

Focussing Review

バイオミメティックなHPLCを目指して 脂質膜類似配向場を利用する分子形状識別能の増幅

伊原博隆

熊本大学大学院自然科学研究科

〒860-8555 熊本市黒髪2 - 39 - 1

ihara@kumamoto-u.ac.jp

New Organic Phase for Biomimetic HPLC Enhanced Molecular-Shape Selectivity through Molecular Orientation

Hirotaka Ihara

Graduate School of Science & Technology, Kumamoto University, Kumamoto 860-8555, Japan

Received, February 17, 2000. Accepted, May 31, 2000.

Abstract

Lipid membranes work as important media for generation of various biofunctions in which precise separation and permeation of chemical substances are included. Therefore, immobilization of lipid membrane functions onto carrier particles such as silica promises to increase possible applications, especially in column separation chemistry. However, stabilization of lipid membranes is generally accompanied by disappearance of lipid membrane functions because of suppressing the lateral diffusion of lipids. To overcome this dilemma, we have developed a method to graft the comb-shaped polymers as lipid membrane analogues. In this review, we wish to introduce that specific separation behavior in HPLC can be realized through highly-oriented structures from the lipid membrane analogues on silica.

Key words : liquid chromatography, molecular recognition, shape selectivity, highly-oriented structure, carbonyl- π interaction, thermo-responsive polymer, lipid bilayer membranes

1. はじめに

生体膜の基本構成成分である脂質二分子膜は、生命現象にかかわる主要な化学反応の媒体であり、また、情報の形成や変換、伝達などをつかさどる精密かつ多機能な超小型デバイスである。この天然デバイスを人工的に構築し、有機化学や工業化学の分野で利用することができれば、化学物質の分離や反応等が精密に制御できると思われる。しかしながら、生体膜を *in vitro* で利用しようとするれば、明らかにその物理的

あるいは化学的不安定さの壁にぶつかるであろう。生体膜は常に代謝の中で再生され、機能を維持し続けているからである。そのため、数ある生体膜モデルに関する研究があるにもかかわらず、それらが実用化に供された例はきわめて少ない。もし、カラム分離や膜分離のようなプロセスにおいて生体膜あるいはそのモデルを利用しようとするなら、それらの安定化を最優先して検討を加えなければならない。

本稿は、生体膜を構成する脂質二分子膜の機能を分離化学、

HPLCには利用できないと考えている。それは、同法では脂質の溶出を押さえることができない点にあり、またきわめて複雑なイオン性もHPLCには不向きであると考え。

2.3 HPLCのための脂質膜アナログ

以上のような指摘は、脂質膜をHPLC用の有機相として利用することが不可能のように思わせるが、ここで脂質膜の機能をもう一度眺め直してみると、以外に単純な物質が脂質膜のモデルとして浮上してくる。すなわち、2.1の項で脂質膜が多様な機能を有することを述べたが、HPLCの有機相としてとらえた場合、すべての機能を再現する必要がないことに気がつく。目的に応じて機能を選択すべきであり、たとえば逆相系の液体クロマトグラフィー(RPLC)に照準を合わせるのであれば、疎水性や配向性(結晶あるいは液晶相)を中心に考えるべきであり、二分子膜構造や膜融合機能、フリップ・フロップなどを固定相上で再現する必要はないと決断できる。また、光学分割を対象としないのであれば、キラリティも導入する必要はない。RPLCに照準を合わせるのであれば、イオン性もかえって邪魔になるので、分子設計はその分、単純化できる。このような観点から、疎水性と配向性を有し、高分子化によっても側方拡散性がある程度維持される分子に限定すれば、分子設計はますます簡単になる。もちろん、固定化のための官能基の導入と容易に合成できることも考慮しなければならない。ポリマー-ODA_nは以上のような視点に立ち、著者らによって提案された最初の固定相脂質膜アナログ⁷⁻¹⁰⁾である。一般的に言えば、くし型ポリマーの範疇に入る化合物であり、テロメリゼーションと呼ばれる方法(Fig. 4)により一段階で収率よく合成できる単純高分子である。テロメリゼーションとは、連鎖移動定数の大きい試剤XY(テロゲン)存在下でのモノマーM(主としてビニル化合物)の重合反応であり、X-M_n-Yが得られる。重合度も50以下のものであれば、重合時のテロゲンとタクソゲンの初期仕

