OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

| | |
|---|---|
| Title | 高速液体クロマトグラフィー用電気化学検出器の開発と生体微量分析への応用 |
| Author(s) | 池谷, 理 |
| Citation | 大阪大学, 1981, 博士論文 |
| Version Type | |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/33132 |
| rights | |
| Note | 著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。 |

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

【8】

| | |
|---|---|
| 氏名・(本籍) | 池谷　理 |
| 学位の種類 | 薬学博士 |
| 学位記番号 | 第　5349　号 |
| 学位授与の日付 | 昭和56年5月11日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第5条第2項該当 |
| 学位論文題目 | **高速液体クロマトグラフィー用電気化学検出器の開発と生体微量分析への応用** |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 枡井雅一郎<br>(副査) 教授 佐々木喜男　教授 冨田　研一　教授 田村　恭光 |

## 論文内容の要旨

### 緒　論

近年高速液体クロマトグラフィー（HPLC）は，分析化学のみならず有機化学，生化学，臨床化学など広範囲な分野で使用されている。それに伴いHPLC用検出器も示差屈折（RI）紫外（UV），蛍光検出器（FD）などの光学的検出器が開発されてきた。しかしHPLCの対象とする物質は，非常に広範囲であり，これらの検出器のみでは，感度や選択性の点で不充分でより高感度で高選択性のある検出器の出現が望まれてきた。

電気化学検出器（ECD）は，電気化学的活性物質に対し高感度，高選択的な検出器と成り得ることから，今までカーボンペースト[1]やカーボン含浸シリコーンゴム，[2]白金[3]などを電極材質として電極が開発されてきた。しかしこれらのＥＣＤは，アルコールなどの移動相中では使用できなかったり，被験物質の電極への吸着が起ったりする問題点をもっていた。

著者は，電極としてグラシーカーボン，参照電極として耐溶媒性のあるメチルセルローズAg/AgCl電極につき，その電極特性を検討したところ，この電極は，高感度でかつ定量性に優れHPLCに応用可能であることが判明した。さらに試作した検出器を用いて生体物質のHPLCによる分析法を検討したところ，本ECDが生体中に存在する微量の成分を迅速かつ特異的に定量する際のHPLCの検出器として有用であることが判明した。

### 本　論

#### 第1章　電気化学検出器の構造と特性

電気化学検出器は，3極式ポテンシオスタットと電極部から成っている。著者が検討した電極部を

Fig. 1 に示す。Aの構造は，参照電極と電極（グラシーカーボン）の距離が離れているためセル抵抗（100KΩ）が大きく，ダイナミックレンジが狭い。Bは，セル容量が大きく拡散が生じやすく感度も低い。Cの構造は，セル容量（3$\mu l$），セル抵抗（22KΩ）とも小さい。

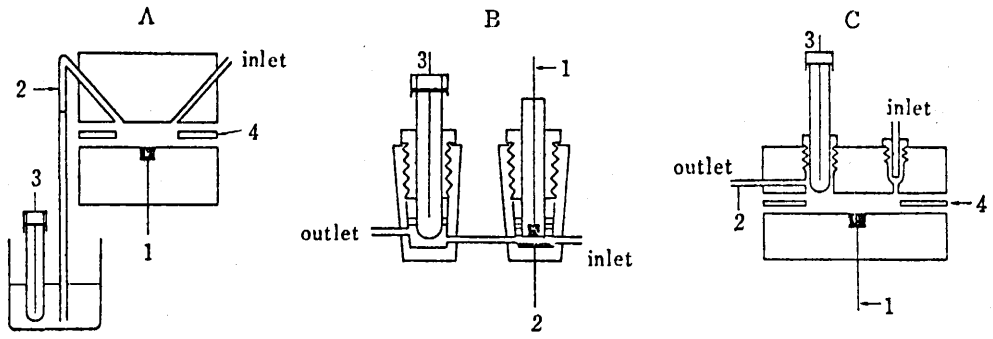


Fig. 1. Constructions of Electrochemicel Detector Cells
1: glassy carbon working electrode.
2: auxiliary electrode.
3: reference electrode (Ag/AgCl).
4: Teflon spacer.

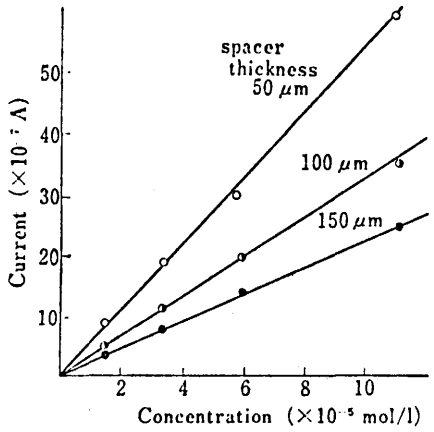


Fig. 2. Dependence of Current upon DA Concentration under Various Spacer Thickness
Flow rate, 0.75ml/min

