

誘導体化技術を応用した 一対多型校正法の確立に向けた調査研究

外松沙依*

(2021年12月23日受理)

A survey for development of an innovative calibration method using derivatization techniques

SOTOMATSU Sae

Abstract

Use of calibrated materials traceable to the International System of Units (SI) is essential to obtain reliable analytical results. Due to the rapidly increasing demands for such analysis of organic compounds, efficient development of SI traceable calibrants is desired. As a new SI traceable analytical method, a high-performance liquid chromatography (HPLC) combined with derivatization technique has been developed. The method provides another functional group on target analytes (traceable derivatization with HPLC, Td-LC). To develop Td-LC, I have investigated important items such as derivatization reagents, available certified reference materials for calibrants and technical issues to be solved. Based on this survey, Td-LC will be developed as one of the innovative calibration methods.

1. はじめに

身の回りの物質は、大きく分けて有機物と無機物が存在する。有機物の例としては、アミノ酸、ビタミン、タンパク質、プラスチックなどがあり、有機物が身の回りに多数存在し、生活の基盤となっていることが分かる。一方で、有害とされている有機物質も存在し、規制や基準値が設けられている場合が多い。その例として、農作物中の残留農薬に関する規制¹⁾、水道法で定められた水質基準²⁾、環境基本法で定められた大気や土壌などの環境基準³⁾が挙げられる。このような規制や基準が定められていることから、有機物質を正しく測定することが重要であることが分かる。

有機物質を正しく測定するために必要とされるものが標準物質であり⁴⁾、国際単位系 (SI) にトレーサブルな有機標準物質の供給体系には、大きく3つの体系がある。また、分析現場においては混合標準液が利用されている

場合も多くあり、その値付けで有用とされる技術が「一対多型校正法」である。

一対多型校正法として、いくつかの手法が存在するが、例として、定量核磁気共鳴分光法 (qNMR)^{5),6)}、qNMR/クロマトグラフィー⁷⁾⁻⁹⁾、ポストカラム反応ガスクロマトグラフィー (GC)^{9),10)}が挙げられる。しかし、これら既存の一対多型校正法は、適用可能な物質に制限があり、特殊な装置が必要であるといった欠点が存在するため、新たな一対多型校正法の確立が求められていた。そこで、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と誘導体化技術を組み合わせて、SI トレーサブルな測定を行う新たな一対多型校正法として「SI トレーサブルな誘導体化-HPLC」を新たに開発することになった。なお、英語表記で「Traceable derivatization HPLC」を略して「Td-LC」と呼ぶこととする。

本調査研究では、誘導体化技術を応用した新規一対多型校正として Td-LC を確立するために、有用と期待される既存 CRM と誘導体化試薬について調査し整理するとともに、克服すべき技術的課題を抽出した。

* 物質計測標準研究部門 有機標準物質研究グループ

2 有機物質と有機標準物質

2.1 有機物質と官能基

有機物質は、一般的に炭素 (C) を含む物質を指す。有機物質の構成元素として、炭素 (C) 以外に、水素 (H)、酸素 (O)、窒素 (N)、硫黄 (S) などが挙げられる。構成する元素の種類は少ないが、それらを組み合わせることで多種多様な有機物質が構成され、分子量が小さい物質から大きい物質まで存在する。具体的な有機物として、分子量の小さいアミノ酸やビタミン、分子量の大きいタンパク質やプラスチックなどが挙げられる。

官能基は、有機物質の性質を特徴づける原子団である。官能基によって様々な異なる性質を持ち、官能基の例として、アミノ基 (-NH₂)、カルボキシ基 (-COOH)、ヒドロキシ基 (-OH)、アルデヒド基 (-CHO)、ケトン基 (-CO-)、チオール基 (-SH)、ニトロ基 (-NO₂)、スルホ基 (-SO₃H)、シアノ基 (-CN) などが知られている。また、複数の官能基を持つ有機物質も存在し、その例として、アミノ基とカルボキシ基を持つアミノ酸やヒドロキシ基とケトン基を持つステロイドなどが挙げられる。

2.2 有機標準物質とその供給体系

有機物質を正しく測定するためには、SIトレーサブルな標準物質によって分析機器を校正することが不可欠であり、このような用途の標準物質は校正用標準物質とも呼ばれている (図1)。

これらの標準物質を供給する際に用いられるSIトレーサブルな純度評価法として、一次標準測定法や差数法が知られている。一次標準測定法とは、「最高の質を有し、その操作が完全に記述され、理解され、かつ不確かさがSIを用いて完全に記述される方法で、その量については他の標準を参照せずに測定結果を標準として使用できる方法」とされ、凝固点降下法や滴定法などが挙げられる^{4),11)}。また、差数法とは、「試料中の分析種以外の成分の含有率を求め、100から差し引いた値を持って分析種の含有率を表す方法」とJIS K 0211に定義されている¹²⁾。なお、一次標準測定法や差数法は非常に精度が良いという利点を持つ一方で、適用できる有機物質の性質に制限があり、時間やコストがかかるといった欠点も存在する。

有機物質の校正用標準物質は3つの供給体系が存在する。1つ目は計量法トレーサビリティ制度 (JCSS) で供給されるJCSS標準物質、2つ目は計量標準総合センター (NMIJ) が頒布している認証標準物質 (CRM)、3つ目は民間企業の市販する試薬にNMIJがSIトレーサブル

に値付けを行ったNMIJトレーサブルな標準物質である (図2)。なお、CRMは、「測定装置の校正、測定方法の評価または材料に値を付与することに用いられるために一つ以上の規定特性について、計量学的に妥当な手順によって値付けられ、規定特性の値およびその不確かさ、ならびに計量学的トレーサビリティを記載した認証書が付いている標準物質」と定義されている^{4),13)}。

1つ目のJCSS標準物質は、一般財団法人化学物質評価研究機構 (CERI) が製造している特定標準物質にトレーサブルな標準物質である¹⁴⁾。SIトレーサブルとするためにNMIJが維持管理するJCSS基準物質を利用してCERIが特定標準物質を調製する場合とCERIが調製した特定標準物質にNMIJがqNMR/クロマトグラフィーやポストカラム反応GCなどの技術で値付けを行う場合がある。2つ目のCRMはNMIJが高純度物質や標準液を準備し、SIトレーサブルな純度評価法を用いて値付けを行い、均質性や安定性などを評価した上で、一般ユー

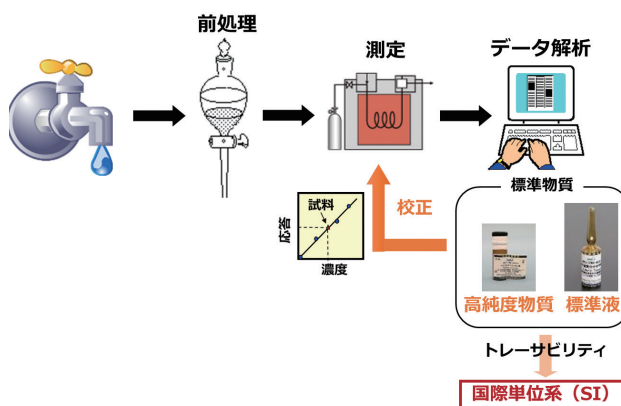


図1 校正用標準物質の利用例

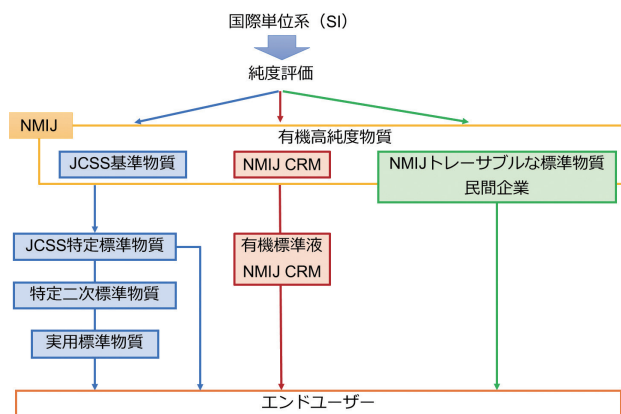


図2 SIトレーサブルな標準物質の供給体系

に向けて頒布している標準物質である^{4),15),16)}。3つ目のNMIJトレーサブルな標準物質は、民間企業の試薬にNMIJがNMRやクロマトグラフィーなどを用いて値付けをした上で、民間企業が均質性や安定性を評価している標準物質である。

3 混合標準液の開発

3.1 混合標準液

混合標準液は、複数の有機標準物質を混合して調製された溶液であり、分析現場では広く用いられている。混合標準液の例として、水道基準項目に含まれる有機物があり、18種の揮発性有機化合物(VOC)、3種のハロ酢酸、5種の陰イオン界面活性剤、2種のかび臭物質、6種のフェノール類などが挙げられる¹⁷⁾。

3.2 一対多型校正法

一対多型校正法は、少数のSIトレーサブルな標準物質を用いて、複数の分析対象物質にSIトレーサブルな値付けが可能な校正法である。具体例として、qNMRとポストカラム反応GCの原理を説明する。

qNMRは物質中の水素(H)を数える手法である^{5),6)}。そのため、水素の基準物質(NMIJ CRM 4601-b, 4602-a)¹⁶⁾を内標準物質として用いた測定により、分析対象物質の定量分析を行うことができる。ポストカラム反応GCは物質中の炭素(C)を数える手法である。具体的には、GC部で分離された物質が反応装置内で二酸化炭素(CO₂)に酸化された後メタン(CH₄)に還元され、そのメタンを検出器で測定している¹⁰⁾。そのため、炭素の基準物質を用いた測定を行い、検量線を作成することで、複数の有機物質を含む混合液に対して定量分析を行うことがで

きる。この2つの手法の特徴については、表1にまとめた。これら既存の一対多型校正法の欠点として、適用可能な物質に制限があり、特殊な装置が必要であることが挙げられる。よって、これまで以上に広範囲の物質に適用可能で、特殊な装置を必要としない、新たな一対多型校正法が求められている。

3.3 混合標準液の開発

混合標準液の開発スキームはいくつか存在する。これは従来では一対一型校正を行っていたが、近年、一対多型校正が発達してきたためである¹⁷⁾。

従来の一対一型校正による混合標準液の開発では、分析対象物質ごとに標準物質を用い、検量線を作成することで、分析対象物質の定量分析を行っていた。開発スキームとして、SIトレーサブルな純度評価法で分析対象物質ごとの標準物質に直接個別の値付けを行った後で、混和して混合標準液としていた(図3-a)。

qNMRを用いた開発スキームとしては、まずSIトレーサブルな純度評価法を用いて、水素の基準物質に値付けを行う。その後、値付けされた水素の基準物質を用いて、分析対象物質ごとに効率的に値付けを行い、混合して混合標準液としている(図3-b)。

