- 3) 倉田軍一, 佐野健治: 生化学, **31**, 153 (1959).
- 4) M. R. Lunt, P. W. Kent: Biochem. et Biophys. Acta, **44**, 371 (1960).
- 5) 沖増哲: 農化, **32**, 303 (1958); 広島女子短大研究紀要第8集 (1957).
- 6) 千手諒一, 沖増哲: 農化, **23**, 432 (1949).
- 7) E. Husemann, O. H. Weber: J. prakt. Chem., [2] **159**, 334 (1942).
- 8) S. T. Horowitz, S. Roseman, H. J. Blumenthal: J. Am. Chem. Soc., **79**, 5046 (1957).
- 9) 桜田一郎, 野間夫之: 大有機化学, **19**, 34(1960), 朝倉書店.
- 10) C. Doree, A. C. Healey: J. Soc. Dyers a. Colourists, **49**, 290 (1933); C. Birtwell, D. A. Clibbens, B. P. Ridge: J. Textile Inst., **16**, T13(1925); **19**, T349 (1928).

キチンおよびグルコサミンに関する研究 (Ⅲ)^{*2} キチンおよび関連誘導体のカタツムリ酵素による分解^{*2}

倉田軍一, 酒井立夫, 宮原龍郎 (富山大学薬学部^{*3})

Studies on Chitin and Glucosamine. (Ⅲ).^{*1} Degradation of Chitin and Its Related Derivatives by Snail Enzyme.

Gun-ichi Kurata, Tatsuo Sakai, and Tatsurō Miyahara
(Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Toyama^{*3})

Enzymatic degradation of chitin and its derivatives was attempted by means of snail digestive fluid and its acetone-dried powder, which was made from snail gastrointestinal and liver.

N-acetylglucosamine could be detected by paper chromatography in the degradation process of purified chitin, colloidal chitin, regenerated chitin, acetylated chitosan, carboxymethylchitin or glycolchitin.

Glucosamine could be also characterized from degradation product of chitosan by the conversion to arabinose and *N*-acetylglucosamine.

To investigate the above degradation process, viscosity reduction of water-soluble chitin derivatives were measured, and production of *N*-acetylglucosamine or glucosamine was determined by colorimetric method.

In case of carboxymethylchitin and glycolchitin, the hexosamine was produced remarkably by the degradation and viscosity reduced distinctly, but in case of chitosan the yield of glucosamine was small. (Received September 25, 1964)

動植物界に広く存在する Chitin と同様にその分解酵素 Chitinase はカタツムリ¹⁻⁵⁾, エムルシン⁶⁾, 糸状菌⁷⁻⁹⁾ など動物, 植物, 微生物にわたって広く見出され

ている。なかでもカタツムリ消化液の Chitinase 活性は特に強く, Chitin を容易に単量体 *N*-Acetylglucosamine (以下 NAGA と略す) に分解する。

著者らは前報 (Ⅱ)^{*1} において Chitin 及び関連誘導体の塩酸による加水分解条件について検討したが, Chitin は極めて強固な化学構造を有するため, 加水分解においても高濃度の酸を必要とし, かつ Glucosamine (以下 GA と略す) にまで分解される。したがって化学

*1 前報 (Ⅱ); 倉田軍一, 酒井立夫, 宮原龍郎: 本誌, **11**, 50 (1965).

*2 第17回日本薬学大会 (金沢) で発表 (1963).

*3 富山市五福3190; 3190, Gofuku, Toyama-shi.

的な方法による加水分解は Chitin の部分構造の研究において、例えば Chitin の構成単位である NAGA の測定などにおいては不適當である。

本報においては Chitin ならびに各種の関連誘導体について緩やかな分解条件として酵素分解を試み種々検討した。酵素としては、使用上及び保存上の見地からカタツムリ消化液の他に、その胃液及び肝臓のアセトン乾燥粉末を使用し、ペーパークロマトグラフィー（以下 PPC と略す）、粘度測定及び既報¹⁰⁾における GA 及び NAGA の比色定量などの方法によって分解の過程と成績体などについて検討を加えた。

実験材料および実験方法

1. 酵 素

カタツムリの Chitinase はその胃液および肝臓中に存在するが、著者らはまず Chitosan に胃液及び肝臓抽出液を別々に作用させたところ、ほぼ同程度の分解力を有したので、定量的実験に供するため胃液及び肝臓のアセトン乾燥粉末を調製した。

