

## ステロイドホルモン標準物質の開発に関する調査研究

山崎太一\*

(平成20年10月30日受理)

## A study on development of reference materials of steroid hormone

Taichi YAMAZAKI

## 1. 諸言

臨床検査は病気の早期発見や健康管理を行なう上で非常に重要であり、近年では多くの医療検査機関で行われているが、そこで必要とする標準物質の整備が進んでいない。試薬メーカーや学会等から頒布されている標準物質はあるものの特性値における統一的な標準物質はほとんど整備されていないのが現状である。そのために、医療検査機関ごとに異なる標準物質や検査値を使用することになり、測定結果の同等性や整合性が確保できず、測定値の信頼性が疑われる。また、医療検査機関を換える際には再検査の必要性が発生するために被験者にとって経済的にも身体的にも不利益を生じることになる。そのために近年では測定法・測定物質の標準化が叫ばれ、2002年6月にCIPM (Comite international des Poids et Mesures, 国際度量衡委員会)、IFCC (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 国際臨床化学連合)<sup>1)</sup>、WHO (World Health Organization, 世界保健機構)<sup>2)</sup>、ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation, 国際認定所認定機構)<sup>3)</sup>によりJCTLM (Joint Committee on Traceability of Laboratory Medicine, 検査医学のトレーサビリティに関する合同委員会)<sup>4)</sup>がBIPM (Bureau International des Poids et Mesures, 国際度量衡局)<sup>5)</sup>に設立された。JCTLMは2003年12月からヨーロッパで施行された“*In Vitro* (体外診断用医療機器に関するEU指令 (IVD指令))”への対応で、健康医療技術向上のために、医療計測における測定結果の国際的な等価性、信頼性、同等性の確保を目的として設立された。このような国際的動向から将来的には測定対象となる標準物質のSIトレーサビリティが確保されていなくては臨床・医学における信頼性を得ることができなくなると予

想され、今後はメディカル分野における標準物質の整備が一段と進むと考えられている。

現在までにIVD標準物質の整備が進んでいないものの一つとしてステロイドホルモンが挙げられる。ステロイドホルモンは元来、生体内に存在している物質であるが、非常に強い生理活性を有しているために極微量な濃度変化でさえも身体に大きな影響を及ぼすことから多くのステロイドホルモンが臨床検査項目として挙げられている。また、ステロイドホルモンは臨床検査だけではなく医薬品としても用いられているために正確な標準を用いた検査により投与量や純度の正確な値を知ることによって利用者の安全にも繋がると考えられ、ステロイドホルモン類について標準物質の整備が必要とされている。このような状況から計量標準総合センター (NMIJ) はBIPMと共同でSIにトレーサブルなステロイドホルモン標準物質の開発を行っている。

本調査研究においては臨床・医学におけるステロイドホルモンの需要と標準物質の整備状況を調査していくことで社会に必要とされているステロイドホルモン標準物質を明確にしていく。また、実際の標準物質の開発を行う際の評価法や測定法について調査する。

## 2. 臨床検査におけるSIトレーサビリティ

臨床検査におけるSIトレーサビリティとは測定対象となる検体から途切れることなくSI単位であるmolへ標準物質と標準測定法を通して連鎖していることである(図1)。この中でも一次標準物質(純物質系標準物質)はCCQM(物質質量諮問委員会)により認められている一次標準測定法で値付けされた標準物質である。一次標準物質はSI単位に直結することからSI単位にトレーサビリティを確保する上で非常に重要な標準物質になっているだけでなく、その値を基準に低次の標準物質の値が決め

