〔講演:キャピラリー電気泳動と生命解析科学〕

CZE エレクトロフェログラムの標準化

廣川 健・育田夏樹・吉山竜也・岡本 光 芝山貴幸・真鍋雄生

SUMMARY

Although chromatography is widely utilized, it is behind the other analytical methods from the viewpoint of the standardization of the data. This is because usual chromatograms are strongly dependent on the used hardware. Capillary electrophoresis is not either the exception: The obtained electropherograms are also dependent on the hardware such as capillary length, capillary inner surface, applied voltage, and thermostatting capacity etc, even if the same background electrolyte and the same sample is used. We have developed a conversion method of the time-based electropherograms of capillary zone electrophoresis (CZE) into the mobility-based ones by removing contribution of electroosmotic flow considering temperature rise caused by Joule heating. The conversion method also contained correction for delay of migration time caused by relaxation of potential gradient at sample plug. In this paper, after discussing the factors affecting migration time of CZE, electropherograms of rare-earth ions obtained using different migration voltage were converted to demonstrate utility of our method proposed for standardization (data transfer). The conversion method was also successfully applied to electropherograms of several cations obtained by using field enhanced sample stacking.

Key words : CZE (capillary zone electrophoresis), electropherograms, conversion, standardization, stacking.

はじめに

クロマトグラフィーは広く利用されているが,得られる クロマトグラムはハードウエアに著しく依存するため,デ ータの標準化という面で,他の機器分析法に比べ,立ち後 れている。キャピラリー電気泳動法(CE)も例外ではな く,得られるエレクトロフェログラムは試料・電解液条件 が全く同じであっても,キャピラリー長,キャピラリー内 部表面(電気浸透流に影響),印加電圧,温度調節能力な どのハードウエアに依存する。このため,異なる装置で測 定されたエレクトロフェログラムの相互比較は時間軸に関 して意味を持たないのが普通である。一方,エレクトロ フェログラムの縦軸は,例えばUV/VIS検出器を使用し た場合,吸光度という規格化された数値で相互比較が可能 であるので、なんらかの方法により時間軸を変換し、相互 比較が可能なパラメーターを採用すれば、エレクトロフェ ログラムの標準化が可能になる.

CEにはそれぞれ特徴ある種々のモードが存在する が^{1,2)},キャピラリーゾーン電気泳動法(CZE)の場 合^{3,4)},分離の基本原理はある支持電解液条件下における 試料成分間の実効移動度差である。実効移動度は同じ温度 で同じ支持電解液が使用される限り一定である。また CZEの分離の場は自由溶液系であり、複雑な液-固相互作 用を考慮しなくてよいため、上述のハードウエア依存性を 除去できる可能性がある。しかしながら、通電によりジュ ール熱が発生するので、キャピラリー内の温度は温調装置 の設定温度より上昇することは避けられない。また分離場 の電位勾配は試料の組成に応じて変化し、これらはしばし

Standardization of electropherograms of CZE.

Takeshi Hirokawa, Natsuki Ikuta, Tatsuya Yoshiyama, Hikaru Okamoto, Takayuki Shibayama, Yuuki Manabe;広島大学 大学院工学研究科物質化学システム専攻応用化学講座応用分析化学

Correspondence address: Takeshi Hirokawa, Department of Applied Chemistry, Chemistry and Chemical Engineering, Graduate School of Engineering, Hiroshima University, 1-4-1, Kagamiyama, Higashi-hiroshima 739-8527, Japan. 第 51 回日本電気泳動学会総会・招待講演

ば泳動時間の再現性を悪化させる.

我々は、ジュール熱による温度上昇を考慮しながら電気 浸透流の寄与を除去することによって、時間ベースの CZE エレクトロフェログラムを移動度ベースのフェログ ラムに変換する方法を開発した^{5.6)}.この変換法は、電位 勾配の緩和による泳動時間の遅れの補正も含んでいる。電 位勾配の緩和とは泳動初期に高い電位勾配のゾーンが生成 し、その電位勾配が徐々に平均値(印加電圧/キャピラリ ー長)に漸近するように減少する現象を言い、特にスタッ キング効果を利用して低濃度試料を分析する場合に著し い。実効移動度を横軸とする標準化されたエレクトロフェ ログラムではハードウエアや試料依存性をかなりの程度ま で消去でき、異なる装置間でのデータ比較およびデータベ ース化に有用であると考えられる。

本論文では、まず CZE エレクトロフェログラムの標準 化を検討するにあたって重要となる泳動時間の再現性につ いて述べる.ついでこれらを考慮した「標準化のための変 換法」の原理について述べ、希土類混合試料などを用いて 具体的にデータ標準化の有用性を示す.