ポストカラム反応GCを用いた開発スキームとしては、まずSIトレーサブルな純度評価法を用いて、炭素の基準物質に値付けを行う。その後、値付けされた炭素の基準物質を用いて、直接混合標準液に値付けを行っている(図3-c)。なお、混合標準液に直接値付けを行っているため、分析対象物質ごとの個別の標準物質を必要としないことが本手法の大きな特徴である。

表1 qNMRとポストカラム反応GCの特徴

	qNMR	ポストカラム反応GC
基準物質	水素(H)の基準物質(CRM 4601-b, 4602-a)	炭素(C)の基準物質
適用可能な物質	水素を持ち、類似構造物質が多数共存しないもの	揮発性物質
多成分の値付け	個別の値付け(同時の値付けは困難)	同時の値付け
混合標準液の開発	ある程度簡便(混合の工程が必要)	簡便
装置の汎用性	低い	低い

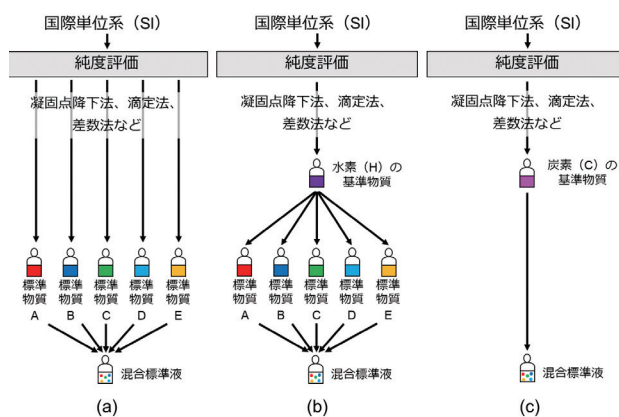


図3 混合標準液の開発スキーム
(a) 従来法(一対一型校正法) (b) qNMR
(c) ポストカラム反応GC

4 Td-LC に不可欠な HPLC と誘導体化技術

4.1 高速液体クロマトグラフィー (HPLC)

Td-LC の分析機器として不可欠な機器が HPLC である。HPLC は、分離分析に用いられる機器として非常に汎用的である。その原理としては、水や有機溶媒を使用して、溶媒に含まれる分析対象物質を分離し、検出器で検出を行っている (図 4)。利点としては、分析対象物質が溶媒に溶けるものであれば基本的に測定可能であるため多種多様な有機物質に適用可能であること、カラムにより分離が可能であるため多成分分析を同時に行うことができること、検出器が吸光度検出器、蛍光検出器、質量分析計 (MS) など豊富であるため分析に適した検出器を選択可能であることなどが挙げられる。一方で、HPLC の欠点として、SI トレーサブルな値付けをするためには分析対象物質ごとの標準物質が必要であることが挙げられる。そのため、HPLC を用いて一対多型校正法を行うためには、他の手法と組み合わせる必要がある。

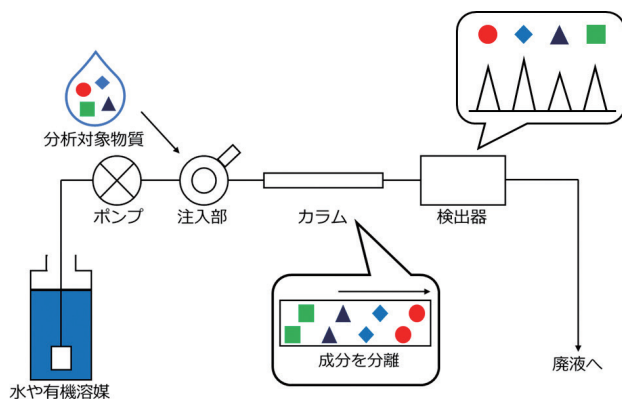


図 4 HPLC の概念図

4.2 誘導体化技術

4.2.1 誘導体化技術と誘導体化試薬

誘導体化は、クロマトグラフィーと組み合わせることで広く利用されている技術であり、分析対象物質の持つ官能基と誘導体化試薬の持つ官能基が化学反応することで、新たな構造を導入する技術である。

本技術は誘導体化を行うタイミングの違いで、カラムで分離する前に誘導体化を行うプレカラム誘導体化とカラムで分離した後に誘導体化を行うポストカラム誘導体化があり、それぞれ利点と欠点を持っている¹⁸⁾⁻²⁰⁾。また、様々な誘導体化試薬がこれまでに開発されてきており、誘導体化試薬に関する総説を含む数多くの論文が報告されている¹⁸⁾⁻³⁶⁾。なお、今日では、試薬メーカーからも多くの誘導体化試薬が市販されており^{37),38)}、非常に多くの試

薬の中から最適な試薬を選択することが重要である。

4.2.2 誘導体化の目的

誘導体化の主な目的は、分離や感度を向上させることである。また、誘導体化により、分析対象物質が持たない構造を付加もしくは形成することで特異的な吸収や蛍光を与え、検出することが可能となる。分離や感度の向上は、具体的には、保持時間の調整²⁷⁾、ピーク形状の改善²⁷⁾、選択性の向上^{27),39)}、固定相への不可逆的な吸着の減少³⁹⁾ などにより実現する。LC/MS での誘導体化の目的は分離や感度の向上に加えて、噴霧化・イオン化効率の向上²⁷⁾、内因性干渉の除去³¹⁾、構造決定を容易にすること^{31),39)}などが挙げられる。このように誘導体化は様々なメリットをもたらすことが知られている。

5 Td-LC を一対多型校正法として確立するための要件

5.1 Td-LC を一対多型校正法として確立するための 3 つの軸

Td-LC の原理は、既存 CRM と分析対象物質を混合し、誘導体化試薬と反応させた後で HPLC にて測定を行っている (図 5)。

誘導体化を組み合わせる HPLC 測定を一対多型校正法とするためには、「基準物質として用いる既存 CRM の選択」、「誘導体化試薬の選択」、「技術的課題の克服」の 3 つが軸となる。「基準物質として用いる既存 CRM の選択」と「誘導体化試薬の選択」は原理的に重要であり、「技術的課題の克服」は実験による最適化や検証が不可欠である。よって、適切な既存 CRM と誘導体化試薬を選択し、技術的課題を克服することが、Td-LC を一対多型校正法として確立するために重要である。

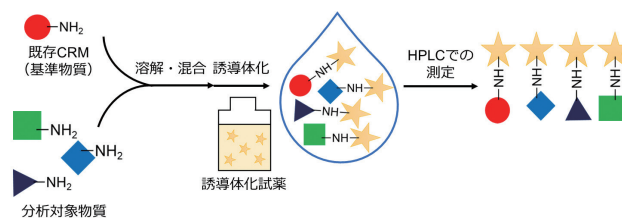


図 5 Td-LC の原理

5.2 基準物質として用いる既存 CRM の選択

基準物質として既存 CRM を用いることで、分析対象物質ごとの CRM を新しく準備することなく、SI トレーサブルな測定が可能となる。既存 CRM の選択で重要なことは、既存 CRM の持つ官能基と溶解性である。

現在頒布されている NMIJ CRM は毎年更新されるカ

カタログで知ることができる。カタログの2021-2022版¹⁶⁾では約190種が掲載されており、この中に有機標準物質は64種存在する。この有機標準物質の内、アミノ基をはじめとする反応性の官能基を持つ物質が約30種あり、これが本校正法の基準物質として有用である。具体的には、アミノ基を持つ17種アミノ酸(NMIJ CRM 6011-6027)、尿素(NMIJ CRM 6006-a)、クレアチニン(NMIJ CRM 6005-a)、カルボキシ基を持つ物質として17種アミノ酸(NMIJ CRM 6011-6027)、トリクロロ酢酸(NMIJ CRM 4074-a)、ヒドロキシ基を持つ物質としてエタノール(NMIJ CRM 4001-b)や17 β -エストラジオール(NMIJ CRM 6004-a)、テストステロン(NMIJ CRM 6002-a)、カルボニル基を持つ物質としてテストステロン(NMIJ CRM 6002-a)、プロゲステロン(NMIJ CRM 6003-a)、クレアチニン(NMIJ CRM 6005-a)などが挙げられる¹⁶⁾。また、既存CRMの溶解性は様々であり、親水性から疎水性の溶媒に対して幅広く分布している。Td-LCでは、既存CRMと分析対象物質を混合し、誘導体化試薬と反応させるため、これら3つが同一溶媒に溶けることが溶解性として求められる。

よって、既存CRMの持つ官能基と溶解性の2点を考慮した上で適切な既存CRMを選択することが求められる。

5.3 誘導体化試薬の選択

誘導体化試薬は、非常に多くの種類が存在するにも関わらず、あらゆる物質に最適である試薬は存在しないため、使用目的に応じて、適した試薬を選択することが求められる。誘導体化試薬を選択する評価項目として、「利用される検出器の安定性」、「誘導体の安定性」、「試薬の入手性」、「官能基に対する選択性」などの性質が重要である。

1つ目の「利用される検出器の安定性」は、測定のみならず、つきを少なくすることが可能であるため、経時的な安定性に優れた汎用性の高い吸光度検出器が適している。2つ目の「誘導体の安定性」は、反応後速やかに分解する誘導体、反応後数時間は安定な誘導体、反応後数日間安定な誘導体などがあるが、測定においては安定である方が良いと考えられる。3つ目の「試薬の入手性」は、試薬メーカーから常時市販されている試薬、品目としては存在するが受注により生産される試薬、メーカーからの供給がなく自分で合成する必要のある試薬など様々である。本校正法では、反応達成率を一律にするために十分量の試薬を用いるため、試薬メーカーから常時市販されている試薬を用いることが適していると考えられる。

また、メーカーやロットの違いにより差が出る可能性もあるため、その部分も確認する必要がある。4つ目の「官能基に対する選択性」は、単一の官能基に選択的である方が適している。しかし、分析対象物質の持つ官能基と誘導体化試薬が反応性を示す官能基で、一致する官能基が1つであれば、問題とならないため、評価項目としての優先度は低いと考えられる。

