

《日本分析化学会 2006 年度学会賞受賞記念》

機能性試薬の創製と化学分析の自動化に関する研究

Development of Novel Chemical Reactions and its Applications to Automated
Chemical Analysis

酒井忠雄

T. Sakai

Abstract New chemical reactions based on ion association formation with a monoprotic acid dyestuff, thermochromism of ion associates with amines, stepwise titration with ion association ability and water-soluble color and fluorescence reactions were proposed. And also, flow injection analyses (FIA) coupled with novel chemical reactions mentioned above have been developed for the analyses of pharmaceuticals, toxic air pollutants and physiological substances. Moreover, the automated flow-based techniques were proposed for the rapid, reproducible, less reagents consumption and sensitive analysis using newly designed apparatus. The proposed technologies are available in food science, control of industry waste water, environmental chemistry, pharmaceutical and agricultural chemistry.

These researches described here were awarded by Japan Society for Analytical Chemistry on September 21, 2006.

1. はじめに

イオン会合反応には、親水性イオン会合と疎水的イオン会合が古くから知られている。前者は含水性イオンが静電的に会合し、沈殿を生成する。また後者はバルキーな疎水性イオン間の会合に基づくもので、特にイオン会合抽出に用いられる。例えば、Fe(II)は1,10-フェナントロリン (phen) と 1:3 錯体 $[\text{Fe}(\text{II})(\text{phen})_3^{2+}]$ を形成し、赤色錯陽イオン ($\lambda_{\text{max}} = 510 \text{ nm}$) となる。この溶液に無色の過塩素酸イオン (ClO_4^-) が添加されると $[\text{Fe}(\text{II})(\text{phen})_3^{2+}](\text{ClO}_4^-)_2$ の 1:2 イオン会合体が定量的に形成され、有機溶媒に抽出される。したがって $[\text{Fe}(\text{II})(\text{phen})_3^{2+}]$ の吸光度を測定することにより、間接的に過塩素酸イオンの濃度を定量することが出来る¹⁾。しかし $[\text{Fe}(\text{II})(\text{phen})_3^{2+}]$ のモル吸光係数は $10,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 程度であり、微量分析には適さない。そこで各種の疎水性陽イオンを対イオンとし、さらに大きなモル吸光係数 (約 $100,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) を持つメチレンブルー

(MB)²⁾、エチルバイオレット (EV)³⁾ やローダミン B (RhB)⁴⁾ などが用いられると、疎水性陰イオンや錯陰イオンの高感度分析が可能である。MB や EV は陰イオン性界面活性剤の微量分析に導入され、JIS^{5),6)} に採用されている。一方、塩基性化合物に対しては二塩基酸染料が用いられた。例えば、三級アミン (R_3NH^+) に対してブロモクレゾールグリーン (H_2BCG) を用いると pH4 以下では黄色の 1:1 の $(\text{R}_3\text{NH}^+)(\text{HBCG}^-)$ 会合体が得られ、間接的に R_3NH^+ の濃度を求めることができる⁷⁾。また pH 8 付近では青色の 2:1 の $(\text{R}_3\text{NH}^+)_2(\text{BCG}^{2-})$ 会合体が形成される。前者の会合体は速やかに有機溶媒に抽出されるが、モル吸光係数は小さい。後者は $25,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 程度の感度を有するが、原点を通る検量線の直線性、またイオン会合体の抽出性が悪く、会合体生成の最適 pH 領域も狭い。さらに中性付近でのイオン会合体の組成は 1:1 と 1:2 が混在することがある。そこで、著者らは 1 つの酸解離定数 (pK_a) しか持たない一塩基酸染料の応用を提案した。その結果、会合体の組成は全て 1:1 が得られ、またモル吸光係数は約 $3 \sim 90,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ を

与え、二塩基酸染料よりも優れた感度を得ることができ、高感度化が図られた。特に、テトラプロモフェノールフタレインエチルエステル (TBPE) はアミンに対しては約 $45,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ^{8,9)}, 第4級アンモニウムイオンに対しては約 $100,000 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ のモル吸光係数を与え^{10,11)}, また、最適 pH 領域も 5~11 と大幅に改善された。

TBPE は最も優れたイオン会合性試薬であるが、1~3級アミンに対しては赤~赤紫色の会合体を、また、第4級アンモニウム塩は全て青色会合体を形成することが見出された。このように対イオンにより、会合体の色が異なることは極めて珍しい現象である。さらに赤~赤紫色のアミン会合体にサーモクロミズム (thermochromism, 熱変色性) を発現すること、その吸光度の変化は温度、アミン濃度に対して化学量論的に変化することを見出し、第4級アンモニウム塩の分別定量¹²⁾, アミンの分別定量^{13,14)}及びアミン間の同時分析^{15,16)}に応用された。

一方、二塩基酸染料 (例えば BCG^{2-}) をアルカリ領域で用いると原点を通る検量線の直線領域が狭いことを指摘した。しかし pH 7~8 付近において、バルキーな3級アミンであるシンコナアルカロイド (Q^+) が存在すると、 BCG との間で赤色会合体 [$\text{BCG}^{2-}(\text{Q}^+)_2$] が生成され、この会合系に微量の第4級アンモニウム塩が添加されると青色の会合体が形成されることが判明した¹⁷⁾。このことにより、バソクロミズムが発現し、感度の増幅が図られ、また検量線の直線性は大きく改善された。この会合体は三元イオン会合体 (ternary ion associate) と命名された。

上述の方法は新規に提案されたイオン会合反応を利用する高感度・高選択的分析法であるが、全てバッチマニュアル法である。したがって、一回の測定に用いる試薬の消費量は多く、分析に要する時間も長く、迅速分析には不適である。また分析操作は煩雑で、技術的に熟練を要する。これらの問題点を解決するために、溶媒抽出をオンライン化したフローインジェクション法 (Flow Injection Analysis, FIA) を提案し、実用化をはかった¹⁸⁾。バッチマニュアル溶媒抽出法は、再現性や揮発性抽出溶媒による実験環境汚染、多量の有機溶媒廃液などに問題があり、FIA はこれらの問題点を解決できる方法として注目されている。

溶媒抽出 FIA 法はモル吸光係数の大きな染料を用いる陰イオン界面活性剤や塩基性医薬品などの迅速・高精度分析法には適しているが、金属イオンの分析には感度・選択性に優れているとは言えない。最近では低濃度 (数十 ppb~数十 ppt) の金属イオンの分析にはグラフィ

トファーネス原子吸光光度法 (GFAAS) や誘導結合プラズマ原子発光分析法 (ICP-AES) が用いられているが、これらは大型な装置で、また高価である。そこで、水性キレート試薬を用いる FIA の検討を行った。その結果、シングル ppb の Fe(II), Co(II), Cu(II) などの定量が可能となった。また1時間当たりの試料分析速度は 20~60 試料で、バッチマニュアル法と比べると数倍の迅速性が確保された。また、多くの FIA では単元素分析システムが提案されているが、著者は 2~3 元素を同時に検出するために、新規のツインフローセル、ダブルフローセル、四連フローセルを開発し、迅速・同時分析システムを考案し、特許出願している¹⁹⁾。

前述したが、FIA は反応系、検出系がクローズドシステムになっているため、外部からの汚染を防ぐことができる。したがって、環境分析や臨床化学分析に適している。また迅速分析が可能である。そこで、大気中のオキシダントやホルムアルデヒドの微量分析に適用した。また新生児尿中のクレアチニンの迅速分析システムを開発した。

「2006 年度日本分析化学会学会賞」の対象になった主な研究内容を Table 1 に示す。「新しいイオン会合反応の創出と新しい水溶性発色蛍光反応の創出」で見出した「特異的化学反应」を体系化した。それらの化学反应を組み込んだ「流れ分析法の開発」により、「分離・検出機能の向上」を図り、「分離・分析化学の新展開」と「化学分析の自動化」を目指した。高機能化・高性能化された FIA 法による新しい分離・分析化学の手法は、環境化学、品質評価、プロセス管理などの分野に導入され、分析技術の発展と進歩に大きく寄与し、社会への貢献も大きい。紙面に都合上、これらの中から著者が主に行った業績の一部を紹介する。