\* 計測標準研究部門 有機分析科 有機標準第1研究室

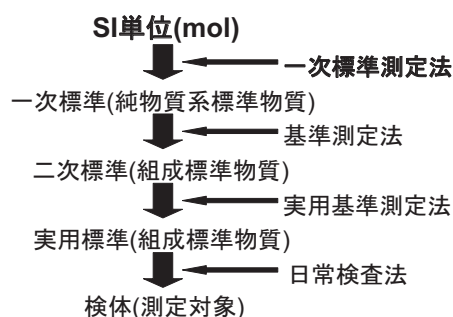


図1 臨床検査におけるSIトレーサビリティ体系

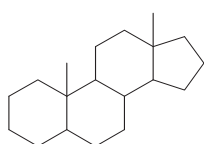


図2 ステロイド骨格（ペルヒドロペンタノフェナントレン骨格）の構造

られるので非常に重要である。

CCQMによって認められている一次標準測定法としては同位体希釈法・重量法・電量分析法・容量滴定法・凝固点降下法などが挙げられていて、これらの測定法を用いて注意深く、適切に値付けされた物質はSIにトレーサブルとされる。

### 3. 臨床医学におけるステロイドホルモン

ステロイドホルモンとはステロイド骨格（ペルヒドロペンタノフェナントレン核）を基本骨格（図2）として持つホルモンの総称で、このようなステロイド骨格を有するステロイド化合物は人工的に合成された物質を含めると200種類以上もの存在が確認されている。これらのステロイドの中には臨床検査対象や医薬品として用いられているものもある。

実際の臨床検査現場においては標準物質との比較を利用した比色法、RIA（radioimmunoassay）法、酵素法などがよく用いられている<sup>6), 7)</sup>。

UK NEQAS (the United Kingdom National External Quality Assessment Service)<sup>8)</sup>では臨床医学上、重要とされているステロイドホルモンを8種類挙げている（図3）。この中でも、現在までに認証標準物質（CRM）としてステロイドホルモンはアンドロステンジオン、コルチゾール、テストステロンの3種類が開発されているだけにすぎない（表1）。また、ステロイドホルモンは組成標準物質も同様にほとんど整備されておらず、CRMステロイド

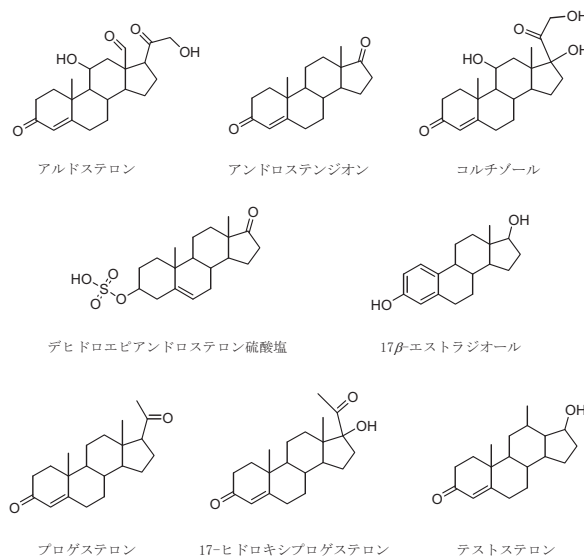


図3 臨床医学上、重要視されているステロイドホルモン類

表1 頒布されている純物質系ステロイドホルモンのCRM

物質名	開発機関	認証値(%)	拡張不確かさ(%) k=2	備考
コルチゾール	NIST	98.9	0.2	SRM921
テストステロン	NMIA	99.2	1.0	差数法での純度評価
アンドロステンジオン	NMIA	99.5	0.2	差数法での純度評価

表2 頒布されている組成系ステロイドホルモンのCRM

物質名	マトリックス	開発機関	認証値(nmol/L)	不確かさ(nmol/L) k=2
コルチゾール	血清中	IRMM	273	6 (2.2%)
コルチゾール	血清中	IRMM	763	14 (1.9%)
17βエストラジオール	血清中	IRMM	0.114	0.005 (4.4%)
17βエストラジオール	血清中	IRMM	0.689	0.032 (4.7%)
17βエストラジオール	血清中	IRMM	1.34	0.07 (5.2%)
プロゲステロン	血清中	IRMM	10.13	0.21 (2.1%)

ホルモン組成標準物質はコルチゾール、17β-エストラジオール、プロゲステロンがそれぞれ異なる濃度で数例が整備されているにすぎない（表2）。このようにステロイドホルモンに関わる標準物質では、JCTLMのデータベースに登録されているものは非常に少なく<sup>9)</sup>、登録されている少数の標準物質はいずれも海外機関によるものであり、日本国内ではSIトレーサビリティが確保されたステロイドホルモン標準物質は全く整備されていない。