込み比によって調節できる。一見すると、ODA_nは二分子膜とは無縁の化合物に見えるが、機能を限定すれば脂質二分子膜をここまで一般化することができるという見本である。すなわち、ODA_nは決して水中では二分子膜を形成しないが、有機溶媒中で脂質膜同様に側鎖がよく配向し、結晶-液晶-等方相間の相転移を行う。さらに、この化合物の特徴として、高分子鎖の片方の末端にシラノール基との反応性が高いトリメトキシシリル基が導入されている点にあり、容易にシリカゲルのような支持体に共有結合によって固定化することができる。また、片方の末端だけが固定されるので、側鎖の配向性に及ぼす支持体からの影響も小さくなる。

2.4 脂質膜アナログの合成と固定化

テロメリゼーションのテロゲンとしては3-メルカプトトリメトキシシランが便利である。末端メルカプト基は連鎖移動定数が極めて大きいので、アクリレートなどのビニル化合物との相性が良く、モル比によって容易に重合度が調節できる(Fig. 4)。テロメリゼーションの特徴として、重合度分布が狭いことも特筆的である。固定化後も均質な特性が得られやすくなる。なお、通常はポリマーとしての特性が十分に期待できる重合度30前後のものを調製している。本報では主にオクタデシルアクリレートとのポリマーについて述べるが、Fig. 4に示すように、このテロメリゼーションは多彩なモノマーに適用でき、それらを利用して様々なポリマーグラフト型固定相¹²⁻¹⁶⁾の調製が可能となる。これらについては他の機会に紹介する。

得られたポリ(オクタデシルアクリレート)を適当な有機溶媒に溶解させ、多孔質のシリカを加えてかき混ぜるだけでポリマーのグラフト化が効率よく進行する。たとえば、粒径5 μm、細孔径150 nm、比表面積300 m² g⁻¹のシリカ粒子に対して実施した場合、最大重量比で25%までの導入が確認されている。

3. 固定化脂質膜アナログのキャラクタリゼーション

ポリマー-ODA_n(nは平均重合度)を乾燥状態において示差走査熱量分析(DSC)を行うと、昇温過程では40~45 °C付近にシヨルダ-を有し、約48 °Cに鋭い吸熱ピークをもつ相転移現象が観察される(Fig. 5a)。偏光顕微鏡観察では、これらの転移が、結晶-液晶、液晶-等方相間の相転移であることを示す。エックス線回折¹⁸⁾により、室温ではオクタデシル基が約4 nmの間隔で配向していることが明らかとなっている。同様な相転移挙動は、RPLCでよく使用される有機溶媒(たとえば、メタノール、エタノール、アセトニトリルやそれらの混合溶液)中でも観察される。一方、脂質膜は有機溶媒中でそのような相転移を示すことはないばかりか、溶解するであ

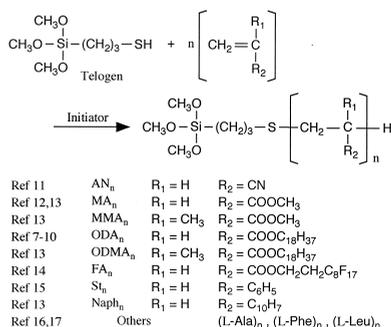


Fig. 4 Preparation of ODA_n as a lipid membrane analogue by telomerization. This method is applied to polymerization of many monomers. The resultant polymers can be grafted onto silica through the reactive terminal group at one side of the main chain.

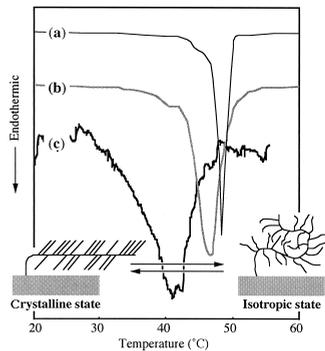


Fig. 5 DSC thermograms of ODA₂₇ (a and b) and Sil-ODA₂₇ (c). The thermograms b and c were obtained in the presence of methanol and methanol-water (7 : 3), respectively.