2. 新規イオン会合反応の創製と実用分析への応用

2.1. TBPE によるイオン会合体のサーモクロミズム^{20~25)}

TBPE は pH8 付近においてはプロトンが付加した R_3NH^+ (R_2NH_2^+) と付加錯体 (R_3NHTBPE あるいは $\text{R}_2\text{NH}_2\text{TBPE}$) を形成する。この会合体の吸収極大波長 (λ_{max}) は 550~580nm に存在し、赤~赤紫色に呈色する。これら会合体の吸収スペクトルを Fig. 1 に示す。医薬品に用いられるメチルエフェドリン会合体の λ_{max} は 550 nm, エフェドリンは 555 nm, ジフェンヒドラミン

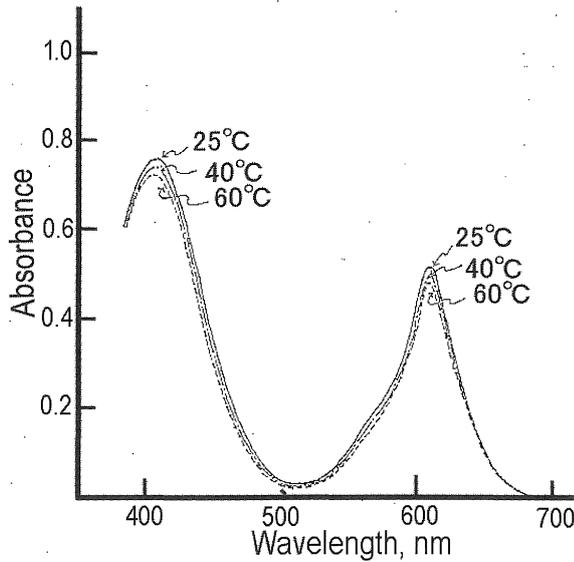


Fig. 2 The changes of absorbance spectra with elevated temperature (Berberine-TBPE-1,2-dichloroethane).¹²⁾ (1): 25°C (2): 40°C (3): 60°C. Berberine: 1.0×10^{-6} M, TBPE: 6.4×10^{-6} M. Reference: Water, pH: 8.5.

して用いる場合、アミンに対しては付加錯体を、4級アンモニウム塩に対しては静電的に会合したイオン会合体(イオン対)を形成するが、これは極めて珍しい現象である。さらに、これらの会合体を加温したところ、青色イオン会合体は加温により、わずかな吸光度の減少が見られた。一方赤色会合体は温度の上昇に伴い、580 nm 付近の吸光度は顕著に減少し、 λ_{\max} 410 nm の吸光度が増大した。このスペクトル変化を Fig. 2 と Fig. 3 に示す。ここでは第4級アンモニウム塩として 1×10^{-6} M ベルベリン (Ber^+) を用い、アミンとして 2.5×10^{-5} M プロカイン (ProH^+) を用いた¹²⁾。Fig. 2 に見られるように (Ber^+)(TBPE) は温度の上昇に伴い、610 nm 及び 410 nm のいずれにおいても吸光度に減少が見られた。これは加温による 1,2-DCE の膨張に起因によるもので、膨張係数を用いて補正すると 25°C における吸光度と一致した。一方、赤紫色会合体 (ProHTBPE) は温度が 20°C から 55°C へ上昇するに伴い、580 nm 付近の吸光度は定量的に減少し、60°C 付近においては赤色会合体の吸光度は試薬空試験液(試薬ブランク)とほぼ同じとなることが明らかとなった。また 410 nm における吸光度は増大した。さらに 55°C から 20°C に冷却すると 20°C での吸光度に戻ることから、加熱による吸光度の減少はイオン会合体の分解ではなく、反応式(2)に示す可逆的サーモクロミズム (reversible thermochromism) が生じていると考える。

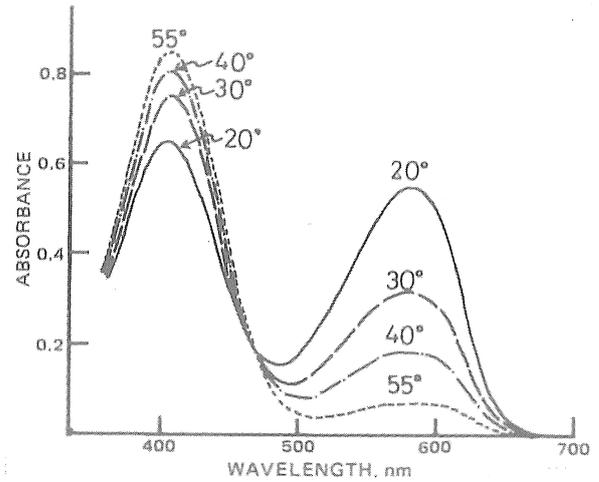
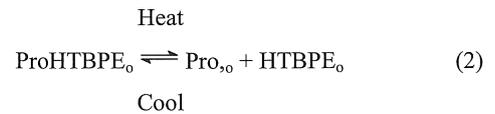


Fig. 3 The changes of absorption spectra of the charge transfer complex by thermochromism.¹²⁾ Procaine : 2.5×10^{-5} M, TBPE : 1.28×10^{-6} M. pH: 8.5, Solvent : DCE. Reference: water.



そこで、イオン会合体が示すサーモクロミズムを分離分析に導入することを試みた。

Table 2 Effect of foreign substances on berberine determination^{a,12)}

Substance	Mole ratio	Berberine recovery, %	
		25°C	60°C
Glucose	1:1000	100	—
Lactose	1:1000	98	—
Ammonium sulfate	1:1000	101	—
Calcium chloride	1:1000	100	—
Sodium carbonate	1:1000	98	—
Sodium chloride	1:1000	102	—
Sodium nitrate	1:1000	101	—
Sodium acetate	1:1000	101	—
Sodium citrate	1:1000	100	—
Sodium salicylate	1:1000	99	—
Starch, 0.4%	—	101	—
Thiamine	1:1	102	—

Table 2 continued

Triethanolamine	1:500	105	105
Caffeine	1:100	101	—
Benzethonium	1:1	185	185
Neostigmine	1:0.1	111	111
Diphenhydramine	1:0.3	107	102
	1:0.5	112	104
Procaine	1:2	129	102
	1:4	159	106
Emetine	1:1	113	102
	1:2	130	106
Papaverine	1:10	105	98
	1:20	114	101
Pilocarpine	1:30	106	101
Eserine	1:1	111	100
	1:2	126	102
Chlorophenylamine	1:0.3	115	104
	1:0.5	128	106

a. The berberine taken was 1×10^{-6} M, the wavelength was 610 nm, and the pH was 8.5.

2.1.1. サーモクロミズムを利用する第 4 級アンモニウム塩及び芳香族アミンの分別分析

イオン会合性試薬として TBPE を用いると、 R_4N^+ 及び R_3NH^+ ともイオン会合体を形成し、1,2-DCE への抽出性も高い。したがって、これらが共存するときは相互にプラスの妨害を与える。しかし Fig. 2 に見られるように、 Ber^+ と $TBPE^-$ との青色会合体はサーモクロミズムを示さない。一方、 $ProH^+$ との会合体は $55^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ 付近においてはほぼ試薬ブランクと同じ吸光度を示す。すなわち、測定温度を $55^\circ\text{C} \sim 60^\circ\text{C}$ に保てばアミンによる妨害を防ぎ、選択的に Ber^+ を測定することができる。その結果を Table 2 に示す。この反応例を模式的に Fig. 4 に示す。 25°C では赤色会合体は当然妨害するが、測定温度を 60°C に保てば、赤色は消滅する。すなわち、青の会合体の吸光度には影響を与えない。また、アミン会合体のサーモクロミズムに定量的温度依存性があることが分かった。たとえば 2×10^{-6} M ジフェンヒドラミンについて 25°C から 50°C に昇温し、その吸光度差すなわち Δt と ΔA の比 $\Delta A/\Delta t$ を算出したところ、 7.48×10^{-3} の値を得、10