### 4. ステロイドホルモン標準物質の開発

ステロイドホルモン標準物質の開発においても『均質性』、『不純物の定量』、『純度評価』、『安定性』などを総合的に評価し、値付けすることが重要となる。また、ス

ステロイドホルモンのような複雑な構造を持つ化学物質では、同じ分子式でも置換基の位置が異なる構造異性体や立体構造が異なる幾何異性体が数多く存在するため、定性できない不純物や標品が入手できない不純物では評価が難しいと予想される。このため標品を用いて定性・定量できないケースでの評価法の検討も必要とされる。

以下には開発の流れと共に一般的な評価法・測定法について記載する。

#### 4.1 ステロイドホルモン標準物質開発の流れ (図4)

標準物質開発の流れとしては候補高純度標準物質原料の選定・精製を行い、試料の小分けを行うことで候補高純度標準物質を準備する。その後瓶間・瓶内の均質性評価を行い、短期的・長期的安定性評価や不純物の定性・定量を行うと共に試料の純度評価をした後に、認証・頒布する。

##### 4.1.1 均質性評価

均質性評価は試料の瓶内・瓶間における純度や不純物の含量に大きなばらつきがないかを確認する。 $3\sqrt{N}$  ( $N$ は全試料数) 本または10本以上のサンプルを抜き取って瓶間・瓶内での均質性を予め評価しておくことで任意の瓶について抜き取り検査を行った結果を全ての瓶の値として統計的に扱うことができるため、均質性の評価は多量の瓶を評価する際に有用とされている。

固体試料であるステロイドは試料の精製法の影響を受けて液体の試料と比較して均質性が悪い傾向があり、均質性の評価は不確かさを評価する上で影響することがある。ステロイドホルモンの均質性評価はクロマトグラフ法 (4.2.1) を用いて成分ごとの含有量を面積値により評価し、クロマトグラフ法では測定が困難な水分についてはカールフィッシャー法 (4.2.2) を用いることで総合的に評価する。このとき、主成分の面積百分率による純度

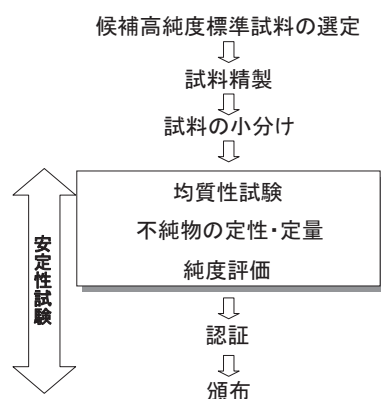


図4 ステロイドホルモン標準物質開発の流れ

について評価することも重要であるが、その他に含まれる不純物に大きな違いが見られないかも確認しなくてはならない。

##### 4.1.2 不純物の定性

定性分析とは測定対象としている物質がどのような化合物であるか明らかにすることである。不純物の定性分析は含まれる不純物の構造や性質について議論する場合や差数法により純度評価を行う場合において重要になる。

不純物の定性における主な分析法としてはクロマトグラフ法 (4.2.1) で分離した成分をそれぞれの標品を用いて保持時間等を比較することで定性するのが一般的である。揮発性成分についてはGC/MS, 不揮発性成分についてはLC/MSやLC/MS/MSを用いて分析する。また、不揮発性成分も誘導体化することでGC測定が可能になり、構造推定や定性が容易になる化合物もある<sup>10)~13)</sup>。

一般的な定性分析の流れとしては質量分析計で得られるマスペクトルから化合物を推定し、入手した標品を分析したクロマトグラフの保持時間、マスペクトル、紫外-可視吸収スペクトルなど物質固有の分析結果を比較して行う。

##### 4.1.3 不純物の定量

定性することができた不純物は標品を用いて定量することができる。ここでの標品としては市販されている高純度試薬の純度を評価したものをを用いる。微量成分の分析では繰り返し測定誤差が大きく、数%~数十%オーダーでばらつくことがある。このため、候補標準物質中に含まれる不純物の定量では、標品純度の不確かさの評価は比較的大きな調製誤差や測定誤差に含まれるために定量値への影響は小さい。

