

항갑상선 의약물 중 2-mercpto-1-methyl-imidazole의 펄스차이 풀라로그래피에 의한 분석

김일광† · 천현자 · 임순화
원광대학교 자연과학대학 화학과
(1994. 11. 25. 접수)

Determination of 2-Mercapto-1-methyl-imidazole in Antithyroid Drug by Differential Pulse Polarography

Il Kwang Kim, Hyun Ja Chun and Soon Hwa Lim

Dept. of Chemistry, Coll. of Natural Science, Wonkwang University, I-ri 570-749, Korea

(Received Nov. 25, 1994)

요약 : 5.0×10^{-2} M LiClO₄ 용액 중에서 펄스차이 풀라로그래피로 2-mercpto-1-methyl-imidazole(MMI)의 정량방법을 조사하였다. 분석의 최적 조건은 초기전위 -0.9 volt vs. Ag / AgCl, 펄스높이 80mV, 주사속도 2mV/sec, 중간 크기 수은방울이었다. 검정곡선은 1.0×10^{-7} M에서 8.0×10^{-5} M 범위까지 좋은 직선성을 보여 주었으며, 검출한계는 2.2×10^{-9} M이었다. 이 방법은 다른 첨가제의 방해 없이 항갑상선 치료제 중의 MMI 정량에 응용할 수 있었다.

Abstract : The determination method of 2-mercpto-1-methyl-imidazole(MMI) in 5.0×10^{-2} M lithium perchlorate solution has been investigated by the differential pulse polarography. The optimum conditions for the determination of MMI were as follows: -0.9 volt(vs. Ag / AgCl) initial potential, 80mV pulse height, 2mV/sec scan rate, and medium mercury drop size. The calibration curve showed a good linearity in the range of 1.0×10^{-7} M to 8.0×10^{-5} M and the detection limit was 2.2×10^{-9} M. This method was applicable to the determination of MMI in thyroid drugs without interference from the additives.

Key words : 2-mercpto-1-methyl-imidazole, differential pulse polarography.

1. 서 론

갑상선은 호르몬을 합성하는 갑상포(thyroid follicle)의 많은 주머니로 구성되어 있고, 내부는 풍부한 단백질이 포함되어 있는 콜로이드 용액으로 되어 있는 가장 큰 내분비선이다. 갑상선의 갑상포는 혈액 중의 요오드화 이온을 콜로이드 내에서 산화시켜서 당단백질인 thyroglobulin의 L-thyroxine 잔기를 요오드화

하고, 일련의 효소반응을 통하여 L-thyroxine과 L-triiodothyronine 호르몬을 분비한다.^{1,2}

이 호르몬들은 당대사를 증가시키고 성장을 촉진시키는 작용을 하며, 이러한 갑상선 호르몬이 과잉으로 되거나 결핍되면 대사이상이 발생하게 된다. 과잉인 경우에는 갑상선 기능 항진증으로서 바세도우병이 생기며, thiouracil, thiourea, methimazole 같은 항갑상선 치료제는 thyroglobuline과 길항작용을 하여

thyroglobuline의 생성을 저해함으로써 갑상선 호르몬인 thyroxine의 과잉을 억제시킨다.³ 이러한 항갑산성 치료제는 -SH기나 S=C-기를 포함하는 황화합물이다.^{4~6}

항갑상선 치료제 중에 주로 사용되는 methimazole (2-mercapto-1-methyl-imidazole)의 분석방법으로는 spectrophotometry⁷, HPLC^{8,9}, GC-mass spectrometry¹⁰, gas-liquid chromatography^{11,12}, radioimmunoassay¹³ 등이 있으나, 검출한계가 $10^{-5} \sim 10^{-6}$ M 범위로서 아직은 미량분석에 적합치 않으며, 전기분석법에 대한 연구는 보고되어 있지 않다.

본 연구에서는 감도가 뛰어나며 방해효과를 작게 받는 펠스차이 폴라로그래피를 이용하여 미량의 2-mercapto-1-methyl-imidazole의 정량을 시도하였다. 이를 위하여 지지전해질의 종류, 초기전위, 펠스높이, 주사속도, 수은방울 크기 등의 분석조건 변화에 따라서 봉우리 전류값을 조사하여 최적 조건을 찾고, 표준 검정곡선과 검출한계를 제시하였다. 그리고 얻어진 분석조건을 이용하여 시판되는 의약물 중의 2-mercapto-1-methyl-imidazole의 정량에 응용하였다.