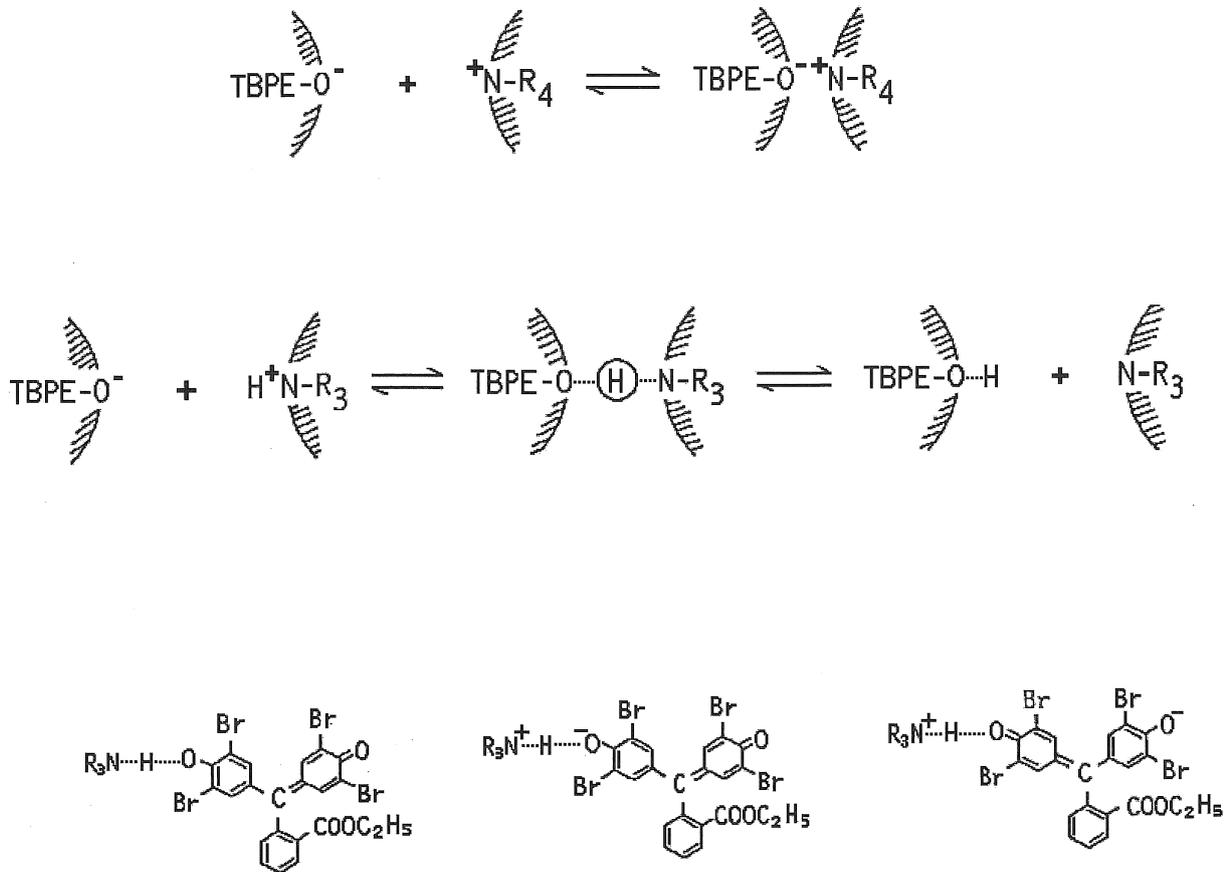


Fig. 4 Resonance structures of charge transfer complex.

Table 3 Effect of quaternary ammonium cations in the determination of diphenhydramine using thermochromism¹³⁾

2×10^{-6} M diphenhydramine $\Delta A/\Delta t = 7.48 \times 10^{-3} \Delta t = 25^\circ\text{C}$			
R_4N added	Concentration/M	$\Delta A/\Delta t$ ($\times 10^{-3}$)	Recovery, %
Benzethonium	5×10^{-7}	7.68	103
	1×10^{-6}	7.72	103
Berberine	5×10^{-7}	7.41	99
Octylatropine	5×10^{-7}	7.64	102
Sparteine	5×10^{-7}	7.40	99
3×10^{-6} M diphenhydramine $\Delta A/\Delta t = 10.76 \times 10^{-3} \Delta t = 25^\circ\text{C}$			
Benzethonium	5×10^{-7}		103
Berberine	5×10^{-7}		97
Octylatropine	5×10^{-7}		100
	1×10^{-6}		103
Sparteine	5×10^{-7}		102

回の繰り返し実験の変動係数は1.5%で、信頼できる値と思われる¹³⁾。さらに Δt を 25°C とし、ジフェンヒドรามミンの濃度を $(1 \sim 5) \times 10^{-6}$ Mの範囲で変化させ、各濃度での $\Delta A/\Delta t$ を求めたところ、良好な直線関係が得られ、これをジフェンヒドรามミン定量のための検量線として用いることができることが分かった。 R_4N^+ の $\Delta A/\Delta t$ とジフェンヒドรามミンの $\Delta A/\Delta t$ を比較した結果をTable 3に示すが、 R_4N^+ による妨害がないことが分かる。

2.1.2. サーモクロミズムを利用する脂肪族アミンの同時定量^{26~29)}

アミンによるサーモクロミズムを系統的に解明するために、1~3級脂肪族アミンの会合定数とその温度依存性について検討した。まず、アミンとTBPEH(通常はTBPEを用いるが、pH3以下の水溶液にすると分子種TBPEHが得られ、1,2-DCEに完全抽出される)との会合定数を求めた。TBPEHを 2.4×10^{-5} Mに保ち、プロピルアミンの濃度を 8.0×10^{-5} M~ 6.0×10^{-4} Mの範囲で添加したときの吸光度変化をFig. 5に示す。スペクトル1の410 nmにおける吸光度からTBPEHのモル吸光係数(ϵ_{TBPEH})を求めることができる。会合定数は以下の式を用いて算出される。

$$K_{a0} = [\text{R}_3\text{N} \cdot \text{HTBPE}] / [\text{HTBPE}]_R [\text{R}_3\text{N}]_R \quad (3)$$

この場合 $[\text{HTBPE}]_R$ と $[\text{R}_3\text{N}]_R$ は反応後のTBPEHと R_3N の濃度である。プロピルアミン添加後の $[\text{HTBPE}]_R$ は

$$[\text{HTBPE}]_R = A_{410} / \epsilon_{\text{TBPEH}} \quad (4)$$

A_{410} は410 nmにおけるTBPEHの吸光度である。一方TBPEH及び R_3N の初期濃度を $[\text{HTBPE}]_i$ 、 $[\text{R}_3\text{N}]_i$ とすると

$$[\text{HTBPE}]_i - [\text{HTBPE}]_R = [\text{R}_3\text{N} \cdot \text{HTBPE}] \quad (5)$$

$$[\text{R}_3\text{N}]_R = [\text{R}_3\text{N}]_i - [\text{R}_3\text{N} \cdot \text{HTBPE}] \quad (6)$$

(4), (5), (6)を式(3)に代入することにより、 K_{a0} を求めることができる。その結果をTable 4に示す。吸収極大波長は1級アミンの場合560 nm付近に、2級は570 nm、3級アミンは580 nm付近に存在し、炭素鎖に依存せず、塩基性度が強くなるにつれ、レッドシフトしていることが分かる。これはFig. 6に示すように、この付加錯体は水素原子を橋渡し(水素橋, hydrogen bridge)とする電

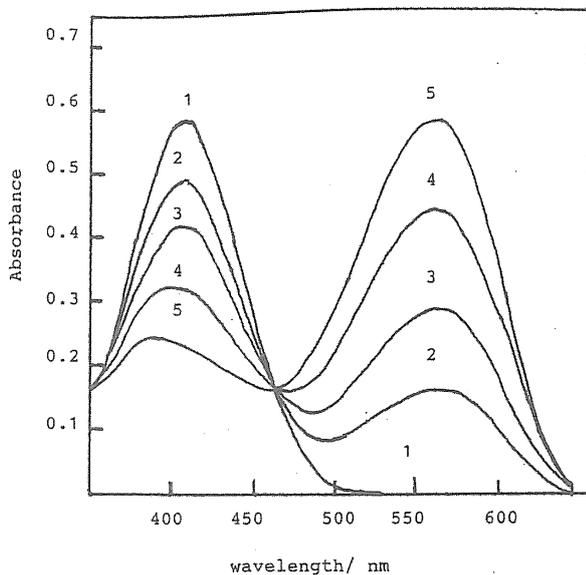


Fig. 5 Changes of absorption spectra of Htbpe associates with increasing amine concentration.²⁷⁾ Htbpe; 2.4×10^{-5} M, propylamine concentration: 1, none; 2, 8×10^{-5} M; 3, 1.6×10^{-4} M; 4, 3.2×10^{-4} M; 5, 6×10^{-4} M. Reference: 1,2-DCE, temperature: 20°C .