一般的に含まれる不純物としては合成の段階で含まれる副生成物や精製の段階で除去できなかった残留溶媒・水分などが考えられる。不揮発性物質についてはLCを用い、残留溶媒などの揮発性についてはGCを用いてそれぞれ検量線法や同位体希釈法から定量する。また、水分については水分測定法として用いられているカールフィッシャー法 (4.2.2) により定量する。

ステロイドホルモンのように比較的複雑な化学種では全ての不純物の標品を入手することは難しく、全ての不純物を定性することは難しい。そのため、定性できない不純物の定量については各不純物のUVスペクトルにおける極大吸収波長やマスペクトルから得られる分子量を参考にして類似物質であると考え、相対感度も類似していると仮定した評価法を用いることで妥当性の高い定量

値を得ることができると考えられる。例えばUVスペクトルからはその吸収スペクトルから類似構造かどうかを推測することができるために極大吸収波長領域が類似しているものごとに分類し、吸光度が同程度と考えて定量することもできる。また、MSスペクトルからは分子量を推測することができ、主成分とモル吸光係数が同程度であると仮定することで主成分の検量線から定量し、分子量を補正することで妥当な定量値を得られると考えられる。一方、類似しているという測定データが得られない不純物については吸光度やモル吸光係数の相対感度についての実験的な証拠を得ることが難しい。このような不純物については物性が類似した標品から定量分析し、不確かさを大きく見積もるなど、評価法を十分検討する必要がある。また、測定条件により検出されない不純物が存在することもあり、複数の手法を用いて見落としの確認や検出下限を設定して下限以下の不純物を見積もる必要がある。

#### 4.1.4 純度評価

高純度ステロイドホルモン標準物質開発における純度評価では測定原理の異なる複数の手法を用いて値付けを行う。クロマトグラフ法ではGC、LCというように分離条件が異なるだけでなく、検出器として水素炎イオン化検出器 (FID)、紫外-可視吸収スペクトル (UV-vis)、荷電化粒子検出器 (CAD) 等を用いる。また、凝固点降下法として示差走査熱量分析計 (DSC) を用いた純度評価も検討する。複数の評価法で値付けを行うことで特定の測定法では評価されない要因を見落とす可能性が低くなるためにより高い信頼性を得ることができる。実際に開発されているCRMでは複数の手法で値付けられたものが多く、異なる測定法で値付けしたものを総合的に評価することでより高い信頼性を得ることができる<sup>14)</sup>。

特にSIにトレーサブルな一次標準物質開発においては一次標準測定法を用いて値付けすることが望ましい。また、差数法においても各不純物についてSIトレーサな標準液を用いて定量することで主成分の純度値のSIトレーサビリティが確保される。

#### 4.1.5 安定性評価

安定性評価は製造した標準物質の保存条件や有効期間を決定し、品質を確保するために重要であり、「短期安定性」と「長期安定性」をそれぞれ評価する。

短期安定性評価としては輸送中に起こり得る極端な条件下での安定性を確認するために加速試験・過酷試験を行うこともある。これにより輸送条件を決定することが

でき、その結果で標準物質の輸送の前後における品質を保証することができる。さらには加速試験を行うことで長期的な安定性も予想することもでき、有効期限の決定や安定性による不確かさの評価にも参考になる。

また、長期安定性評価は保存条件や認証書の有効期限を確立するために行う。長期安定性評価は一定時間、ある条件下で保管した試料について行い、純度の劣化や不純物の変動がないかについて評価する。

安定性試験でもクロマトグラフ法 (4.2.1) 及びカールフィッシャー法 (4.2.2) が用いられる。クロマトグラフ法では初期評価値に対しての差異を評価し、含まれる不純物の種類や相対的な含量に変動がないかを確認する。また、クロマトグラフ法では含有する水分を測定することができないために吸湿性が問題になる試料では水分測定も安定性評価が必要になる。