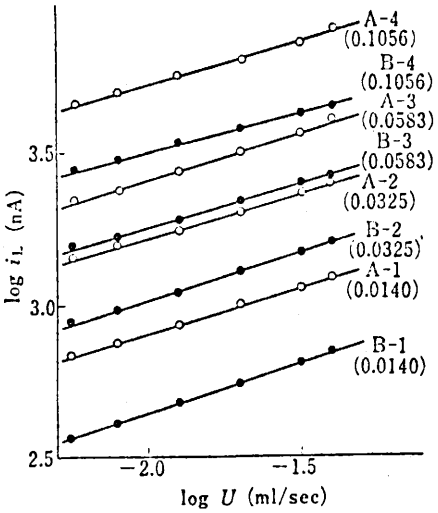


Fig. 3. Dependence of Current upon Flow Rate at Various DA Concentration
A-1—A-4; spacer thickness 50$\mu$m.
B-1—B-4: spacer thickness 100$\mu$m.
Parentheses in figure show the concentration ($m_M$ /1).

Cの電極についてテフロンスペーサの厚さと移動相中のドーパミン（DA）濃度との関係をFig. 2に示した。50$\mu$mのスペーサは，100$\mu$mに比べ1.7倍感度が高かった。しかし25$\mu$mでは，セル内圧が高くなり液漏れが生じた。また参照電極はアセトニトリル・メチルセルロース・$NaClO_4$混液中Ag/AgCl電極としたところエタノール中でも1年以上の寿命があった。また電極の大小は感度に大きな影響を及ぼさなかった。

Fig.3は流速（log U）と電流値（log$i_L$）の関係を示した。Fig.3のグラフの傾きは電極構造によって定まり,[4] 本電極の場合0.3であることからBlaedel[5] らの円筒状電極の特性に類似していると考えられる。

また本電極の電解効率は，2～3％であることからアンペロメトリー型の検出器である。最小検出感度（S/N＝2）は，ノルエピネフリン（NE），DAでそれぞれ5，10pgであり注入量50pg～1$\mu$gの間で直線性が認められた。

Fig.4は，NE，エピネフリン（E），DAなど40pg注入時のクロマトグラムである。本検出器は，HPLC-FD法のようにカテコールアミンの種類による感度の差はみられなかった。[6] 本電極の再現性の変動係数は，2～3％であり定量性においてもほとんど問題はなかった。

以上のことより，電極—グラシーカーボン，スペーサの厚さ50$\mu$m，電極面積—0.022cm$^2$，セルブロック—ダイフロンを使用したFig.1-Cの電極を以後の実験に使用した。

第2章　生体モノアミン分析への応用

まず水系での適用性を調べる目的で中枢神経刺激伝達物質と考えられるモノアミン（カテコールアミンのNE，DAおよびセロトニン（5-HT）への応用を検討した。今まで1個体の脳中のNE，DA，5-HTの定時定量法に関しては全く報告されていない。著者はこれら3成分のHPLC-ECDによる同時定量法について検討した。

Fig.5はマウス全脳からブタノール抽出法により抽出したモノアミンのクロマトグラムである。設定電位が0.8V（A）では，5成分のピークが検出されるが，0.6Vではチロシン（Tyr）のピークは消失し，DAの定量を妨害しない。

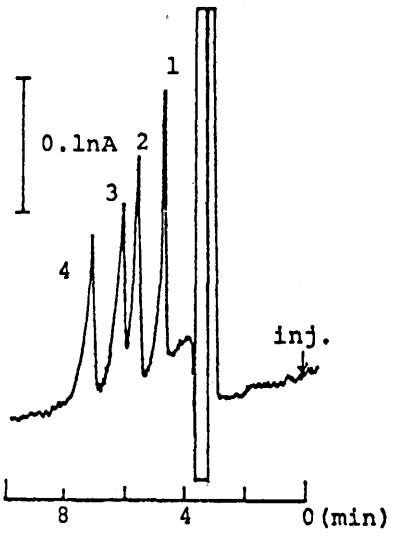


Fig.4. Chromatogram of Catecholamines
1; NE (40pg), 2; E (40pg),
3; DHBA (40pg), 4; DA (40pg)

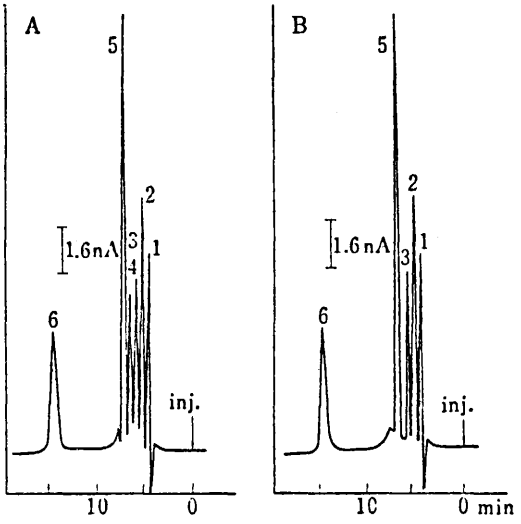


Fig.5. Chromatograms of Monoamines in Whole Mouse Brain
Column; LiChrosorb RP-18 (10$\mu$m), 25cm×4.6mm I.D.
Mobile phase; 1% tetrahydrofuran-pH 5.1buffer.
Applied potential; A, 0.8 V *vs.* Ag/AgCl,
B, 0.65 V *vs.* Ag/AgCl.
Flow rate; 0.77 ml/min.
1; solvent, 2: NE, 3: DHBA, 4: Tyr, 5: DA, 6: 5HT.

