

氏 名(本籍)	あか 赤	さか 坂	かず 和	あき 昭
学位の種類	農	学	博	士
学位記番号	農	博	第 379	号
学位授与年月日	昭和 63 年 3 月 25 日			
学位授与の要件	学位規則第 5 条第 1 項該当			
研究科専攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 食糧化学専攻			
学位論文題目	新しい発蛍光反応を利用した H P L C に よる蛍光微量分析法の開発に関する研究			
論文審査委員	(主 査)			
	教授	目黒	熙	教授 安元 健
				教授 藤本健四郎

論文内容要旨

第 I 章 序 論

最近の高速液体クロマトグラフィー (HPLC) の急速な発展, 特に, カラムの分離能と検出感度の向上により, 従来では分析できなかった多くの化合物の, 高感度で精度良い分析が可能となってきた。特に, 感度, 及び, 選択性に優れた蛍光検出法, 電気化学的検出法, 生物・化学発光法などの HPLC への応用は, 生体試料や食品のような複雑な系の中に含まれる極微量な成分の高感度・高選択的な分析に適した方法である。これらの方法の利用に際し, 分析対象となる化合物が上記の検出法では検出されない場合には, プレ, 或はポストカラム法によるラベル化が必要となり, これまでにもこの目的のため多くの試薬の開発・応用がなされてきている。

本研究では, HPLC のための新しい蛍光分析法の開発を目的とし, 新しい発蛍光反応の開発とその分析への応用について検討した。第 II 章では, カルボン酸の蛍光ラベル化試薬 (9-ブロモメチルアクリジン) の開発と脂肪酸分析への応用について, 第 III 章では, 過酸化脂質分析のための蛍光検出試薬 (ジフェニル-1-ピレニルホスフィン) の開発とその応用について, 更に, 第 IV 章では, 最近明らかにされた N-(9-アクリジニル)マレイミドと亜硫酸の発蛍光反応を用いた亜硫酸の分析法の開発についてそれぞれ検討した。

第 II 章 9-ブロモメチルアクリジン (9-Br·Ma) を用いた HPLC による脂肪酸の分析

〔II-1: 緒言〕 自然界に広く存在する脂肪酸, 及び, その誘導体は非常に多様な生理活性を有しており, 食品学, 栄養学, 臨床化学, 医学など広い分野で注目されてきている。本章では, HPLC を用いた脂肪酸の高感度分析のための蛍光ラベル化試薬の開発とその応用について検討した。II-2 では, 9-ブロモメチルアクリジン (9-Br·Ma) の合成, 及び, 反応性について, II-3 では, 生成した 9-アクリジニルメチル (9-AM) 誘導体の HPLC による分離と定量性, 及び, 血漿中の遊離脂肪酸の定量への応用について, 更に, II-4 では, 油脂の脂肪酸組成分析のためのトリアシルグリセロールのケン化とそれに続くラベル化法についてそれぞれ検討した。

〔II-2〕 カルボン酸のラベル化試薬としてベンジルブロマイド型の 9-Br·Ma を合成した。この試薬は, 安価な原料より短行程で収率よく調製することができた (Fig. 1)。9-Br·Ma と脂肪酸の反応は DMF 中, 塩基としてテトラエチルアンモニウム炭酸塩 (TEAC) を加えることにより, 室温で 10 分以内という非常に穏和な条件下で進行し, 脂肪酸の 9-AM エステルをほぼ定量的に与えた (Fig. 2)。この生成物は冷暗所に保存することにより 1 週間以上安定であった。また, 425 nm (励起波長 360 nm) に極大波長を有する蛍光を示し, また, 252 nm にモル吸光係数が約 2×10^5 と非常に強い UV 吸収を示したことから, 熱などに不安定なカルボン酸類の高感度な蛍光及び UV ラベル化試薬としての有要性が示唆された。

〔Ⅱ-3〕 9-Br・Ma と脂肪酸の反応により生成した 9-AM エステルの HPLC による分離・定量条件について検討した。カラムとして逆相系の ODS カラムを用い分離溶媒組成（メタノール-水系）、及び、温度を変化させ、この時の保持時間に与える脂肪酸の炭素数、及び、二重結合数の影響について明らかとした。この結果を基に、高度不飽和脂肪酸を含む15種の脂肪酸誘導体の分離条件を設定し、各誘導体を pmol レベルで分離・検出することができた（Fig. 3）。また、ヒト血漿 100 μ l を試料として、クロロホルムにより遊離脂肪酸を抽出し溶媒を除去した後、9-Br・Ma でラベル化し、HPLC に導入することにより脂肪酸の定量が可能であった（Fig. 4）。この方法における添加回収率は何れの脂肪酸誘導体についても95～106%であり、また、測定値の変動係数は5%以内であった。