ろう。これらの点に関しては、明らかに脂質膜アナログとしてのODA_nの方がお手本である脂質膜より機能的であると言えるだろう。

シリカゲルに担持されたODA_n (以下, Sil-ODA_nと略す)も吸熱ピークを示すが, メタノール中では前転移は不明瞭になり, ピークトップの温度がさらに低温側にシフトする (Fig. 5c)。このことは, シリカゲル担体がODA_nの配向性にいくらか影響を及ぼすが, 少なくともODA_n側鎖の配向 (結晶) 状態が固定化後も維持されることを示している。シリカ固定化後の相転移挙動ならびに室温での分子配向性については, ¹H-NMR (ナブプローブ)⁹⁾によって容易に確認できる。

Fig. 5には, ODA_nのシリカ上での相転移 (結晶相 - 等方相)の様子を模式的に表している。なお, ODA_nの重合度と相転移温度の関係を調査すると, 重合度が約15までは重合度の増大とともに相転移温度の上昇が観察されるが, それ以上の温度でほぼ一定となる。

4. HPLCへの応用

4-1 ODSと何が違うか - まずは分子の平面性識別能について

Sil-ODA_nをステンレスカラムに充填し, メタノールを溶離液として各種の飽和炭化水素や多環芳香族の同族体の50で分離を試みると, 溶出順序はもっとも普及しているRPLC充填剤, オクタデシル化シリカゲル (ODS) とほぼ同一であった (Fig. 6a)。このことは, 分離モードに疎水性 (極性) に対する識別 (いわゆるRPLCモード) が含まれていることがわかる。ODA_nの側鎖がODSと同等のオクタデシル基を多数有することを考えれば, この結果に容易に理解できる。

Sil-ODA_nの特長は分離の温度依存性に見いだすことができる。ここで議論を単純化するために, スチルベンの2種の異性体に対する分離について取り上げる (代表的なクロマトグ

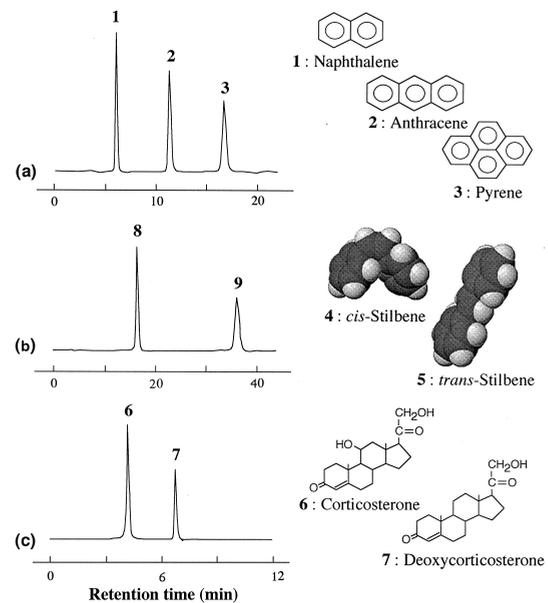


Fig. 6 Typical chromatograms with Sil-ODA_n columns (n = 27 in a and b; n = 17 in c) at 20°C. Mobile phases: methanol (a and c); methanol-water (7 : 3, b).

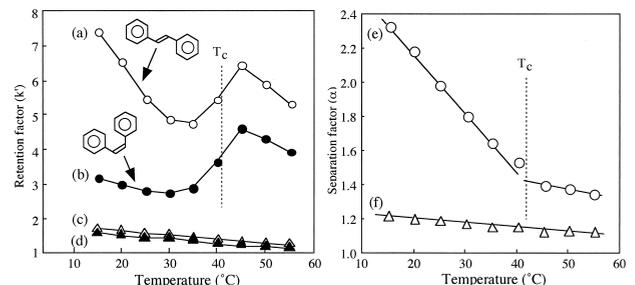


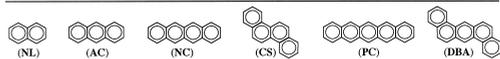
Fig. 7 Temperature dependencies on retention factors (a, b, c and d) for geometrical isomers of stilbenes with Sil-ODA₂₇ (○, ●) and ODS (△, ▲), and separation factors (e and f) between *trans*- and *cis*-stilbenes with Sil-ODA₂₇ (○), and ODS (△). T_c which corresponded to a peak-top temperature in a DSC thermogram was determined in a methanol-water (7 : 3) dispersion. Mobile phases: methanol-water = 7 : 3 (a, b and e), = 5 : 5 (c, d and f).

