

동위원소 희석 HPLC/MS에 의한 혈청 내 urea의 정량

이화심* · 박상열

한국표준과학연구원 물질량표준부
(2004. 11. 24 접수, 2005. 8. 1 승인)

Quantification of urea in serum by isotope dilution HPLC/MS

Hwashim Lee* and Sangryoul Park

*Division of Chemical Metrology and Materials Evaluation, Korea Research Institute of Standards and Science,
Taejeon 305-600, Korea*

(Received November 24, 2004, Accepted August 1, 2005)

요 약 : 혈액 내 urea는 임상진단 시 신장 기능을 판단하는 중요한 표지물질로서 측정되고 있다. 단백질 등 질소화합물의 최종 대사물인 urea는 콩팥의 사구체에서 걸러져 소변으로 배출되는데, 사구체의 거르는 능력이 저하되면 결국 혈액 속의 urea 농도가 증가하게 되어 신장 기능의 정상여부를 판단할 수 있게 된다. 이러한 임상진단 결과의 신뢰성 향상을 위해서는 측정결과가 일차분석법으로 인증된 인증표준물질과 소급성 고리를 유지해야 한다. 본 연구에서는 혈청 내 urea의 일차분석법으로서 $^{15}\text{N}_2$ -urea를 내부표준물질로 사용하는 동위원소희석 액체크로마토그래피-질량분석법 (ID-HPLC/MS)을 개발하였다. 이 방법은 측정원리상 고도의 정확성이 확보될 뿐 아니라 별도의 유도체화가 필요 없기 때문에 빠르고 편리하다. C_{18} -분리관에 0.1 mmol/L NH_4Cl buffer를 이동상으로 사용하여 urea를 분리하였는데, 이 완충용액은 비교적 분자량이 작은 urea를 질량분석하는데 방해가 크지 않은 장점이 있다. HPLC와 질량분석기의 인터페이스로서 positive mode의 electrospray ionization (ESI)를 사용하여 높은 감도와 재현성을 성취하였다. 국제적으로 인정된 인증표준물질의 분석을 통해 최적화된 방법의 유효성을 확인하였으며, 국제비교시험에도 참여하여 좋은 결과를 얻었다. ISO guide에 따라 불확도를 계산하였으며, 확장 불확도는 95 % 신뢰도에서 약 1.8 %로 나타났다. 이 분석법은 표준연에서 개발 중인 혈청인증표준물질을 인증하는 일차기준측정절차로도 사용되고 있다.

Abstracts : Urea in blood has been measured as an effective marker for diagnosis of renal function. Urea which is the end-product of nitrogen containing metabolites such as proteins is filtered through glomeruli of kidneys and then excreted as urine. If the renal function is deteriorated, the urea concentration in blood will be increased, from which the healthiness of renal function is judged. In order to improve the confidence of diagnosis results, the results must keep traceability chain to certified reference materials, which was certified by primary reference method. In this study, we proposed isotope dilution-liquid chromatography/mass spectrometry (ID-LC/MS) as a candidate primary method, in which $^{15}\text{N}_2$ -urea is used as an internal reference material. The developed method is highly accurate in principle and is convenient as it does not require cumbersome derivatization. 0.1 mmol/

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)42-868-5348 Fax : +82-(0)42-868-5042

E-mail: eclhs@kriss.re.kr

L ammonium chloride was selected as a mobile phase for HPLC because it provided low interference in MS analysis of relatively low molecular weighted urea. HPLC and MS were connected with an electrospray ionization (ESI) interface of positive mode, which provided high sensitivity and reproducibility. The developed method was validated with internationally recognized reference materials, and we have obtained satisfactory results in an international ring trial. The expanded uncertainty calculated according to ISO guide was 1.8 % at 95 % confidence interval. The developed method is being used as a primary reference measurement method such as for certification of serum certified reference materials (CRMs).