2. 실험

2.1. 시약

지지전해질인 lithium perchlorate는 Aldrich 회사 제품을 사용하였고, 2-mercapto-1-methyl-imidazole(MMI)은 표준시약(Aldrich)을 Milli-Q에 통과시킨 탈이온수에 녹여서 저장용액으로 만들어 사용하였다.

구리용액은 AA 분석용 Junsei 표준시약을 사용하였고, 작업전극용 수은은 Aldrich제 특급(99.9995%)을 구입하여 그대로 사용하였다. 실험 용액 속의 용존산소를 제거시키기 위해 시판되는 고순도 아르곤 기체를 구입하여 염기성 pyrogallol 용액과 CaCl_2 층에 차례로 통과시킨 후, 용액에 아르곤 기체가 미리 포화되어 있는 상태로 하여 실험하였다.

2.2. 기기 및 장치

EG & G PARC Model 384B polarographic analyzer에 EG & G PARC Model 303A static mercury drop electrode(ohmic drop 보상을 위한 3전극 형)와 PARC Model 0093 digital plotter를 연결하여

펠스차이 폴라로그램을 얻었다. 작업전극으로는 수은 전극, 기준전극으로는 Ag / AgCl 전극, 상대전극으로는 백금선을 사용하였다. pH의 측정은 Orion Research사의 Model 520A digital pH-meter, 온도조절은 A-Line Lab.의 thermo-cool을 이용하였다. 고체상 추출장치는 1m/ octadecyl 컬럼의 Baker-10 SPE (solid phase extraction) system을 이용하였다.

2.3. 실험방법

LiClO_4 로 만든 지지전해질 10ml를 취하여 용기에 넣고, 아르곤 분위기하에서 적절한 초기전위와 펠스높이를 선택한 다음 양전위쪽(산화)으로 주사하면서 펠스차이 폴라로그램을 얻었다. 초기전위, 펠스높이, 주사속도, 수은방울의 크기에 따른 전류값을 조사하여 최적 조건을 구하고, 이 조건하에서 표준 검정곡선을 작성하였다. pH의 영향을 보기 위해 Lange's Handbook of Chemistry¹⁴에 나와 있는 National Bureau of Standards(NBS) 방법에 따라, pH 2와 pH 3은 KCl 과 HCl 완충용액을 pH 4~8까지는 Na_2HPO_4 와 citrate 완충용액을, pH 9~11은 borate 완충용액을 만들어 사용하였다. 의약물로는 항갑상선 치료제로 쓰이는 알약을 시중에서 구입하여 중류수에 녹인 후, 고체상 추출장치로 걸러서 회석하고, 최적의 실험조건에 맞추어 전압-전류곡선을 얻었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 지지전해질에 따른 봉우리 전류

펠스높이, 주사속도 등의 조건을 최적화하지 않은 상태에서, 이들을 통상 사용하던 조건으로 임의 설정하고 지지전해질의 선택을 위한 실험을 먼저 하였다. 지지전해질의 조건에 따른 MMI의 봉우리 전류를 측정하여 그 결과를 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 봉우리 전위는 지지전해질이 산성 용액이면 양전위 방향으로 옮겨가고, 염기성 용액이면 음전위 방향으로 이동을 보여 준다. 봉우리 전류값은 약한 산이나 염기의 완충용액을 지지전해질로 사용하였을 때에 크게 감소하였으며, 중성 염이나 염기성 염의 지지전해질에서는 높게 나타났다. 이는 지지전해질의 조성에 따라서 MMI의 확산계수가 달라지는 데 기인되는 것으로 보인다. 여기서는 5.0×10^{-2} M LiClO_4 용액에서 가장 높게 나타났다. 이후의 실험은 5.0×10^{-2} M LiClO_4 용액

Table 1. Peak current of 2.0×10^{-5} M 2-mercaptop-1-methyl-imidazole in various supporting electrolytes*

Supporting electrolytes	Peak potential (volts)	Peak current (nA)
0.1 N H ₂ SO ₄	0.130	9.70
0.1 M LiClO ₄	0.018	18.89
0.05M LiClO ₄	0.030	20.08
0.1 M NaOH	-0.416	16.19
0.05M NaOH	-0.300	16.52
Acetate buffer (pH 4.6)	-	-
Borax buffer (pH 9.2)	-0.236	3.90

*pulse height : 20mV scan rate : 4mV/sec
initial potential : -0.9 volt vs. Ag / AgCl drop size : medium drop time : 0.5 sec

을 지지전해질로 선택하여 사용하였다.