〔Ⅱ-4〕 油脂の脂肪酸組成分析のための簡単なケン化と 9-Br・Ma によるラベル化法について検討した。試料溶液に大過剰の TEAC メタノール溶液を加え、密栓し60℃の湯浴中で5分間加熱した。更に開栓してから30分間加熱を続け、溶媒を除去すると共に完全に脂肪酸まで加水分解した。窒素気流により完全に溶媒を除き、DMF に溶媒を置換した後、これに 9-Br・Ma 溶液を加えラベル化し、HPLC により脂肪酸組成分析を行った（Fig. 5）。加熱温度を高くするとリノール酸の異性化が認められたが、本条件下では異性化は認められなかった。バターに対して脂肪酸を添加した結果、92～102%の回収率を得た。また、変動係数はミリスチン酸の場合 2.5%（42.8 pmol, n=6）であった。本法により植物油、及び、バター、マーガリンの脂肪酸組成分析を行った結果、加工食品であるバター、マーガリンよりオレイン酸の異性体であるイソオレイン酸を検出した。

第Ⅲ章 過酸化脂質の蛍光分析試薬の開発とその応用

〔Ⅲ-1：緒言〕 脂質の過酸化によって生成する過酸化脂質は、食品の呈味性、風味、及び、栄養価を低下させ食品化学において非常に大きな問題の一つとなっている。また、近年、生体内における過酸化脂質の生成と、ある種の疾患、或は老化との関係が注目されてきている。しかし、これまで報告されてきた過酸化脂質の分析法は、感度、選択性、再現性、或は簡便性等の点で問題を残すものが多く、充分満足できる方法とは言えなかった。

本研究では、過酸化脂質、特にヒドロペルオキシドの新しい分析試薬の開発とその応用を目的とし、Ⅲ-2において、ホスフィン試薬の合成とその特性を検討した。また、Ⅲ-3では、合成した試薬の中で最も有望と考えられたジフェニル-1-ピレニルホスフィン（DPPP）を用いた液相法によるヒドロペルオキシドの定量法について、更に、Ⅲ-4では、DPPPのHPLCポストカラム法への応用についてそれぞれ検討した。

〔Ⅲ-2〕 脂質過酸化物の一つであるヒドロペルオキシドの定量的還元法として知られている

トリフェニルホスフィンの反応 (Fig. 6) に着目し、その誘導体を合成し、それらのスペクトル特性、及び、反応特性について検討した。合成した化合物は、トリフェニルホスフィンのフェニル基の一つを蛍光性のナフチル、アンズリル、及び、ピレニル基で置換したもので、全てトリフェニルホスフィン为原料とし、金属リチウムによりホスフィットとした後、導入する置換基の臭化物と反応させることにより調製した。これら調製したホスフィン、何れも無蛍光性であったが、酸化されて生成したオキシドは強い蛍光性を示した (Fig. 7)。特に、ピレン誘導体のジフェニル-1-ピレニルホスフィン (DPPP) のオキシドは最も強い蛍光強度を与え、同濃度のアントラセンの12倍の蛍光強度を与えた。ホスフィンは、結晶状では非常に安定であった (20カ月以上)。また、溶液中では、遮光することによりかなり安定であった。各ホスフィンとヒドロペルオキシドとの反応性は、ナフタレン \geq ピレン $>$ アントラセンの各誘導体の順で高く、これはリン原子の回りの立体障害の影響と考えられた。以上、感度、試薬の安定性、反応性などから分析試薬として DPPP が最も有望と考えられた。

〔Ⅲ-3〕 ヒドロペルオキシドが、新しく開発した無蛍光性の試薬 DPPP を定量的に蛍光性のオキシドに酸化することを利用したヒドロペルオキシドの定量法について検討した。DPPP と各種ペルオキシドとの反応性は、ペルオキシドの-O-O-結合の回りの立体的な込み合の影響を受け、比較的込み合の少ないヒドロペルオキシドは高い反応性を示したが、込み合の大きなジアルキルオキシド等は殆ど反応性を示さなかった (Table 1)。このことは、本試薬がヒドロペルオキシドに高い選択性を有することを示唆するものであった。また、反応は各種有機溶媒中で進行したが、特にアルコール類、及び、クロロホルム中で速やかに進行した (Table 2)。DPPP とヒドロペルオキシドとの反応を、クロロホルム-メタノール混液中、60℃で行った場合、反応は40分以内で完了し、その後、60分以上一定の蛍光強度を示した (Fig. 8) ことから、Fig. 9 に示した操作条件を設定した。更に、10種類の油脂について、POVの測定法として一般的に用いられているヨウ素滴定法と本法により測定した。その結果、両測定値間に良好な相関性を認めた (Fig. 10)。本法の感度は、ヨウ素法の約 1×10^4 倍で、検出限界は約 200 pmol であった。