Key words : urea, isotope dilution-liquid chromatography / mass spectrometry, primary method, traceability

1. 서 론

Urea는 인체 내 단백질 분해의 주요 대사산물로서 단백질이 아미노산으로 분해되고 아미노산이 다시 ammonia로 분해된 후 ammonia가 urea cycle을 거치면서 간에서 hepatic enzyme에 의해 합성되는 경로를 취한다. 합성된 urea는 콩팥의 사구체에서 걸러져 노로 방출된다. 이 때 사구체의 거르는 능력이 저하되면 결국 혈액 속의 urea 농도가 증가하게 되므로, 혈청이나 혈장 속의 urea는 신장기능을 진단하는 중요한 표지물질로서 측정되고 있다.¹ 그러나 urea의 특성상 신장 기능과 관계없는 요인들이 urea의 농도에 영향을 미치므로 이의 효용성이 제한되고 있다. 예를 들어 고단백 식품의 섭취에 의한 단백질 분해대사 증가, 근육 소비 (기아 상태인 경우), 위출혈 후 혈액 단백질의 재 흡수, 만성 간 질환, 콩팥의 감소된 환류 등에 의해 urea의 농도는 증가할 수 있다. 이와 같은 것은 신장 이전의 문제로서 신장의 기능과 관계없이 urea의 농도가 증가한다. 그러므로 신장의 상태를 진단할 또 다른 질소계 화합물인 크레아티닌의 농도를 측정하는데, 위와 같은 경우에도 혈청 속 크레아티닌의 농도는 일정하다. 그러나 신장암, 신장결석증, 전립선증과 같은 경우는 신장 이후의 문제로서, 이 때는 소변의 통로가 방해를 받으므로 urea와 크레아티닌 모두의 농도가 증가하게 되는데 urea의 확산 성질 때문에 urea의 농도가 더 크게 증가한다. 그러므로 임상학적으로 더 큰 의미를 갖기 위해 현재는 두 질소계 화합물의 비 (urea/크레아티닌)를 측정한다.^{2,4}

Urea 분석법은 분광학적 분석법, HPLC법,⁵ Mass spectrometry^{6,7} 등 여러 가지가 있으며,⁸ 임상병리실험실에서 주로 사용되는 urea 분석법은 urea를 유도체화 시킨 다음 분광학적으로 정량하는 방법을 사용한다.^{9,11} 분광학적 정량방법은 불확도의 허용폭은 크나 능률과 경제성면에서는 효율적이다. 이러한 임상측정 결과의 신

뢰성 향상을 위해서는 측정 결과가 일차분석법으로 인증된 인증표준물질과 고리가 연결된 소급성 체계를 유지해야 한다. 본 연구에서는 혈청 속 urea의 농도 측정을 위한 일차분석법으로 동위원소희석 액체크로마토그래피-질량분석법 (ID-HPLC/MS)을 개발하였다. 현재 혈청 속 urea 분석을 위한 일차분석법으로 동위원소희석 기체크로마토그래피-질량분석법 (ID-GC/MS)¹²⁻¹⁵이 작은 불확도로 확립되어 측정의 소급성을 유지하나, GC 사용을 위해 복잡한 유도체화 과정을 필요로 하므로, ID-HPLC/MS 방법으로 대체될 필요가 있다. ID-HPLC/MS 방법은 내부표준물질로 urea와 물리화학적 성질이 동일한 동위원소를 사용하며, 유도체화 과정이 필요 없으므로 정확하고 간편한 이점이 있다.

본 연구에서는 이 방법을 이용하여 NIST 인증표준물질의 분석을 통해 최적화된 방법의 유효성을 확인하였고, IMEP, JCTLM 국제비교시험에 참여하여 좋은 결과를 얻었다. 또한 이 분석법은 표준연에서 개발 중인 혈청인증표준물질을 인증하는 일차기준측정절차로 사용되고 있다. 불확도는 ISO guide에 따라 평가하였다.