キャピラリー電気泳動法における 泳動時間の再現性について

1. 泳動時間に影響する因子

泳動時間の再現性は、CZE による定性・定量の精度に 直接かかわる重要な因子の一つである。この再現性は種々 の実験的な理由のほか、CZE 分離系の性質に起因する原 理的な因子によって影響を受ける。CZE でのイオンの泳 動速度(*v*_{mig})は次式のように電気泳動速度(*v*_{ep})と電気 浸透流速度(*v*_{eof})の和として与えられる。

 $v_{mig} = v_{ep} + v_{eof} = (\overline{m} + \epsilon \zeta / \eta) E$ (1) ここで \overline{m} はある試料成分イオンの実効移動度, E は分離 キャピラリー内の電位勾配(印加電圧/キャピラリー全 長), ϵ , ζ , η はそれぞれ溶媒の誘電率, キャピラリー内 壁のゼータ電位, 溶媒の粘度である.

試料の泳動時間 tmig は次式で与えられる。

(2)

ここに l はキャピラリー末端から検出器までの距離(キャ ピラリー有効長)である。キャピラリー全長が同じでも l は装置メーカー毎に異なる。1 式・2 式から明らかなよう に, tmig には種々の因子が関与している。これらの因子の 特性のため,仮に l や他の実験条件を一致させたとしても tmig は必ずしも一致しない。この理由について,以下詳し く述べる。

2. 温度制御の影響

 $t_{\rm mig} = l/v_{\rm mig}$

1式中の \bar{m} , ϵ , ζ , η は, 程度の差はあるが全て温度 依存性を示す。したがって, 再現性のよい電気泳動分析を 行うためには温度制御が最も重要である。しかし, キャピ

ラリーチャンバーの温度をある一定値に制御することは可 能であっても, 通電により発生するジュール熱によるキャ ピラリー管内の温度上昇は避けられない。このため移動 度・浸透流が変化し泳動時間の再現性が影響を受ける。図 1にキャピラリーチャンバーの温度を一定値(25℃)に制 御し,印加電圧を変化させて測定したランタニドイオンの エレクトロフェログラムを示す。もし管内の電解液の温度 が一定であるならば1式で表される移動速度は印加電圧に 比例するはずであるが、図1を注意深く見ると、例えば Kイオンの泳動時間は電圧変化に対して非線形な変化を 示している。これはジュール熱の発生による温度上昇が原 因である. すなわち印加電圧を高くするとキャピラリー管 内の温度が恒温槽設定温度(図1では25°C)より上昇し, その結果,支持電解液の粘度ηが小さくなり移動速度が 大きくなったと解釈できる. このような場合, 成分イオン の移動度が温度上昇とともに増加するためオームの法則が 成立せず,泳動電流は電圧の変化に対して直線的に変化し なくなる (図3参照).



図1. ランタニド混合試料 (14種ランタニド45 mg/l, Li 15.5 mg/l, K 30.4 mg/l, 全て塩化物)のエレクトロフェ ログラム.

実験条件:支持電解液, クレアチニン 30 mM+ α -ヒドロキシイソ 酪酸 4 mM, 酢酸を加えて pH 4.8;装置, CAPI-3100 (大塚電 子) UV 間接吸収法 (λ =220 nm),シリカキャピラリー,75 μ m I. D.×70 cm (有効長 57.7 cm);印加電圧,30~10 kV;泳動槽設 定温度,25°C;注入条件,落差法 (20 mm, 60 sec). 同一の装置・キャピラリー・支持電解液を使用した実験 であっても、図1のように異なる電圧条件で得られたフェ ログラムを比較して、なんらかの定性・定量の知見を得る ことは従来不可能とされてきた。異なる装置間でのデータ 比較は印加電圧を含め実験条件を統一すればある程度可能 と思われるが、キャピラリー内部の温度は温調の方式に依 存するので、他の実験条件を一致させたとしても *tmlg* は必 ずしも一致しない。標準化という観点からすると、基準温 度への変換が必要となる。

3. 電位勾配の緩和

CZE で良好な泳動時間再現性を得るには,温度のほか, 1 式中の電位勾配 E が一定でなければならない. CZE で は通常定電圧駆動で分析が行われるため,平均電位勾配の 制御は容易である.しかし,キャピラリー管内の局部的な 変化は制御できない.すなわち,試料の移動度が支持電解 液中の co-ion と同じ移動度である場合を除きキャピラリ ー内部の電位勾配は試料に応じて変化するだけでなく,試 料の濃度やカウンターイオンの移動度・試料注入量に応じ て泳動中にかなり大きく変化し,泳動時間に影響する.し かし,このような電位勾配の変化はシャープなピークを得 るためには不可欠である.もし支持電解液と試料溶液との 間に電位勾配の差がなく,泳動中も保たれるようなことが あれば,試料はピーク状にならず,拡散のため注入プラグ が台形状になったピークが観察されるのみである.