Table 4 Association constants of amine-HTbpe associates²⁷⁾

Amine	Wavelen gth/nm	20°C	35°C	45°C
		log K_{a_0}	log K_{a_0}	log K_{a_0}
Propylamine	562	3.42	2.86	2.50
Butylamine	565	3.52	2.93	2.61
Pentylamine	565	3.53	3.01	2.63
Hexylamine	562	3.54	2.94	2.65
Dipropylamine	570	4.65	4.01	3.70
Dibutylamine	575	4.79	4.17	3.71
Dipentylamine	573	4.84	4.29	4.03
Diethylamine	568	4.70	4.17	3.82
Tripropylamine	580	5.02	4.46	4.07
Tributylamine	580	5.23	4.66	4.36
Tripentylamine	585	4.95	4.51	4.22
Trihexylamine	580	5.28	4.74	4.45

Table 5 Recovery test for tertiary amine in the presence of primary amine at 20 and 60°C²⁶⁾

Primary amine ^b	Tri- <i>n</i> -heptylamine ^a			
	20°C		60°C	
	Abs	Recovery,%	Abs	Recovery,%
0	1.109	100	0.745	100
5×10 ⁻⁶ M	1.170	106	0.754	101
1×10 ⁻⁵ M	1.255	113	0.746	100
2×10 ⁻⁵ M	1.443	130	0.744	100
3×10 ⁻⁵ M	1.584	143	0.745	100
4×10 ⁻⁵ M	1.752	158	0.738	99

a. λ_{\max} = 581 nm, 2×10⁻⁵ M, HTBPE, 3.2×10⁻⁴ M.

b. Added concentration of *n*-heptylamine.

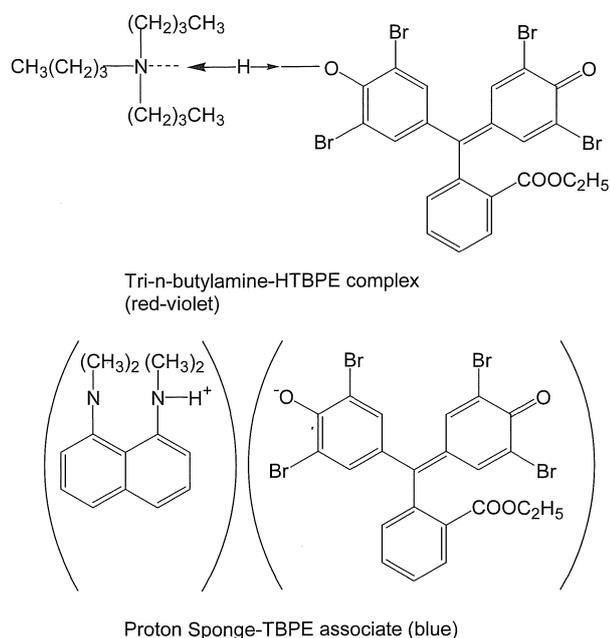


Fig. 6 Electronic structures of tri-*n*-butylamine-HTBPE complex and proton sponge-TBPE ion associate.²⁶⁾

荷移動錯体を形成し、中心の水素原子がアミン側へ引き付けられる度合いによるものと考えられる。その根拠として極めて塩基性の強いアミンであるプロトンスポンジを添加すると TBPEH のプロトンが完全に引き抜かれ、解離した青色会合体を形成することに裏づけられる²⁶⁾。また、Table 4 を比較すると 1 級アミンの会合定数は 3.5、2 級は 4.6、3 級は 5 と次第に大きくなり、また温度の上昇に伴い定量的に減少すること、会合定数の減少率はアミンごとに特異的であることが判明した。したがって、アミンの減少率を利用すればアミン間の分別定量が可能となる^{27,28)}。

たとえば、トリ-*n*-へプチルアミンと *n*-へプチルアミンの混合溶液について 20°C と 60°C における吸光度とその回収率を Table 5 に示す。2×10⁻⁵ M トリ-*n*-へプチルアミンに 0.5~4×10⁻⁵ M の *n*-へプチルアミンを添加すると 20°C においては大きな妨害を示すが、50°C での測定においては全く妨害が見られず、回収率は 100% でトリ-*n*-へプチルアミンが選択的に定量できることが分かった。この原理を用いたところ、1 級と 3 級、2 級と 1 級、*n*-アミンと *iso*-アミンなどの分別分析が可能となった²⁹⁾。また 2 種の混合アミン溶液の同時分析も可能であることが分かった。たとえば、Fig. 7 に示すように吸収極大波長を 555 nm と 575 nm に持つ 2 つのアミンの場合、それぞれの λ_{\max} における 25°C と 50°C での ϵ を予め算出する。25°C におけるアミン 1 (555 nm) のモル吸光係数を $\epsilon_{1,25^\circ\text{C}}$ 、アミン 2 を $\epsilon_{2,25^\circ\text{C}}$ とし、一方、50°C においては $\epsilon_{1,50^\circ\text{C}}$ 、 $\epsilon_{2,50^\circ\text{C}}$ とすると

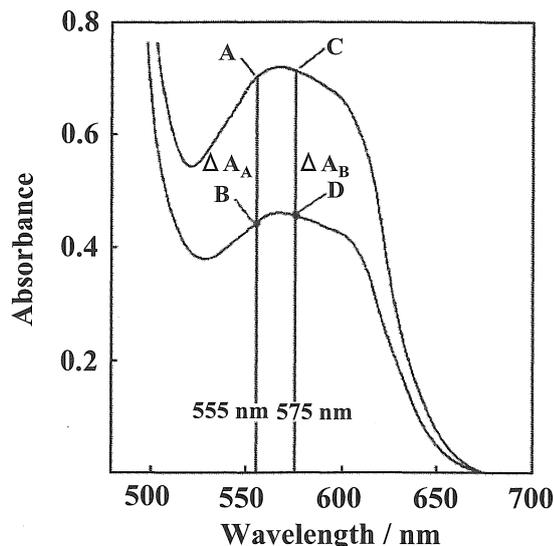


Fig. 7 Changes in absorption spectra of dibucaine and chlorpheniramine mixture with TBPE in DCE with temperature increase.¹⁵⁾ Dibucaine, 2×10^{-6} M; chlorpheniramine, 2×10^{-6} M; TBPE, 1.6×10^{-4} M; Buffer : pH 8.0. Absorbances : A, $A_{I,25^\circ\text{C}}$; B, $A_{I,50^\circ\text{C}}$; C, $A_{II,25^\circ\text{C}}$; D, $A_{II,50^\circ\text{C}}$.

Temperature, the 4th dimension in UV-visible molecular spectroscopy

Analytical applications of thermochromism

D. Thorburn Burns
Belfast, U.K.

and

T. O'Reilly
Dublin, Ireland

Time and temperature are often relevant independent variables in spectroscopic studies. Variation of absorbance with time gives rise to kinetic methods of analysis and with temperature to thermochromic studies. Thermochromic compounds are those which show change in colour (and spectrum) with temperature. The process, called thermochromism, is usually based on changes in positions of equilibria for ion-pair, charge-transfer, chelate and acid-base reactions. A number of analytical application studies are now available for review.

Ion-pair and charge-transfer complexes

An interesting group of papers in this area concern the application of reversible thermochromism by Sakai and co-workers using the tetrabromophenolphthalein ethyl ester anion (TBPE⁻) which forms ion-associated

complexes from amines. The rate of increase of absorbance with temperature ($\Delta A/\Delta T$) is proportional to the concentration of amine in the aqueous phase and is little affected by the presence of the quaternary ammonium cation which permits the determination of drugs such as verine² and diphenhydramine³. It has been determined in component formulations with spectral overlap interference removed by thermochromism simultaneous determination of dibucaine and chlorpheniramine is possible using measurement of $\Delta A/\Delta T$ at 555 and 575 nm³. Similar procedures were reported for phenhydramine and chlorpheniramine malcate⁶, dibucaine : phenhydramine⁷ and also for procaine and procaine⁸. The procedure has been further evaluated by the determination of methylephedrine, chlorpheniramine, ephedrine, phenhydramine in commercial formulations and has been extended to three components in model systems such as berberine, methylephedrine, phenhydramine. TBPEH permits the determination of

$$\text{Abs}_{1,25^\circ\text{C}} = \varepsilon_{1,25^\circ\text{C}} \times C_1 + \varepsilon_{2,25^\circ\text{C}} \times C_2 \quad (7)$$

$$\text{Abs}_{1,50^\circ\text{C}} = \varepsilon_{1,50^\circ\text{C}} \times C_1 + \varepsilon_{2,50^\circ\text{C}} \times C_2 \quad (8)$$

$$\Delta \text{Abs}_A = \Delta \varepsilon_{1,A} \times C_1 + \Delta \varepsilon_{2,A} \times C_2 \quad (9)$$