〔Ⅲ-4〕 ヒドロペルオキシドの検出試薬 DPPP を HPLC ポストカラム法に応用した。HPLC のシステムの概要を Fig. 11 に示した。分離カラムからの溶出液を、UV 検出器でモニターした後、DPPP 溶液を混合し、70℃に保った反応コイルを通して反応させ、蛍光検出器でオキシドの生成量をモニターした。様々なヒドロペルオキシドを検出するため、いくつかの分離条件を検討し、遊離脂肪酸、トリアシルグリセロール、及び、リン脂質 (PC、及び、PE) の各ヒドロペルオキシドを数 pmol レベルで検出することができた。また、健康な成人男女の血漿 500 μ l を試料として抽出した脂質を HPLC に導入し、順相シリカゲルカラムにより分離した後、DPPP 法により検出することにより (Fig. 12, 13)、20~40 pmol/ml のホスファチジルコリンのヒドロペルオキシドを検出した。定量は標準添加法により行い、測定値のばらつきは10%以内であった。

第Ⅳ章 N-(9-アクリジニル)マレイミド(NAM)を用いた亜硫酸の分析

〔Ⅳ-1：緒言〕 亜硫酸、及び、その塩は、漂白、酸化防止、及び、保存の目的で多くの食品に添加されているが、その毒性のため食品中の残存量は法律で規定されている。しかし、亜硫酸は非常に不安定で、分析操作中に分解する傾向が強く、食品添加物中最も難しい分析項目の一つとなっている。一方、亜硫酸は、近年問題となっている酸性雨の原因物質としても注目されてきている。雨水中に含まれる亜硫酸は、酸化されて硫酸となり雨水のpHを低下させる。この酸化のメカニズムを知る上で、雨水中の亜硫酸量を測定することは非常に重要なことであるが、亜硫酸の不安定さと極微量しか含まれないことから分析は非常に困難であった。

近年、SH基の蛍光ラベル化試薬N-(9-アクリジニル)マレイミド(NAM)が、亜硫酸とも反応し蛍光性の誘導体を与えることが示された。そこで、本研究では、亜硫酸の新しい蛍光定量法の確立を目的として、Ⅳ-2ではNAMと亜硫酸の反応機構、及び、反応性について検討し、更にこの反応を、ワイン中の亜硫酸の定量(Ⅳ-3)、雨水中の亜硫酸の定量(Ⅳ-4)、及び、グルタミン酸：オキサロ酢酸アミノ基転移酵素(GOT)の活性測定法(Ⅳ-5)にそれぞれ応用した。

〔Ⅳ-2〕 NAMと亜硫酸の反応生成物を単離し、その構造解析を行った。その結果より、反応は、NAMに対する亜硫酸(SO_3^{2-})の付加反応とそれに続く加水分解反応の2段階で進行し、最終的に2種の安定な誘導体を与えることが明らかとなった(Fig.14)。また、最終生成物の生成比は、反応の温度及びpHにより影響を受けたため、反応を一定条件下で行う必要を認めた。このラベル化反応とHPLC法と組み合わせることにより数100 fmolの亜硫酸の検出・定量が可能であった。

〔Ⅳ-3〕 NAMを用いたHPLCプレカラム法による、ワイン中の亜硫酸分析法について検討した。共存するアルデヒドやケト酸の影響を防ぐため、反応はpH 10.0の緩衝液中、50℃で行った。この条件により反応は20分以内に完了したが、安全性を見込み30分間行った。検出には、NAMの分解物の影響を除くためHPLCを用いた。HPLCによる一回の分析は10分以内で完了した。分析操作法をFig.15に示した。13種のワインについて本法と改良ランキン法(最も一般的な分析法)で分析した結果、両方法間に良好な相関性を認めた(Fig.16)。本法における添加回収率は1例を除き99~105%であった。また、測定値の変動係数は全て3%以内であった。本法は、感度、迅速性、及び、簡便性において改良ランキン法より優れていた。

〔Ⅳ-4〕 雨水中の亜硫酸を安定に捕集するために0.02M・EDTAを含むほう酸緩衝液を用い、一定量の捕集液にNAM溶液を加えラベル化した後、HPLCにより亜硫酸を検出・定量した。