2. 실험

2.1. 표준용액의 준비

고순도 Urea (NIST SRM 912a, 99.9%) 약 50 mg을 물 50 g에 녹여 약 1,000 µg/g 농도가 되도록 4개의 표준용액을 제조하였다. ¹⁵N₂-urea (Cambridge사, 98+ %) 동위원소 표준용액도 urea 표준용액과 동일한 방법과 비슷한 농도로 1개를 제조하였다. 4 mL Vial에 4개의 urea 표준용액과 ¹⁵N₂-urea 동위원소 표준용액으로부터 두 물질의 무게비 (urea/¹⁵N₂-urea)가 1:1이 되도록 무게를 달아 혼합하여 4개의 혼합표준용액을 만들었다. 정확한 농도를 계산한 후 약 10 µg/g 농도가 되도록 이동상으로 희석한 후 사용하였다.

2.2. 혈청시료의 준비

NIST (National Institute of Standards and Technologies) SRM (Lyophilized Human Serum 909b level I, II)은 냉장고에서 꺼내 천칭실에서 2시간 이상 방치하여 온도 평형에 이르게 한 다음, 교정된 피펫을 사용하여 10.0 mL의 살균된 증류수를 넣어 혈청을 재구성하였다. 이 때 혈청 분말의 무게와 들어간 물의 무게를 측정하였다.

혈청을 완전히 녹인 다음, 4 mL vial에 약 1 mL의 혈청을 넣고 무게를 측정 한 후, 예비실험을 통하여 확인한 urea의 무게와 1:1이 되도록 ¹⁵N₂-urea 표준용액을 첨가하였다. 교반하여 평형에 이르도록 2시간 동안 방치한 후 혈청 양의 약 5배에 해당하는 아세트니트릴을 넣어 단백질을 침전시켰다. 이를 4,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액을 따라낸 후 질소 피지 농축기 (Turbovap I concentration workstation, Zemark)로 용매를 휘발시켰다. 이를 약 10 µg/g 농도가 되도록 이동상으로 회석하여 HPLC/MS 실험을 하였다.

IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements) IMEP (The International Measurement Evaluation Programme, Level I, II) 시료는 냉동혈청이므로 그대로 상온에서 녹인 후 NIST 혈청과 동일한 방법으로 전처리하여 측정하였다. IMEP시료는 IRMM 주관으로 실시한 국제비교시료로서 본 연구원에서는 일정 상 공식적으로 참여하지는 않았으나 이를 측정하여 상호 비교하였다. JCTLM (The Joint Committee on Traceability in Laboratory Medicine) ring trial 국제비교시료는 냉동 건조 혈청시료로, 두 시료 (KSA, KSB)에 5 mL의 증류수를 넣어 혈청을 재구성한 다음 NIST 혈청과 동일한 방법으로 전처리하여 측정하였다. KRIS 혈청은 냉동혈청이므로 상온에서 녹인 후 NIST 혈청과 동일한 방법으로 전처리하여 측정하였다.

2.3. HPLC/MS 최적화 조건

Waters (Milford, MA) 2690 HPLC와 Micromass (Manchester, UK)의 Quatro Ultima triple stage quadrupole 질량분석기를 연결시킨 HPLC/MS 시스템을 사용하였다. 분리관은 Symmetryshield C₁₈ Guard Cartridges (Waters, 4×2.1 mm)를 부착한 Shinseido C₁₈ (250×4.6 mm) column을 사용하였으며, 이동상은 0.1 mM NH₄Cl 수용액을 사용하였다. 유속은 1 mL/min로 하였고 splitter를 달아 MS로 주입되는 양을 1/2로 줄였으며, 시료는 10 µL씩 주입하였고 혼합표준용액, 시료의 순으로 5회 반복 측정하였다.