ラムをFig. 6bに示す)。Fig. 8は両異性体の保持係数 (k')ならびに分離例数 () の温度依存性を示している。まず, k' 値の温度依存性に注目すると, Sil-ODA_nにはODS には見られない著しい屈曲が見られ, その温度がSil-ODA_nの溶離液中での相転移温度とよく一致することがわかる (Fig. 7aとb)。このような特殊な温度依存性は分離係数においても観察される (Fig. 7e)。ODS では, 温度に対して無関係にほぼ同一で低い分離能 ($\alpha = 1.1 \sim 1.2$) が得られるのに対し, Sil-ODA_n では相転移温度以下の温度で分離能が著しく増大することがわかる (20 で $\alpha = 2.2$)^{9, 10)}

同様な特殊な温度依存性は, スチルベンと同様な幾何異性を有する各種のアゾベンゼン²⁰⁾ やターフェニルの異性体²¹⁾ についても観察できる。これらの異性体の分離に対する共通

Table 1 Typical retention factor and separation factor for aromatic hydrocarbons with Sil-ODA₂₃ and ODS in ethanol as a mobile phase

aromatic hydrocarbons	Sil-ODA ₂₃ at 5°C		Sil-ODA ₂₃ at 60°C		ODS at 5°C	
	k'	α	k'	α	k'	α
naphthalene (NL) C ₁₀ H ₈	0.22		0.22	0.20		
anthracene (AC) C ₁₄ H ₁₀	0.46	2.1	0.33	1.5	0.40	2.0
naphthacene (NC) C ₁₈ H ₁₂	2.35	5.1	0.54	1.6	0.65	1.6
chrysene (CS) C ₁₈ H ₁₂	1.30	17.6	0.48	2.1	0.63	1.4
pentacene (PC) C ₂₂ H ₁₄	41.4	9.4	1.13	1.03	1.03	
1,2,5,6-dibenzoanthralene (DBA) C ₂₂ H ₁₄	4.40		0.70	0.97	1.06	

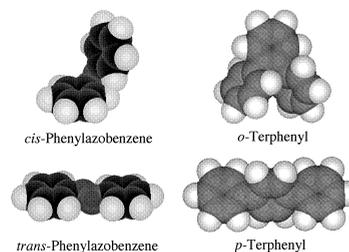
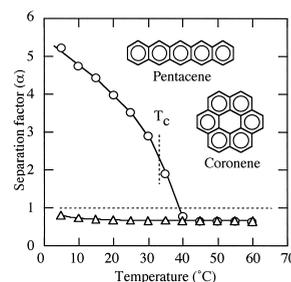


点の一つとして、平面性の高いトランス異性体や *p*-体において高い保持係数を示し、シス体や *o*-体のようにかさ張った異性体に対して低い保持係数を示す点に見いだせる (Fig. 8)。分子配向している脂質膜中に平面性の高いコレステロールが溶解しやすいように、結晶相にある Sil-ODA_n は、溶質の分子平面性に敏感な選択的取り込み (吸着) を示し、逆に等方性液体状態ではそのような分子形状に依存しない分配型の取り込みを示すものと考えられる。なお、アダマンタンのように著しくかさ高い有機化合物の保持挙動を調査すると、固定相が結晶相から等方相に変化する温度で著しく保持係数が増大する現象を書く察することができる。¹⁰⁾ もちろん、このような異常性は、ODS では認められない。なぜなら、ODS には温度変化に伴う物理状態の著しい変化 (相転移) が存在しないためである。

4-2 分子長を識別する

4-1 では固定相の分子配向性が分子平面性の識別能を増幅させることを明確にしたが、より正確には、溶質の分子形状に敏感であると言ったほうが良い。たとえば、溶質として Benzene, Naphthalene, Anthracene, Naphthacene, Pentacene を選択し、これらの保持係数や分離能を比較すると興味深い結果が得られる。これらの溶質はいずれも剛直で平面的な構造を有し、分子厚もほぼ同一である。異なるのは元素数と分子長である。Table 1²¹⁾ に代表的な結果をまとめているが、結晶相にある Sil-ODA_n においてのみ著しい分子長依存性が確認できる。しかしこの比較は元素数が異なるので、元素数の等しい Naphthacene と Chrysene, Pentacene と 1,2:5,6-Dibenzoanthracene の間で比較するとさらに興味深い結論を導き出すことができる。すなわち、より分子直線性が高い物質に対して選択性が高いことがわかる。