調製法：カタツムリの胃腸と肝臓とを剔出し、ほぼ同重量の碎氷と、ついで倍量の冷アセトンと homogenize する。これを篩過（100 メッシュ）しながら氷と食塩とで冷却したアセトン中に分散させ、静置後遠心分離し沈澱物を冷アセトンで三回洗浄後乳鉢に移し、 P_2O_5 上室温で減圧乾燥する。この際固塊化しない様にとときどき細かく砕く必要がある。灰白色の乾燥物を乳鉢で軽く磨砕し篩過して繊維を除去、密栓し湿気を避けて冷蔵庫に貯蔵する。用時にこの乾燥粉末を緩衝液で抽出して使用する。

2. 基 質

精製 Chitin、再製 Chitin は第2報⁴⁾に従って、コロイド性 Chitin は精製 Chitin より R. M. Lunt ら¹¹⁾の方法により調製した。Glycolchitin は再製 Chitin よりグリコール化剤として Ethylene chlorhydrin を用いた以外は、千手ら¹²⁾の方法により、Carboxymethyl-chitin（以下 CM Chitin と略す）は再製 Chitin から増ら¹³⁾の方法により調製した。再製 Chitin より調製した Chitosan¹⁴⁾を無水酢酸と室温で五日間処理して希酸に不溶性のアセチル化 Chitosan を調製した。

3. 酵 素 分 解

Chitosan の場合は基質として精製遊離 Chitosan 200 mg に適量の水を加え、かきまぜながら濃塩酸を滴加して完全に溶解し水を加えて全量100mlにし pH を4.5に調製する。一方酵素液としてカタツムリから採取した胃液を0.1N 酢酸緩衝液（pH 4.5）で3倍に希釈、遠心分離して上澄液をとり用いる。あるいはカタツムリから剔

出した肝臓2gを緩衝液40mlと共に homogenize し遠心分離した上澄液を用いる。この Chitosan 水溶液5mlに酵素液2ml、トルエン2滴を加えて37°で48時間保温した。なお対照として Chitosan 水溶液の代りに水5mlを用いた。

精製 Chitin および再製 Chitin の場合はその各々10 mg に pH 4.5 の酢酸緩衝液 5 ml を加えたものに、コロイド性 Chitin はその5 ml（Chitin として10mg 含有、pH 4.5 に緩衝化したもの）に、CM Chitin 及び Glycolchitin はそれぞれその0.2%水溶液（pH 4.5 に緩衝化したもの）5 ml に、Chitosan の場合と同様に、胃液及び肝臓抽出液を作用させた。

4. 酵素分解成績体の PPC

酵素分解液をエタノールで除蛋白後、約50°で減圧乾燥したものについて PPC を行なう。東洋汙紙 No. 51、展開溶媒は n-ブタノール：氷酢酸：水（4：1：5）を用い、下降法で室温で行なった。

還元糖は、アニリン水素フタル酸試薬で検出し、NAGA は Morgan-Elson 反応¹⁵⁾で検出した。GA はニンヒドリン試薬によるほか、ニンヒドリン分解によりアラビノースに誘導する方法¹⁶⁾、NAGA に誘導する方法、及び次のろ紙上アセチル化してから Morgan-Elson 反応で検出する方法で行なった。

すなわち、ろ紙を展開後溶媒を蒸散させ、エタノール、ホウ酸混液¹⁵⁾を噴霧して弱く加熱する（試料が遊離 GA の場合は、この操作を省略する）。次にアセチル化試薬（アセトン10 ml と無水酢酸0.2 ml の混液）を噴霧して風乾する。この操作を更に一度くり返し、再びエタノール・ホウ酸混液を噴霧して充分加熱後（検出され難ければこの操作を2～3回くり返す）、p-dimethyl-aminobenzaldehyde（以下 DMAB と略す）試薬¹⁵⁾を噴霧して室温で放置すると紫色に発色する。

なお、GA の検出には、ろ紙電気泳動法（東洋汙紙 No. 50、電解液7N-酢酸、500V・3mA/cm、25°で1時間泳動）を試みた。この条件では GA のみが泳動され、中性糖と区別できる。