HPLC와 질량분석기의 인터페이스 연결은 electrospray positive ionization mode로 하였고, SIM(selected ion monitoring) mode에서 urea와 동위원소 표준물질의 선택이온을 [M+H]⁺의 m/z인 61.2와 63.2에서 정량하였다. 이온화 조건으로 capillary voltage를 1.65 kV, cone voltage 42 V, cone 가스 유속 110 L/min, desolvation 가스 유속 470 L/min, source 온도 150 °C, desolvation 가스 온도를 200 °C로 하였다.

2.4. 데이터 처리절차

동위원소회석 질량 분석법에 의한 농도 결정에는 1점 교정, 2점 교정이 있지만 첨가된 시료중의 동위원소비와 유사한 동위원소비를 갖는 혼합표준용액을 사용하고 시료 중에 동위원소물질이 포함되어 있지 않은 경우 1점 교정이 가능하므로 본 연구에서는 1점 교정을 하였다.

동위원소회석 질량 분석법에 의한 혈청 시료중의 urea 농도 (C)는 다음식으로부터 계산하였으며, 측정 결과의 불확도는 ISO guide에 따라 평가하였다.

$$C = \frac{M_{is-urea,spiked} \cdot AR_{sample} \cdot M_{urea,std} \cdot C_{urea}}{W_s \cdot AR_{std} \cdot M_{is-urea,std}}$$

- M_{is-urea,spiked}* : 시료에 spiking된 ¹⁵N₂-urea 표준용액의 무게
- M_{urea,std}* : 혼합표준용액에 투입한 urea 표준용액의 무게
- M_{is-urea,std}* : 혼합표준용액에 투입한 ¹⁵N₂-urea 표준용액의 무게
- C_{urea}* : Urea 표준용액의 농도(µg/g)
- W_s* : 시료의 무게
- AR_{sample}* : 시료의 LC/MS 측정으로 얻은 urea와 ¹⁵N₂-urea의 특성이온의 면적비
- AR_{std}* : 혼합표준용액의 LC/MS 측정으로 얻은 urea와 ¹⁵N₂-urea의 특성이온의 면적비

3. 결과 및 고찰

3.1. HPLC/MS 측정의 최적화 조건

HPLC/MS 이동상 용매는 분석물의 이온화를 잘 촉진시키고 휘발성이어서 기기 감도를 높이고 기기의 재현성을 좋게 하는 것이 좋다. Urea는 분자량이 60인 저분자량 물질이므로 [M+H]⁺ 이온이 LC/MS의 buffer 이온 패턴과 겹치는 경우가 많다. LC/MS 이동상 buffer로 자주 쓰이는 ammonium acetate, formic acid 등은 아세트

산 분자량 이온이 urea 분자량 이온과 겹쳐 사용할 수 없었으므로 본 연구에서는 NH₄Cl buffer를 사용하였다. NH₄Cl buffer는 비 휘발성이므로 진한 농도일 경우 측정의 재현성을 나쁘게 하므로 10, 1, 0.1 mM NH₄Cl 세 농도에서 LC/MS 크로마토그램과 측정 결과의 재현성을 비교하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 세 농도에서 크로마토그램 모양에는 변화가 없고, 1 mM 이하의 농도에서 더 낮은 intensity를 보이나 정량에 문제가 없고 반복 측정시 더 좋은 재현성을 보였으므로 낮은 농도인 0.1 mM NH₄Cl 이동상을 택하였다. 실험을 거쳐 확립한 최적 조건에서 동위원소를 첨가한 혈청에 대한 urea와 동위원소 urea의 크로마토그램을 이온성 물질들이나 혈청 중 다른 성분들에 의한 방해 없이 Fig. 2와 같이 좋은 크로마토그램을 얻을 수 있었다. 혈청 속 urea와 동

위원소 urea는 머무름 시간의 차이가 없었고, 순수 혈청에 대해 동위원소 urea에 대한 크로마토그램을 얻었을 때 동위원소 urea는 들어 있지 않음을 확인할 수 있었다. 이로써 1점 교정을 하였고, 혈청 중 urea의 정량에 합당한 실험조건을 구비할 수 있었다.