我々のシミュレーションによれば,特に希薄な試料を注 入した場合やカウンターイオンの移動度が支持電解液のそ れに比べて大きい場合には E の時間変化は無視できず, 泳動時間の再現性に重要な影響を及ぼすことがわかった. 特に CE の低感度を補うため希薄試料を大量注入し stacking 効果を利用する場合,電位勾配の変化は長時間にわた る点が問題である.また後述するように,希薄溶液の注入 は局部的な電気浸透流の変化を伴い,これも再現性に悪影 響を及ぼす.このような場合,同一装置・同一実験条件を 使用した場合でも,標準試料のエレクトロフェログラムを もとに実試料を分析する際,分析精度低下の原因となる.

この現象は泳動時間を遅らせるように作用するが,低濃 度試料を扱うときは後に述べるように同時に電気浸透流速 度が上昇する現象が付随するので,結果的に分離ウインド ウが狭くなるという現象が見られる.この点については後 述する.

4. 浸透流速度の変化

シリカキャピラリー表面のシラノール基は解離してアニ オン化し、1式における ζ の原因となる。シリカ表面とは 逆にキャピラリー内の溶液はプラスに帯電し、泳動電圧の 印加に伴い負極に移動する(電気浸透流)。シラノール基 は弱酸性(pK は 5~6 程度)であるため、電気浸透流移 動度には pH 依存性がある。イオン強度が一定の場合、 pH が 8 以上では浸透流移動度は最大となり,逆に 3 以下 になると移動度はかなり小さくなる. ζ はイオン強度が小 さいほど大きいので,支持電解液や試料のイオン強度に影 響を受ける.さらに ζ はシラノールの密度と直接関係す るから,キャピラリーの製法やロット・前処理(コンディ ショニング)の方法などによっても変化することに注意す る必要がある.

同一装置・同一実験条件での再現性にもっとも大きな影響を与えるのはキャピラリーの交換であろう。同じ製造ロットのキャピラリーに交換し、同じようにコンディショニングを行ったとしても、長時間使用したキャピラリーの表面状態は変化しているので、同一の浸透流速度を期待することは困難である.

図2に希土類イオンを試料としてアルカリ洗浄後の泳動 時間の変化を示した。図2から明らかなように、アルカリ 洗浄後にpH=4.8の支持電解液を使用して測定を繰り返 すごとにシステムピークの出現時間が遅くなることが確認 できる。これは、キャピラリー内壁の状態が各ランの前後 で異なり、イオン化したシラノール基がしだいに少なくな ってくるためで、その結果くが小さく(すなわち、veor が 小さく)なり、結果としてシステムピークの出現時間が遅



 図2. ランタニド混合試料(14種ランタニド+Y50 mg/l, K, Na, Li,全て塩化物)のエレクトロフェログラム。
測定前に10 mM NaOH を減圧下300秒流した後,水で300秒支 持電解液で300秒洗浄。各測定後は支持電解液で300秒洗浄。

れることになる.このように,浸透流には履歴現象が見ら れるので注意を要する.この現象の影響を抑えるために は,測定前に毎回アルカリ洗浄を行うことが有効である. なおスタッキング効果を期待して低濃度の試料を大量に注 入した場合,同じキャピラリー・支持電解液であっても試 料プラグ部の浸透流速度が増加するため,全体の浸透流速 度も増加する.

エレクトロフェログラムの標準化のための 変換法(温度係数法)

以上述べたように、CZE における時間軸の再現性には 種々の要素が関与しているため、旧来のエレクトロフェロ グラムを使用する限りハードウエア依存性は避けられな い.この点を改善し、異なる条件でのデータ比較を可能に する方法として、従来いくつかの方法が提案されている.