よって、本校正法に用いる誘導体化試薬は、吸光度検出器で検出される吸収を持ち、安定性に優れ、入手しやすい試薬であると同時に、必要に応じて選択性を考慮することが重要である。また、誘導体化条件の最適化を行うために、誘導体化のタイミングは条件検討を行いやすいプレカラム誘導体化試薬が適している。なお、アミノ基、カルボキシ基、ヒドロキシ基、カルボニル基に対する誘導体化試薬については、各論として6章で述べることにした。

5.4 技術的課題の克服

Td-LCを一対多型校正法として確立するために、克服すべき技術的課題が複数存在する。具体的には、「誘導体化条件の最適化」、「定量性の評価」、「トレーサビリティの確保と評価」、「不確かさ要因の抽出と評価」、「汎用性の検証」の5つが挙げられる。

1つ目の「誘導体化条件の最適化」のためには、適切な誘導体化試薬の選択、誘導体化効率の確認が必要である。適切な誘導体化試薬の選択については、5.3で述べた通りである。誘導体化効率の確認については、誘導体化試薬を十分量用いることで反応効率を一定にするなどの工夫をした上で、効率に変動がなく一定であることを確認する手法が考えられる。2つ目の「定量性の評価」では、偏りの評価、再現性の評価が必要である。偏りや再現性の要因となる項目は、物質の選択から測定まで多種多様に存在するため、それらの要因を精査し、評価することが求められる。3つ目の「トレーサビリティの確保と評価」には、適切なCRMの選択、CRMの安定性と溶解性の確認、他手法での検証が必要である。適切なCRMの選択や溶解性については、5.2で述べた通りである。他手法での検証については、すでにSIトレーサビリティが確保された手法であるNMRなどの原理の異なる手法を用いた測定を行うことで評価する。4つ目の「不確かさ要因の抽出と評価」には、試薬や溶媒のメーカーやロット間の差の検証、秤量、誘導体化操作、測定などの全工程における評価が必要である。5つ目の「汎用性の検証」には、複数の分析対象物質を用いて検討を行う必要がある。

6 Td-LC で有用と期待される誘導体化試薬

6.1 アミノ基の誘導体化

6.1.1 アミノ基に対する誘導体化試薬

アミノ基に対する誘導体化試薬は数多く存在し、アミノ基に対する誘導体化試薬に注目した論文も多数報告されている^{40)–42)}。特にアミノ基は、アミノ酸や生体アミンを始め、生体にとって重要な多くの物質が有する官能基であり、反応性も高いため、これまでに誘導体化試薬の開発も盛んであった。また、アミノ基は、第1級アミノ基 ($-NH_2$) と第2級アミノ基 ($-NH-$) があるため、必要に応じて官能基に対する選択性だけではなく、級の選択性についても問われる場合がある。よって、これらのことを踏まえた上で、数ある誘導体化試薬の中から適切な試薬を選択することが求められる。アミノ基に対する誘導体化試薬の例を 6.1.2–6.1.7 に示す。

6.1.2 2,4-Dinitrofluorobenzene (DNFB)

DNFB は、ハロゲンの1種であるフッ素を持つ試薬である。DNFB 誘導体は遮光下で 48 時間安定である¹⁹⁾。また、DNFB は安価に市販されており、アセトニトリルなどに溶解されて利用される⁴³⁾。なお、DNFB が反応性を示す官能基は、アミノ基以外に、ヒドロキシ基、チオール基などがある^{43)–45)}。また、DNFB は N-末端アミノ酸残基の決定することで DNA の塩基配列の決定を行う Sanger 法で利用されるため、Sanger 試薬とも呼ばれる⁴⁶⁾。分析対象物質としては、アミノ酸^{43),47)} やアミノグリコシド系抗生物質^{48),49)} が報告されている。

ハロゲンを持つ他の試薬として、ベンゾフラザン骨格を基本骨格とし、フッ素を持つ 4-fluoro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-F)^{22),24),40),50)} や 4-(N,N-dimethyl-aminosulphonyl)-7-fluoro-2,1,3-benzoxadiazole

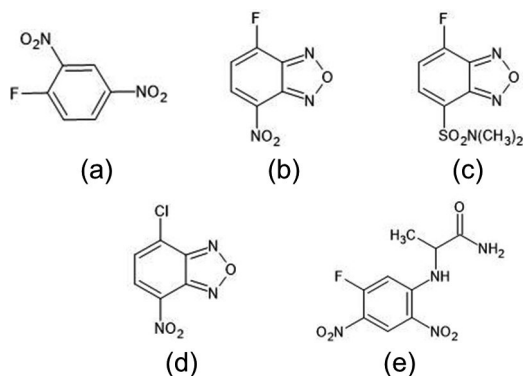


図6 ハロゲンを持つ誘導体化試薬

(a) DNFB (b) NBC-Cl (c) DBD-F (d) NBD-Cl (e) FDAA

(DBD-F)^{22),24),51),52)}、塩素を持つ 4-chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazole (NBD-Cl)^{40),53),54)}、Marfey's 試薬として知られている Na-(2,4-dinitro-5-fluorophenyl)-L-alaninamide (FDAA)^{55)–57)} が挙げられる。

6.1.3 5-(Dimethylamino)naphthalene-1-sulfonyl chloride (Dansyl chloride, Dns-Cl)

Dns-Cl はスルホニルクロリド ($-SO_2Cl$) 構造を持つ試薬である。生成された dansyl 誘導体の1種である dansyl amino acid は 4 °C 保管で少なくとも 7 日間安定である¹⁹⁾。Dns-Cl はやや高価であるが市販されており、アセトニトリルなどに溶解されて利用される⁵⁸⁾。なお、反応性を示す官能基は、アミノ基以外に、ヒドロキシ基がある⁴⁰⁾。分析対象物質としては、アミノ酸^{41),58),59)}、薬物⁶⁰⁾、生体アミン⁶¹⁾ が報告されている。

スルホニルクロリド構造を持つ他の試薬として、4-dimethylaminoazobenzene-4'-sulfonyl chloride (dabsyl chloride)^{19),59),62)} や 4-(5,6-dimethoxy-2-phthalimidinyl)-2-methoxyphenylsulfonyl chloride (DMS-Cl)^{63),64)} などが挙げられる。

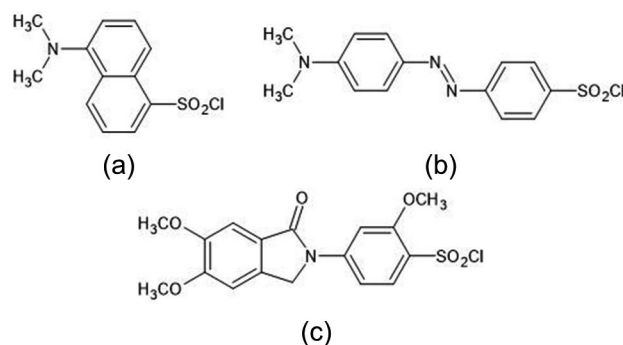


図7 スルホニルクロリド構造を持つ誘導体化試薬

(a) dansyl chloride (b) dabsyl chloride (c) DMS-Cl

6.1.4 6-Aminoquinyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (AQC)

AQC は、スクシンイミジル構造を持つ試薬である。誘導体は室温で少なくとも 1 週間安定である¹⁹⁾。AQC はキットで市販されており⁶⁵⁾、アセトニトリルなどに溶解可能である⁶⁶⁾。なお、反応性を示す官能基は、アミノ基以外に、ヒドロキシ基がある⁶⁷⁾。分析対象物質としては、アミノ酸^{66),68)} や生体アミン^{69),70)} などが報告されている。

スクシンイミジル構造を持つ他の試薬として、3-aminopyridyl-N-hydroxysuccinimidyl carbamate (APDS)^{71)–73)} などが挙げられる。

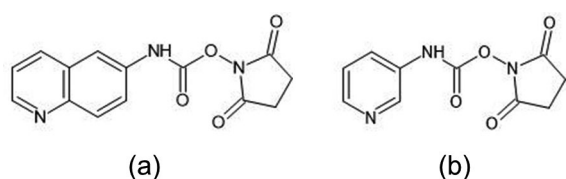


図8 スクシンイミジル構造を持つ誘導体化試薬
(a) AQC (b) APDS

6.1.5 9-Fluorenylmethyl chloroformate (FMOC-Cl)

FMOC-Clはクロロホルメート (-COCl) 構造を持つ試薬である。この際に、得られる誘導体は安定である^{19),41)}。FMOC-Clは安価に市販されており、アセトニトリルなどに溶解されて利用される⁷⁴⁾。なお、反応性を示す官能基は、アミノ基以外に、カルボキシ基がある⁷⁵⁾。分析対象物質としてはアミノ酸⁷⁶⁾や農薬のグリホサート⁷⁷⁾が報告されている。

クロロホルメート構造を持ち、アミノ基と反応する他の試薬として、4-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-7-(N-chloroformylmethyl-N-methylamino)-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-COCl)^{78),79)} や 4-(4,5-diphenyl-1H-imidazol-2-yl) benzoyl chloride (DIB-Cl)⁸⁰⁾⁻⁸²⁾などが挙げられる。

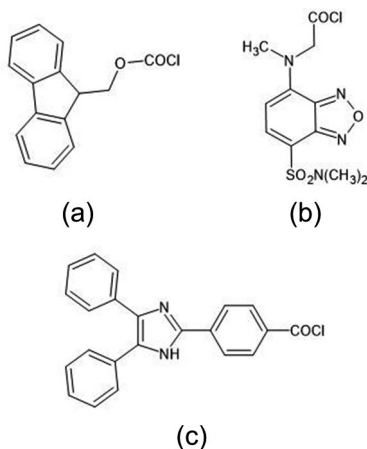


図9 クロロホルメート構造を持つ誘導体化試薬
(a) FMOC-Cl (b) DBD-COCl (c) DIB-Cl

6.1.6 o-Phthaldehyde (OPA)

OPAは、ジアルデヒド (di-CHO) 構造を持つ試薬である。得られるイソインドール誘導体は不安定である¹⁹⁾。OPAは安価に市販されており、メタノールなどに溶解されて利用される。なお、反応性については、第1級アミノ基に選択的であり、第2級アミノ基とは反応をしないと知られている¹⁹⁾。反応は、一般にチオール存在下で起こるため、2-mercaptoethanol⁴⁰⁾、3-mercaptopropionic

acid⁸³⁾、N-acetyl-L-cystein^{83),84)}などを入れる必要がある。分析対象物質としては、アミノ酸^{19),40),83),84)}が有名であり、アミノ酸分析の誘導体化試薬として、長らく汎用されてきた。