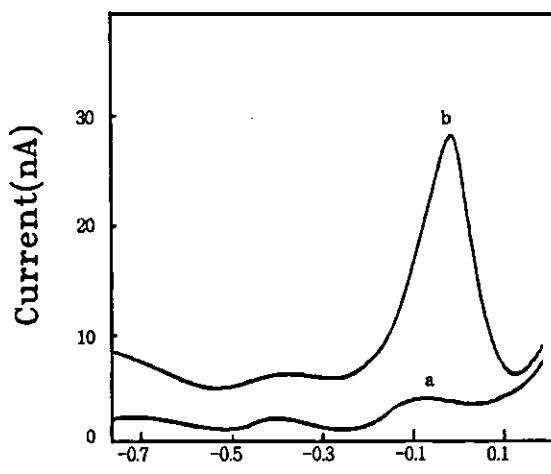
3.2. LiClO₄ 지지전해질에서 MMI의 봉우리 전류

5.0×10^{-2} M LiClO₄ 지지전해질만 있을 때와 5.0×10^{-6} M MMI를 가했을 때의 전형적인 펄스차이 폴라그램을 Fig. 1에 나타내었다.

Fig. 1에서 a는 지지전해질만 있을 때의 폴라그램으로서 0.1 volt(이후 전위표시는 Ag / AgCl 전극전위를 기준으로 함) 근방까지 잔류전류만을 보였으며, b는 지지전해질 용액에 5.0×10^{-6} M MMI를 첨가한 것으로 0.0 volt 부근에서 MMI의 안정한 산화봉우리를 나타내었다.

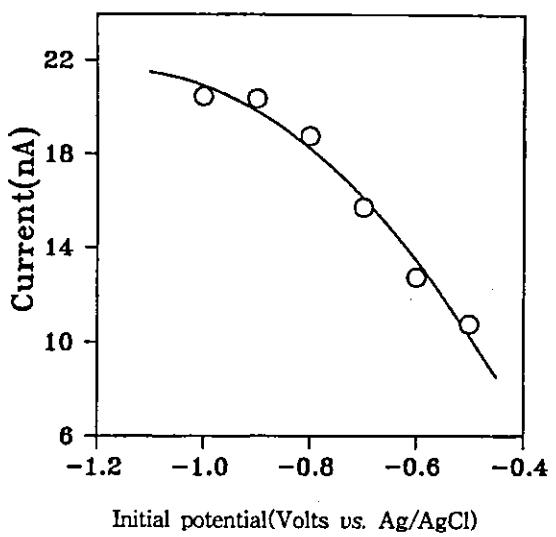
3.3. 초기전위의 영향

초기전위가 MMI 산화 전류값에 미치는 영향을 알기 위하여 5.0×10^{-6} M MMI 표준용액에서 초기전위를 -1.0 volt로부터 -0.5 volt로 변화시키면서 MMI의 산화봉우리값을 얻었으며, 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 이들 결과를 보면 초기전위가 보다 음전위일수록 봉우리 전류값은 커지는 것으로 나타났다. 큰 봉우리값을 얻기 위하여 높은 음전위값을 택하는 것이 유리하겠지만, 반면에 그만큼 더 방해성분의 전류가 포함될 수도 있기 때문에, 본 실험에서는 다른 이온들의 방해를 덜 받고 비교적 높은 감도를 유지하면서 주사속도를 단축시키기 위하여 -0.9 volt를 초기전위로 선택하였다.



Potential vs. Ag/AgCl reference electrode
Fig. 1. A typical differential pulse polarogram for 5.0×10^{-6} M 2-mercaptop-1-methyl-imidazole(MMI) in 5.0×10^{-2} M LiClO₄. Initial potential: -0.9 volt, pulse height: 80mV, scan rate: 2mV/sec, mercury drop size: medium, drop time: 0.5 sec.

- a. 5.0×10^{-2} M LiClO₄(supporting electrolyte) only
- b. added 5.0×10^{-6} M MMI



Initial potential(Volts vs. Ag/AgCl)
Fig. 2. Effect of initial potential on the peak current for 5.0×10^{-6} M MMI in 5.0×10^{-2} M LiClO₄. Pulse height: 80mV, scan rate: 2mV/sec., mercury drop size: medium.