Lee と Yeung は通電した電気量を横軸とする方法を提唱 している (Migration index, MI)⁷⁾. この方法は温度変化 をかなり吸収するよい指標であるが,厳密には温度依存性 のある溶媒の粘度と支持電解液の比電導度の項が残ってい る. さらにより深刻な問題として,浸透流の変化に対応で きない. すなわち1式でくが異なる系では相互比較がで きない. この点を改良するため,LeeらはAdjusted Migration index (AMI) という概念を導入し,電気浸透 流速度で移動するシステムピークまたは中性マーカーの MI に対する相対値を取ることによってこの問題を回避し ようとした.しかし AMI にも依然として温度依存性のあ る項が残っており十分とは言えない.さらに,こうして得 られた指標の物理的意味が希薄である.

このような問題を回避するため,我々はある参照温度に おける1式の移動度(m)を横軸とすることを検討してき た.我々は既にこのための変換法として,いくつかの方法 を提案している。その変換法の優劣等については文献 6) に詳しい。ここでは温度係数法について簡単に述べる。

従来法では実効移動度は次式で求められる.

 $\overline{m} = v_{\text{ion}}/\overline{E}$ $= \frac{l/t - v_{\text{eof}}}{V/L}$ (3)

ここに v_{ton} はあるイオンの電気泳動速度, \bar{E} は平均電位 勾配 ($\bar{E} = V/L$), l はキャピラリー有効長, v_{eof} は移動度 0 の物質のピークもしくはシステムピークの泳動速度 ($v_{\text{eof}} = l/t_{\text{eof}}$, t_{eof} はピークの泳動時間), V は印加電圧, Lはキャピラリー全長である.

図1に示したエレクトロフェログラムを3式を用いて変換し、図3に示した。図より明らかなように、3式を使用 して得られる実効移動度は分離キャピラリー内の支持電解 液温度での実効移動度である。その温度は分離キャピラリ ーを納めたサーモスタットの温度より必ず高い。図3中の



図3. 図1のランタニド混合試料のエレクトロフェログラム を従来法で移動度に変換。

印加電圧, 25~5 kV;他の条件は図1に同じ.

温度は K⁺ の移動度の温度依存性から推定した値である. このように 3 式による変換は泳動電流の大きさやキャピラ リーの冷却方法などにより影響を受けるので,標準化には 有用でない.例えば電気伝導度計において 25°Cの値への 換算が伝導度の対温度直線性を利用して行われるように, 移動度についても同様な換算を簡単に行うことができれば 便利である.

3 式による変換の別の欠点は、暗黙のうちに分離システ ムの電位勾配 \bar{E} が一定であると想定している点である。 既に我々が明らかにしたように、試料成分の泳動速度を支 配する支持電解液の電位勾配は、泳動開始時平均電位勾配 よりしばしば低く、電気泳動の進行とともにしだいに平均 電位勾配に漸近する(電位勾配の緩和)⁸⁾.この結果、泳 動時間は理想的な状態(すなわち泳動時間中系の電位勾配 が平均電位勾配に等しい)に比べ、遅れることになる。電 気回路の保護のため泳動電圧は数秒かけて所定の電圧に到 達するようプログラミングされていることもあるが、もち ろんこのような効果も泳動時間の遅れの原因となる。

我々の変換法(温度係数法)はこれらの二点(キャピラ リー内温度上昇と電位勾配の緩和)を考慮したもので,次 式で表される.

 $\overline{m} = l/\{(t-\tau)E\} - m_{\text{eof}} \tag{4}$

ここで τ は電位勾配の緩和効果を補正する泳動時間の遅れ, m_{eof} は電気浸透流移動度である.

一方,イオンの移動度は温度に対してほぼ直線的に比例 して増加するため次式が成立する.

 $\bar{m} = m_0(1 + \alpha \Delta T)$

(5)

ここに *a* は温度係数であり、イオンにより微妙に異なる が 0.02 程度の値をとり、イオンによらないとみなしてよ い. したがって 4 式と 5 式から次式を得る.

$$m_0 = [l/\{(t-\tau)E\} - m_{\rm eof}]/(1 + \alpha \varDelta T)$$
 (6)

ここで、 τ , $1+\alpha\Delta T$, m_{eof} は未知数である. これらを求 めるためには,移動度が既知の3種のピークの泳動時間が 必要である.本報中の変換例では,2種の内標準試料およ びシステムピーク(あるいはノニオンのピーク)をこの目 的に使用している.内部標準の移動度は既知でなくてはな らない.我々は移動度がよく知られている単純なイオンを 内部標準に使用し,絶対移動度をイオン強度補正して使用 している.またできる限り目的試料を挿むように選ぶほう がよい.詳細については文献 6)を参照されたい.