亜硫酸は Fe^{2+} や Mn^{2+} などの金属イオンにより酸化が触媒されることから、EDTA を含む溶液によりその触媒効果を防ぎ、比較的安定に捕集し、捕集した雨水を直ちに NAM で蛍光性の誘導体に固定化することができたため、極微量の亜硫酸を正確に分析することが可能であった。雨水中の亜硫酸の添加により 92~107% が回収された。また、測定値の変動係数は 1.1% ($n=5$) であった。Table 3 に仙台市内で捕集した雨水中の亜硫酸の測定結果を示した。本法では、5 ml の雨水の採取により 14 ppb の亜硫酸の検出が可能であり、非常に高感度で簡便な方法であった。

〔Ⅳ-5〕 GOT は L-アスパラギン酸と 2-オキソグルタル酸から L-グルタミン酸とオキサロ酢酸を生成する反応、及びその逆反応を触媒するアミノ基転移酵素であり、正常時のヒト血清（或は血漿）中の活性レベルは低く保たれているが、各種肝疾患、心筋梗塞、或は筋ジストロフィー等の患者では組織の破壊にともない血清（或は血漿）中 GOT レベルの上昇が観察され、臨床分析中で最も重要な分析項目の一つとなっている。

L-アスパラギン酸の構造類似体である L-システインスルフィン酸 (CSA) も GOT の良い基質となり、酵素反応により β -スルフィニルピルビン酸を経てピルビン酸と亜硫酸を生成する。この酵素反応により生成した亜硫酸を NAM と反応させ定量することにより、GOT の活性の測定を行った (Fig. 17)。測定操作法を Fig. 18 に示した。本法では、10 μl の試料（血清、或は血漿）を用いて、4~141 U/l の GOT 活性測定が可能であった。また、GOT 活性測定法として一般的な改良カルメン法と比較した結果、両方法間に良好な相関性を認めた (Fig. 19)。

第 V 章 総括

新しい蛍光試薬の開発とその分析への応用により、これまで分析が困難であったいくつかの化合物の微量分析法を確立した。

- 1) カルボン酸の新しいラベル化試薬として 9-ブロモメチルアクリジンを合成した。この試薬は比較的安価な原料より高収率で調製することができた。この試薬と脂肪酸の反応は、DMF 中、TEAC の存在下、室温で 10 分以内に完了し、生成物は冷暗所に保存することにより 1 週間以上安定であった。HPLC により 15 種類の脂肪酸誘導体を分離し、それぞれを pmol レベルで検出・定量することができ、また、血漿中の遊離脂肪酸の分析にも応用が可能であった。更に、簡単なケン化法と組み合わせることにより、油脂の脂肪酸組成分析にも応用が可能であった。本試薬は、感度的には山口・大倉らの試薬 (Br-DMEQ) 等には劣るが、反応条件が穏和なこと等から、不安定な化合物のラベル化に適していると考えられた。
- 2) ヒドペルオキシドの新しい蛍光検出試薬として 3 種のホスフィン型試薬を合成した。これら合成した試薬は何れも無蛍光性であったが、オキシドに酸化されることにより強い蛍光性を示し、特にジフェニル-1-ピレニルホスフィン (DPPP) オキシドは最も強い蛍光性を示したことから、DPPP が蛍光試薬として最も有望と期待できた。DPPP はヒドペルオキシドに

高い選択性を示し、反応は様々な有機溶媒中で進行した。また、ヒドロペルオキシドとの反応は60℃で40分以内に完了し、ヒドロペルオキシドの濃度と蛍光強度の間に良好な直線性を認めた。更に、ヨウ素法と比較した結果、両方法間に良好な相関性を認めた。本法は、ヨウ素法に比べ 1×10^4 倍感度が高く、操作の簡便性や多検体の分析においては迅速性においても優れていた。このDPPPはHPLCポストカラム法における検出試薬としても使用可能であり、pmolレベルのヒドロペルオキシドの検出・定量が可能であった。また、ヒト血漿より抽出した脂質を分析した結果、20~40 pmol/mlのホスファチジルコリンのヒドロペルオキシドを検出した。本法は、非常に高感度で、しかもHPLCと組み合わせることにより選択性も更に向上し、今後、この方法の様々な応用が期待できた。

3) NAMと亜硫酸の発蛍光反応は、2段階反応で進行し、最終的に安定な2種の異性体を与えた。反応生成物をHPLCにより分析することにより、数100 fmolレベルで亜硫酸の定量が可能であった。この方法を応用することにより、ワイン中の亜硫酸分析法、雨水中の亜硫酸分析法、及び、GOTの活性測定法を確立することができた。これらの方法は、高感度で簡便性に優れており、また、一般的な分析方法と比較した結果、両方法間に良好な相関性を認めた。