波長 575 nm においても同様にして ΔAbs_B を求めることができる。

$$\Delta \text{Abs}_B = \Delta \varepsilon_{1,B} \times C_1 + \Delta \varepsilon_{2,B} \times C_2 \quad (10)$$

(9), (10)の連立方程式を解くと

$$C_1 = [(\Delta \text{Abs}_B \times \Delta \varepsilon_{2,A}) - (\Delta \text{Abs}_A \times \Delta \varepsilon_{2,B})] / [(\Delta \varepsilon_{1,B} \times \Delta \varepsilon_{2,A}) - (\Delta \varepsilon_{1,A} \times \Delta \varepsilon_{2,B})] \quad (11)$$

$$C_2 = [(\Delta \text{Abs}_A \times \Delta \varepsilon_{1,B}) - (\Delta \text{Abs}_B \times \Delta \varepsilon_{1,A})] / [(\Delta \varepsilon_{2,A} \times \Delta \varepsilon_{1,B}) - (\Delta \varepsilon_{1,A} \times \Delta \varepsilon_{2,B})] \quad (12)$$

したがって、555 nm と 575 nm における 25°C と 50°C の吸光度差を測定すれば混合された 2 種のアミンの濃度を求めることができる。

これらのアミン会合体が示すサーモクロミズムとその特異性を利用する分析法は世界で初めての報告であり、*Trends in Analytical Chemistry*, 7, 82 (1988)に“Analytical applications of thermochromism”のタイトルで D. T. Burns と T. O'Reilly によって紹介された (Fig. 8)。

2.2. イオン会合滴定による逐次定量^{30~34)}

バルキーでマイナスとプラスの疎水性イオンは水溶液中でイオン会合体を生成する。会合による疎水性が高まるほど水溶液中に存在することは難しくなり、水の中から押し出される。したがって、水と混ざらない有機溶媒が存在すれば有機溶媒への抽出が起こる。これがイオン会合抽出である。例えば、キレート試薬と金属イオンが反応して生成したマイナス 1 価の錯陰イオンにプラス 1 価の染料陽イオンが会合すると 1:1 の会合体は適当な有機溶媒に移動する。イオン会合性は、お互いのイオン会合能 (イオン会合定数の大きさ) の差を利用すれば A により B は抽出できるが、C は抽出できないことが可能で、この原理を利用すれば B と C に選択性を生み出すことが可能である。この原理を巧みに利用したものがイオン会合滴定である。

局所麻酔薬であるプロカイン、ジブカイン、テトラカイン (これらは塩基性度が異なる) は陰イオン染料であ

Fig. 8 Introduction of the author's work published in *Trends in Anal. Chem.* 7, 82 (1988).

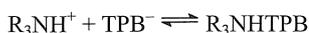
る TBPE とイオン会合する。局所麻酔薬を R₃N で示すと、中性付近では R₃NH⁺として存在しているので R₃NH⁺・TBPE 会合体を形成し赤色を呈する。

まず R₃NH⁺が存在している溶液に有色のイオン会合試薬 TBPE⁻を指示薬として数滴添加すると以下のイオン会合体が形成され、有機相に移動する。



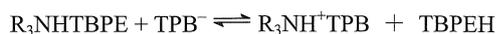
Red color

未反応の R₃NH⁺は滴定剤であるテトラフェニールボロン (TPB⁻) とイオン会合し、有機相に移動する。



Colorless

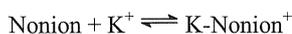
さらに TPB⁻が滴下されるとイオン会合能が TBPE<TPB であるため、以下の置換反応が起こる。



Yellow

すなわち R₃NH⁺・TBPE が R₃NH⁺・TPB にかわり無色となり、TBPE は遊離され黄色となる。当量点ではこの変色反応により明確な終点を得ることができ、プロカインなどを滴定により定量出来ることになる。上記の原理を局所麻酔薬の定量に適用したところ、表記濃度とほぼ一致する結果を得た。局所麻酔薬のアンブル中の濃度管理は重要で、簡便法として有用である。

また非イオン界面活性剤に多量のアルカリ金属イオンを加えると錯形成し、全体で陽イオンとなるので、上記の方法が同様に適用できる³³⁾。



Blue



TBPEH

Yellow

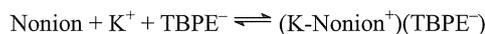
さらに、陽イオン界面活性剤 (R₄N⁺) と非イオン界面活性剤を共存させ、逐次定量することを提案した。



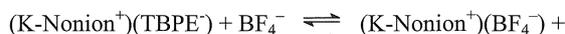
Blue



Yellow



Blue



TBPEH

Yellow

上記の反応を説明する。指示薬 TBPE を添加すると R₄N⁺・TBPE がイオン会合し、青色となる。BF₄⁻ (セシポール) を滴下すると当量点で黄色になる。その後、アルカリ金属イオンと TBPE を加えると Nonion-Me⁺・TBPE となり、再び青色に呈色する。当量点では Nonion-Me⁺・BF₄⁻ が形成され、その結果、TBPE が再度遊離して黄色となる。この逐次会合反応で陽イオン及び非イオン界面活性剤の逐次分析が可能となった。その結果を Table 6 に示す。通常の滴定は操作が簡便で精度が高いので、定量には簡便法として有用であるが、逐次同時定量の例は極めて少なく、この提案はイオン会合定数の差を利用したユニークで実用性の高い方法である。

Table 6 Determination of synthetic mixtures of benzalkonium chloride and Triton X-100 with 5×10⁻⁴ M BF₄⁻³⁴⁾

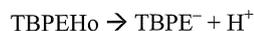
BZ:Triton (mg/ml)	Added (mg/5 ml)	Found (mg/5 ml)	Recovery (%)
0.184	0.92	0.94	102
0.625	3.13	3.05	97.4
0.184	0.92	0.93	101
0.31	1.56	1.52	97.4
0.184	0.92	0.91	98.9
0.16	0.78	0.76	97.4
0.184	0.92	0.89	96.7
0.031	0.16	0.16	100

2.3. イオン会合体のサーモクロミズムを利用するオンライン溶媒抽出 FIA^{35~38)}

2.1.及び 2.2.では新規に見出したイオン会合反応を利用する溶媒抽出法による塩基性化合物の高感度・高選択

定量法について述べた。これらの方法は従来提唱されている手法と比べると感度・選択性・再現性の点で大きく改善されたものである。しかしながら、いずれの方法もバッチマニュアル法であるため、試薬の消費量、労力、1 試料当りの分析時間、大量の廃液、実験環境の汚染、実験者の揮発性溶媒による暴露など多くの問題点を有する。そこで溶媒抽出をオンライン化する試みとして Ruzicka と Hansen によって提唱された FIA^{39~41)}との融合を提案した。FIA は少試薬、廃液の大幅な削減、分析の半自動及び完全自動化、迅速性、連続測定、繰り返し測定の容易さ、測定値の再現性、容易なラインの組み立て、スキルフリーなどの利点があることから、分析試料が多い品質管理、工場排水管理、医薬品分析、農学分野、臨床化学、環境モニターなど幅広く研究されており、今までにおよそ 9000 報の研究論文が発表されている⁴²⁾。しかし多くの研究は水溶液反応を利用するもので、溶媒抽出をオンライン化した報告は Karberg^{43,44)}, Motomizu^{45~50)}, Burns^{51,52)}らによるものが主体である。著者もイオン会合反応を利用する溶媒抽出 FIA 法に関する論文を多く発表し、総説も発表しているが^{53,54)}、ここではサーモクロミズムを導入した FIA について述べる。

1,2-DCE に溶かした TBPEH を抽出試薬として用いた。pH8 以上に保たれた水溶液系では



となり、イオン化された TBPE⁻はキャリアー中に注入された試料 R₄N⁺や R₃NH⁺と青色及び赤紫色イオン会合体を形成し、1,2-DCE 中に抽出される。これら会合体の Δλ (吸収極大波長差) は 30~50 nm しかないので、これらが共存すると相互に妨害する。しかし 2.1.で見出された赤紫色会合体のサーモクロミズムを応用することにより、R₄N⁺の選択的定量が可能となった。そのフローシステムを Fig. 9 に示す。キャリアーとして蒸留水を 0.8 mL/min でプランジャーポンプにより送液し、その流れに試料 140 μL が注入される。試料は緩衝液 (pH 11) と混合され、その後抽出試薬と抽出溶媒を兼ねた TBPEH/DCE が合流される。この水相と有機相を混合するために Y 字タイプのセグメンターを接続すると水相と有機相のセグメントが形成され、抽出コイル (RC) 中を移動しながら、TBPER₄N 及び TBPEHR₃N が形成され 1,2-DCE に抽出される。水相と有機相は PTFE メンブランフィルター (孔径 0.8 μm) を装着した相分離器で分離され、フィルターを透過した有機相のみが検出器に

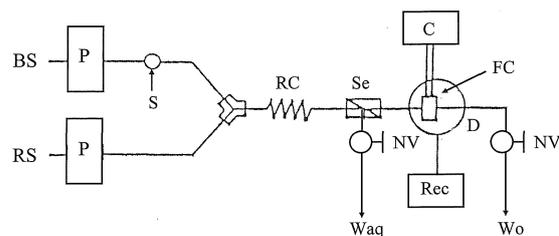


Fig. 9 Flow system for the determination of acetylcholine by extraction and thermochromism.³⁷⁾ BS : buffer solution (pH 11), RS: 1×10^{-5} M TBPEH DCE solution, P: pump (flow rate 0.8 ml/min), S: sample injector (140 μl), RC: 3 m reaction coil, Se: separator, C: circulator, FC: flow cell (8 μl), W : waste.