図1に示したフェログラムを温度係数法で変換し,図4 に示した。図4の全てのフェログラムが大変よく一致して おり,本変換法の有用性が明らかである。図2に示したよ うな比較的わずかな時間のずれを起こしている場合,変換 して得られたフェログラムの横軸はほぼ完全に一致する。



図4. 温度係数法により図1のランタニド混合試料のエレク トロフェログラムを移動度に変換。

スタッキング効果を利用して得られた エレクトロフェログラムの変換

CE 法の欠点の一つである低濃度感度を補うため、しば しば希薄な試料を大量に注入し CE 分析が行われる. この 場合,図5に示したようにスタッキング効果^{9,10}と呼ばれ る前濃縮が試料プラグと支持電解液の界面で起こる. すな わち,この場合,試料溶液の電気伝導度は支持電解液より 低いので,試料プラグ部の電位勾配は大きくなり,支持電 解液の電位勾配は平均の電位勾配よりはずっと小さくな る.その結果,試料はプラグ部を迅速に移動するが界面で 停滞するので,結果的に試料成分の濃縮が起こる.

この現象は希薄試料の分析に有用であるが、既に報告さ れているように^{11,12},移動度の小さい試料成分の泳動時間 は希薄試料の体積に逆比例し短縮し、定性・定量の支障と なることが知られている。

図6に0.06 mMの試料についてスタッキングにより得 られたエレクトロフェログラム(泳動電圧10 kV, キャピ ラリー40 cm)を示した.試料の注入には落差法を使用し 25 mmで20秒から260秒とした.Hargen-Poiseuille式 によれば,試料注入量は11~139 nl,試料プラグ長は 0.24~3.15 cm,そして試料中の各成分量は0.64~8.34 pmolと推定された.テスト用混合試料の電導度は25.6

1) 試料充填





図6.5種カチオン混合試料(KCl, NaCl, LiCl, Tris, ϵ -アミノカプロン酸,各0.06 mM)の実測エレクトロフェロ グラム(a)および移動度軸に変換したエレクトロフェログラ ム(b).

実験条件:支持電解液, クレアチニン 30 mM, 酢酸を加えて pH 4.8; 装置, CAPI-3100 (大塚電子) UV 間接吸収法 (λ = 220 nm);シリカキャピラリー, 75 μ m I. D.×40 cm (有効長 27.7 cm);印加電圧, 10 kV;泳動槽設定温度, 25°C;注入条件, 落差 法 (25 mm).

µScm⁻¹,支持電解液のそれは0.861 mScm⁻¹ であるから, この系では強いスタッキング効果が期待される.図6aは 落差法により試料注入時間を20秒から260秒まで変化さ せた時の実測フェログラムである.図6aより明らかなよ うに,Kピークの泳動時間は比較的よく一致しているも のの,システムピーク(試料プラグ部)の出現時間が試料 の導入量に逆比例して短縮している.この実験では260秒 試料を導入した場合,分離ウインドウが狭くなって分離時 間が不足し,LiとTris間でベースライン分離ができなく なっている.

図 6 a に示した実測エレクトロフェログラムを 6 式を用 いて変換するにあたり、K⁺、Li⁺ と System peak の先端 の移動度をそれぞれ 70.9×10⁻⁵、35.7×10⁻⁵、0×10⁻⁵ cm²V⁻¹s⁻¹ とした。前 2 者の値は各イオンの 25°Cにおけ る絶対移動度¹³⁾を使用した溶液のイオン強度で補正して 得た理論値である¹⁴⁾.6式を用いると,図6bに示したような移動度を軸とするフェログラムが得られた.注入量が多くなると一致の程度は低下するが,それは定性分析を妨害することはなく,本変換法の有用性が改めて確認できた.

図6aでは注入体積の増加とともにシステムピークが非 常に早く移動するようになる一方,K⁺の泳動時間はむし ろわずかに遅く移動するようになっている。この現象はど のように説明できるのであろうか?

CZE において, 試料成分の移動速度は電気泳動速度 (vep) と浸透流速度(veof)の和で与えられる. 浸透流速 度の寄与を分離用キャピラリーを試料プラグ部と泳動バッ ファー部に分けて, それぞれの浸透流移動度を meof,p およ び meof,b とすると,移動速度は次式で与えられる.