3.4. 펄스높이의 영향

MMI 산화봉우리에 대한 펄스높이의 영향을 알아보기 위하여 5.0×10^{-6} M MMI 표준용액에서 초기전위를 -0.9 volt로 하고, 펄스의 높이를 20mV로부터 120mV까지 변화시키면서 펄스차이 플라로그램을 얻었으며, 그 결과를 Fig. 3에 나타내었다. Fig. 3을 보면 펄스높이가 커짐에 따라서 봉우리전류값은 등온선 모양으로 증가함을 알 수 있었다. 본 실험에서는 봉우리 모양이 안정하면서도 봉우리 전류값이 비교적 높은 80mV를 적정 펄스높이로 선택하였다.

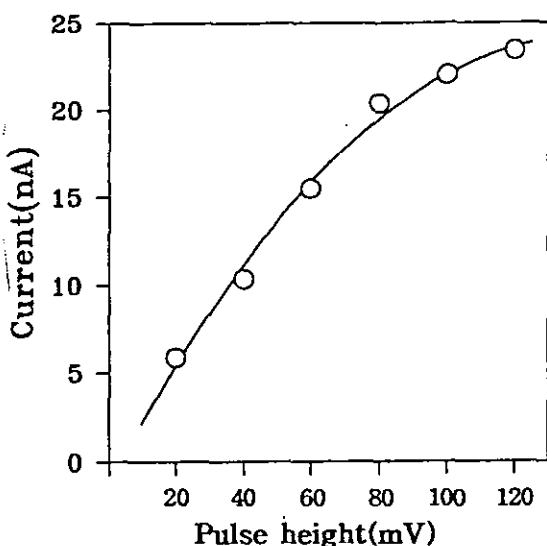


Fig. 3. Effect of pulse height on the peak current for 5.0×10^{-6} M MMI in 5.0×10^{-2} M LiClO₄. Initial potential: -0.9 volt, scan rate: 2mV/sec., mercury drop size: medium.

3.5. 주사속도의 영향

MMI 산화전류에 대한 주사속도의 영향을 알아보기 위하여 5.0×10^{-6} M MMI 표준용액에서 초기전위 -0.9 volt, 펄스높이 80mV로 하고, 주사속도를 변화시키면서 펄스차이 플라로그램을 얻었으며, 그 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 주사속도가 증가함에 따라서 봉우리 전류값이 감소하였으며, 주사속도가 10mV/sec 이상일 때는 전압-전류 곡선이 찌그러지는 경향을 보였다. 따라서 본 실험에서는 감도와 분리능이 좋은 2mV/sec의 주사속도를 선택하였다.

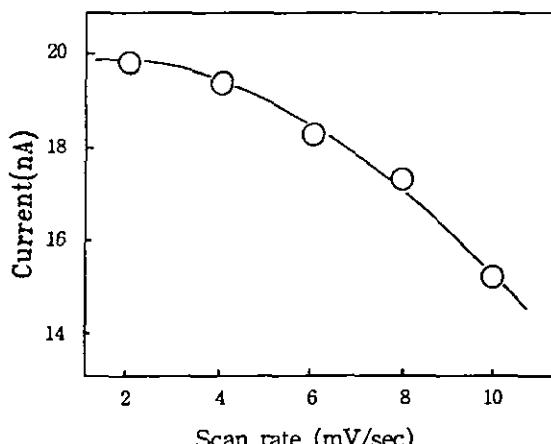


Fig. 4. Effect of scan rate on the peak current for 5.0×10^{-6} M MMI in 5.0×10^{-2} M LiClO₄. Initial potential: -0.9 volt, pulse height: 80mV.

3.6. 수은방울의 영향

MMI 산화전류에 대한 수은방울 크기의 영향을 알아보기 위하여 5.0×10^{-6} M MMI 표준용액에서 초기전위 -0.9 volt, 펄스높이 80mV, 주사속도 2mV/sec로 고정하고 수은방울의 크기를 변화시키면서 펄스차