ジアルデヒド構造を持つ他の試薬として、2,3-naphthalenedialdehyde (NDA)^{85),86)}などが挙げられる。

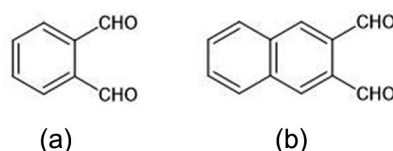


図10 ジアルデヒド構造を持つ誘導体化試薬
(a) OPA (b) NDA

6.1.7 Phenyl isothiocyanate (PITC)

PITCはイソチオシアナート (-NCS) 構造を持つ試薬である。生成される誘導体のPTC-aminoは数日間安定である⁴¹⁾。PITCは安価に液体として市販されている。また、PITCはprolineなどの第2級アミンの定量にも用いられる¹⁹⁾。なお、タンパク質のアミノ酸配列の決定法の一つであるEdman分解で利用されるため、Edman試薬とも呼ばれる⁴⁶⁾。分析対象物質としては、アミノ酸^{87),88)}などが報告されている。

イソチオシアナート構造を持つ他の試薬として、2,3,4,6-tetra-O-acetyl-β-D-glucopyranosylisothiocyanate (GITC)^{89),90)} や 4-(N,N-dimethylaminosulfonyl)-7-(3-isothiocyanatopyrrolidin-1-yl)-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-Py-NCS)⁹¹⁾などが挙げられる。

また、イソチオシアナートの類似構造としてイソシア

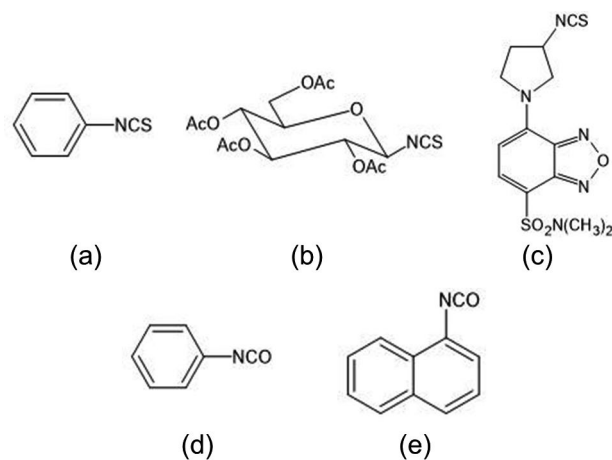


図11 イソチオシアナート構造もしくはシソシアナート構造を持つ誘導体化試薬
(a) PITC (b) GITC (c) DBD-Py-NCS (d) PIC (e) NIC

ナート (-NCO) があり, イソシアナート構造を持つ試薬として, phenyl isocyanate (PIC)^{92),93)} や 1-naphthyl isocyanate (NIC)^{94),95)} などが挙げられる。

6.2 カルボキシ基の誘導体化

6.2.1 カルボキシ基に対する誘導体化試薬

カルボキシ基に対する誘導体化試薬は数多く存在し, カルボキシ基に対する誘導体化試薬に注目した論文も多数報告されている⁹⁶⁾⁻⁹⁸⁾。カルボキシ基は, 脂肪酸やプロスタグランジン類 (PGs) などの多くの生体成分が持つ官能基であり, これまでに誘導体化試薬の開発が盛んであった。しかし, アミノ基と比べると反応性が劣るため, 反応を起こすために工夫が必要な場合もある。よって, これらのことを踏まえた上で, 数ある誘導体化試薬の中から適切な試薬を選択することが求められる。カルボキシ基に対する誘導体化試薬の例を 6.2.2-6.2.7 で示す。

6.2.2 2-Bromoacetophenone (phenacyl bromide)

Phenacyl bromide はプロモアセチル (-COCH₂Br) 基を持つ試薬である。生成された誘導体は数週間安定である⁹⁹⁾。Phenacyl bromide は安価に市販されており, アセトンなどに溶解させて利用される⁹⁹⁾。分析対象物質としては, 脂肪酸¹⁰⁰⁾などが報告されている。

プロモアセチル基を持つ他の試薬として, *p*-(9-anthroyloxy) phenacyl bromide (panacyl bromide)^{101),102)} や *p*-bromophenacyl bromide (*p*-BPB)^{100),103),104)} などが挙げられる。

6.2.3 2-Nitrophenylhydrazine (2-NPH)

2-NPH はヒドラジノ (-NHNH₂) 基を持つ試薬である。生成された誘導体は 5℃で少なくとも 1ヶ月間安定である¹⁰⁵⁾。2-NPH は 2-NPH hydrochloride (2-NPH·HCl)

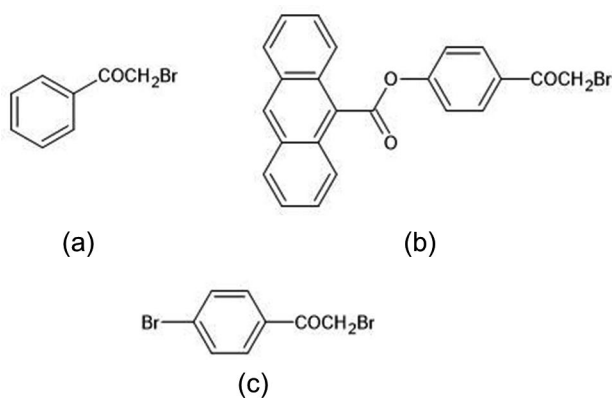


図 12 プロモアセチル基を持つ誘導体化試薬

(a) phenacyl bromide (b) panacyl bromide (c) *p*-BPB

として安価に市販されており, 水などに溶解させて利用可能である。反応性を示す官能基は, カルボキシ基以外に, カルボニル基などがある¹⁰⁶⁾。分析対象物質としては, 脂肪酸^{105),107)}などが挙げられる。

ヒドラジノ基を持つ他の試薬として, 6,7-dimethyl-2(1H)quinoxalinone-3-propionylcarboxylic acid (DMEQ-Hydrazide)^{108),109)} や N-(4-nitro-2,1,3-benzoxadiazoyl-7-yl)-N-methyl-2-aminoacetohydrazide (NBD-CO-Hz)¹¹⁰⁾ などが挙げられる。なお, ヒドラジノ基を持つ試薬はカルボニル基と反応する試薬も多い。

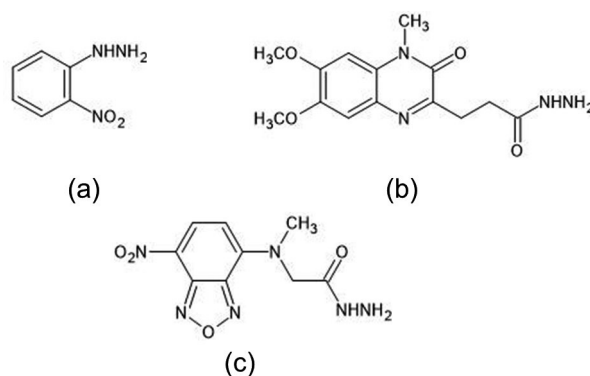


図 13 ヒドラジノ基を持つ誘導体化試薬

(a) 2-NPH (b) DMEQ-Hydrazide (c) NBD-CO-Hz

6.2.4 2-Picolylamine (2-PA)

2-PA は第 1 級アミノ基を持つ試薬である。誘導体は, 移動相に溶かした場合には, 室温で少なくとも 1 日, もしくは, 4℃で少なくとも 5 日間安定である¹¹¹⁾。2-PA は安価に市販されており, アセトニトリルなどに溶解させて利用される¹¹¹⁾。なお, 価格は 1g で数百円と安価である。分析対象物質として, 胆汁酸¹¹²⁾や PGs¹¹¹⁾などが挙げられる。

1 級アミノ基を持つ他の試薬として, 4-N,N-dimethylaminosulfonyl-7-N-(2-aminoethyl) amino-2,1,3-benzoxasiazole (DBD-ED)¹¹³⁾⁻¹¹⁵⁾ などが挙げられる。

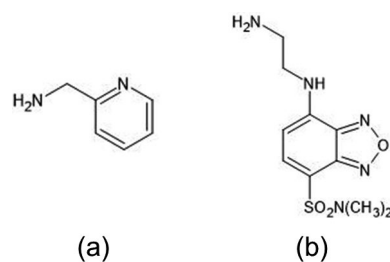


図 14 第 1 級アミノ基を持つ誘導体化試薬

(a) 2-PA (b) DBD-ED

6.2.5 4-Bromomethyl-7-methoxycoumarin (Br-Mmc)

Br-Mmc は、ブロモメチル (-CH₂Br) 基を持つ試薬である。誘導体は、反応混合液内で少なくとも数週間安定である¹¹⁶⁾。Br-Mmc は高価であるが市販されており、アセトンなどに溶解させて利用される¹¹⁷⁾。分析対象物質としては、脂肪酸^{117),118)}やPGs¹¹⁹⁾などが報告されている。

ブロモメチル基を持つ試薬として、4-bromomethyl-7-acetoxycoumarin (Br-Mac)^{120),121)}や3-bromomethyl-7-methoxy-1,4-benzoxazin-2-one (BrMB)¹²²⁾⁻¹²⁴⁾が挙げられる。

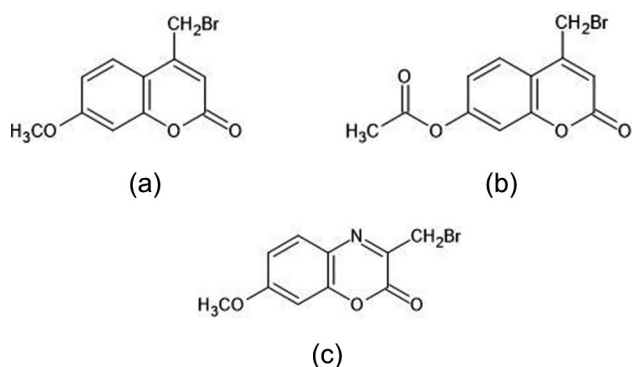


図 15 ブロモメチル基を持つ誘導体化試薬
(a) Br-Mmc (b) Br-Mac (c) BrMB

6.2.6 4-N,N-Dimethylaminosulfonyl-7-N-piperazino-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-PZ)