Human Plasma 100 μ l
 0.1M KH_2PO_4 100 μ l
 Chloroform 2.0 ml

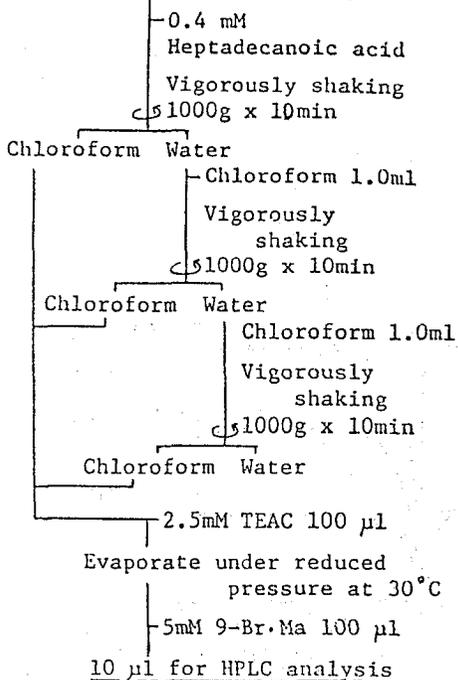


Fig.4: Determination procedure of free fatty acids in human plasma

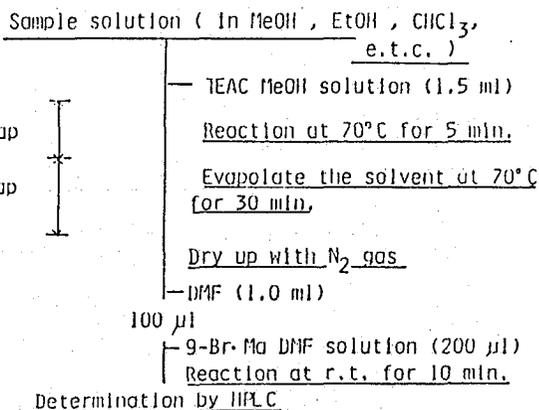


Fig.5: Determination procedure of fatty acid compositions of triacylglycerols

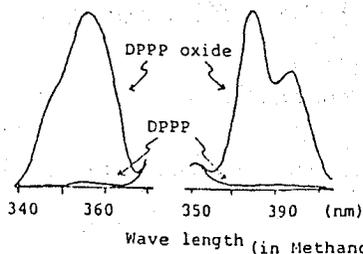
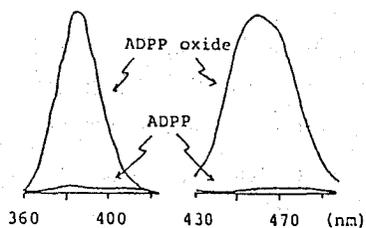
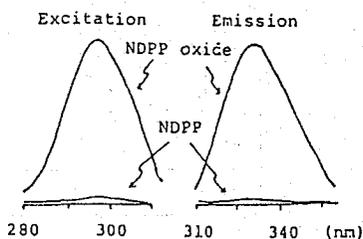


Fig.7: Fluorescence spectra of aryl-di-phenylphosphines and their oxides.

NDPP: 1-Naphthyl-1-di-phenylphosphine
 ADPP: 9-Anthryl-di-phenylphosphine
 DPPP: 1-Pyrenyl-di-phenylphosphine

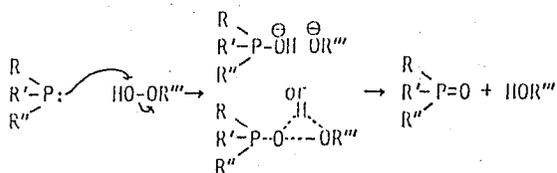


Fig.6: Reduction of hydroperoxides with phosphines. Hydroperoxides were reduced by phosphines to corresponding alcohols and phosphines gave corresponding oxides.

Table 1: The reactivities of peroxides with DPPP
The reaction was performed at 60°C for 60 min
in the mixture of chloroform and methanol (1:1).

Peroxides	Reactivity (%)
Linoleic acid hydroperoxides	100
Triolrin hydroperoxides	100
Benzoyl peroxide	80
<i>tert</i> -Butyl hydroperoxide	80
<i>tert</i> -Butyl perbenzoate	13
Di- <i>tert</i> -butyl peroxide	1
1-Bronobutane	0
Buthyl hydroxy toluene (BHT)	0

Table 2: The effects of reaction solvents on reactivities
The autoxidized linoleic acid was used as a sample and reactions were performed at 60°C for 60 min.