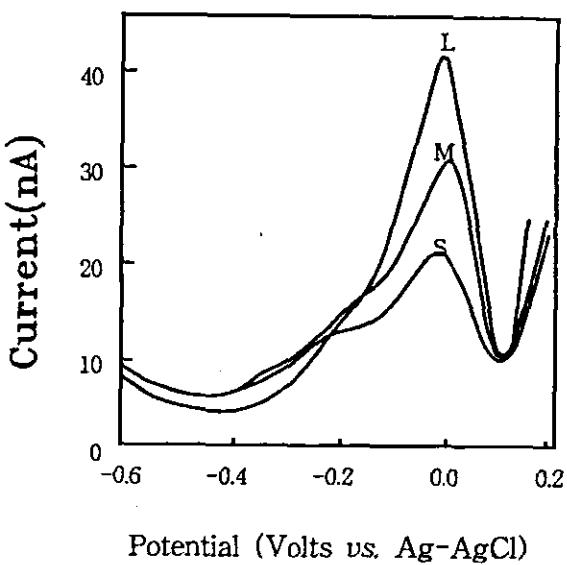


Fig. 5. Effect of drop size on the peak current for 5.0×10^{-6} M MMI in 5.0×10^{-2} M LiClO₄. Pulse height: 80mV, scan rate: 2mV/sec, initial potential: -0.9 volt.

drop size: a: small, b: medium, c: large.

i) 폴라그램을 얻었으며, 그 결과를 Fig. 5에 보였다. Fig. 5를 보면 수은방울의 크기가 작은 방울에서 큰 방울로 변화됨에 따라서 봉우리 전류값도 증가됨을 알 수 있다. 큰 수은방울일 때 가장 높은 전류값을 보였으나, 재현성과 봉우리 모양의 안정성을 고려하여 중간 크기의 수은방울을 선택하였다.

3.7. pH의 영향

MMI 산화전류에 대한 pH의 영향을 알아보기 위하여 NBS¹⁴의 방법에 따라 만들어진 완충용액을 사용하여 2.0×10^{-6} M 표준용액에서 펄스차이 폴라로그램을 얻고, 그 결과를 Fig. 6에 나타내었다.

Fig. 6의 E_p 대 pH 도표에서 두 개의 직선이 $/$ 모양으로 만나는 pH 6 부근이 pK_1 이고, $\text{}/$ 모양으로 만-

나는 pH 10 부근이 pK'_1 가 된다.¹⁵ $pK_1 < \text{pH} < pK'_1$
 ± 1 영역에서 봉우리 전위는 음전위로 이동되었고, 이 범위에서 $\Delta E_p / \Delta \text{pH}$ 는 62mV였다. 이 값을 Meites¹⁶ 가 제안한 식 $dE/d(\text{pH}) = -0.059 \cdot p/\alpha_n$ 에 적용하면, α_n 를 1로, 불 때 양성자수(p)도 1로 얻어지며, 이것은 RSH 형태의 mercaptan 화합물들의 전형적인 결과들과도 잘 일치한다.^{17~21} Fig. 6의 전류 대 pH 도표에서는 완충용액을 사용하였을 경우에 전류값이 크게 낮아지는 현상을 보였으며, 이 결과는 어떤 완충용액의 농도에서 MMI 성분의 화산계수가 작아지거나, MMI 성분의 전극활성 농도가 낮아지는 데 따른 영향으로 생각된다. 강산성과 강염기성 용액에서 높은 전류값을 보이고, 중성에서도 비교적 높은 전류값을 보였으나, 중성 지지전해질 0.05M LiClO₄에서 가장 높은 전류값을 얻었다.

3.8. 구리의 첨가 영향

MMI의 산화전류에 영향을 미치는 주요 방해성분은 구리이온이다. 이에 대한 정량적인 조사를 하기 위하여 5.0×10^{-6} M MMI 용액에 구리이온을 20ppb로부터 2ppm까지 첨가하면서 펄스차이 폴라로그램의 봉우리 전류값을 조사하여 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Effect of Cu(II) added on the differential pulse polarographic peak potential for 5.0×10^{-6} M MMI in 5.0×10^{-2} M LiClO₄ solution

Added Cu(II) concentration (ppb)	Peak potential(volts)			
	E_1	E_2	E_3	E_4
20	-0.156	-	-	-
120	-0.150	-	-	0.118
140	-0.154	-	-	0.116
170	-0.156	-	-	0.115
300	-0.200	-0.292	-0.090	0.094
400	-	-0.280	-0.088	0.084
500	-	-0.214	-0.098	0.080
900	-	-	-0.162	0.078

Only MMI peak potential : -0.054 V

Only Cu²⁺ peak potential : 0.056 V

E_2, E_3 : split peak potential of mixture (Cu²⁺+MMI)