3.2. 혼합표준용액의 검증

4 set의 urea, 동위원소 urea 혼합표준용액에 대한 ID-LC/MS 실험을 5회 반복한 후 urea와 동위원소 urea의 농도비에 대한 peak area 비 (response factor)를 구하여 상호 비교하였다. Response factor로부터 표준용액 제조의 정확성과 측정 도중 기기의 drift 여부를 알 수 있다. 이의 결과를 Table 1에 나타내었는데 상대표준편차가 0.21% 이내로 일치하여 실험 기간동안 기기의 long-term drift도 없었고 혼합표준용액의 제조도 정확하게 되었음을 확인할 수 있었다. 이 혼합표준용액 가운데 하나를 선택하여 혈청 시료의 urea 농도를 측정하는데 사용하였다.

3.3. LC/MS 방법의 유효성 검증

방법의 유효성을 검증하기 위해 인증값을 가지고 있는 NIST SRM과 IRMM 주관으로 실시한 IMEP 국제 비교시료를 측정하여 상호 비교하였다. NIST SRM과 IRMM IMEP결과는 ID-GC/MS 방법으로 인증한 것이고 본 연구에서는 ID-LC/MS 방법으로 인증한 것으로, 측정 결과의 비교는 방법의 유효성을 검증할 수 있었을 뿐만 아니라 두 방법간의 비교도 가능케 하였다. 본 실험의 측정 결과와 NIST의 SRM 인증값, IRMM IMEP 측정값을 Table 2와 Fig. 3에 나타내었으며 모두 불확도 범위 내에서 잘 일치하였다. 이로써 본 연구에서 개발한 ID-LC/MS urea 분석방법이 유효하며 또한 복잡한

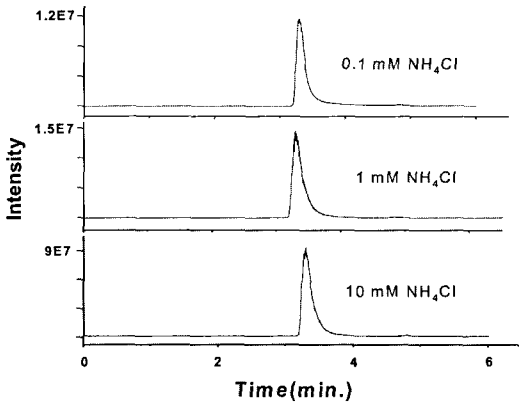


Fig. 1. HPLC/MS chromatogram of urea according to ammonium chloride buffer concentrations of mobile phase.

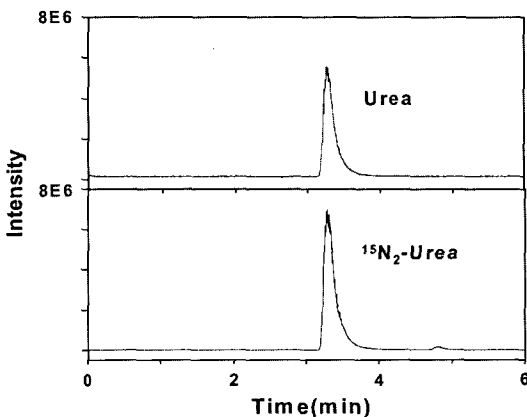


Fig. 2. HPLC/MS SIM chromatogram of urea at m/z 61.2 and ¹⁵N₂-urea at m/z 63.2 in serum.