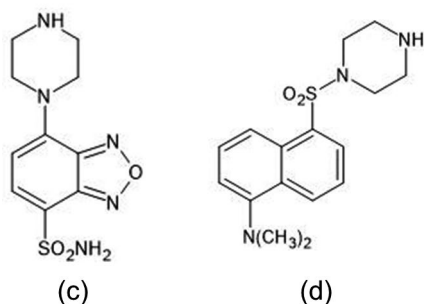
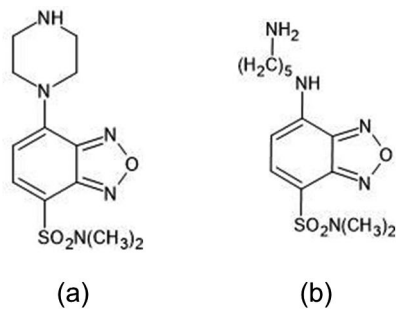


図 16 ピペラジノ基を持つ誘導体化試薬
(a) DBD-PZ (b) DBD-CD (c) ABD-PZ
(d) dansyl semipiperazide

DPD-PZ はピペラジノ基を持つ試薬である。誘導体は室温のオートサンプラー内で1日安定である¹²⁵⁾。DBD-PZ は高価であるが市販されており、アセトニトリルなどに溶解させて利用される⁹⁶⁾。また、本試薬の誘導体化反応は活性化剤である diethyl phosphorocyanidate (DEPC) や向山試薬の存在下で起こる^{96),126)}。分析対象物質としては、脂肪酸^{24),127)}などが報告されている。

ピペラジノ基を持つ他の試薬として、4-(N,N-dimethylaminosulphonyl)-7-N-cadaverino-2,1,3-benzoxadiazole (DBD-CD)^{24),126)}、4-(aminosulphonyl)-7-(1-piperazinyl)-2,1,3-benzoxadiazole (ABD-PZ)^{24),128)}、5-(dimethylamino)-1-naphthalenesulphonyl semipiperazide (dansyl semipiperazide)¹²⁹⁾などが挙げられる。

6.2.7 9-Anthryldiazomethane (ADAM)

ADAM はジアゾメタン (-CHN₂) 構造を持つ試薬である。誘導体は酢酸エチル-メタノールの溶液中で -20 °C 保存で数ヶ月間安定である¹³⁰⁾。ADAM は高価であるが市販されており、アセトンなどに溶解させて利用される¹³¹⁾。分析対象物質としては、脂肪酸¹³²⁾やPGs¹³⁰⁾などが報告されている。

ジアゾメタン構造を持つ他の試薬として、1-pyrenyldiazomethane (PDAM)^{133),134)}が挙げられる。

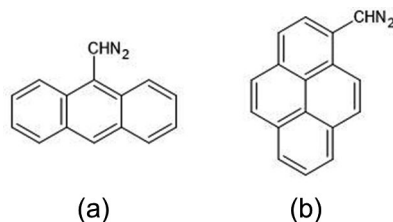


図 17 ジアゾメタン構造を持つ誘導体化試薬
(a) ADAM (b) PDAM

6.3 ヒドロキシ基の誘導体化

6.3.1 ヒドロキシ基に対する誘導体化試薬

ヒドロキシ基に対する誘導体化試薬は複数存在し、ヒドロキシ基に対する誘導体化試薬に注目した論文も報告されている¹³⁵⁾⁻¹³⁷⁾。ヒドロキシ基を持つ物質としては、アルコール類やフェノール類、各種ステロイドなど様々な物質が存在する。アルコール類は、アミノ基と同様に第1級アルコールから第3級アルコールまで級が存在し、立体障害の程度が異なる。よって、これらのことを踏まえた上で、複数存在する誘導体化試薬の中から適切な試薬を選択することが求められる。ヒドロキシ基に対する誘導体化試薬の例を 6.3.2-6.3.5 で示す。

6.3.2 1-Anthronitrile (1-AN)

1-ANは、アシルニトリル (-COCN) 構造を持つ試薬である。生成された誘導体は、安定である¹³⁸⁾。1-ANは高価であるが市販されており、アセトニトリルなどに溶解させて利用される¹³⁹⁾。反応性として、立体障害の影響から3級アルコール性ヒドロキシ基とはほとんど反応しないとされている³⁷⁾。分析対象物質としては、胆汁酸¹³⁹⁾、アルコキシエタノール¹⁴⁰⁾、ヒドロキシステロイド¹⁴¹⁾などが報告されている。

アシルニトリル構造を持つ他の試薬として、9-anthronitrile^{142),143)} や pyrene-1-carbonyl cyanide (PCC)¹⁴⁴⁾などが挙げられる。

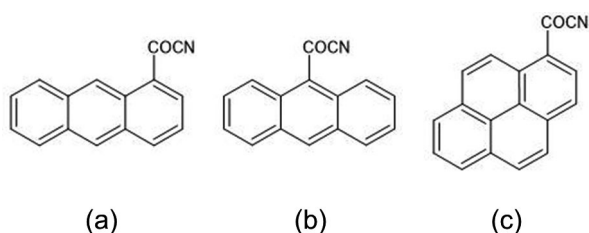


図18 アシルニトリル構造を持つ誘導体化試薬
(a) 1-AN (b) 9-anthronitrile (c) PCC

6.3.3 2-Aminopyridine (2-AP)

2-APは第1級アミノ基 (-NH₂) を持つ試薬である。生成された誘導体は安定である¹⁴⁵⁾。2-APは安価に市販されており、水などに溶解させて利用される¹⁴⁶⁾。分析対象物質としては、糖が報告されている^{145),146)}。

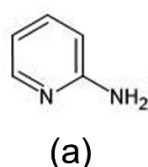


図19 第1級アミノ基を持つ誘導体化試薬
(a) 2-PA

6.3.4 3,4-Dihydro-6,7-dimethoxy-4-methyl-3-oxoquinoxaline-2-carbonyl azide (DMEQ-CON₃)

DMEQ-CON₃はカルボニルアジド (-CON₃) 構造を持つ試薬である。DMEQ誘導体は、最終溶液中で、室温明所で少なくとも72時間安定である¹⁴⁷⁾。DMEQ-CON₃は、ベンゼンなどに溶解させて利用される¹⁴⁷⁾が、一般に自ら試薬を生成する必要がある。分析対象物質としては、アルコール類¹⁴⁷⁾やコレステロール類¹⁴⁸⁾などが報告されている。

カルボニルアジド構造を持つ他の試薬として、isonicotinoyl azide (INA)¹⁴⁹⁾⁻¹⁵¹⁾ や 7-methoxycoumarin-3-carbonyl azide (MC-CON₃)^{152),153)}などが知られている。

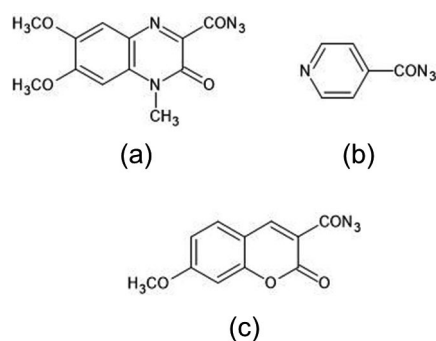


図20 カルボニルアジド構造を持つ誘導体化試薬
(a) DMEQ-CON₃ (b) INA (c) MC-CON₃

6.3.5 3,5-Dinitrobenzoyl chloride (DNBC)

DNBCはクロロホルメート (-COCl) 構造を持つ試薬である。生成されたモノグリセリドのDNBC誘導体は安定である¹⁵⁴⁾。DNBCは安価に市販されており、ベンゼンなどに溶解させて利用される¹⁵⁵⁾。なお、DNBCが反応性を示す官能基は、ヒドロキシ基以外にアミノ基がある¹⁵⁶⁾。分析対象物質としては、脂肪族アルコール¹⁵⁷⁾が報告されている。

DNBC以外にクロロホルメート構造を持つ他の試薬として、3-chlorocarbonyl-6,7-dimethoxy-1-methyl-2(1H)-quinoxalinone (DMEQ-COCl)^{158),159)}などが挙げられる。

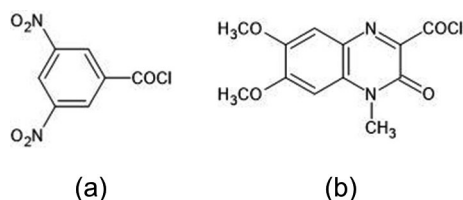


図21 クロロホルメート構造を持つ誘導体化試薬
(a) DNBC (b) DMEQ-COCl

6.4 カルボニル基の誘導体化

6.4.1 カルボニル基に対する誘導体化試薬のまとめ

カルボニル基に対する誘導体化試薬は複数存在し、カルボニル基に対する誘導体化試薬に注目した論文も報告されている¹⁶⁰⁾。カルボニル基を持つ物質としては、アルデヒド類やステロイドなどが代表的である。カルボニル基に対する誘導体化試薬は、他の官能基に対する誘導体化試薬と比べると数が少ないため、その中から適切な試薬を選択することが求められる。カルボニル基に対する誘導体化試薬の例を6.4.2-6.4.4で示す。

6.4.2 1,2-Diamino-4,5-methylenedioxybenzene (MDB)

MDBは、*o*-phenylenediamine構造を持つ試薬であ

る。誘導体化反応によりキノキサリン誘導体が生成され³⁷⁾、室温明所で6時間、4℃暗所で少なくとも24時間安定である^{161),162)}。MDBは高価であるが市販されており、2-mercaptoethanolや亜ジチオン酸ナトリウムを含む溶液などに溶解させて利用される¹⁶¹⁾。分析対象物質としては、 α -ケト酸¹⁶³⁾などが報告されている。

同様に *o*-phenylenediamine 構造を持つ他の反応する試薬として、1,2-diamino-4,5-dimethoxybenzene (DDB)^{164),165)}や4,5-diaminophthalhydrazide (DPH)^{166),167)}が挙げられる。

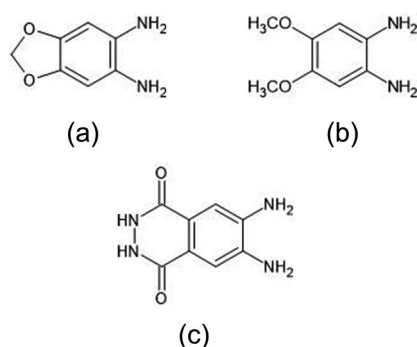


図22 *o*-phenylenediamine 構造を持つ誘導体化試薬
(a) MDB (b) DDB (c) DPH

6.4.3 1,3-Cyclohexanedione (CHD)