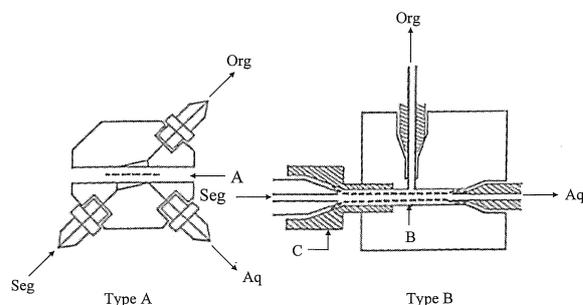


Fig. 10 Phase separators tested.³⁸⁾ Seg, segment; Aq, aqueous phase; Org, organic phase; A, PTFE membrane filter (pore size 0.8 μm); B, microporous PTFE tube (1 mm i.d., thickness 0.5 mm, porosity 60%, length 2.5 cm); C, connector made of Daiflon.

導入され、吸収極大波長でイオン会合体の吸光度が測定・記録される。水相と有機相の分離効率を高めるためにニードルバルブ(NV)を用いた。有機相の回収率は 60%程度でも十分感度を得ることができるが、本研究では 98%の回収率を得た³⁸⁾。水相と有機相を効率よく、また連続的に分離するためには相分離器の機能が重要である。そこで、いくつかの相分離器を作製し (Fig. 10), その機能を比較した。1 つは PTFE メンブラン (長さ 1.0 cm) を用い、もう一方はマイクロポラスな PTFE チューブ (細孔率 60%,長さ 2.5 cm) を用いたが、いずれも良好な回収率を得ることができた。しかし、PTFE チューブの場合、抽出面の長さがメンブランと比べると長いので、ピークが若干ブロードになり、リテンション

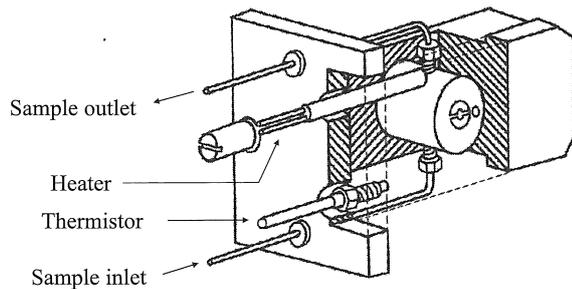


Fig. 11 Temperature-controlled micro flow cell.³⁶⁾

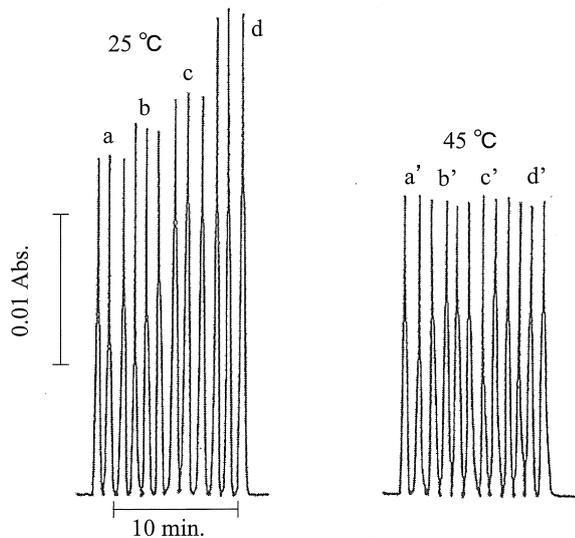


Fig. 12 Flow signals of TBPE-cetylpyridinium and mixture with amine associates at 25°C and 45°C.³⁵⁾ a, a': 1×10^{-6} M cetylpyridinium (CPC); b, b': 3×10^{-5} M procaine with CPC; c, c': 2×10^{-6} M chlorpheniramine with CPC; d, d': 5×10^{-6} M chlorpheniramine with CPC; TBPE·H: 5×10^{-6} M; pH: 12.5.

タイムも長くなった。

また、イオン会合体を加温するために温度調節機能を有するフローセル (Fig. 11) を開発した。フローセルの体積は $8 \mu\text{L}$ 、光路長は 10 mm で、アルミニウムブロックの中にセルを内蔵し、サーミスターにより温度が調節 (温度誤差は $\pm 1^\circ\text{C}$) できる。25°C で TBPER₄N 及び TBPEHR₃N 混合溶液のピーク高さを測定し、その後セルの温度を $40 \sim 50^\circ\text{C}$ に昇温し、再度ピーク高さを測定した。その結果を Fig. 12 に示す。TBPER₄N のピークは少し減少するが、残存する。しかし TBPEHR₃N のピークは完全に消滅することから、TBPER₄N のみのピーク高さを求めることができる。測定波長は 610 nm が用い

られた。このシステムを用いることにより、TBPER₄N を選択的にかつ高感度に測定でき、試料の分析速度は $36/\text{h}$ と迅速で、また変動係数 ($n=5$) は 1.2% であった。また、セルを通過する時間は数秒であるが、セル体積が $8 \mu\text{L}$ と極めて小さいことから温度の伝播には全く影響がないことが判明した。

3. 新規発色蛍光誘導体化反応を用いる FIA

システムの開発⁵⁵⁻⁵⁸⁾

大気環境汚染が深刻な問題となっているが、原因物質は有機ガスから無機ガスあるいは浮遊性物質と様々である。また、これらの汚染物質による影響は局所的な問題ではなく、広域化しており、その動態把握も重要な問題である。著者らのグループでは名古屋市近郊における NO_x 及び SO_x を数年間に渡り、継続測定を行い、動態観察を報告した⁵⁸⁾。また光化学スモッグの原因物質であるオキシダントを測定するシステムの開発を行った。ここで用いた蛍光反応と検出 FIA システムを Fig. 13 及び Fig. 14 に示す。オゾン (O₃) は Γ を定量的に酸化し、I₂ を生成する。I₂ は発蛍光性の 2-ナフタレンチオールを酸化するとジスルフィド化合物が生成され、消光を示す。消光減少を用いて I₂ を検出し、オゾン濃度を間接的に定量するので、シグナルは Fig. 15 に示すようにマイナス方向のシグナル応答となる。 $2.5 \times 10^{-6} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-5} \text{ M}$ の範囲で良好な検量線が得られたが、大気中の酸化性物質の影響を受け、若干のブランクピークが観察された。20 L 試料を対象とした LOD は 2 ppb (v/v) (signal-to-noise = 2) で公定法の 5 倍の感度が得られた。また大気を採集して測定したところ $0.034 \sim 0.047 \text{ ppm(v/v)}$ の値が得られた。

一方、シックハウス症候群が室内環境汚染の問題として社会問題化している。厚生労働省が定めるホルムアルデヒドの指針値は 0.08 ppmv と定められているが、従来法では濃縮などの前処理を必要とする。そこで、以下の蛍光誘導体化反応 (Fig. 16) を利用する FIA システム (Fig. 17) を提案した。Cyclohexane-1,3-dione (CHD) はホルムアルデヒドと pH 5.0 の酢酸アンモニウム共存下で蛍光性物質である Decahydroacridine-1,8-dione を生成した。この誘導体の励起波長は 376 nm 、蛍光波長は 452 nm に存在する。燃焼温度を $100, 300, 500, 700^\circ\text{C}$ と変化させ、高分子燃焼排ガスをインピンジャーに吸収させ、その溶液を用いてホルムアルデヒド濃度を測定し