E_4 : peak potential of Cu(II) in complex mixture

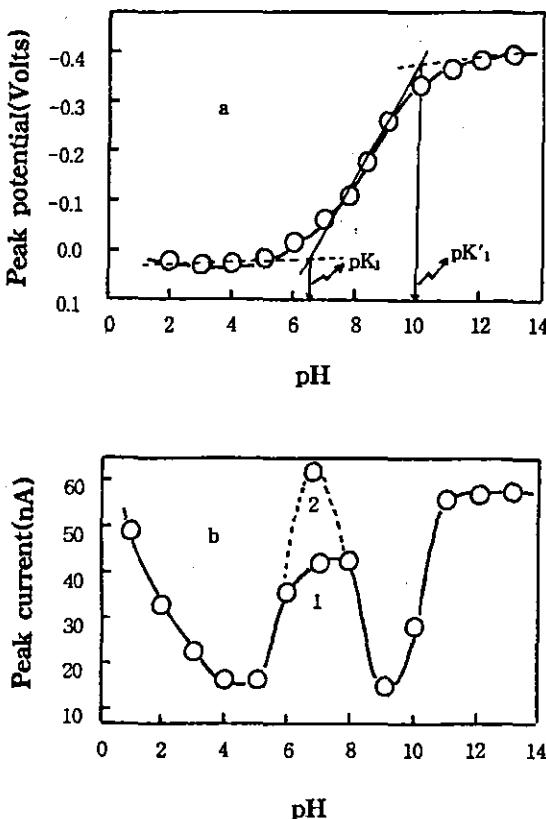


Fig. 6. Effects of pH change on the peak potential and peak current of 2.0×10^{-6} M MMI.

- a. plot of E_p vs. pH in buffer solution
- b. plot of I_p vs. pH: 1. buffer solution 2.50×10^{-2} M LiClO₄

처음 80ppb까지는 MMI 표준용액의 봉우리 전류값은 거의 변화가 없었고, 봉우리전위만 -0.054 volt로부터 -0.150 volt 근처로 이동하였다. Cu^{2+} 를 120ppb 첨가하면, -0.150 volt에서 봉우리 전류값이 증가됨과 동시에 0.120 volt 근처에서 수은전극에 Hg-Cu 아말감이 형성되는 Cu(II) 의 환원봉우리 전류값이 크게 나타났다. Cu^{2+} 의 첨가에 따른 봉우리의 갈라짐은 Cu-MMI 혼합물의 형성 때문일 것으로 생각되며, 이런 갈라짐 현상은 Wandruszka²¹의 연구에서도 나타났다. 300ppb 이상에서는 갈라지던 봉우리가 -0.24 volt 부근으로 모여서 나타나고, -0.09 volt 근처에서 Cu^{2+} 만의 봉우리 전류가 나타나기 시작하였다. 500ppb 이상에서는 -0.24 volt 근처의 봉우리 전류가 뒷쪽 Cu^{2+} 봉우리 전류로 이동되는 현상을 보이며, 900ppb 이상에서는 앞쪽의 봉우리 전류가 없어지고 뒷쪽의 Cu^{2+} 봉우리 전류에 모두 합쳐져서 나타났다. Table 2에서, E_1 봉우리전위는 MMI의 고유한 봉우리전위이며, E_2 와 E_3 는 MMI와 구리의 혼합물을 의해 갈라지는 봉우리 전위이다. 한편, 120ppb 이상에서부터 나타나는 0.1 volt 근처의 E_4 봉우리 전위는 Cu(II) 가 아말감을 형성하기 때문에 생기는 것으로 보이며, Miller²³가 언급한 경우와 비슷하게 Cu 의 농도가 증감함에 따라서 음전위쪽으로 이동되는 현상을 보였다. 따라서, 100ppb 이상의 Cu^{2+} 가 존재할 경우에는 미량의 MMI 정량에 큰 영향을 미치므로 SCN^- 가리움제를 사용하거나 Cu^{2+} 의 농도를 다른 방법으로 조사하여 보상하여야 할 것이다.