ECDは設定電位により検出ピークの選択が可能である。また1%のテトラヒドロフランの移動相への添加は，5-HTの保持時間を短縮するのに効果があった。

Table 1には，内部標準法（DHBA）によるマウス全脳（約400mg）および小脳（約40mg）中のNE, DA, 5-HT量を示した。これらは，Welch[8]らの蛍光法（各成分を別個に測定）の値とほぼ一致した。

Table 1. NE, DA and 5HT Concentration in Whole Mouse Brain and Mouse Cerebellum

| Tissue | Investigators | Assay procedure | NE (ng/g) | DA (ng/g) | 5HT (ng/g) |
|---|---|---|---|---|---|
| Whole mouse brain | Present paper | HPLC | 430±10[a] (28) | 872±22 (28) | 749±20 (28) |
| | Sasa and Blank[7] | HPLC | — | 973±16 (40) | 805±12 (40) |
| | Welch and Welch[8] | Fluorometry | 350—450 (1000) | 700—900 (1000) | 600—800 (1000) |
| Mouse cerebellum | Present paper | HPLC | 259±19 (7) | 16±3 (7) | 240±21 (7) |
| | Sasa and Blank[7] | HPLC | — | 19±2 (6) | 240±14 (6) |

*a*) The values are expressed as the mean±standard error of mean for the number of animals in parentheses.

Table 2は，レゼルピン（RP. 2.5mg/kgi.p.），α-メチルチロシン（α-MT, 250mg/kgi.p.）投与後18時間，4時間後の脳中モノアミンの変動を示した。RP投与では，カテコールアミン系およびセロトニンとも非常に減少している。チロシン水酸化酵素阻害剤であるα-MTでは，NE，DAのみが選択的に減少しておりセロトニンには，影響を及ぼさない。このように本法を応用することにより薬物作用などの研究も簡便に行うことができる。

Table 2. Brain Monoamines Levels after Intraperitoneal Injection of Various Drugs (Mouse)

| | NE(ng/g) | DA(ng/g) | 5-HT(ng/g) |
|---|---|---|---|
| Normal | 430±10[a] (28) | 872±22 (28) | 749±20 (28) |
| Reserpine (2.5mg/kg,i.p) | 8.1±2.3 (8) | 17.4±3.4 (8) | 60.5±5.2 (8) |
| α-methyl-p-tyrosine (250mg/kg,i.p) | 253±9 (6) | 362±12 (6) | 722±13 (6) |

a) The values are expressed as the mean ± standard error of mean for the number of animals in parentheses.

さらに尿中カテコールアミン，血中セロトニン[9]やD, L-DOPAの光学分割などに対しても高感度分離分析が可能であることが判った。

第3章　脂溶性ビタミンE（トコフェロール），ビタミンK（フィロキノン）およびユビキノン分析への応用

本検出器がアルコールなどの有機溶媒移動相中でも安定に使用できるかを調べる目的で，脂溶性物質のトコフェロール（TP)フィロキノン（PQ)，ユビキノン-10（UQ-10）の血中定量法を検討した。

アルコールなどの電導性の低い移動相では，支持電解質（$NaClO_4$など）を添加しなければならない。Fig. 6のTPなどの被酸化性物質に対する$NaClO_4$濃度とピーク感度および保持時間の関係から，支持電解質濃度0.05Mが最適であった。同様の関係がPQ，UQ-10などの被還元性物質においてもみられた。

本法による最小検出感度は，$\alpha$-TP，PQ，UQ-10に関して50，100，200pgであり高感度であった。

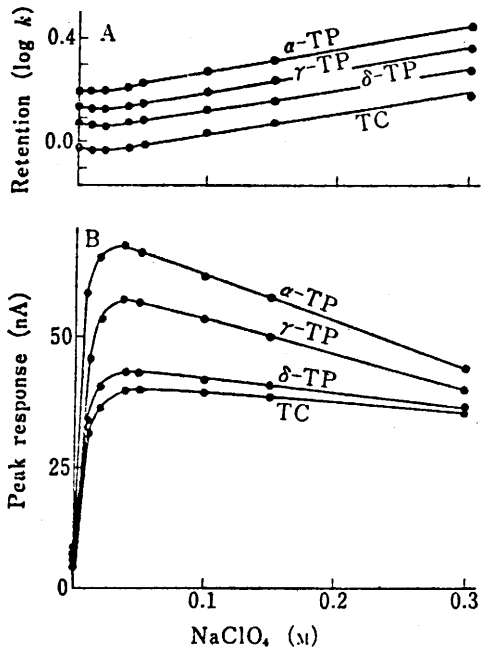


Fig. 6. Dependence of Retention (A) and Peak Response (B) upon $NaClO_4$ Concentration in the Mobile Phase