Formation of iodine by photochemical oxidants



Reducing reaction of Iodine with 2-thionaphthol

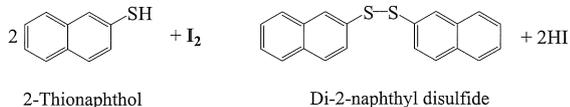


Fig. 13 Measurement of oxidants in urban air.⁵⁵⁾

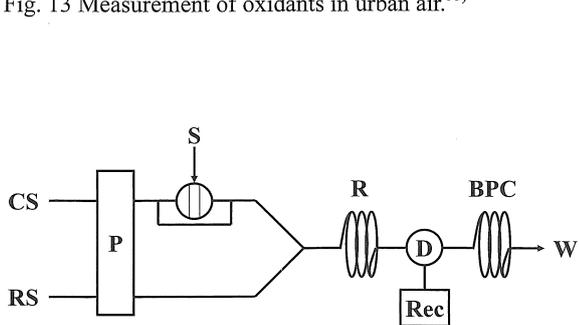
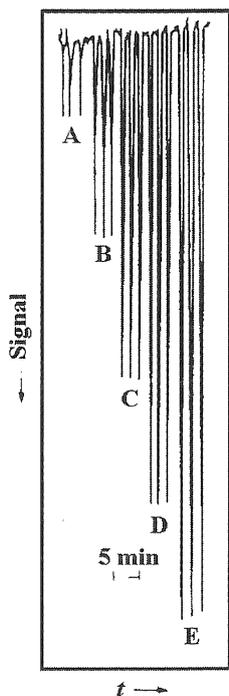


Fig. 14 Schematic diagram of flow system.⁵⁵⁾ CS: Carrier solution (2×10^{-2} mol dm⁻³ potassium iodide solution); RS: reagent solution (2×10^{-4} mol dm⁻³ 2-NAP solution); P: pump (flow rate 0.55 cm³ min⁻¹); S: sample injector (140 mm³); R: reaction coil (100cm \times 0.5 mm i.d.); BPC: back-pressure coil (200 cm \times 0.25 mm i.d.); D: spectrofluotimetric detector; Rec: recorder.



A: 0
 B: 2.5×10^{-6} M
 C: 5×10^{-6} M
 D: 7.5×10^{-6} M
 E: 1×10^{-5} M

Fig. 15 Flow signals for iodine.⁵⁵⁾

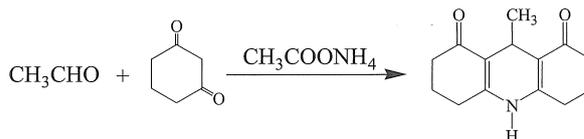


Fig. 16 Reaction of acetaldehyde with CHD.⁵⁶⁾

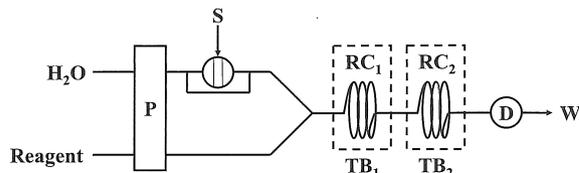


Fig.17 Flow injection manifold for aldehydes determination.⁵⁷⁾ P: pump; S: sample (60 μ l); RC1: reaction coil (700 cm \times 0.5 mm i.d.); RC2: reaction coil (200 cm \times 0.5 mm i.d.); TB1: thermostated bath (70°C); TB2: thermostated bath (10°C); D: detector; W: waste.

たところ, 100°Cでは検出されず, 300°Cでは 350 ppm, 500°Cで 716 ppm, 700°Cでは 332 ppm が検出され, 燃焼温度での発生率の差が確認された. ここで得られた検量線は 100~400 ppb で 100 ppb 以下を測定する場合は大気の吸引量を増やす必要がある. このシステムでは CHD と酢酸アンモニウム混合溶液を共存させ, 2 流路としたため, 時間経過とともにバックグラウンドの上昇が起こり, ベースラインのドリフトが観察された. そこで CHD と酢酸アンモニウムを別々に送液する 3 流路システムを用いたところ, ドリフトは見られず, また検量線は 10~100 ppb が得られ, 雨水の測定に応用された. また 50 ppb ホルムアルデヒドに対する相対標準偏差 ($n = 10$) は 1% で再現性のある結果が得られた.

4. 臨床化学分析への FIA の導入^{59~63)}

新生児の尿中のクレアチニンは筋萎縮症や筋ジストロフィーのスクリーニング法として重要であり, またクレアチニンは 1 日に排泄される量がほぼ一定であることから尿中成分の濃度を補正するために, 常時測定され

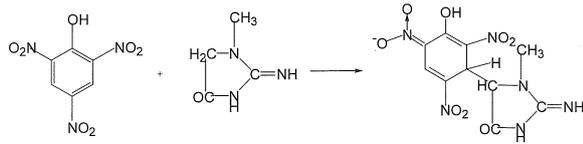


Fig. 18 Reaction of creatinine with picric acid.

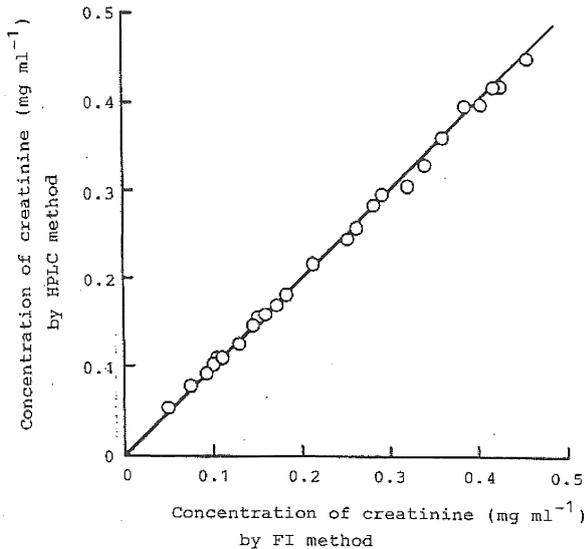


Fig. 19 Correlation diagram between HPLC and FI methods.⁶³⁾

ている。クレアチニンの測定には Fig. 18 に示される Jaffe reaction が用いられる。これはクレアチニンがアルカリ領域においてピクリン酸と反応して赤色化合物を生成する反応である。通常の測定では高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が使われるが、測定に長時間を要する。またプレートリーダー法も用いられるが、前処理が必要である。そこで、2 流路の FIA 装置を組み立てた⁶³⁾。クレアチニンの分析は迅速・多検体分析が要求されることから、試料導入にはオートサンプラーを装着した。100 μL の試料が 30 秒のインターバルでキャリアー (二リン酸カリウム+EDTA) に注入される。試薬 (ピクリン酸+水酸化ナトリウム) の流速が遅いと高いピークが得られたが、ピーク幅が広がるため、0.82 mL/min とした。その結果、試料処理速度は 102/h と極めて速く分析することができた。検量線は 5~200 μg/mL の範囲で原点を通る直線が得られた。HPLC を用いる方法と比べると、定量下限は 40 倍の感度増幅を図ることができ、また試料の処理速度は HPLC では 15/h に対し 102/h と大幅に改善され、実用分析に適している。Fig. 19 に新生児尿中のクレアチニンを HPLC と提唱する FIA による測定値の相関を示すが、ほぼ 1 の相関係数が得られ、FIA が信頼できる方法であることが明らかとなった。

以上の研究結果を Fig. 20 にまとめる。本研究の特徴は「新しいイオン会合反応と新しい水溶性発色蛍光反応の創出」で見出した「新しい分離・検出特性」と「新しい FIA 装置の開発」とを融合することにより、高機能 FIA システムを構築することに成功した。その結果「化学分析の高度化と自動化」を達成することができ、環境化学、臨床化学、品質・プロセス管理、犯罪科学などの現場分析に導入することが可能となり、有効に活用されており、社会的ニーズに答えていると確信している。著者は 34 年間に渡り、疎水的イオン会合反応及び水溶性発色・蛍光反応に基づく分析化学反応を創出してきた。これらの新規反応はフローインジェクション分析 (FIA) に導入され、様々な分野で実用性が立証されている。これらの研究成果は 130 報の原著論文、12 編の著書、31 編の総説・解説等にまとめられている。

またその他の受賞は JAFIA 学術賞 (2001 年 11 月), JAFIA 論文賞 (2004 年 11 月), Pasifichem2005#16 ベストポスター賞 (2005 年 12 月) がある。