Table 1. Relative response factor of urea-isotope and urea standard mixture solutions

| No. | Conc. ratio (urea/isotope) | Area ratio (urea/isotope) | Relative response factor* |
|-----|----------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 1 | 1.017 | 0.717 | 0.705 |
| 2 | 0.981 | 0.692 | 0.706 |
| 3 | 1.030 | 0.729 | 0.708 |
| 4 | 1.063 | 0.752 | 0.708 |
| | | Average | 0.706 |
| | | Stdev | 0.0015 |
| | | Relative Stdev | 0.21% |

*Relative response factor = Area ratio/Conc. ratio

Table 2. The results of measurements of urea in various serum reference materials

| Lab. | Serum | NIST Level I (mmol/L) | NIST Level II (mmol/L) | IMEP Level I (mmol/kg) | IMEP Level II (mmol/kg) |
|-----------------|-------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Certified Value | | 5.51±0.15 | 30.75±0.32 | 4.665±0.048 | 9.85±0.130 |
| KRISS | | 5.49±0.06 | 31.13±0.46 | 4.63 ±0.05 | 9.82±0.10 |

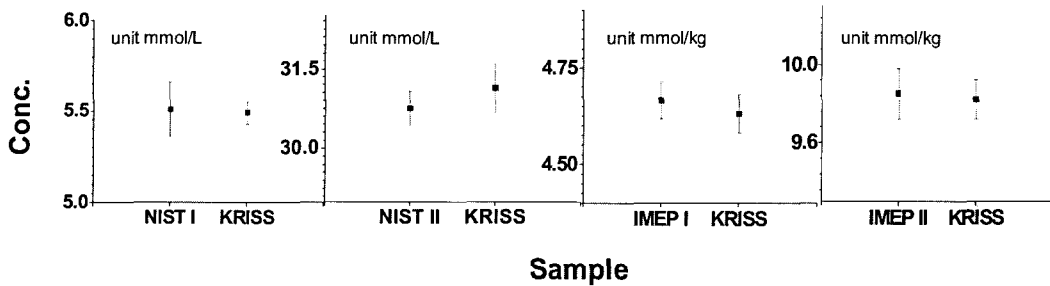
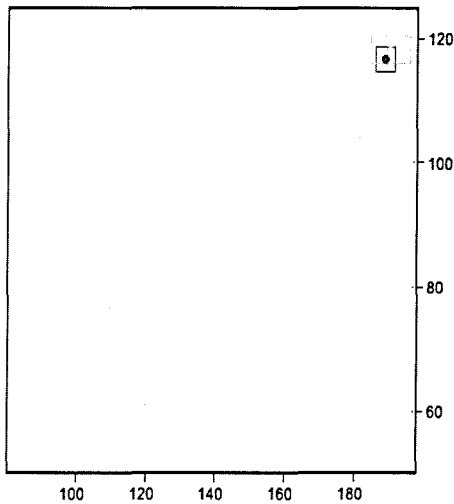


Fig. 3. The comparison of measurement results of urea in various serum reference materials.

RELA 1/2003

Urea [mg/dl]



| Lab | A | p.e.u. | B | p.e.u. | method |
|------|---------|--------|---------|--------|--------------|
| 01 ● | 188,708 | 2,834 | 116,576 | 1,984 | ID-MS |
| 22 ◊ | 190,3 | 5,838 | 118,2 | 2,224 | ID-MS |
| 24 | 87,2 | 1,368 | 54,4 | 1,368 | spectrometry |

Fig. 4. Results of JCTLM Ring Trial : Urea in Serum, Lab 01 : pilot lab, 22 : KRISS.

유도체화 과정을 필요로 하는 ID-GC/MS 방법을 대체할 수 있음을 알 수 있었다. JCTLM ring trial에는 pilot lab (01, 영국의 LGC)와 본 연구원을 포함하여 두 기관이 참가하였으며, 같은 방법을 사용한 pilot lab과는 좋은 일치를 보였으며 spectrometry를 사용한 lab과는 불일치를 보였다. 이의 국제비교 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 이러한 일련의 국제비교를 하면서 본 연구방법이 유효함을 확인하였고 일차분석법으로 자리매김할 수 있음을

확인하였다.