CHDは、ジオン構造を持つ試薬である。生成された誘導体の蛍光は4時間で徐々に減少していることが報告されている¹⁶⁸⁾。CHDは安価に市販されており、酢酸アンモニウムなどと合わせて水などに溶解させて利用される¹⁶⁹⁾。分析対象物質としては、アルデヒド類^{168),169)}が報告されている。

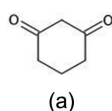


図23 ジオン構造を持つ誘導体化試薬
(a) CHD

6.4.4 2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH), 5-dimethylaminonaphthalene-1-sulfonyl hydrazine (dansyl hydrazine)

6.2.1ではヒドラジノ(-NHNH₂)基を持ち、カルボキシ基と反応する試薬についてまとめたが、ヒドラジノ基を持つ試薬はカルボニル基と反応する試薬が多く存在する。DNPHやdansyl hydrazineは、ヒドラジノ基を持ち、カルボニル基と反応する試薬として有名である。

DNPHは誘導体化反応により、安定な生成物である2,4-dinitrophenyl hydrazonesを得る¹⁷⁰⁾。DNPHは安

価に市販されており、アセトニトリルなどに溶解させて利用される¹⁷¹⁾。分析対象物質として、アルデヒド類^{170),171)}が報告されている。

Dansyl hydrazineはDNPHと同様に誘導体化反応により、安定な生成物であるdansyl hydrazoneを得る¹⁷²⁾。誘導体の一種である糖のdansyl hydrazoneは暗所の4℃で少なくとも2日間安定である¹⁷³⁾。Dansyl hydrazineはやや高価であるが市販されており、エタノールなどに溶解させて利用される¹⁷²⁾。分析対象物質として、マロンジアルデヒド¹⁷⁴⁾やケトステロイド¹⁷⁵⁾が報告されている。

ヒドラジノ基を持ち、カルボニル基と反応する他の試薬として、2-hydrazino-1-methylpyridine (HMP)^{176),177)}や4-N,N-dimethylamino-6-(4'-methoxy-1'-naphthyl)-1,3,5-triazine-2-hydrazine (DMNTH)¹⁷⁸⁾などが知られている。

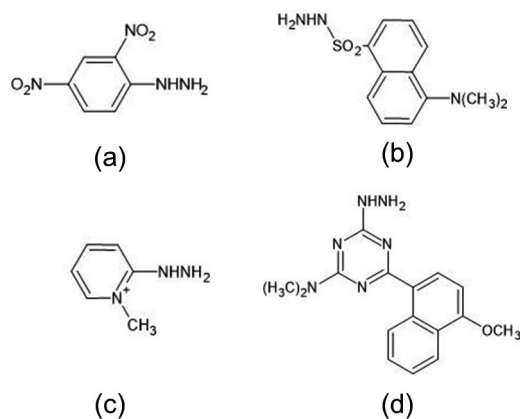


図24 ヒドラジノ基を持つ誘導体化試薬
(a) DNPH (b) dansyl hydrazine (c) HMP (d) DMNTH

7 まとめ

7.1 新たな一対多型校正法であるTd-LCの特徴

一対多型校正法として、これまでにqNMRやポストカラム反応GCなどが開発されてきたが、適用可能な物質に制限があり、特殊な装置が必要であるといった欠点が存在する。一方で、今回着想したTd-LCは、適応可能な物質の範囲が広く、装置は非常に汎用的なHPLCを用いるため、それらの欠点を克服することができる。また、既存のCRMと誘導体化試薬を用いることにより、SIトレーサブルな値付けができる。このことから、今回着想したTd-LCは高い汎用性が期待できる。

7.2 Td-LCを一対多型校正法として確立する要件のまとめ

5章でも述べた通り、Td-LCを一対多型校正法として

確立するためには、「基準物質として用いる既存 CRM の選択」、「誘導体化試薬の選択」、「技術的課題の克服」の3つの軸が重要である。1つ目の既存 CRM は、NMIJ CRM として頒布されている約 30 種の有機標準物質が有用であり、その溶解性は様々である。2つ目の誘導体化試薬の選択は、検出器の安定性、誘導体化試薬や誘導体の安定性、試薬の入手性、官能基に対する選択性が評価項目として重要であるとされており、この4つの評価項目を考慮して、誘導体化試薬を選択することが望ましい。なお、6章でアミノ基、カルボキシ基、ヒドロキシ基、カルボニル基に対する誘導体化試薬を、試薬の持つ反応部位の官能基ごとにまとめた。技術的課題については、5.4で述べた通りであり、今後の研究課題である。

7.3 今後の展望

今後の展望としては、5章で挙げた3つの軸を考慮して本校正法の確立を目指す。本調査研究で「基準物質として用いる既存 CRM」と「誘導体化試薬の選択」についてまとめた。これらの情報から、実際の分析対象物質に合わせて選択することが必要である。「技術的課題」を検証するために、まず初めにアミノ基を持つ CRM 同士であるアミノ酸を用いた測定を行い、誘導体化条件の最適化、定量性の評価、トレーサビリティの確保と評価、不確かさ要因の抽出と評価に取り組む。その後、アミノ基を持つ様々な分析対象物質を用いて汎用性の検証を行い、これらを実現した後で、アミノ基以外の官能基に対する検討も行っていくこととする。

本校正法が確立することで、既存 CRM の効率的な維持と管理、社会ニーズに即した校正業務の実現、確立した校正法の技術移転などが期待され、一般ユーザが自ら SI トレーサブルな値付けをすることも可能となる。これらのことから、SI トレーサブルな値付けが様々な有機物質に対して広がっていくことが期待される。

謝辞

本調査研究報告書の執筆を行うにあたり、全般に渡りご指導・ご助言いただきました有機基準物質研究グループ長伊藤信靖博士に深く感謝申し上げます。また、有機基準物質研究グループの諸先輩方から貴重なご助言をいただきましたことに感謝いたします。

参考文献

1) <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/>

- kenkou_iryuu/shokuhin/zanryu/index.html
- 2) <https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/topics/bukyoku/kenkou/suido/kijun/index.html>
- 3) <https://www.env.go.jp/kijun/>
- 4) 久保田正明 編著, “化学分析・試験に役立つ 標準物質活用ガイド,” 丸善株式会社, 2009-5-30
- 5) 井原俊英, 齋藤剛, 杉本直樹, *Synthesiology*, 2, 12-22 (2009)
- 6) T. Saito, T. Ihara, M. Koike, S. Kinugasa, Y. Fujimine, K. Nose, and T. Hirai, *Accreditation and Quality Assurance*, 14, 79-86 (2009)
- 7) Y. Kitamaki, N. Saito, T. Yamazaki, S. Otsuka, S. Nakamura, Y. Nishizaki, N. Sugimoto, M. Numata, and T. Ihara. *Analytical Chemistry*, 89, 6963-6968 (2017)
- 8) 黒江美穂, 齋藤直樹, 山崎太一, 西崎雄三, 杉本直樹, 沼田雅彦, 井原俊英, *BUNSEKI KAGAKU*, 67, 541-549 (2018)
- 9) M. Numata, Y. Kitamaki, Y. Shimizu, T. Yamazaki, N. Saito, M. Kuroe, N. Hanari, K. Ishikawa, T. Saito, and T. Ihara. *Metrologia*, 56, 034002 (2019)
- 10) Y. Kitamaki, N. Saito, N. Sasaki, M. Morita, T. Sasaki, H. Miyamoto, M. Numata, and T. Ihara. *Analytical Science*, 37, 1185-1188 (2021)
- 11) <https://unit.aist.go.jp/nmij/library/units/substance/>
- 12) <https://www.jisc.go.jp/app/jis/general/GnrJISSearch.html>
- 13) https://www.gls.co.jp/product/reagents/aist_crm/00821.html
- 14) https://www.cerij.or.jp/service/08_reference_material/JCSS_02.html
- 15) <https://unit.aist.go.jp/qualmanmet/refmate/>
- 16) [https://unit.aist.go.jp/qualmanmet/refmate/pdf/CRM_Catalog_\(JE\)_2021-2022.pdf](https://unit.aist.go.jp/qualmanmet/refmate/pdf/CRM_Catalog_(JE)_2021-2022.pdf)
- 17) https://unit.aist.go.jp/mcml/rg-orgp/img/JASIS2020_smart_calibratoion_presentation.pdf
- 18) H. Lingeman, W. J. M. Underberg, A. Takedate, and A. Hulshoff. *Journal of Liquid Chromatography*, 8, 789-874 (1985)
- 19) R. M. Callejon, A. M. Troncoso, and M. L. Morales. *Talanta*, 81, 1143-1152 (2010)
- 20) P. G. Rigas. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 7957-7992 (2013)
- 21) K. Imai, and T. Toyo'oka. *Journal of Chromatography Library*, 39, 209-288 (1988)