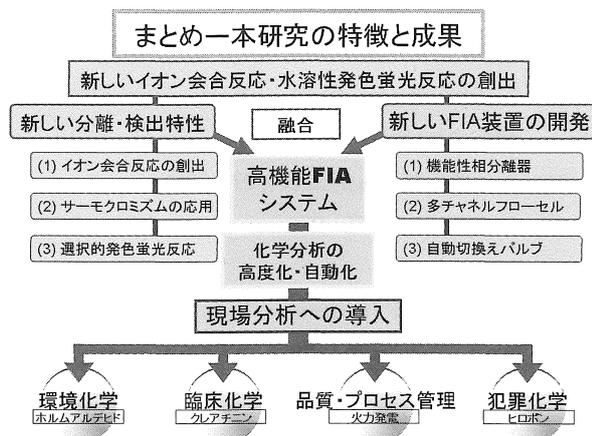


Fig. 20 まとめ

謝辞

ここで発表した研究は朝日大学及び愛知工業大学で行われたもので、研究の前半は朝日大学大野典子教授及

び鳥取大学故田中昌也教授・坪内正弘助教授との、そして後半は愛知工業大学手嶋紀雄助教授との共同研究によるものであるが、多くの学生たちの絶大なる協力があってこれらの成果が得られたものである。また多くの仲間・同僚に支えられたお陰で栄えある学会賞が授与され心より感謝いたします。また30年間にわたり「イオン会合反応」について意義深い研究討議とサジェッションを頂いた岡山大学名誉教授桐榮恭二先生並びに岡山大学理学部本水昌二教授に深謝します。

研究は「資金があつてこそ良質の研究ができる」とよく言われるが、私は「研究は資金・大型装置より優れた人材」とであると痛感している。この度の受賞は愛知工業大学の元副学長伊澤康司教授、柘植新教授及び手嶋紀雄助教授の全面的なバックアップにより成就されたもので心より感謝いたします。

また原稿執筆の機会を与えて頂いた愛知工業大学総合技術研究所所長架谷昌信教授にお礼申し上げます。

文献

- 山本勇麓, 小辻奎也, 絹脇晴一郎, 沢村紘明: 日本化学会誌, **85**, 869 (1964).
- T. Koh, M. Katoh: *Anal. Chim. Acta*, **109**, 107(1979).
- S. Motomizu, S. Fujiwara, A. Fujiwara, K. Toei: *Anal. Chem.*, **54**, 392(1982).
- 桐榮恭二, 中藤和正: 日本化学会誌, **92**, 731 (1971).
- JIS K0102(1998), 工場排水試験方法, p.73, 日本規格協会.
- 同上, p.77.
- H.M.N.H. Irving, J.J. Markham, *Anal. Chim. Acta*, **39**, 7(1967).
- 酒井忠雄, 小川逸子, 坪内正弘, 鎌田俊彦: 衛生化学, **21**, 199 (1975).
- T. Sakai, I. Hara, M. Tsubouchi: *Chem. Pharm. Bull.*, **24**, 1254(1976).
- M. Tsubouchi: *Bull. Chem. Soc. Japan*, **44**, 1560(1971).
- 酒井忠雄: 分析化学, **24**, 135 (1975).
- T. Sakai: *J. Pharm. Sci.*, **68**, 879(1979).
- 酒井忠雄, 石田典子, 鶴房繁和: 分析化学, **28**, 303 (1979).
- T. Sakai, N. Ohno: *The Analyst*, **107**, 634(1982).
- T. Sakai, *The Analyst*, 107, 640 (1982).
- T. Sakai, N. Ohno: *Talanta*, **33**, 415(1986).
- T. Sakai, N. Ohno: *Chem. Lett.*, 107(1982).
- T. Sakai: *The Analyst*, **116**, 187(1991).
- 特許出願 2003-327414, 特許公開 2005-91259.
- 酒井忠雄, 石田典子: 分析化学, **27**, 410 (1978).
- T. Sakai, N. Ohno: *Chem. Pharm. Bull.*, **27**, 2846(1979).
- 大野典子, 酒井忠雄: 分析化学, **30**, 398 (1981).
- T. Sakai, N. Ohno: *The Analyst*, **107**, 634(1982).
- T. Sakai: *The Analyst*, **107**, 640(1982).
- 大野典子, 酒井忠雄: 衛生化学, **27**, 231 (1981).
- T. Sakai, S. Watanabe, S. Yamamoto: *Anal. Chem.*, **69**, 1766(1997).
- 酒井忠雄, 佐々木英人: 日本化学会誌, **1994**, 656.
- 酒井忠雄, 渡邊志央, 大野典子: 分析化学, **45**, 1033 (1996).
- T. Sakai, M. Kato, N. Teshima: *Anal. Sci.*, **21**, 1557(2005).
- 酒井忠雄, 宮竹伸卓, 大野典子: 分析化学, **46**, 951 (1997).
- T. Sakai, N. Teshima, Y. Takatori: *Anal. Sci.*, **17**, 1105(2001).
- T. Sakai: *Anal. Sci.*, **17**, 1379(2001).
- 鷹取康史, 手嶋紀雄, 酒井忠雄: 分析化学, **51**, 849 (2002).
- T. Sakai, N. Teshima, Y. Takatori: *Anal. Sci.*, **19**, 1223(2003).
- T. Sakai, Y. Gao, N. Ohno, N. Ura: *Chem. Lett.*, **1991**, 163.
- T. Sakai, N. Ohno: *Anal. Sci.*, **7**, 297(1991).
- T. Sakai, Y. Gao, N. Ohno, N. Ura: *Anal. Chim. Acta*, **255**, 135(1991).
- T. Sakai: *The Analyst*, **117**, 211(1992).
- J. Ruzicka, E.H. Hansen: *Anal. Chim. Acta*, **78**, 145(1975).
- J. Ruzicka, E.H. Hansen: "Flow Injection Analysis", Wiley, New York, 1988.
- J. Ruzicka: *Anal. Chem.*, **55**, 1040A(1983).
- T. Takayanagi: *J. Flow Injection Analysis*, **23**, 138 (2006).
- B. Karlberg, S. Thelander: *Anal. Chim. Acta*, **98**, 1(1978).
- L. Nord, B. Karlberg: *Anal. Chim. Acta*, **118**, 285(1980).

- 45) S. Motomizu, M. Oshima: *Analyst*, **112**, 295(1987).
- 46) 本水昌二 : *J. Flow Injection Anal.*, **5**, 71(1988).
- 47) 本水昌二, 米田直生, 岩知道正 : 分析化学, **37**, 642(1988).
- 48) S. Motomizu, K. Korechika: *Anal. Chim. Acta*, **220**, 275(1989).
- 49) S. Motomizu, M. Oshima, N. Yoneda, T. Iwachido, *Anal. Sci.*, **6**, 215(1990).
- 50) S. Motomizu, M. Onoda: *Anal. Chim. Acta*, **214**, 289(1988).
- 51) D.T. Burns, N. Chimpalee, M. Harriott, *Anal. Chim. Acta*, **225**, 123(1989).
- 52) *ibid*, **225**, 241(1989).
- 53) 酒井忠雄, 大野典子 : *J. Flow Injection Anal.*, **10**, 2(1993).
- 54) T.Sakai: *Recent Res.Devel. In Pure & Applied Chem.*, **2**, 441(19898).
- 55) T.Sakai, H.Nishikawa: *The Analyst*, **117**, 1399(1992).
- 56) T.Sakai, H. Nagasawa, H. Nishikawa: *Talanta*, **43**, 859(1996).
- 57) 西川治光, 酒井忠雄, 長澤秀紀 : 分析化学, **47**, 225(1998).
- 58) 手嶋紀雄, 酒井忠雄, 安田誠司, 樋口慶郎 : 分析化学, **49**, 455(2000).
- 59) S.W. Kang, T. Sakai, N. Ohno, K. Ida: *Anal.Chim.Acta*, **261**, 197(1992).
- 60) 大野典子, 酒井博淳, 中村勝彦, 井田和徳, 酒井忠雄 : *J. Flow Injection Anal.*, **9**, 58(1992).
- 61) T.Sakai, A. Yanagisawa, K. Higuchi, N. Teshima, N. Ura: *Talanta*, **52**, 159(2000).
- 62) S. Gotoh, N. Teshima, T. Sakai, K. Ida: *Anal. Chim. Acta*, **499**, 91(2003).
- 63) T. Sakai, H. Ohta, N. Ohno, J. Imai: *Anal. Chim. Acta*, **308**, 329(1995).