본 연구에서는 또한 KRISS 혈청 시료에 대한 urea의 농도를 측정하였다. 분취해서 -80 °C 냉동고에 보관했던 시료 중 10개를 취하여 5회 반복 측정 결과를 Table 3과 Fig. 5에 나타내었다. 절대값은 속도시험 등에 사용될 가능성을 감안하여 평균값에 대해 normalize한 상대값을 표시하였으며 측정값 사이에는 상대 표준편차가 0.33% 이내로 재현성이 좋은 결과를 나타내었다. 측정

Table 3. Quantification of urea in KRISSE Serums

| Sample No. | Normalized conc. |
|-----------------------------|------------------|
| 1 | 1.0008 |
| 2 | 0.9980 |
| 3 | 0.9999 |
| 4 | 0.9960 |
| 5 | 1.0002 |
| 6 | 1.0051 |
| 7 | 1.0010 |
| 8 | 1.0054 |
| 9 | 0.9971 |
| 10 | 0.9966 |
| Average | 1 |
| Standard deviation | 0.0033 |
| Relative standard deviation | 0.33 % |

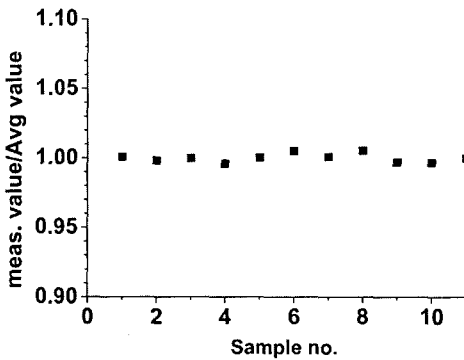


Fig. 5. The comparison among the measurement results of urea in KRISSE serums.

결과의 불확도를 ISO guide에 따라 평가하여 불확도에 영향을 미치는 인자와 영향정도 등을 Table 4에 나타내

Table 4. Uncertainty budget for urea concentration in KRISSE serum according to ISO guide

| Parameter | Unit | Standard Uncertainty | Degree of freedom | Type of uncertainty | Sensitivity coefficient | Uncertainty contribution (%) |
|-------------------------------|---------|----------------------|-------------------|---------------------|-------------------------|------------------------------|
| $M_{is-urea, spiked}$ | g | 0.0001 | 200 | B | 643.1973 | 0.08 |
| AR_{sample} | | 0.0028 | 4 | A | 353.3546 | 57.00 |
| $M_{urea, std}$ | g | 0.0001 | 200 | B | 164.0025 | 0.005 |
| W_s | g | 0.0001 | 200 | B | -161.0994 | 0.005 |
| AR_{std} | | 0.0038 | 4 | A | -224.0241 | 42.80 |
| $M_{is-urea, std}$ | g | 0.0001 | 200 | B | -651.7260 | 0.08 |
| M_{urea} | μg | 0.5774 | 200 | B | 0.0815 | 0.02 |
| M_{H_2O} | g | 0.0001 | 200 | B | -8.1568 | 0.00 |
| Average | | | | | 1 | |
| Combined Standard Uncertainty | | | | | 0.008 | |
| Degree of freedom | | | | | 7 | |
| k (95 % level of confidence) | | | | | 2.360 | |
| Expanded uncertainty | | | | | 0.0187 | |

었다. 본 연구에서 혈청 속 urea 측정의 확장불확도는 1.8% 이었으며, uncertainty contribution으로부터 측정 불확도에 영향을 미치는 인자들을 파악하였다. 본 실험에서 불확도에 영향을 가장 크게 미치는 인자는 시료와 혼합표준용액에 대한 urea와 동위원소 urea의 면적비로서 기기의 측정 재현성을 나타내는 것이다. 모든 불확도 가운데 99% 이상이 기기의 고유 특성과 관계가 있다고 볼 수 있으며 무엇보다 불확도를 줄이기 위해서는 기기의 재현성을 유지시킬 최적 조건을 잡는 것이 중요함을 알 수 있었다.