## 4.2 標準物質開発に用いられる測定法

ここではステロイドホルモン標準物質開発で必要になると考えられる測定法について記載する。以下には主にステロイド系不純物分析に用いるクロマトグラフ法、水分測定に用いるカールフィッシャー法、一次標準測定法でもある凝固点降下法について記載する。

### 4.2.1 クロマトグラフ法

クロマトグラフ法はステロイド分析において広く用いられている分析法の一つである。この測定法は分子の極性等の違い固定相と移動相に対する相互作用が成分ごとに違うことを利用して、各成分を分離する方法である。各成分を分離してから検出器で測定できるように含まれる不純物分析から成分ごとの定性・定量に利用することができる。移動相として用いる媒体によりGC (ガスクロマトグラフィー) とLC (液体クロマトグラフィー) に分類される。

GCは移動相としてガス (気体) を用い、カラム中に気化させた試料を流し、分離するために揮発性のある物質であれば測定が可能である。このためGCでは試料を加熱して気化させるために不揮発性物質や難揮発性物質、熱分解や熱反応するような成分には適用できないという制約があるが、ステロイドホルモンのような難揮発性物質でも物質によっては誘導体化することで気化するものもあり、目的に応じた試料の導入法を選択することが重要となる。GC分析の際の誘導体化は試料の官能基に対して化学反応させることで試料の沸点や極性を下げ、GC測定を可能にするために用いられる。

実際に誘導体化してGC/MS分析が行われたステロイド

ホルモンも数多く報告されているが、血清中の微量分析に用いられていることが多い<sup>15), 16)</sup>。高純度標準物質を誘導体化して純度評価を行う際には目的試料の同位体を添加して誘導体化することで反応効率を考慮することなく評価できるID法が有効とされている。しかし、ステロイドのように複雑な化合物では同位体試料を入手することが難しいために誘導体化における反応効率を算出した上で不確かさを評価することが要求される。しかし、正確な反応効率を算出することは難しく、誘導体化による分析は不純物の定量分析よりは定性分析に有効であると考えられる。

LCは移動相として液体を用いるために移動相として用いる溶媒に溶解する物質であればほとんど全ての物質の分析が可能であり、数多くのステロイドホルモンについても様々な検出器をLCと組み合わせて分析に利用されている<sup>17)-20)</sup>。

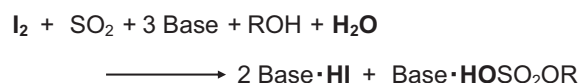
また、固体状態では安定であるが溶液中で扱うことでイオン化してしまう物質や反応して他の物質に異性化するようなもの存在することがある。このような物質を扱う場合には溶媒の選択や調製時の条件設定が重要となる。実際にステロイドホルモン類をLCで測定した例は数多く報告されているが、溶液として扱うために安定に測定できないといったケースも報告されている<sup>21)</sup>。

クロマトグラフ法での検出感度は同じ検出器であっても物質や測定条件により大きく異なることが多く、検出器による感度変動も大きい。また、測定により得られるデータは相対的なものであり、結果は測定条件に依存するために面積値や強度から純度値を評価することは難しい。一方、安定性試験などにおいて試料中に含まれる物質の変動を確認する際には相対値で評価可能であり、成分ごとに分析することなく評価することができるといった利点もある。

このようにクロマトグラフは様々なメリット・デメリットを有しているために、試料や目的に応じた測定法の検討が非常に重要とされる。ステロイドでは難揮発性の物質が多く、GCでは誘導体化が必要であることや前処理を含む定量では同位体ラベルされた標品が必要などの問題点があるためにGCは定性を目的として利用し、定量分析ではLCを利用する。

#### 4.2.2 カールフィッシャー法（水分測定）<sup>22)</sup>

カールフィッシャー法は式1に従い、ヨウ素と水が定量的に反応することを利用して水分量を測定する手法であり、日本薬局方にも記載されていて、広く用いられている。



式1 カールフィッシャー測定法における反応式

カールフィッシャー法には電量法と容量法があるが、電量法は検出感度が非常に高く、数  $\mu\text{g}$  ～数  $10 \text{ mg}$  までの測定が理論上可能とされている。ステロイド分析では少量の試料で測定を行うことが多く、水分の絶対量として微量であるために、カールフィッシャー反応で発生したヨウ化物イオンを電量滴定により定量する電量法を用いるほうが高感度であるために有用である。