Reaction solvent	ΔFI	Reactivity (%)
Acetonitrile	66.9	73.8
Methanol	90.8	100.1
Ethanol	85.4	94.2
Ethyl acetate	73.3	80.8
Chloroform	95.1	104.9
Benzene	84.3	92.2
Hexane	81.8	90.2
Chloroform Methanol mixed solution (1:1)	90.7	100.0

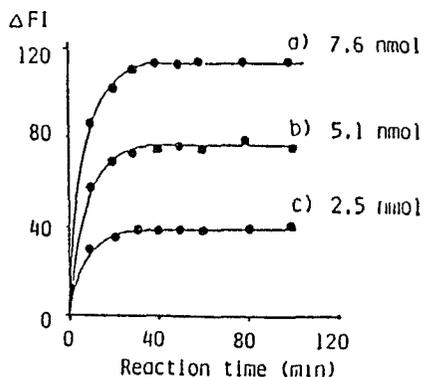


Fig. 8: Reaction time course of DPPP with hydroperoxides
The reaction mixture contained (a) 7.6, (b) 5.1 and (c) 2.5 nmol of linoleic acid hydroperoxides
The reactions were carried out at 60°C in the mixture of chloroform and methanol (1:1).

Sample solution 100 μ l
DPPP solution (1.0 mg/ 10 ml) 50 μ l

- closed screw cap tightly
- Reaction at 60°C for 60 min
in the dark
- Chilled on the ice-bath
- 3.0 ml of methanol

Determination

Fluorometry (Ex. 352 nm, Em. 380 nm)