Column; Nucleosil C-18 (10$\mu$m), 25cm×4.6mmI. D.
Mobile phase; methanol.
Applied potential; 0.7 V *vs.* Ag/AgCl.
Flow rate; 4.44 ml/min.
Injected amount (ng): $\alpha$-TP, 74.6; $\gamma$-TP, 47; $\delta$-TP, 34.6; TC, 33.

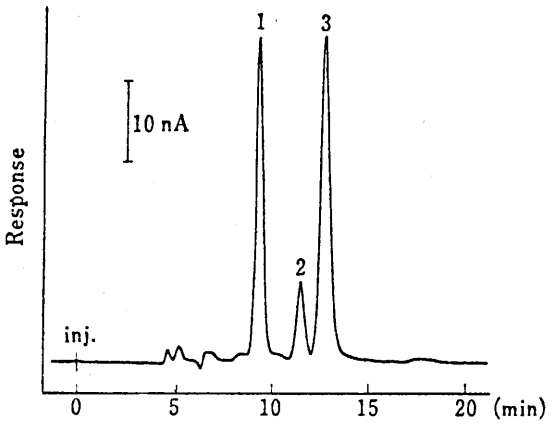


Fig. 7. Chromatogram of Tocopherols in Human Serum

Column; Nucleosil C-18(10$\mu$m), 25cm×4.6mm I. D.
Mobile phase; 0.1% pyridine-methanol (containing 0.05M $NaClO_4$).
Applied potential; 0.7 V *vs.* Ag/AgCl.
Flow rate; 0.75 ml/min.
1: TC, 2: $\beta$-or $\gamma$-TP, 3: $\alpha$-TP

Fig. 7は，人血清中のTPを内部標準物質(TC)を加えたのちエタノール・ヘキサン混液より抽出したクロマトグラムである。移動相に0.1%ピリジン添加により，分離能の改善と限界電流値の低下がみられた。また本法は，吸着カラムを使用したHPLC-FD[10]法の結果と定量値は一致した。

また，被還元物質であるPQやUQ-10の生体分析においては，移動相に$HClO_4$などのプロトン溶媒を添加することにより還元電位が低下し，高感度分析が可能となった。

Fig. 8は人血漿中のUQ-10をHPLC-UV法とHPLC-ECD法によって測定した図である。UV法では，ピーク2の$\beta$-カロチン様物質の妨害がみられ，ECDでは，それらは検出されずUQ-10と内部標準物質（TQ-10）が高感度に分離されている。

またPQの経口投与後（1 mg/kg）のラット血漿中濃度も高感度に測定できPQの血中消失速度定数

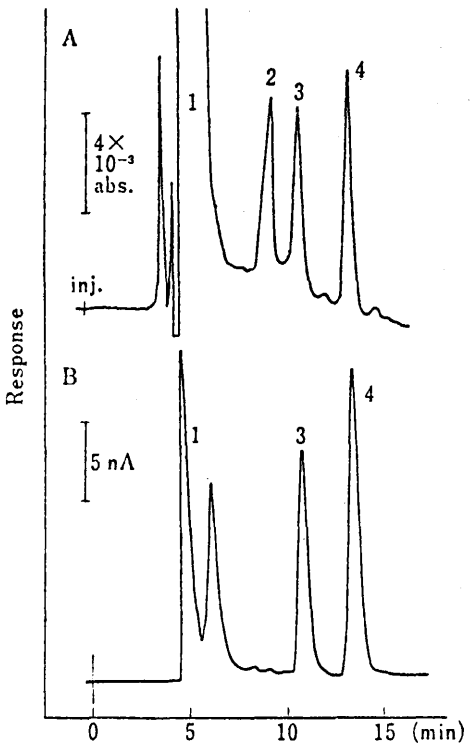


Fig. 8. Chromatograms of Ubiquinone-10 in Human Serum
Column; Nucleosil C-18 (10$\mu$m), 25cm×4.0 mm I. D.
Mobile phase; $HClO_4$ (70%) ethanol (1: 999, containing 0.05$_M$ $NaClO_4$).
Applied potential; −0.30 V *vs.* Ag/AgCl.
Flow rate: 0.55 ml/min.
1: unknown, 2: unknown, 3: UQ-10, 4: TQ-10
A, HPLC-UV (275nm).
B, HPLC-ECD.