- 22) K. Imai, S. Uzo, and T. Toyo'oka. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 7, 1395-1403 (1989)
- 23) Y. Ohkura, M. Kai, and H. Nohta. *Journal of Chromatography B*, 659, 85-107 (1994)
- 24) K. Imai, S. Uzu, and S. Kanda. *Analytica Chimica Acta*, 290,3-20 (1994)
- 25) M. Yamaguchi, H. Yoshida, and H.Nohta. *Journal of Chromatography A*, 950, 1-19 (2002)
- 26) T. Fukushima, N. Usui, T. Santa, and K. Imai. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 1655-1687 (2003)
- 27) F. Xu, L. Zou, Y. Liu, Z. Zhang, and C. N. Ong. *Mass Spectrometry Reviews*, 30, 1143-1172 (2011)
- 28) Y. Iwasaki, Y. Nakano, K. Mochizuki, M. Nomoto, Y. Takahashi, R. Ito, K. Saito, and H. Nakazawa. *Journal of Chromatography B*, 879, 1159-1165 (2011)
- 29) T. Santa. *Drugs Discoveries & Therapeutics*, 7, 9-17 (2013)
- 30) C. F. Poole. *Liquid Chromatography*, Applications, 25-56 (2013)
- 31) B. L. Qi, P. Liu, Q. Y. Wang, W. J. Cai, B. F. Yuan, and Y. Q. Feng. *Trends in Analytical Chemistry*, 59, 121-132 (2014)
- 32) Y. Z. Baghdady, and K. A. Schug. *Journal of Separation Science*, 39, 102-114 (2016)
- 33) T. Higashi, S. Ogawa. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 162 57-69 (2016)
- 34) M. Tobiszewski, J. Namiesnik, and F. P. Pereira. *Green Chemistry*, 19, 5911-5922 (2017)
- 35) T. Toyo'oka. *Analytical Sciences*, 33, 555-564 (2017)
- 36) S. Zhao, L. Li. *Trends in Analytical Chemistry*, 131, 115988 (2020)
- 37) https://www.tcichemicals.com/assets/brochure-pdfs/Brochure_A1096_J.pdf
- 38) https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/category/docs/00988_doc01.pdf
- 39) 三田村邦子, 島田和武. *YAKUGAKU ZASSHI*, 118, 206-215 (1998)
- 40) K. Imai, T. Toyo'oka, and H. Miyano. *Analyst*, 109, 1365-1373 (1984)
- 41) P. Furst, L. Pollack, T. A. Graser, H. Godel, and P. Stehle. *Journal of Chromatography*, 499, 557-569 (1990)
- 42) A. Lkhagva, C.C. Shen, Y. S. Leung, and H. C. Tai. *Journal of Chromatography A*, 1610, 460536 (2020)
- 43) M. G. Gioia, P. Andreatta, S. Boschetti, and R. Gatti. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45, 456-464 (2007)
- 44) H. A. Archontaki, M. A. Koupparis, and C. E. Efstathiou. *Analyst*, 114, 591-596 (1989)
- 45) R. Gatti, M. G. Gioia, A. M. D. Pietra, and V. Cavrini. *Analytica Chimica Acta*, 447, 89-99 (2001)
- 46) 村井稔幸. *生物工学*, 96, 208-210 (2018)
- 47) N. Li, Y. Liu, Y. Zhao, X. Zheng, J. Lu, Y. Liang. *Food Analytical Methods*, 9, 1307-1314 (2016)
- 48) D. M. Barends, C. L. Zwaan, and A. Hulshoff. *Journal of Chromatography*, 225, 417-426 (1981)
- 49) J. Lu, M. Cwik, and T. Kanyok. *Journal of Chromatography B*, 695, 329-335 (1997)
- 50) T. Toyo'oka, Y. Watanabe, and K. Imai. *Analytica Chimica Acta*, 149, 305-312 (1983)
- 51) H. Akiyama, M. Miyahara, M. Toyoda, and Y Saito. *Journal of the Food Hygienics Society of Japan*, 36, 77-81 (1995)
- 52) H. Kawanishi, T. Toyo'oka, K. Ito, M. Maeda, T. Hamada, T. Fukushima, M. Kato, and S. Inagaki. *Journal of Chromatography A*, 1132, 148-156 (2006)
- 53) H. J. Klimisch, and L. Stadler. *Journal of Chromatography*, 90, 141-148 (1974)
- 54) M. Omer, M. Omar, A. Thiel, and A. Elbashir. *Eurasian Journal of Analytical Chemistry*, 13, em40 (2018)
- 55) D. B. Goodnough, M. P. Lutz, and P. L. Wood. *Journal of Chromatography B*, 672, 290-294 (1995)
- 56) B. S. Foster, D. D. Gilbert, A. Hutchaleelaha, and M. Mayersohn. *Journal of Analytical Toxicology*, 22, 265-269 (1998)
- 57) S. Hess, J. Beek, and L. K. Pannell. *Analytical Biochemistry*, 311, 19-26 (2002)
- 58) Y. Tapuhi, D. E. Schmidt, W. Lindner, and B. L. Karger. *Analytical Biochemistry*, 115, 123-129 (1981)
- 59) T. Takeuchi. *Journal of Chromatography Library*, 70, 229-241 (2005)
- 60) H. L. Perez, S. Wang, and C. Bowen. *Journal of Chromatography B*, 877, 1040-1046 (2009)
- 61) J. J. Learey, S. C. Clark, B. J. Bowen, C. J. Barrow, and J. L. Adcock. *Journal of Separation Science*, 41, 4430-4436 (2018)
- 62) E. H. J. M. Jansen, R. H. V. D. Berg, R. B. Miedema, and L. B. Doorn. *Journal of Chromatography*, 553, 123-133 (1991)

- 63) Y. Tsuruta, and H. Inoue. *Analytical Biochemistry*, 265, 15-21 (1998)
- 64) Y. Tsuruta, K. Maruyama, H. Inoue, K. Kosha, Y. Date, N. Okamura, S. Eto, and E. Kojima. *Journal of Chromatography B*, 878, 327-332 (2010)
- 65) https://www.waters.com/waters/ja_JP/Amino-Acid-Analysis-Standards-%26-Kits/nav.htm?cid=134635960&locale=ja_JP
- 66) S. A. Cohen, K. M. D. Antonis. *Journal of Chromatography A*, 661, 25-34 (1994)
- 67) J. C. Motte, R. Windey, A. Delafortrie. *Journal of Chromatography A*, 728, 333-341 (1996)
- 68) H. J. Liu. *Journal of Chromatography A*, 670, 59-66 (1994)
- 69) O. Busto, J. Guasch, and F. Borrull. *Journal of Chromatography A*, 737, 205-213 (1996)
- 70) T. S. Weiss. *Journal of Chromatography Library*, 70, 502-523 (2005)
- 71) <https://labchem-wako.fujifilm.com/jp/product/detail/W01W0101-2384.html>
- 72) K. Shimbo, T. Oonuki, A. Yahashi, K. Hirayama, and H. Miyano. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 23, 1483-1492 (2009)
- 73) N. Arashida, R. Nishimoto, M. Harada, K. Shimbo, and N. Yamada. *Analytica Chimica Acta*, 954, 77-87 (2017)
- 74) D. A. Stead, and R. M. E. Richards. *Journal of Chromatography B*, 693, 415-421 (1997)
- 75) B. Mohammadi, M. B. Majnooni, P. M. Khatabi, R. Jalili, and G. Bahrami. *Journal of Chromatography B*, 880, 12-18 (2012)
- 76) S. Einarsson, B. Josefsson, and S. Lagerkvist. *Journal of Chromatography*, 282, 609-618 (1983)
- 77) S. Goscinny, H. Unterluggauer, J. Aldrian, V. Hanot, and S. Masselter. *Food Analytical Methods*, 5, 1177-1185 (2012)
- 78) X. Yang, T. Fukushima, T. Santa, H. Homma, and K. Imai. *Analyst*, 122, 1365-1369 (1997)
- 79) P. Prapatpong, T. T. In, W. Padungpuak, S. Buranaphalin, and L. Suntornsuk. *Journal of Chemistry*, 672183, (2015)
- 80) O. A. Dirbashi, J. Qvarnstrom, K. Irgum, and K. Nakashima. *Journal of Chromatography B*, 712, 105-112 (1998)
- 81) M. Wada, S. Kinoshita, Y. Itayama, N. Kuroda, and K. Nakashima. *Journal of Chromatography B*, 721, 179-186 (1999)
- 82) H. J. Zhu, J. S. Wang, J. L. Donovan, C. L. D. Vane, B. B. Gibson, and J. S. Markowitz. *Journal of Chromatography B*, 846, 351-354 (2007)
- 83) Y. Mengerink, D. Kutlan, F. Toth, A. Csampai, I. M. Perl. *Journal of Chromatography A*, 949, 99-124 (2002)
- 84) N. Nimura, and T. Kinoshita. *Journal of Chromatography*, 352, 169-177 (1986)
- 85) P. D. Montigny, J. F. Stobaugh, R. S. Givens, R. G. Carlson, K. Srinivasachar, L. A. Sternson, and T. Higuchi. *Analytical Chemistry*, 59, 1096-1101 (1987)
- 86) X. He, C. L. Huang, and E. H. Schuchman. *Journal of Chromatography B*, 877, 983-990 (2009)
- 87) R. L. Heinrikson, and S. C. Meredith. *Analytical Biochemistry*, 136, 65-74 (1984)
- 88) R. A. Sherwood, A. C. Titheradge, and D. A. Richards. *Journal of Chromatography*, 528, 293-303 (1990)
- 89) Z. Tian, T. H. Pavlina, and R. W. Roeske. *Journal of Chromatography*, 541, 297-302 (1991)
- 90) X. Li, T. W. Yao, and S. Zeng. *Journal of Chromatography B*, 742, 433-439 (2000)
- 91) D. Jin, K. Nagakura, S. Murofushi, T. Miyahara, and T. Toyo'oka. *Journal of Chromatography A*, 822, 215-224 (1998)
- 92) B. Bjorkqvist. *Journal of Chromatography*, 204, 109-114 (1981)
- 93) S. Chen. *Chromatographia*, 59, 697-703 (2004)
- 94) A. Neidle, M. B. Schwartz, S. Sacks, and D. S. Dunlop. *Analytical Biochemistry*, 180, 291-297 (1989)
- 95) F. Belal, M. Walash, N. E. Enany, and S. Zayed. *Journal of Chromatography B*, 933, 24-29 (2013)
- 96) Y. Yasaka, and M. Tanaka. *Journal of Chromatography B*, 659, 139-155 (1994)
- 97) T. Toyo'oka. *Journal of Chromatography B*, 671, 91-112 (1995)
- 98) T. Toyo'oka. *Analytica Chimica Acta*, 465, 111-130 (2002)
- 99) E. Mentasti, M. C. Gennaro, C. Sarzanini, C. Baiocchi, and M. Savigliano. *Journal of Chromatography*, 322, 177-189 (1985)
- 100) A. Mehta, A. M. Oeser, and M. G. Carlson. *Journal of Chromatography B*, 719, 9-23 (1998)
- 101) H. Salari, M. Yeung, S. Douglas, and W.