Fig. 9: Determination procedure of hydroperoxides with DPPP

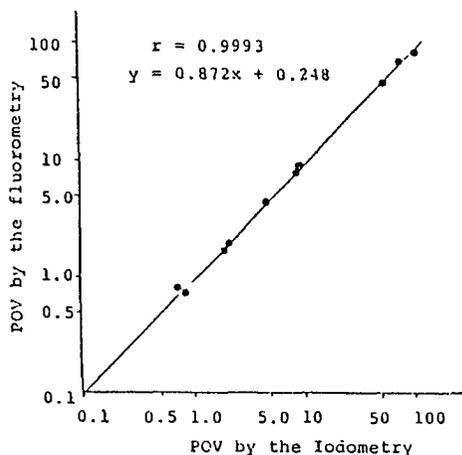


Fig. 10: Relationship of between the POVs by iodometry and fluorometry

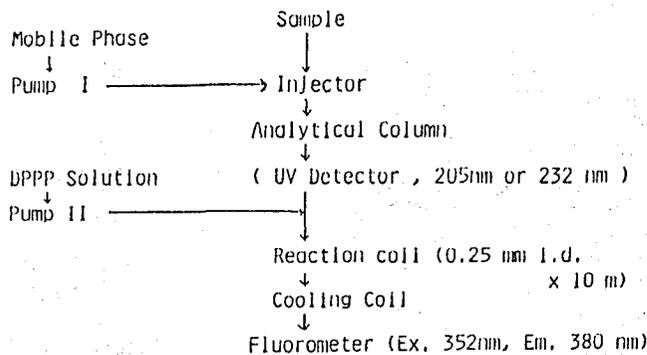


Fig. 11: Schematic diagram of HPLC post-column system with DPPP

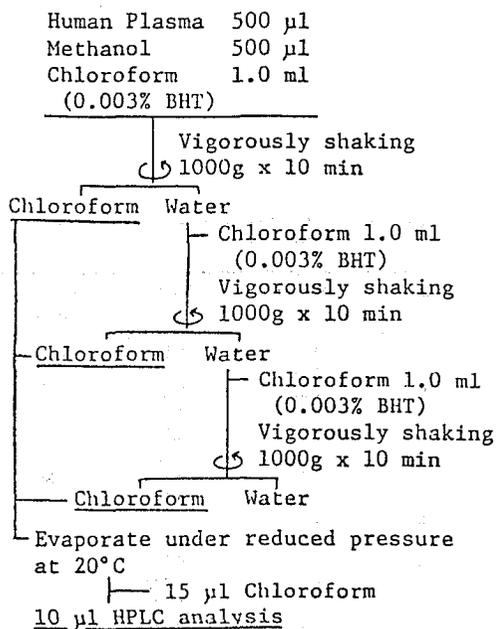


Fig. 12: Determination procedure of PC-HPO in human plasma

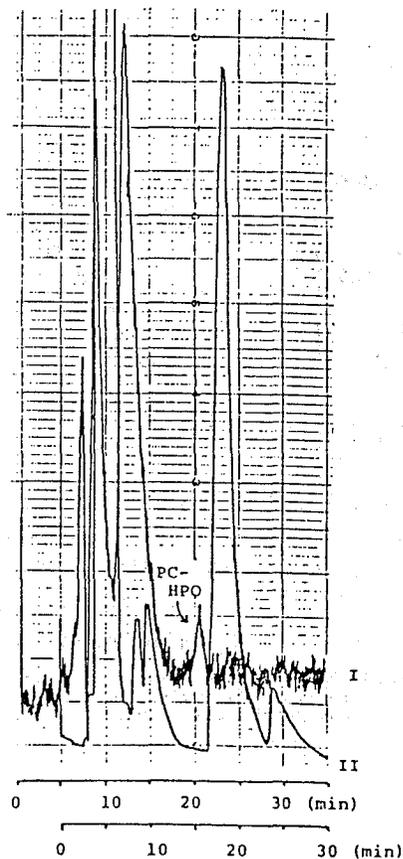


Fig. 13: HPLC Chromatogram of PC-HPO in human plasma
I: Fluorometry with DPPP
II: UV at 235 nm

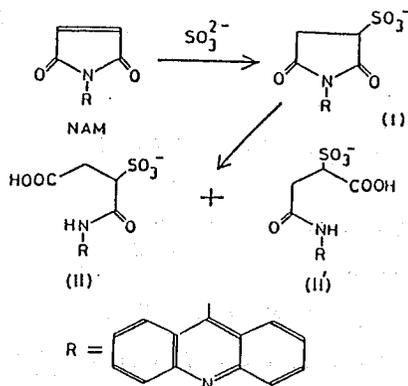


Fig. 14: Reaction pathway of sulfite with N-(9-acridinyl)maleimide

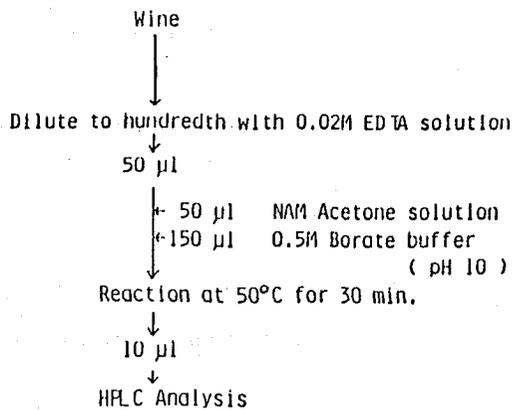


Fig. 15: Determination procedure of sulfite in wine

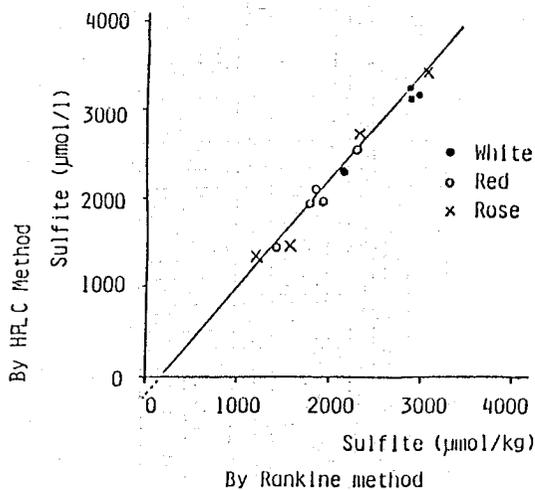


Fig. 16: Relationship between sulfite contents in wines determined by Rankine's methods and NAM-HPLC method

Table 3: Concentration of sulfite in rainwater

Sample	Volume of rain/ ml	Sulfite, ppm	Average, ppm
A	5.38	0.179	0.175
	5.87	0.171	
B	1.65	2.69	2.54
	2.33	2.53	
	2.69	2.39	
C	6.58	0.609	0.607
	7.17	0.560	
	6.91	0.652	
D	8.59	0.350	0.366
	8.10	0.381	
E	5.18	0.286	0.293
	4.73	0.299	
F	2.93	0.471	0.477
	3.10	0.483	
G	6.31	0.767	0.777
	6.04	0.782	
	6.74	0.783	
	6.80	0.550	
H	6.91	0.553	0.542
	7.89	0.524	
	8.69	0.444	
I	8.33	0.426	0.442
	8.33	0.426	
	9.41	0.455	

Sampling performed in Sendai, Miyagi Pref. Japan from November 10 to 24, 1985.