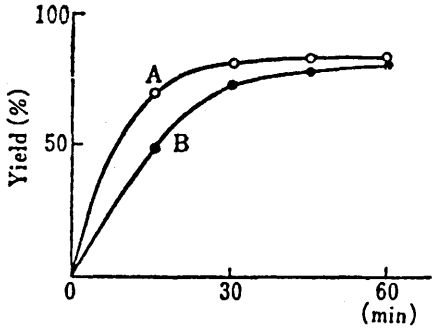


Fig. 9. Reaction of Stearic Acid with *p*-Aminophenol
A; at 60°(procedure A).
B; at 25°(procedure B).

は，0.33hr$^{-1}$，消失の半減期は，2.1hrであった。

これら血中UQ-10，PQの濃度を他法と比較したところ，ほとんど差がなかったことから，本法はこれら脂溶性の酸化・還元物質の分析にも十分適用できることが判った。[11]

第4章　電気化学的活性誘導体化による脂肪酸，胆汁酸，プロスタグランジン分析への応用

著者は，HPLC-ECDの高い選択性と感度に着目し電気化学的不活性物質にも適用することを目的としてカルボン酸のＥＣＤ誘導体化について検討した。

カルボン酸の電気化学的活性誘導体試薬としてp-アミノフェノール（AP）を選び2-bromo-1-methylpyridinium iodide（BMP）[12]を触媒とし３級アミン存在下で反応させたところカルボン酸のp-hydroxyanilide（HA）体が生成した。

Fig. 9は，60°浴槽および25°超音波槽中でのp-hydroxystearanilide（HSA）の生成を示した。30～40分で反応は一定に達する。ステアリン酸の反応混液中の濃度が10n mole～1$\mu$ mole 範囲の場合反応時間を一定にすれば，溶質濃度とクロマトグラムのピーク高さに直線関係があった。同様にラウリン酸，コール酸においても認められた。

またHSAの陽極反応は，Chart 1に示す通りであることが電解酸化数や電解生成物の結果から確かめられた。本反応は，p-hydroxybenzanilide[13]の陽極酸化反応と同一であった。

Fig. 10および11は，標準脂肪酸およびプロスタグランジンのクロマトグラムであり本法は，比較的

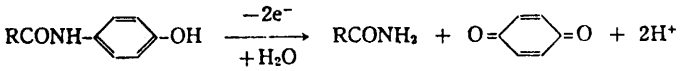


Chart 1

高感度にこれらの物質を分離検出できる。

さらに血清中遊離脂肪酸の分析や胆汁中胆汁酸の分析にも適用可能であった。Fig. 12は，ケノデオキシコール酸（CDCA）1日400mg，21日間投与後の人胆汁中胆汁酸のクロマトグラムである。HPLC-ECDとGC-MSによる結果を比較したところ両者は，ほぼ一致した。（Table 3）

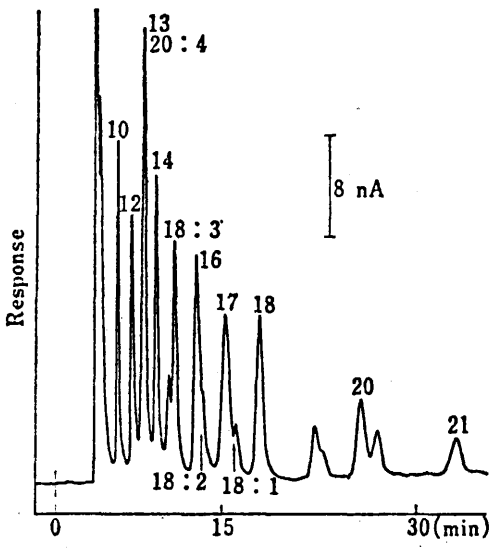


Fig. 10. Chromatogram of *p*-Hydroxyanilides of Fatty Acids

Column; Nucleosil C-18 (10$\mu$m), 25cm× 4.6 mm I. D.
Mobile phase; methanol-$H_2O$-pyridine (900: 100: 1, containing 0.05$_M$ $NaClO_4$).
Applied potential; 0.7 V *vs.* Ag/AgCl.
Flow rate; 1.2ml/min.
Injection amount; $C_{10}$—$C_{21}$ acids, 30—110ng.
The numbers in the figure represent the ratio (number of carbon atoms): (number of double bonds) for fatty acids.