3.9. MMI에 대한 표준 검정곡선

이제까지 조사한 실험조건으로부터 선택한 초기전위 -0.9 volt, 펄스높이 80mV , 주사속도 2mV/sec , 수은방울의 크기 medium, 그리고 $5.0 \times 10^{-2}\text{M LiClO}_4$ 용액에서 MMI의 표준용액을 묽은 농도로부터 진한 농도로 첨가하면서 펄스차이 폴라로그램을 얻고, 그 결과로부터 Fig. 7과 같은 검정곡선을 얻었다. 이 MMI 표준용액에 대한 검정곡선은 $1.0 \times 10^{-7}\text{M}$ 로부터 $8.0 \times 10^{-5}\text{M}$ 범위에 걸쳐서 좋은 직선성을 보여 주고 있으며, 감도는 $14.48\text{nA}/10^{-5}\text{M}$ 이고, 검출한계는 $2.2 \times 10^{-9}\text{M}$ 이었다.

이 검출한계는 생체시료, 특히 단백질 중에 $-\text{SH}$ 기가 포함되어 있는 아미노산종의 분석에 쉽게 이용할 수 있을 것이다. 본 실험에서는 먼저 시료용액의 조성

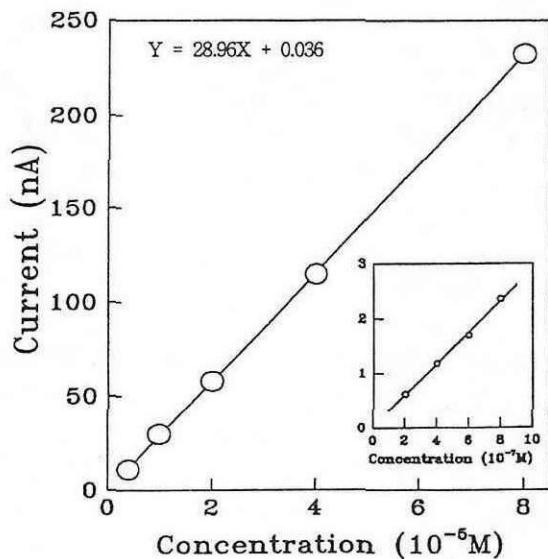


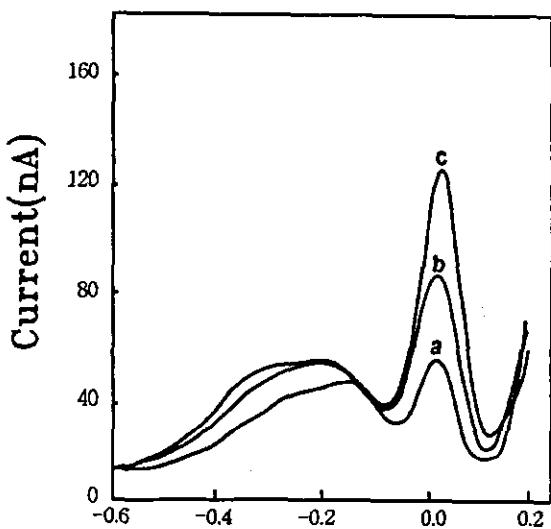
Fig. 7. Calibration curve for the differential pulse polarographic determination of MMI in $5.0 \times 10^{-2}\text{M LiClO}_4$. Initial potential: -0.9 volt, pulse height: 80mV , scan rate: 2mV/sec , mercury drop size: medium, drop time: 0.5 sec.

이 비교적 단순한 의약물 중의 MMI의 정량에 응용하였다.

3.10. 의약물 중의 MMI 성분 분석

시중에서 구입한 의약물을 증류수에 녹인 후, octadecyl 컬럼의 고체상 추출장치로 거르고, $100\mu\text{l}$ 를 취하여 10.0ml 가 되도록 지지전해질 용액으로 희석하였다. 표준용액에 대한 최적 조건과 동일한 실험조건에서 펄스차이 폴라로그램을 얻었으며, 그 결과를 Fig. 8에 보였다.

이 그림의 a는 $1.5 \times 10^{-5}\text{M}$ 의 methimazole 시료용액의 봉우리 전류값을 측정한 것이고, b는 여기에 $1.5 \times 10^{-5}\text{M}$ 의 methimazole 시료용액을 더 첨가한 것이다. c는 b에 표준용액인 MMI 용액을 $1.0 \times 10^{-5}\text{M}$ 첨가한 것이며, 봉우리 전류값은 농도에 비례하였다. -0.4 volt에서 -0.2 volt 사이에 넓게 나타나는 봉우리 전류는 특정 첨가제의 환원 전류파로 여겨지나, 제품 중의 MMI 정량에는 큰 영향을 주지 않았으며, 이로써 펄스차이 폴라로그래피를 $-\text{SH}$ 기가 붙어 있는 화합물의 분석에 이용할 수 있음을 알았다. 의약물 중에 함유된 MMI의 순도를 확인하기 위하여 표기상



Potential (Volts vs. Ag/AgCl)

Fig. 8. Determination of MMI in methimazole tablet.