 $v_{\rm mig} = v_{\rm ep} + v_{\rm eof}$

 $+ m_{eof}$

 $= m_{\rm s,se} E_{\rm se} + (m_{\rm eof,sp} E_{\rm sp} l_{\rm sp})$

$$_{\rm se}E_{\rm se}(L-l_{\rm sp}))/L$$

(7)

ここで $m_{s,se}$ は泳動バッファーにおける試料 S の移動 度, E_{se} , E_{sp} は泳動バッファーおよび試料プラグの電位勾 配, l_{sp} , L はそれぞれプラグ長とキャピラリーの全長であ る. 印加した電圧 V は次式で与えられる.

 $V = E_{\rm sp} l_{\rm sp} + E_{\rm se} (L - l_{\rm sp}) = E_{\rm av} L \tag{8}$

ここに *E*av は平均電位勾配である.8式を7式に代入すると次式を得る.

 $v_{\rm mig} = m_{\rm s,se} E_{\rm se} + m_{\rm eof,sp} E_{\rm av}$

 $+(m_{\text{eof,se}} - m_{\text{eof,sp}})E_{\text{se}}(L - l_{\text{sp}})/L \tag{9}$

ここで、第1項は泳動バッファー中での試料の移動速度、 第2項・第3項は浸透流速度である。9式において l_{sp} が Lに漸近した場合を考えると、第1項・第3項は0に漸 $近する。結局、全ての成分イオンの移動速度は<math>m_{eof,p}E_{av}$ に、泳動時間はキャピラリー有効長(l_{eff})/ $m_{eof,p}E_{av}$ に漸近 することになり、移動度の大きい K⁺ では泳動時間が遅 れ、移動度の小さいイオンでは泳動時間が早まることにな る。

希薄な電解液のイオン強度は低く、キャピラリー壁のゼ ータ電位は高くなるため、 $m_{eof,sp}$ は $m_{eof,se}$ よりずっと大 きい。その結果、図6aに示したように、システムピーク の泳動時間は短縮することになり、カチオンに対する分離 ウインドウはプラグ長の増加とともに狭くなる。なお、 L- l_{eff} より長い試料プラグを導入すると、プラグ部がまだ 検出中に一部キャピラリーから抜けるため浸透流の小さい 部分が増え、実際には泳動速度が $m_{eof,p}E_{av}$ に到達するこ とはない。

おわりに

以上述べたように、従来用いられてきた時間を横軸とす る CZE のエレクトロフェログラムはハードウエアに依存 するが、基準温度(25°C)における移動度を横軸とするこ とによりハードウエアに依存しない、したがって、装置間 でも互換性のあるエレクトロフェログラムを得られること を示した.このことは実際に異なるCE装置を用いて確認 済みである.なお定量分析に関してはスペースの都合によ り割愛させていただいたが、検出時の見かけの速度をピー ク面積に乗じることで良好な互換性を得ることができる. 本報ではカチオンのみを扱ったが、CZEであればもちろ んアニオンにも適用可能である.

文 献

- 1) キャピラリー電気泳動;基礎と実際.本田 進,寺部 茂編. 講談社, 1995.
- 2) Foret F, Krivankova L, Bocek P. Capillary zone electrophoresis. Weinheim : VCH, 1993.
- 3) Mikkers FEP, Everaerts FM, Verheggen ThPEM. J Chromatogr 1979; 169: 11-20.
- 4) Jorgenson JW, Lukacs KD. Anal Chem 1981; 53:

1298-302.

- 5) Ikuta N, Yamada Y, Hirokawa T. Electrophoresis 2000; 21: 360-6.
- 6) Ikuta N, Yamada Y, Yoshiyama T. Hirokawa T. J Chromatogr A 2000; 894: 11-7.
- 7) Lee TT, Yeung ES. Anal Chem 1991; 63: 2842-8.
- 8) Ikuta N, Sakamoto H, Yamada Y, Hirokawa T. J Chromatogr A 1999; 838: 19-29.
- 9) Quirino JP, Terabe S. J Chromatogr A 2000; 902: 119-35.
- 10) Shihabi ZK. J Chromatogr A 2000; 902: 107-17.
- 11) Beckers JL, Ackermans MT. J Chromatogr A 1993; 629: 371-8.
- 12) Hirokawa T, Ikuta N, Yoshiyama T. J Chromatogr A 2000; 894: 3-9.
- 13) Hirokawa T, Nishino M, Aoki N, Kiso Y, Sawamoto Y, Yagi T, Akiyama J. J Chromatogr 1983; 271: D 1-D 106.
- 14) Robinson RA, Stokes RH. Electrolyte solutions. London: Butterworths, 1959.