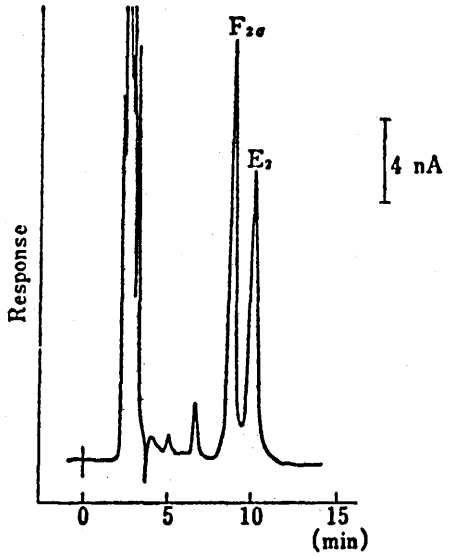


Fig. 11. Chromatogram of *p*-Hydroxyanilides of Prostaglandins $F_{2\alpha}$ and $E_2$

Column; Nucleosil C-18 (10$\mu$m), 25cm×4.6mm I. D.
Mobile phase; methanol-$H_2O$-$HClO_4$ (600: 400: 1, containing 0.05$_M$ $NaClO_4$).
Applied potential; 0.7 V *vs.* Ag/AgCl.
Flow rate; 1.1ml/min.
Amount injected (ng): $F_{2\alpha}$; 95, $E_2$; 85.

以上のように，電気化学的不活性なカルボン酸も電気化学的活性誘導体化によって本法の適用が可能となる。[14]

## 第5章　臓器およびミトコンドリア中の酸化型還元型ユビキノンの同時定量

著者は，本法により内因性のUQがミトコ

Table 3. Concentration of Bile Acids in Human Bile determined by Two Methods[a]

| Bile acid | HPLC (mg/ml) | GC-MS (mg/ml) |
|---|---|---|
| Cholic acid | 2.4 | — |
| Chenodeoxycholic acid | 30.2 | 33.9 |
| Deoxycholic acid | 5.6 | 5.3 |
| Lithocholic acid | 1.2 | — |

*a*) A volunteer was given orally 400 mg/day of chenodeoxycholic acid for 3 weeks.

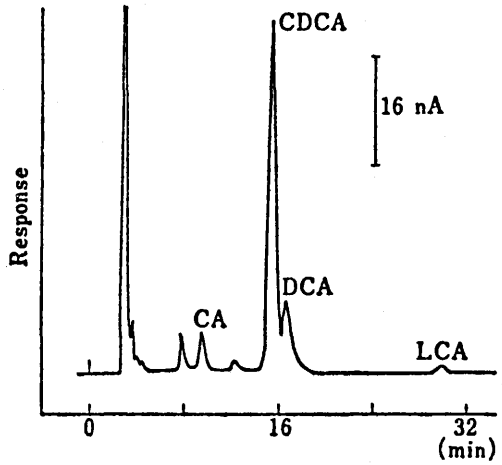


Fig. 12. Chromatogram of Human Bile after Oral Administration of Chenodeoxycholic Acid
Column; Nucleosil C-18 (10$\mu$m), 25cm×4.6 mm I. D.
Mobile phase; methanol-$H_2O$-$HClO_4$ (750: 250: 1, containing 0.05$_M$ $NaClO_4$).
Applied potential; 0.75 V *vs.* Ag/AgCl.
Flow rate; 0.9ml/min.

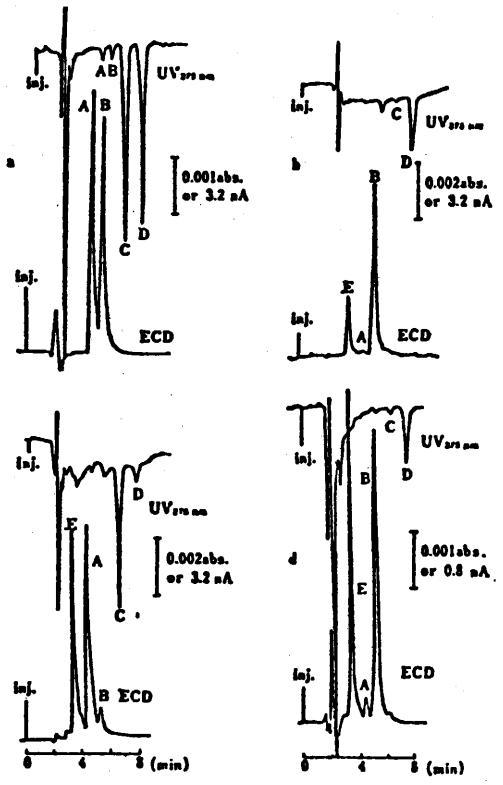


Fig. 13. Charomatograms of Reduced and oxidized Ubiquinones
Column; Nucleosil C-19 (5$\mu$m), 15cm×4 mm I. D.
Mobile phase; ethanol-methanol-70% $HClO_4$ (700: 300:1, containing 0.05$_M$ $NaClO_4$).
Flow rate; 1.2ml/min.
Detection; UV, 275nm; ECD, 0.7V *vs.* Ag/AgCl.
a, standard (amount injected; 56 ng of each UQ); b, guinea pig heart; c, rat heart; d, nutochondrial fraction of guinea pig heart.
Peak A, $UQ_9H_2$; peak B, $UQ_{10}H_2$; peak C, $UQ_9$; peak D, $UQ_{10}$; peak E, tocopherols and others.