- Morozowich. *Analytical Biochemistry*, 165, 220-229 (1987)
- 102) W. Engels, M. A. F. Kamps, P. J. M. R. Lemmens, G. J. V. D. Vusse, and R. S. Reneman, *Journal of Chromatography*, 427, 209-218 (1988)
- 103) H. C. Jordi. *Journal of Liquid Chromatography*, 1, 215-230 (1978)
- 104) H. Nakabayashi, M. Iwamori, and Y. Nagai. *The Journal of Biochemistry*, 96, 977-984 (1984)
- 105) H. Miwa. *Analytica Chimica Acta*, 465, 237-255 (2002)
- 106) R. Peters, J. Hellenbrand, Y. Mengerink, and S. V. D. Wal. *Journal of Chromatography A*, 1031, 35-50 (2004)
- 107) H. Miwa, C. Hiyama, and M. Yamamoto. *Journal of Chromatography*, 321, 165-174 (1985)
- 108) M. Yamaguchi, T. Iwata, K. Inoue, S. Hara, and M. Nakamura. *Analyst*, 115, 1363-1366 (1990)
- 109) T. Iwata, T. Hirose, M. Nakamura, and M. Yamaguchi. *Journal of Chromatography B*, 654, 171-176 (1994)
- 110) T. Santa, A. Takeda, S. Uchiyama, T. Fukushima, H. Homma, S. Suzuki, H. Yokosu, C. K. Lim, and K. Imai. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17, 1065-1070 (1998)
- 111) T. Higashi, T. Ichikawa, S. Inagaki, J. Z. Min, T. Fukushim, and T. Toyo'oka. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 52, 809-818 (2010)
- 112) R. Nagatomo, Y. Okada, M. Ichimura, K. Tsuneyama, and K. Inoue. *Analytical Sciences*, 34, 1031-1036 (2018)
- 113) P. Prados, T. Fikushima, T. Santa, H. Homma, M. Tsunoda, S. A. Kidny, S. Mori, H. Yokosu, and K. Imai. *Analytica Chimica Acta*, 344, 227-232 (1997)
- 114) K. Arai, T. Fukushima, M. Tomiya, S. Mitsunashi, T. Sasaki, T. Toyo'oka. *Journal of Chromatography B*, 875, 358-362 (2008)
- 115) M. Nishikiori, H. Iizuka, H. Ichiba, K. Sadamoto, and T. Fukushima. *Journal of Chromatographic Science*, 53, 537-541 (2015)
- 116) S. Yoshida, S. Hirose, and M. Iwamoto. *Journal of Chromatography*, 383, 61-68 (1986)
- 117) S. Lam, and E. Grushka. *Journal of Chromatography*, 158, 207-214 (1978)
- 118) J. H. Wolf, and J. Korf. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis*, 10, 99-107 (1992)
- 119) J. Turk, S. J. Weiss, J. E. Davis, and P. Needleman. *Prostaglandins*, 16, 291-309 (1978)
- 120) H. Tsuchiya, T. Hayashi, H. Naruse, and N. Takagi. *Journal of Chromatography*, 231, 247-254 (1982)
- 121) H. Tsuchiya, T. Hayashi, H. Naruse, and N. Takagi. *Journal of Chromatography*, 234, 121-130 (1982)
- 122) J. Yamada, M. Sakuma, and T. Suga. *Analytical Biochemistry*, 199, 132-136 (1991)
- 123) A. Nakanishi, H. Naganuma, J. Kondo, K. Watanabe, K. Hirano, T. Kawasaki, and Y. Kawahara. *Journal of Chromatography*, 591, 159-164 (1992)
- 124) T. Kusaka, and M. Ikeda. *Journal of Chromatography*, 639, 165-173 (1993)
- 125) H. Hasegawa, E. Takahara, T. Yamada, and O. Nagata. *Journal of Chromatography B*, 687, 419-425 (1996)
- 126) T. Toyo'oka, M. Ishibashi, Y. Takeda, K. Nakashima, S. Akiyama, S. Uzu, and K. Imai. *Journal of Chromatography*, 588, 61-71 (1991)
- 127) Y. Ueno, H. Matsunaga, K. Umemoto, and K. Nishijima. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 47, 1375-1379 (1999)
- 128) T. Toyo'oka, M. Ishibashi, Y. Takeda, and K. Imai. *Analyst*, 116, 609-613 (1991)
- 129) I. Yanagisawa, M. Yamane, and T. Urayama. *Journal of Chromatography*, 345, 229-240 (1985)
- 130) K. Kiyomiya, K. Yamaki, N. Nimura, T. Kinoshita, and S. Ohishi. *Prostaglandins*, 31, 71-82 (1986)
- 131) S. Kiessig, C. Vogt, and G. Werner. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 357, 539-542 (1997)
- 132) N. Nimura, and T. Kinoshita. *Analytical Letters*, 13, 191-202 (1980)
- 133) N. Nimura, T. Kinoshita, T. Yoshida, A. Uetake, and C. Nakai. *Analytical Chemistry*, 60, 2067-2070 (1988)
- 134) J. Schneede, and P. M. Ueland. *Analytical Chemistry*, 64, 315-319 (1992)
- 135) T. Higashi, K. Shimada. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378, 875-882 (2004)
- 136) A. E. Domenech, E. F. S. Alfonso, J. M. H. Martinez, and G. R. Ramos. *Journal of Chromatography A*, 1296, 140-156 (2013)
- 137) I. Athanasiadou, Y. S. Angelis, E. Lyris, C. Georgakopoulos. *Trends in Analytical Chemistry*, 42, 137-156 (2013)
- 138) C. S. Ramesha, W. C. Pickett, and D. V. K. Murthy. *Journal of Chromatography*, 491, 37-48 (1989)
- 139) J. Goto, M. Saito, T. Chikai, N. Goto, and T.

- Nambara, *Journal of Chromatography*, 276, 289-300 (1983)
- 140) M. Yoshikawa, and C. Tani. *Journal of Chromatography A*, 1005, 215-221 (2003)
- 141) J. Goto, N. Goto, F. Shamsa, M. Saito, S. Komatsu, K. Suzuki, and T. Nambara. *Analytica Chimica Acta*, 147, 397-400 (1983)
- 142) N. Shibata, T. Hayakawa, K. Takada, N. Hoshino, T. Minouchi, and A. Yamaji. *Journal of Chromatography B*, 706, 191-199 (1998)
- 143) M. Takahashi, M. Nagashima, S. Shigeoka, H. Kamimura, and K. Kamata. *Journal of Chromatography A*, 958, 299-303 (2002)
- 144) K. Kamata, M. Takahashi, K. Terasima, and M. Nishijima. *Journal of Chromatography A*, 667, 113-118 (1994)
- 145) G. R. Her, S. Santikarn, V. N. Reinhold, and J. C. Williams. *Journal of Carbohydrate Chemistry*, 6, 129-139 (1987)
- 146) N. O. Maness, E. T. Miranda, and A. J. Mort. *Journal of Chromatography*, 587, 177-183 (1991)
- 147) M. Yamaguchi, T. Iwata, M. Nakamura, Y. Ohkura. *Analytica Chimica Acta*, 193, 209-217 (1987)
- 148) T. Iwata, M. Yamaguchi, and M. Nakamura. *Journal of Chromatography*, 421, 43-50 (1987)
- 149) T. Higashi, T. Nishio, N. Hayashi, and K. Shimada. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55, 662-665 (2007)
- 150) T. Higashi, T. Nishio, H. Yokoi, Y. Ninomiya, and K. Shimada. *Analytical Sciences*, 23, 1015-1019 (2007)
- 151) E. Ayano, Y. Suzuki, T. Nishio, Y. Nagata, H. Kanazawa, K. Nagase, and T. Okano. *Chromatography*, 35, 131-138 (2014)
- 152) A. Takadate, M. Irikura, T. Suehiro, H. Fujino, and S. Goya. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 33, 1164-1169 (1985)
- 153) Y. Saisho, C. Shimada, and T. Umeda. *Analytical Biochemistry*, 265, 361-367 (1998)
- 154) 村上千秋, 丸山武紀, 新谷勲. 食品衛生学雑誌, 29, 235-239 (1988)
- 155) S. Mori. *Analytica Chimica Acta*, 189, 17-25 (1986)
- 156) J. Kirschbaum, K. Rebscher, and H. Brickner. *Journal of Chromatography A*, 881, 517-530 (2000)
- 157) 鈴木義仁, 土屋典子. *Bunseki Kagaku*, 30, 240-245 (1981)
- 158) T. Iwata, M. Yamaguchi, S. Hara, M. Nakamura, and Y. Ohkura. *Journal of Chromatography*, 362, 209-216 (1986)
- 159) M. H. Nagaoka, H. Nagaoka, K. Kondo, H. Akiyama, and T. Maitani. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 54, 922-924 (2006)
- 160) J. E. Szulejko, and K. H. Kim. *Trends in Analytical Chemistry*, 64, 29-41 (2015)
- 161) S. Hara, Y. Takemori, M. Yamaguchi, M. Nakamura, and Y. Ohkura. *Analytical Biochemistry*, 164, 138-145 (1987)
- 162) M. J. Martín, E. Vázquez, and R. Rueda. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 387, 2943-2949 (2007)
- 163) Z. J. Wang, K. Zaitsu, and Y. Ohkura. *Journal of Chromatography*, 430, 223-231 (1988)
- 164) S. Hara, Y. Takemori, M. Yamaguchi, and N. Nakamura. *Journal of Chromatography B*, 344, 33-39 (1985)
- 165) I. Nemet, L. V. Defterdarovic, and Z. Turk. *Clinical Biochemistry*, 37, 875-881 (2004)
- 166) T. Nakahara, J. Ishida, M. Yamaguchi, and M. Nakamura. *Analytical Biochemistry*, 190, 309-313 (1990)
- 167) J. Ishida, S. Sonezaki, and M. Yamaguchi. *Journal of Chromatography*, 598, 203-208 (1992)
- 168) W. L. Stahovec, and K. Mopper. *Journal of Chromatography*, 298, 399-406 (1984)
- 169) 鈴木義仁. *BUNSEKI KAGAKU*, 34, 314-318 (1985)
- 170) J. O. Levin, R. Lindahl, C. E. M. Heeremans, and K. V. Oosten. *Analyst*, 121, 1273-1278 (1996)
- 171) F. Lipari, and S. J. Swarin. *Journal of Chromatography*, 247, 297-306 (1982)
- 172) T. Kawasaki, M. Maeda, and A. Tsuji. *Journal of Chromatography*, 232, 1-11 (1982)
- 173) W. F. Alpenfels. *Analytical Biochemistry*, 114, 153-157 (1981)
- 174) H. L. Lord, J. Rosrnfeld, V. Volovich, D. Kumbhare, and B. Parkinson. *Journal of Chromatography B*, 877, 1292-1298 (2009)
- 175) T. Kawsaki, M. Maeda, and A. Tsuji. *Journal of Chromatography*, 163, 143-150 (1979)
- 176) T. Higashi, A. Yamauchi, and K. Shimada. *Journal of Chromatography B*, 825, 214-222 (2005)
- 177) T. Higashi, Y. Shibayama, K. Shimada. *Journal of Chromatography B*, 846, 195-201 (2007)
- 178) C. Kempter, G. Zurek, and U. Karst. *Journal of Environmental Monitoring*, 1, 307-311 (1999)