- a : 1.5×10^{-5} M methimazole tablet
- b : a+ 1.5×10^{-5} M methimazole tablet
- c : b+ 1.0×10^{-5} M MMI standard solution

3.0×10^{-5} M 농도를 표준용액의 검정곡선에 맞추어 농도로 환산해 본 결과, 실제 농도는 1.9×10^{-5} M가 되는 것으로 나타나므로 다른 분석방법의 결과와 비교할 필요가 있을 것이다.

4. 결론

5.0×10^{-2} M LiClO₄ 수용액을 지지전해질로 써서 초기전위 -0.9 volt, 펄스높이 80mV, 중간크기 수온방울, 주사속도 2mV/sec의 조건에서 필스차이 폴라로그래피로 2-mercaptop-1-methyl-imidazole(MMI)을 정량하였다. 검정곡선은 1.0×10^{-7} M에서 8.0×10^{-5} M 범위까지 좋은 직선성을 보여 주었으며, 이 조건에서 검출한계는 2.2×10^{-9} M이었다. 이 방법은 구리이온이 100ppb 이상 존재할 경우에 영향을 받기 시작하였으며, 의약물 중 MMI의 분석에 응용하여 보았더니 첨가제의 방해를 받지 않고 정량이 가능하였다.

감사의 글

이 연구는 한국과학재단 특별기초연구과제(91-03-

00-08)와 교비 연구비(94)의 지원에 의해 이루어진 것으로 이에 깊은 감사를 드립니다.

5. 참고문헌

1. A. L. Lehninger, "Principle of Biochemistry", Worth Publishers, New York, 1982, p. 796.
2. 고건일 외 "인체 생리학", 탐구당, 1993, p. 212.
3. 백태홍 외 "생화학 요론", 유한문화사, 1985, p. 295
4. D. Schumjann, R. Bennes, P. Vanel and D. Bellostas, *J. Electroanal. Chem.*, **101**, 73(1979).
5. C. Buess-Herman, L. Gierst, M. Gonze and F. Silva, *ibid.*, **226**, 267(1987).
6. T. Wandlowski, *ibid.*, **312**, 245(1991).
7. N. Gallo, P. Bianco, R. Tapino and G. Luisi, *Minerva Medica*, **74**(16), 875(1983).
8. A. Okuno et al., *Endocrinologica Acta*, **115**(1), 112(1987).
9. Y. Okamura, C. Shigemasa and T. Tatsuhara, *Endocrinogica Japonica*, **33**(5), 605(1986).
10. G. G. Skellern, B. I. Knight and J. B. Stenlake, *J. Chromatography*, **124**(2), 405(1976).
11. S. Floberg, K. Lanbeck and B. Lindstrom, *ibid.*, **182**(1), 63(1980).
12. M. R. Bending and D. Stevenson, *ibid.*, **154**(2), 267(1978).
13. J. P. Kampmann and J. M. Hansen, *Clinical Pharmacokinetics*, **6**(6), 401(1981).
14. J. A. Dean, "Lange's Handbook of Chemistry", 13th ed., MacGraw-Hill, New York, 5-100~101(1985).
15. P. Zuman, "The Elucidation of Organic Electrode Process", Academic Press, New York 1969, Chap II.
16. L. Meites, "Polarographic Techniques" 2nd Ed., John Wiley & Sons, New York 1965, p. 248.
17. A. N. Frumkin and N. B. Grigorev, *J. Electroanal. Soc.*, **119**, 1695(1972).
18. K. Chandrasekara, K. C. Pillai and W. E. Waghorne, *ibid.*, **125**, 487(1981).
19. G. Hills and F. Silva, *ibid.*, **137**, 387(1982).
20. M. Skompska and K. Jaszcunski, *ibid.*, **272**, 207(1989).
21. A. J. Bard ed., "Encyclopedia of Electrochemistry of the Elements", Vol III, p. 411, Marcel Dekker, New York, 1973, p. 411.
22. R. von Wandruszka and X. Yuan, *Talanta*, **40**, 37(1993).
23. I. R. Miller and J. Teva, *J. Electroanal. Chem.*, **36**, 157(1972).