ンドリアだけでなく各臓器中において酸化型UQが一定の比率で存在することを初めて明らかにするとともに，HPLC-UVおよびECDの併用による分離定量法を検討した。Fig. 13-aおよびbは，モルモットおよびラット心臓からエタノール・*n*-ヘキサン（2：5）混液により抽出した酸化型・還元型UQのクロマトグラムである。酸化型UQは，UV 275nm，還元型UQは，ECD 0.7Vで検出した。Fig. 13のbのピークBおよびDは，Table 4に示したようにそれぞれ$UQ_{10}H_2$，$UQ_{10}$であると同定した。また抽出条件や保存条件を検討したところホモジネート1ml当りエタノール・*n*-ヘキサン（2：5，ml）混液による直接抽出法が良好であり，抽出物は溶媒留去し窒素気流中で保存することにより酸化型—還元型UQの比率は2日間変化しない。

Table 5には，総UQ量に対する還元型UQ量を示した。動物の種類や臓器ごとに酸化型・還元型の比率は異っていたが同じ種類の臓器では大きな変動はなかった。これらの比率の生理的意義は，今後虚血などの実験的病態動物の値などと比較検討していく必要があると考える。

さらに本法は，少量のミトコンドリア（15$\mu$g protein）で酸化型還元型UQが高感度に測定できることからコハク酸・ユビキノン還元酵素やNADH・ユビキノン還元酵素の活性測定にも応用できる。[15]

Table 4. Chemical and Physical Data for Ubiquinones from Guinea Pig Heart

| | | Peak B[a] | Peak D[a] |
|---|---|---|---|
| HPLC[b] | ($t_R$, min) | 5.4 | 7.6 |
| TLC[c] | ($Rf$) | 0.29[e] | 0.40 |
| $E_p$[d] | (V *vs.* Ag/AgCl) | 0.70 | −0.40 |
| UV | ($\lambda_{max}$, nm) | 290 | 275 |
| MS | (*m/e*) | $M^+$ 948, $M^+$−acetyl 905, $M^+$ 862 $M^+$−diacetyl 862 | |
| Identification | | $UQ_{10}H_2$ | $UQ_{10}$ |

*a*) Peaks B and D are the same as in Fig
*b*) HPLC conditions were the same as in Fig.
*c*) HPTLC Silica Gel 60 $F_{254}$ (E. Merck, Germany), *n*-hexane–isopropyl ether (1: 1), $UV_{254nm}$.
*d*) Peak potential obtained from the hydrodymanic voltammogram.
*e*) Diacetate of peak B.

Table 5. Contents of Reduced and Oxidized Ubiquinones in Animal Tissues

| Animal | Tissue | Content (μg/g) | | | | | Total $UQ_{Red}$[b] / Total UQ (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $UQ_9H_2$ | $UQ_9$ | $UQ_{10}H_2$ | $UQ_{10}$ | Total UQ[a] | |
| Guinea pig | Heart (11) | 5.2±1.6[c] | 7.7±1.5 | 82.3±11.7 | 114.7±10.72 | 210.0±21.2 | 41.6±3.1 |
| | Liver (7) | 1.9±0.4 | 1.5±0.5 | 32.8±6.3 | 24.2±2.4 | 60.5±7.8 | 57.2±3.8 |
| | Kidney (5) | 6.6±0.7 | 3.7±0.2 | 109.6±20.4 | 52.1±6.8 | 172.1±27.0 | 67.4±2.0 |
| | Adrenal (4) | 3.6±0.3 | 2.2±0.3 | 48.8±6.9 | 35.6±4.4 | 89.9±11.0 | 58.1±1.9 |
| | Brain (4) | Trace | Trace | 10.4±2.7 | 16.0±2.7 | 23.9±0.9 | 43.8±9.0 |
| Rat | Heart (4) | 76.5±6.6 | 156.9±7.7 | 5.0±0.5 | 13.3±1.1 | 251.6±18.9 | 32.4±2.5 |
| | Kidney (4) | 71.5±2.0 | 108.9±8.9 | 10.1±0.4 | 15.6±1.4 | 206.1±19.5 | 39.8±2.1 |

*a*) Total UQ is the sum of $UQ_9H_2$, $UQ_9$, $UQ_{10}H_2$ and $UQ_{10}$.
*b*) Total $UQ_{Red}$ is the sum of $UQ_9H_2$ and $UQ_{10}H_2$.
*c*) The values are means±standard errors of the means for the numbers of animals in parentheses.