固定相の分子配向性と分子長識別能との関係をさらに明確にするために、Pentacene と Coronene の分離能をとりあげてみた。²¹⁾ Fig. 9 に示すように、ODS では、Coronene は Pentacene より常に高い保持係数 ($k'_{\text{Pentacene}} / k'_{\text{Coronene}} = 0.6 - 0.8$) を示す。これに対し、Sil-ODA₂₃ では、40 以下の温度で選択

Fig. 8 Structural differences between geometrical isomers. Crystalline ODA_n recognizes their molecular planarity.Fig. 9 Temperature dependencies on the separation factor ($K_{\text{Pentacene}} / K_{\text{Coronene}}$) with Sil-ODA₂₃ (○) and ODS (△) column. Mobile phase, ethanol.

性は逆転し、10 以下では約 5 まで増大した。一方、40 以上の温度での選択性は ODS とほぼ一致する。以上の結果は、(1) 等方相にある時は溶質の炭素数 (あるいは疎水性) に依存した分離 (すなわち RPLC モード) を示すが、(2) 結晶相において初めて、分子形状 (分子長) に対する識別能が増大することを示している。

固定相が結晶相にあるときにのみ著しい分子形状識別能が発現することが明らかとなったが、これを側鎖の分子配向だけで説明することはできない。なぜなら、移動相にアセトンやアセトニトリルのような電子含有溶媒を添加すると選択性が低下することや、側鎖が短く結晶相を形成しにくい Sil-MA_n においてもある程度多環芳香族に対して幾何異性識別能が発現することが確認されるからである。また、分子のかさ張り度 (分子厚あるいは分子平面性) に対する識別能については理解できるが、分子長に対する識別能についての説明もできない。以上の矛盾を埋める説明として、Sil-ODA_n に含まれるカルボニル基の存在に注目した。すなわち、カルボニル基とベンゼン環の間の相互作用 (カルボニル-相互作用)^{12, 13, 18)} を考慮することによって、特異な現象の多くを説明することができる。たとえば、(1) アセトンやアセトニトリルの添加による選択性の低下はそれらの電子によるものと理解できる。(2) 側鎖配向性を有しない Sil-MA_n の選択性もカルボニル基の存在に帰することができる。(3) Sil-ODA_n の分子形状識別能は、飽和炭化水素類よりも多環芳香族類に

対して著しく高いことも、カルボニル - 相互作用によるものと考えられる。最後に、(4)カルボニル - 相互作用の大きさを見積もるため、ホルムアルデヒド - ベンゼン錯体について *Ab initio* 計算を実施すると、約2.8 kcal mol⁻¹という大きな数値が得られる¹⁸⁾ことが上げられる。この値は、まったく同等の計算方法で求められたメタン - ベンゼン、ベンゼン - ベンゼン間の相互作用²²⁾よりも大きい。以上のことを考慮し、Sil-ODA_nの分子形状識別能をFig. 10²¹⁾のように推定した。Sil-ODA_nは結晶相で側鎖の配向とともにカルボニル基の配向も促進する。配向したカルボニル基は溶質分子が平面性に富み、また直線性が高い時にもっとも有効なカルボニル - 相互作用(多重相互作用)が可能となる(Fig. 10b)。PnetaceneやNaphthacene, *trans*-Stilbene, *p*-Terphenylなどがその典型的な例である。しかしながら結晶相にあっても、溶質がCoroneneのようにディスク状である場合には、カルボニル - 相互作用点が増減し、その分、保持係数の低下として観察される。Dibenzoanthracene (Fig. 10a)やChrysene,あるいはねじれ構造を有する*cis*-Stilbeneや*o*-Terphenylなどがその例となる。一方、等方相にある場合には、側鎖だけでなくカルボニル基の配向も存在しない(Fig. 10c)。従って、分離モードはあたかもODS類似のRPLCとなる。

