, and S. R. Anderson, *Anal. Biochem.*, **184**, 353 (1990).
- 129) P. Koski, I. M. Helander, M. Sarvas, and M. Vaara, *Anal. Biochem.*, **164**, 261 (1987).
- 130) Y. Tsuruta, Y. Date, and K. Kohashi, *J. Chromatogr.*, **502**, 178 (1990).
- 131) K. Imai and Z. Tamura, *Clin. Chim. Acta*, **85**, 1 (1978).
- 132) M. Kai, T. Ogata, K. Haraguchi, and Y. Ohkura, *J. Chromatogr.*, **163**, 151 (1979).
- 133) R. Wyss and W. Philipp, *J. Chromatogr.*, **507**, 187 (1990).
- 134) H. Nakamura and Z. Tamura, *Anal. Chem.*, **52**, 2087 (1980).
- 135) G. A. Qureshi and M. S. Baig, *J. Chromatogr.*, **459**, 237 (1988).
- 136) T. Konishi, M. Kamada, and H. Nakamura, *Anal. Sci.*, **5**, 667 (1989).
- 137) G. A. Qureshi and A. R. Qureshi, *J. Chromatogr.*, **491**, 281 (1989).
- 138) O. Nozaki and Y. Ohba, *J. Chromatogr.*, **515**, 621 (1990).
- 139) S. Suzuki, K. Kobayashi, J. Noda, T. Suzuki, and K. Takama, *J. Chromatogr.*, **508**, 225 (1990).
- 140) C. Löser, U. Wunderlich, and U. R. Fölsch, *J. Chromatogr.*, **430**, 249 (1988).
- 141) M. C. G. Alvarez-Coque, M. J. M. Hernández, R. M.V. Camañas, and C. M. Fernández, *Analyst*, **114**, 975 (1989).
- 142) N. Nimura and T. Kinoshita, *J. Chromatogr.*, **352**, 169 (1986).
- 143) H. Brückner, R. Wittner, and H. Godel, *J. Chromatogr.*, **476**, 73 (1989).
- 144) Y. Ishida, T. Fujita, and K. Asai, *J. Chromatogr.*, **204**, 143 (1981).
- 145) M. Mifune, D. K. Krehbiel, J. F. Stobaugh, and C. M. Riley, *J. Chromatogr.*, **496**, 55 (1989).
- 146) H. Koning, H. Wolf, K. Venema, and J. Korf, *J. Chromatogr.*, **533**, 171 (1990).
- 147) S. C. Beale, Y. -Z. Hsieh, D. Wiesler, and M. Novotny, *J. Chromatogr.*, **499**, 579 (1990).



- 148) E. J. Miller, A. J. Narkates, and M. A. Niemann, *Anal. Biochem.*, **190**, 92 (1990).
- 149) T. -Y. Chou, C. -X. Gao, S. T. Colgan, I. S. Krull, C. Dorschel, and B. Bildlingmeyer, *J. Chromatogr.*, **454**, 169 (1988).
- 150) S. Einarsson, *J. Chromatogr.*, **348**, 213 (1985).
- 151) S. Einarsson, B. Josefsson, P. Möller, and D. Sanchez, *Anal. Chem.*, **59**, 1191 (1987).
- 152) E. Brendel, I. Meineke, D. Witsch, and M. Zschunke, *J. Chromatogr.*, **385**, 299 (1987).
- 153) D. A. Yurek, M. S. Kuo, and G. P. Li, *J. Chromatogr.*, **502**, 184 (1990).
- 154) N. Ninura and T. Kinoshita, *J. Chromatogr.*, **504**, 359 (1990).
- 155) J. Ishida, M. Yamaguchi, and M. Nakamura, *Anal. Biochem.*, **184**, 86 (1990).
- 156) H. Fujino and S. Goya, *Anal. Sci.*, **6**, 465 (1990).
- 157) A. Takadate, I. Yagashiro, M. Irikura, H. Fujino, and S. Goya, *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 373 (1989).
- 158) C. F. Verkoelen, J. C. Romijn, F. H. Schroeder, W. P. van Schalkwijk, and T. A. W. Splinter, *J. Chromatogr.*, **426**, 41 (1988).
- 159) R. Shimizu, T. Kakimoto, K. Ishii, Y. Fujimoto, H. Nishi, and N. Tsumagari, *J. Chromatogr.*, **357**, 119 (1986).
- 160) K. H. Lehr and P. Damm, *J. Chromatogr.*, **526**, 497 (1990).
- 161) I. Fermo, F. M. Rubino, E. Bolzacchini, C. Arcelloni, R. Paroni, and P. A. Bonini, *J. Chromatogr.*, **433**, 53 (1988).
- 162) H. Fujino and S. Goya, *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 544 (1990).
- 163) H. E. Meyer, K. Swiderek, E. Hoffmann-Posorske, H. Korte, and L. M. G. Heilmeyer, Jr., *J. Chromatogr.*, **397**, 113 (1987).
- 164) J. F. Davey and R. S. Ersser, *J. Chromatogr.*, **528**, 9 (1990).
- 165) K. Matsubayashi, C. Kojima, and H. Tachizawa, *J. Chromatogr.*, **433**, 225 (1988).
- 166) F. Schmidtke and B. Seifert, *Fresenius' Z. Anal. Chem.*, **336**, 647 (1990).
- 167) A. Neidle, M. Banay-Schwartz, S. Sacks, and D. S. Dunlop, *Anal. Biochem.*, **180**, 291 (1989).
- 168) K. Shimada, Y. Kawai, T. Oe, and T. Nambara, *J. Liq. Chromatogr.*, **12**, 359 (1989).
- 169) G. Pflugman, H. Spahn, and E. Mutschler, *J. Chromatogr.*, **421**, 161 (1987).
- 170) K. Iwaki, H. Nimura, Y. Hiraga, T. Kinoshita, K. Takeda, and H. Ogura, *J. Chromatogr.*, **407**, 273 (1987).
- 171) J. R. L. Smith, A. U. Smart, F. E. Hancock, and M. V. Twigg, *J. Chromatogr.*, **483**, 341 (1989).
- 172) M. Nakajima, H. Wakabayashi, S. Yamato, and K. Shimada, *Anal. Sci.*, **6**, 523 (1990).
- 173) S. Tanabe, T. Kobayashi, and K. Kawanabe, *Anal. Sci.*, **3**, 69 (1987).
- 174) Y. Kobayashi, H. Kubo, T. Kinoshita, and T. Nishikawa, *J. Chromatogr.*, **430**, 65 (1988).
- 175) M. Yoshioka, K. Yamada, M. M. Abu-Zeid, H. Fujimori, A. Fuke, K. Hirai, A. Goto, M. Ishii, T. Sugimoto, and H. Darvez, *J. Chromatogr.*, **400**, 133 (1987).
- 176) K. Shimada and T. Oe, *Anal. Sci.*, **6**, 461 (1990).
- 177) 二村典行, *ぶんせき*, **1989**, 994.