4. 결 론

혈청 속 urea 분석을 위한 일차분석법으로 정확성과 함께 간편함과 신속성을 제공하는 동위원소희석 HPLC/MS 분석법을 적용하였다. 기존의 동위원소희석 GC/MS 분석법에 비해 실험절차가 간단하고 신속히 수행될 수 있기 때문에 매우 바람직한 연구개발 방향이라 할 수 있다. 이 방법의 유효성을 확인하기 위해 국제적으로 공인된 인증값을 가지는 NIST SRM과 상호 비교하였을 때 불확도 범위 내에서 일치하는 결과를 보였으며 국제 비교 시험인 IRMM IMEP과 JCTLM ring trial에서도 Pilot lab의 결과와 일치하였으므로 본 연구방법은 urea 분석을 위한 일차분석법으로 자리매김할 수 있다. 이를 토대로 한국형 혈청의 urea 농도를 측정하였을 때 약 1.8%의 확장불확도를 보였으며, 임상진단 결과의 신뢰성을 높일 수 있는 인증표준물질의 인증에 적용할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 출연연 기본연구 과제로 수행된 내용이며
감사를 드립니다.

참고문헌

1. C. A. Burtis and E. R. Ashwood, "Renal Function and Nitrogen Metabolites" in "Tietz Textbook of Clinical Chemistry", 3rd Ed., Vol. 3, p.1238, W. B. Saunders Company Ed., Philadelphia, U.S.A., 1991.
2. M. S. Elisaf, H. J. Millionis and K. C. Siamopoulos, *European Journal of Internal Medicine*, **8**(2), 127(1997).
3. O. B. Mortensen, M. Noehr, J. F. Moller-Petersen and I. Balslev, *Danish Medical Bulletin*, **41**(2), 237(1994).
4. 青野 正, 松林 公藏, 河本 昭子, 木村 茂昭, 土居 義典, 小澤利男, *Japanese Journal of Geriatrics*, **31**(3), 232(1994).
5. 新谷 英晴, 井上 剛, *Bunseki Kagaku*, **43**, 807(1994).
6. T. Tanigawa, Y. Mizo-oku, K. Moriguchi, T. Suzuki, T. Osumi and M. Odomi, *J. Chromatography B*, **683**, 135(1996).
7. A. Takatsu and S. Nishi, *Analytical Sciences*, **11**, 1021(1995).
8. C. Eggenstein, M. Borchardt, C. Diekmann, B. Gründig, C. Dumschat, K. Cammann, M. Knoll and F. Spener, *Biosensors and Bioelectronics*, **14**, 33(1999).
9. Eric J. Sampson and Marie A. Baird, *Clinical Chemistry*, **25**(10), 1721-1729(1979).
10. J. K. Fawcett and J. E. Scott, *J. Clin. Path.*, **13**, 156(1960).
11. Baoxin Li, Zhujun Zhang and Yan Jin, *Analytical Letters*, **34**(12), 1241(2001).
12. Michael J Welch, Alex Cohen, Harry S. Hertz, Fillmer C. Rugg, Robert Schaffer, Lorna T. Sniegoski and Edward White V, *Anal. Chem.*, **56**, 713-719(1984).
13. C. S. Phinney, K. E. Murphy, M. J. Welch, P. M. Ellerbe, S. E. Long, K. W. Pratt, S. B. Schiller, L. T. Sniegoski, M. S. Rearick, T. W. Vetter, R. D. Vocke, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **361**, 71-80(1998).
14. Anja Kessler, Lothar Siekmann, *Clinical Chemistry*, **45**(9), 1523-1529(1999).
15. B. G. Wolthers, T. Tepper, A. Withag, G. T. Nagel, T. H. Y. de Haan, J. J. van Leeuwen, C. A. Stegeman and R. M. Huibman, *Clinica Chimica Acta*, **225**, 29(1994).