測定法としては試料を直接カールフィッシャー試薬に加える直接法と試料を加熱して気化した水蒸気をキャリアーガスによりカールフィッシャー試薬に吹き込む気化法がある。直接法は試料をカールフィッシャー試薬に直接導入するため試薬に加えらる水分としてロスがないが、カールフィッシャー試薬を劣化させてしまう妨害物質などが含まれる場合は問題がある。また、カールフィッシャー試薬に対して溶解性が低い物質では正確に定量することができない場合がある。気化法は試料に対して熱を加えて気化させた水分をカールフィッシャー試薬に吹き込む方法であり、水分のような揮発性成分のみを加えることができるために妨害物質の影響を受けずに水分測定することができる。一方でステロイドのような固体試料では結晶中の水分を気化させるために試料を融解させる必要があり、比較的高温条件で測定しなくてはならないために熱的安定性も必要となる。今回開発するようなステロイドは固体試料であり、直接法ではカールフィッシャー試薬へ溶解するまでに時間がかかることや試料によっては溶解しない可能性もあるために気化法による測定が有効だと考えられる。

また、カールフィッシャー法に使用されるカールフィッシャー試薬は数多くの種類が市販されていて、測定対象となる物質の性質により使い分けることも必要になる<sup>23)</sup>。

以上のようにカールフィッシャー法による水分測定においても試料に適した分析法を用いなくては正確な定量をすることができない。また、反応させることにより定量値を得る測定法であるために反応効率についても考慮する必要がある場合がある<sup>24)</sup>。

#### 4.2.3 凝固点降下法（純度評価）<sup>25)</sup>

凝固点降下法は一次標準測定法として認められており、本法が適用できる場合は、含まれる不純物を定性することなく直接、純度の値付けを行うことができる分析法で

ある。凝固点降下は不純物として含まれる物質質量 (mol) に比例するため、不純物の総物質質量を算出することができる。しかし、この測定法において純度値をg/gで算出するためには試料の平均分子量を利用して算出するために不純物の定性・定量が必要となる。

凝固点降下法では純度が限りなく1に近いと近似した式を用いて算出するために純度が低下するほどこの近似式からの誤差が生じる。また、凝固点降下法では物質を温度変化させるので、熱的に不安定なものは測定することはできない。さらには凝固しにくい物質や固溶体を形成する物質では正確な測定値を得られない。また、昇華性のある物質や揮発成分を比較的多く含む物質などは繰り返し測定を行う際に試料の状態が変わってしまうために再現性が得られないという結果になることもある。

このように一次標準測定法であり、直接的に純度を求めることができる(単位はmol/mol)利点もあるが、測定できる試料の種類は制約される。

#### 4.2.4 差数法

差数法とは不純物の定量値の合計を全体から差し引くことで間接的に試料の純度を求める手法である。差数法では水分測定、GC、LCなど複数の測定法で得られたデータについて、各不純物に適した分析法で測定した不純物の定量値を用いる。なお、差数法においてもそれぞれの不純物の値にSIトレーサビリティが確保されることで、主成分の純度値に対してもトレーサビリティが確保される。この際の純度値に対する不確かさは各不純物の定量値の相対標準不確かさを合成して算出される。

差数法の問題点としては、定性できない不純物は類似した特性をもつ(測定する検出器での検出感度が近い)化学種と仮定して定量するしかないために不確かさが大きくなることや、一つ一つの不純物を評価していくために含まれる不純物が多いほど時間と手間がかかるということが挙げられる。

## 5. まとめ

本調査研究では、臨床医学上重要とされているステロイドホルモン標準物質の開発・供給状況について調べると共にステロイドホルモン標準物質開発に必要とされる開発法・測定法についてまとめた。