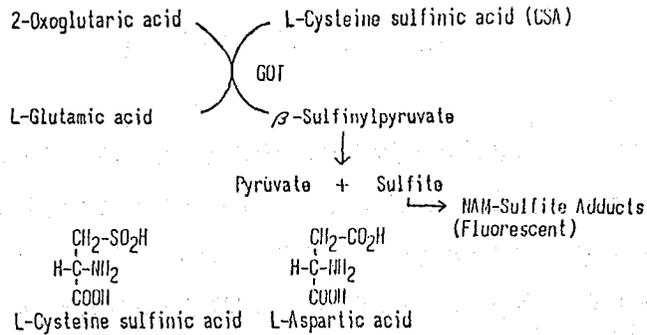


Fig. 17: Assay for GOT (Glutamic acid - Oxaloacetic acid aminotransferase) with cysteinylsulfonic acid

Sample 10 μl
 Substrate 40 μl

Incubate at 37°C for 6 min

Cooling on ice bath

- NAM-Acetone solution (100 μl , 1 mg/ 5ml)
 - Reaction buffer (pH 10, 1.0 ml)
 - Reaction of sulfite with NAM at 37°C for 30 min

10 μl for HPLC analysis

Fig. 18: Determination procedure of GOT activity in human sera or plasma

Substrate: 40mM Cystein-sulfinic acid, 10mM 2-oxo-glutaric acid and 50 μM PLP in 100mM tris-HCl buffer (pH 9.3).

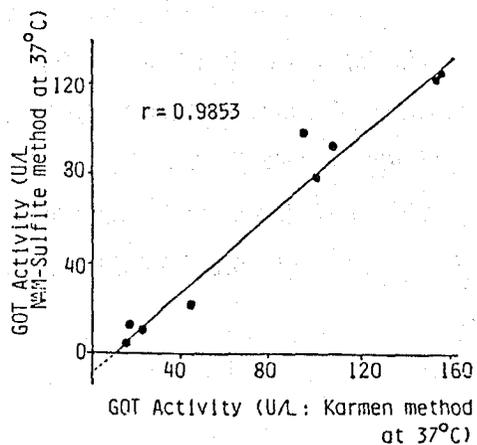


Fig. 19: Relationship between GOT activities determined by Karmen method and NAM method

審査結果の要旨

本学位論文は食品・生物試料中の超微量の有機化合物の定量を目的とし、新しい蛍光反応と高速液体クロマトグラフ (HPLC) とを組み合わせた分析システムを開発したもので、(1)カルボン酸を目的とした9-ブロモメチルアクリジン：(9-BrMa)、(2)ヒドロペルオキシドを対象としたジフェニルピレニルホスフィン：(DPPP)、及び(3)亜硫酸を対象としたN-(9-アクリジニル)マレイミド：(NAM)の三つに大別される。こう内(1)9-BrMa及び(2)DPPPは同氏によって初めて合成された新試薬であり、(3)は食品分析研究室において見出した新しいNAMとSO₂の発蛍光反応を基礎に、その応用開発を行ったものである。

(1)生体成分中カルボン酸を有する化合物は脂肪の構成脂肪酸、プロスタグランジン、リポ等重要な化合物が知られている。同氏の合成した9-BrMaはカルボン酸と穏やかな条件で反応し、強い蛍光とUV吸収を持つエステルを与える。本エステルを蛍光又はUV検出器を備えたHPLCで分離する方法により、多くのカルボン酸を分析することに成功した。同試薬は、合成ステップも短く今後多くの応用が期待できる。

(2)生体中のヒドロペルオキシド (HPO) は脂質の酸化により生成しその毒性は早くから知られていた。近年生体内にも微量に存在する事が知られ、その生理作用との関連において大きな関心が払われていた。同氏の開発したDPPPはピコモルレベルの生体内のHPOの分析を可能にしたもので、国際的に大きな評価を得ている。又DPPP発蛍光反応は蛍光反応として初めて見出されたもので、その分子構造との関連も含めて、分光学的にも興味深いものである。

(3)SO₂の分析は微量で変化し易く最も困難な微量分析の一つである。本論文ではNAMとの発蛍光反応をHPLCと組合わせて極めて高感度の分析法を開発し、血清中のGOT、酸性雨中のSO₂、ワイン中のSO₂等の分析へ応用した。

これらはいずれも従来の分析法に比べて100~10,000倍以上の高感度であり、食品・生体試料のみならず広い領域への応用が可能であり、農学博士の学位を授与するに十分な優れた研究である。