4 - 3 光学分割(ジアステレオマー分離)への応用

Sil-ODA_nには光学活性は存在しない。光学分割剤として利用するには、分子設計の段階でキラリティの導入を考慮する必要があるが、ジアステレオマー化剤の併用によってSil-ODA_nの光学分割への可能性を推し量ることができる。現在広く知られているジアステレオマー化剤^{23, 24)}は、検出感度を高めるために各種の芳香環が導入されている場合がほとんどである。たとえば市販されている(S)-(-)-2,3-Naphthalenedicarboximidyl propionyl fluoride²⁴⁾を例にとり、Phenylethylamineとのジアステレオマーに対して液体クロマトグラフィーを実施すると、予想通りSil-ODA_nが結晶相にある温度で分割能の増大が観察される。¹⁸⁾一方、等方相となる温度では選択性は低下し、ODSと同等になる。選択性の温度依存性および結晶相での選択性の増大も、ジアステレオマー間での分子

平面性あるいは直線性の差(Fig. 11)に帰することができる。

4 - 4 ダイオキシシン類への適用

Sil-ODA_nのカルボニル - 相互作用に基づく分子形状識別能は、様々な物質の分離に適用できると考えられる。たとえば、芳香環に塩素原子が置換された各種のダイオキシシン類は多数の異性体が存在し、毒性はそれらの化学構造に著しく依存する。塩素原子の置換度が異なる場合には、異性体間での疎水性にある程度の差が存在するので、ODSによるRPLCによって分離可能であるが、置換位置がわずかに異なる場合に分離は困難となる。これに対し、Sil-ODA_nの場合には溶質の電子に由来する電子状態の差に敏感であるため、このような異性体の分離にきわめて効率的に作用する。²⁵⁾

5 . おわりに

現在、ODS全盛の感はいなめない。しかしながら、研究報告を検索すれば興味深い新規な有機相が数多くあり、ODSでは達成できない特殊な分離モードが確認されている。²⁶⁾本稿では、とくに著者らの研究成果を中心に特殊な有機相としてのくし型ポリマー、ODA_nを紹介させていただいた。ODA_nは、機能を極度に制限した脂質膜類似物と考えており、液体クロマトグラフィーの分野において、バイオミメティックな分離モードを導入するために開発されたものである。その化学構造は極めて単純で、それ自身、水中では二分膜を形成することはできないが、にもかかわらず、その特性は実に脂質二分子膜に類似しており、従来のRPLCでは達成しにくい分子形状認識型の分離を可能としている。

この新しい脂質膜類似物は、その化学構造において今後多様なモディフィケーションが可能である。^{11 - 16)}今回はその機能を著しく限定したために、イオン性やキラリティを排除しているが、たとえば光学分割を目的とする場合、分子中にキラリ中心を導入することも容易である。また、固定化方法も極めて単純であるので、テロゲン(末端の官能基に相当する)を変えることによって様々な担体への固定化も可能となり、カラム分離にとどまらず、今後、膜分離やセンサーシステムへの展開も期待される。

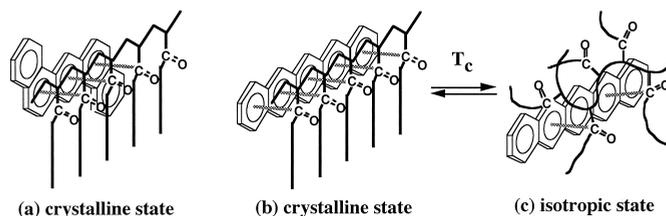


Fig. 10 Schematic illustration to explain the temperature dependence of molecular-linearity recognition through carbonyl- π interaction. If the carbonyl groups are linearly-aligned on highly-oriented structure, multiple interaction will be dominated for linear and planar substances.



Fig. 11 Structural difference between S-S and S-R isomers optimized by CAChe-Mopac Ver. 6.00 with the PM3 option.