Table 6にはミトコンドリアに上述の酵素の基質（コハク酸，リンゴ酸）を添加したときの酸化型・還元型UQの変動を示した。

Table 6. Reduced and Oxidized Ubiquinone-10 Levels in the Heart Mitochondrial Fraction of Guinea Pigs

| | Expl-1[a] | Expl-2[b] |
|---|---|---|
| Total $UQ_{10}$[c] (μg/mg of protein) | 3.75 | 3.75 |
| $\frac{UQ_{10}H_2}{\text{Total } UQ_{10}}$ (%) | | |
| Only buffer | 3.9 | 3.2 |
| Added succinate | 45.2 | 43.1 |
| Added malate | 44.6 | 19.1 |

*a*) Fresh mitochondrial fraction of a guinea pig.
*b*) Aged mitochondrial fraction(−20° for 1 day).
*c*) Total $UQ_{10}$is the sum of $UQ_{10}H_2$ and $UQ_{10}$.

本法は，種々の検出器との併用により適用範囲をよりいっそう広げることが可能である。

## 結　論

1．耐溶媒性に優れた高感度な高速液体クロマトグラフィー用電気化学検出器を開発した。

2．本法による脳中ノルエピネフリン，ドーパミン，セロトニンの同時定量法を確立するとともに，尿中カテコールアミン，血中セロトニンの定量にも適用した。

3．有機溶媒中でのビタミンE，ビタミンK，ユビキノンの測定条件を検討するとともに，それらの血中濃度測定法も確立した。

4．脂肪酸，胆汁酸，プロスタグランジンなど電気化学的に不活性物質は，p-hydroxyanilide誘導体とすることにより，本法による高感度分離分析が可能となった。

5．動物臓器中に酸化型ＵＱだけでなく還元型ＵＱも存在することを見いだすとともに，本法とＵＶ法との併用による同時定量法を確立した。

引用文献


1) P. T. Kissinger, C. Refschauge, R. Dreiling, and R. N. Adams, Anal. Letters, **6**, 465 (1973).

2) P. L. Joynes and R. J. Maggs, J. Chromatogr. Sci., **8**, 4 27 (1970).

3) A. MacDonald and P. D. Duke, J. Chromatogr., **83**, 331 (1973).

4) Z. Feher, G. Nagy, K. Toth, and E. Pungor, Analyst, **99**, 699 (1974).

5) W. J. Blaedel, C. L. Olson, and L. R. Sharma, Anal. Chem. **35**, 2100 (1974).

6) K. Mori, Ind. Health, **12**, 171 (1974).

7) S. Sasa and B. L. Blank, Anal. Chem., **49**, 354 (1977).

8) A. S. Welch and B. L. Welch, Anal. Biochem., **30**, 161 (1969).

9) S. Ikenoya, T. Tuuda, Y. Yamano, Y. Yamanishi, K. Yamatsu, M. Ohmae, K. Kawabe, H. Nishino, and T. Kurahashi, Chem. Pharm. Bull., **26**, 3530 (1978).

10) a) K. Abe, M. Ohmae, and G. Katsui, Vitamins (Japan), **50**, 453 (1976); b) K. Abe and G. Katsui, ibid., **49**, 259 (1976).

11) S. Ikenoya, K. Abe, T. Tsuda, Y. Yamano, O. Hiroshima, M. Ohmae, and K. Kawabe, Chem. Pharm. Bull., **27**, 1237 (1979).

12) a) K. Saigo, M. Usui, K. Kikuchi, E. Shimada, and T. Mukaiyama, Bull. Chem. Soc. Japan, **50**, 1863 (1977). b) E. Bald, K. Saigo, and T. Mukaiyama, Chem. Lett., 1163 (1975).

13) S. Ikenoya, M. Masui, H. Ohmori, and H. Sayo, J. Chem. Soc., Perkin Ⅱ, 1974, 571.

14) S. Ikenoya, O. Hiroshima, M. Ohmae, and K. Kawabe, Chem. Pharm. Bull., in press

15) a) K. Katayama, M. Takada, T. Yuzuriha, K. Abe, and S. Ikenoya, Biochem. Biophys. Res. Commun., 95, 971 (1980); b) S. Ikenoya, M. Takada, Takada, T. Yuzuriha, K. Abe, and K. Katayama, Chem. Pharm. Bull., **29**, 158 (1981).

## 論文の審査結果の要旨

本研究は，電気化学的に活性な物質を高感度，選択的に検出でき，耐溶媒性に優れた高速液体クロマトグラフィー用電気化学的検出器を開発するとともに，種々の生体微量分析法を確立したものである。

生体物質の分析としては，中枢神経刺激伝達物質と考えられる生体モノアミンの簡便かつ高感度な同時定量法を確立し，薬理学的研究にも適用できることを明らかにした。またビタミンE，Kおよびユビキノンなどの脂溶性物質の有機溶媒中での測定条件を検討し，それらの血中定量法を確立するとともに，脂肪酸，胆汁酸，プロスタグランジンなどの電気化学的不活性物質の電気化学的活性体に誘導しての高感度分析の道を開いた。さらに本検出器により動物臓器中に酸化型ユビキノンだけでなく還元型ユビキノンも存在することを初めて見いだすとともに，これら物質の臓器およびミトコンドリア中での同時定量法を確立した。

以上の業績は学位論文に値するものと認める。