開発や供給状況について調査した結果、臨床検査ではステロイドホルモンが一般的に測定対象にされているにもかかわらず、標準物質の開発が遅れている。

従ってステロイドホルモン標準物質の開発・供給は重

要な課題であり、SIトレーサブルな標準を開発・供給していくことにより臨床検査における正確性や医療機関の間での整合性が確保され、社会の安心・安全へと繋がっていくと考えられる。

本調査研究においては純度測定の際によく使用される測定法についてのみ報告したが、ステロイドホルモン類は複雑な分子構造を持ち、不純物の定性・定量が困難であると予想されるために様々な測定法によるアプローチが必要になってくると考えられる。特に測定法によっては検出されない不純物もあるために複数の手法で分析することでより、正確な評価が可能となる。さらには不純物の定性ができない場合や標品が入手できない場合における、特性値の評価法も大きな課題であり、未定性不純物をどう評価するかで特性値も変わってくると予想されるために測定法・評価法を総合的に考慮して純度評価を行う必要があると考えられる。

## 参考文献

- 1) IFCC(International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 国際臨床化学連合)、<http://www.ifcc.org/>
- 2) WHO(World Health Organization, 世界保健機構)、<http://www.who.int/en/>
- 3) ILAC(International Laboratory Accreditation Cooperation, 国際認定所認定機構)、<http://www.ilac.org/>
- 4) JCTLM(Joint Committee on Traceability of Laboratory Medicine, 検査医学のトレーサビリティに関する合同委員会)、<http://www.bipm.org/en/committees/jc/jctlm/>
- 5) BIPM(Bureau International des Poids et Mesures, 国際度量衡局)、<http://www.bipm.org/en/home/>
- 6) 今日の臨床検査(株式会社南江堂, 1987年8月1日発行)
- 7) 臨床生化学診断法(株式会社金芳堂, 1953年3月5日発行)
- 8) UK NEQAS,  
<http://www.ukneqas.org.uk/content/Pageserver.asp>
- 9) JCTLM-database: Laboratory medicine and in vitro diagnostics. <http://www.bipm.org/jctlm/>
- 10) M.Makita and W.W.Wells, Anal. Biochem., 5, 523, 1963.
- 11) N.Sakauchi and E.C.Horning, Anal. Lett., 4, 41, 1971.
- 12) G. Phillipou, D. A. Bigham and R. F. Seamark., Steroids, 26, 516, 1975.
- 13) C.W.Brooks and B.S.Middleditch, Clin. Chim. Acta, 34, p145, 1971.

- 14) B.King, S.Weatwood, J. Anal. Chem., 370, 194, 2001.
- 15) B.G.Wolthers, G.P.B.Kraan, J. Chromatogr. A, 843, 274, 1999.
- 16) Lefteris C.Zacharia, Raghvendra K.Dubey, Edwin K.Jackson, Steroids, 69, 255, 2004.
- 17) Richar L.Tacey, Warren J.Harman and Laura L. Kelly., J. Pharm. Biomed. Anal., 12, 1303, 1994.
- 18) Xing-Fang Li, Mingsheng Ma, Agatha Cheng, Jenny Zheng, Yun K.Tam., Anal. Chem. Acta., 457, 165, 2002.
- 19) Vladimir V.Tolstikov, Arjen Lommen, Kazuki Nakanishi, Nobuo Tanaka, and Oliver Fiehn., Anal. Chem. 75, 6737, 2003.
- 20) Michael Pschlusener and Kai Bester, Rapid Commun. Mass Spectrom. 19, 3269, 2005.
- 21) Lucie Havlikova, Kucie Novakova, Ludmila Matysova, Jan Sicha, Petr Solich, J. Chromatogr. A, 1119, 216, 2006.
- 22) Karl Fischer, Angew. Chem., 48, 394, 1935.
- 23) D.M.Smith, W.M.Bryant and J.Mitchell, Jr., J. Am. Chem. Soc., 61, 2407, 1939.
- 24) J.C.Verhoef, E.Barendrecht, Analytical Chimica Acta, 94, 395, 1977.
- 25) E.F.Palermo and Jen Chiu, Thermochemica, 14, 1, 1976.