参考文献

- 1) C. Pidgeon, U. V. Venkataram, *Anal. Biochem.*, 36 (1989) 176.
- 2) E. Ropez, D. F. O'Brien, T. H. Whitesides, *J. Am. Chem. Soc.*, 104 (1982) 305.
- 3) L. Regen, J. Shin, K. Yamaguchi, *J. Am. Chem. Soc.*, 106 (1984) 2446.
- 4) T. Kunitake, A. Tsuge, N. Nakashima, *Chem. Lett.*, 1984, 1783.
- 5) Y. Okahata, O. Shimizu, *Langmuir*, 3 (1987) 1171.
- 6) K. Toko, K. Hayashi, M. Yamanaka, K. Yamafuji, *Technology Digest of the 9th Sensor Symposium*,
- 7) C. Hirayama, H. Ihara, T. Mukai, *Macromol.*, 25 (1992) 6375.
- 8) H. Ihara, T. Fukumaoto, C. Hirayama, *Anal. Sci.*, 9 (1993) 711.
- 9) T. Fukumoto, H. Ihara, S. Sakaki, H. Shosenji, C. Hirayama, *J. Chromatogr.*, 672 (1994) 237.
- 10) H. Ihara, H. Tanaka, S. Nagaoka, K. Sakaki, C. Hirayama, *J. Liq. Chromatogr.*, 19 (1996) 2967.
- 11) H. Ihara, S. Okazaki, K. Ohmori, S. Uemura, C. Hirayama, S. Nagaoka, *Anal. Sci.*, 14 (1998) 349.
- 12) H. Ihara, H. Tanaka, M. Shibata, S. Sakaki, C. Hirayama, *Chem. Lett.*, 1997, 113.
- 13) H. Ihara, S. Uemura, S. Okazaki, C. Hirayama, *Polym. J.*, 30 (1998) 394.
- 14) C. Hirayama, H. Ihara, S. Nagaoka, T. Wada, *Polym. J.*, 26 (1994) 499.
- 15) H. Ihara, N. Nakamura, S. Nagaoka, C. Hirayama, *Anal. Sci.*, 11 (1995) 739.
- 16) H. Ihara, T. Nakanishi, T. Sagawa, C. Hirayama, T. Sakurai, T. Kinoshita, Y. Tsujita, *Chem. Lett.*, 1998, 963.
- 17) H. Ihara, T. Nakanishi, T. Sagawa, T. Sakurai, C. Hirayama, *Proc. 22nd International Symposium on Capillary Chromatogr.*, (1999) PG306, pp. 1-5.
- 18) H. Ihara, T. Sagawa, K. Nakashima, K. Mitsuishi, Y. Goto, J. Chowdhury, S. Sakaki, *Chem. Lett.*, 2000, 128.
- 19) 伊原博隆, 佐川 尚, 未発表資料
- 20) H. Ihara, T. Sagawa, Y. Goto, S. Nagaoka, *Polymer*, 40 (1999) 2555.
- 21) H. Ihara, T. Sagawa, Y. Goto, J. Chowdhury, *Proc. 22nd International Symposium on Capillary Chromatogr.*, (1999) PG301, pp. 1-7.
- 22) S. Sakaki, K. Kato, T. Miyazaki, Y. Musashi, K. Ohkubo, H. Ihara, C. Hirayama, *J. Chem. Soc., Faraday Trans. 2*, 1993, 659.
- 23) 例えば, S. Einarson, B. Josefsson, P. Moller, D. Sanchez, *Anal. Chem.*, 59 (1987) 1191; S. Miyano, S. Okada, H. Hotta, M. Takeda, C. Kabuto, H. Hashimoto, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 62 (1989) 1528; N. Nimura, T. Kinoshita, *J. Chromatogr.*, 352 (1986) 169; H. Bruckner, B. Strecker, *J. Chromatogr.*, 627 (1992) 97.
- 24) Y. Yasaka, M. Tanaka, *Japan Patent*, H6-179653
- 25) 岩本 政樹, 未発表資料
- 26) 例えば, H. Kanazawa, K. Yamamoto, Y. Matsushima, N. Takaki, A. Kikuchi, Y. Sakurai, T. Okano: *Anal. Chem.*, 68 (1996) 100; K. Kimata, T. Hirose, K. Morichi, K. Hosoya, T. Araki, N. Tanaka, *Anal. Chem.*, 67 (1995) 2556; S. Chen, M. E. Meyerhoff, *Anal. Chem.*, 70 (1998) 2523; J. Xiao, M. R. Savina, G. B. Martin, A. H. Francis, M. E. Meyerhoff, *J. Am. Chem. Soc.*, 116 (1994) 9341; K. Jinno, C. Okumura, M. Harada, Y. Saito, *J. Liq. Chromatogr.*, 19 (1996) 2883.