5. 比色法による酵素分解液の NAGA 及び GA の測定

上記の如く調製したアセトン乾燥粉末を200倍量の0.1N 酢酸緩衝液（pH 4.5）で抽出する。この抽出液2mlと基質5mg（水5mlに分散または溶解したもの）を37°に保温しながらふりまぜる。ある一定時間保温後、煮沸水浴中で1分間加熱して酵素を失活させ、水冷し水3mlを加え遠心分離する。この上澄液0.5mlについて NAGA 及び GA を定量¹⁰⁾した。

6. 酵素分解液の粘度測定⁷⁾

1% CM Chitin 水溶液 5 ml と 0.5% 酵素液 [Mc Ilvaine 緩衝液 (pH 4.5, ただし Na に換算して 0.6 モルになる様に調製) で抽出] 5 ml とを 37° の恒温槽に 10 分間放置してから充分混合してオストワルド型粘度計に注加し, 37° に保温, ある一定時間ごとに粘度を測定し, これより粘度低下率 A_t を求めた。すなわち

$$A_t = (T_0 - T_t) / (T_0 - T_w) \times 100$$

但し T_0 及び T_t は 0 分及び t 分後の反応液の落下秒数, T_w は蒸留水の落下秒数であり, T_0 では酵素液の代りに緩衝液のみを用いて測定した。Glycolchitin の場合も同様に行なった。

Chitosan の場合は, 上記緩衝液では Chitosan が塩析されるので次のように行なった⁹⁾。3. に記した如く調製した 1% Chitosan 溶液 (pH 4.5, 但し塩化ナトリウム 0.3 モル濃度を含む) 3 ml に 0.6 モル酢酸緩衝液 (pH 4.5) 3 ml を加え, ついで 0.5% 酵素抽出液 (蒸留水で抽出する) 3 ml を作用させて, 以下同様に操作して測定した。

実験結果

1. 粗酵素の最適 pH

再製 Chitin, CM Chitin, Glycolchitin および Chitosan の酵素分解液の NAGA または GA 量と pH との関係を Fig. 1, Fig. 2 に示した。いずれの基質も最適 pH は 4.5~4.7 の間にあった。CM Chitin 及び Chitosan では比色法, 粘度法いずれの場合もほぼ同じ結果を得た。

2. 酵素の分解物の PPC

各酵素分解物の PPC の結果を Table I に示した。なお精製 Chitin, コロイド性 Chitin の酵素分解液からも NAGA を検出確認した。Chitosan の場合, 酵素分解液の濃縮液を *n*-ブタノール・酢酸・水の溶媒系で展開すると, アニリン水素フタル酸試薬及びアセチル化してから Morgan-Elson 反応で検出する方法 [第 1 報¹⁰⁾] のいずれによっても陽性なスポット (S_1) が得られ, R_{Ac} 値 (NAGA の R_f を 1 とみなしたときの R_f 値) からみても $GA \cdot HCl$ と考えられる。そこで更に Chitosan の酵素分解濃縮液をニンヒドリン分解 (GA がアラビノースに変わり¹⁶⁾, アニリン水素フタル酸試薬で赤色を呈する) 及び *N* アセチル化 (GA は NAGA に変わり Morgan-Elson 反応で紫色を呈する) の両反応を行なってから PPC にかけたところ, アラビノース (S_2) 及び NAGA (S_3) を検出し得たので, Chitosan の酵素分解物から GA を検出確認することができた。

3. 各基質の酵素分解の比較 (比色法の場合)

Fig. 1. Relation between pH and Amount of NAGA Determined by Colorimetry

5 ml dispersion or soln. (0.1%) of the following substrates and 2 ml enzyme soln. (0.5%) are incubated at 37° for the periods indicated below.

- I : Regenerated chitin, 5 hrs.
- II : Glycolchitin, 1 hr.
- III : CM chitin, 5 hrs.
- IV : Chitosan, 40 hrs.

Fig. 2. Relation between pH and Viscosity Reduction

Reaction was carried out at 37° for 60 min.

- I : Reaction mixture is composed of 5 ml of CM Chitin soln. (1%) and 5 ml of enzyme soln. (0.5%) of various pH.
- II : Reaction mixture is composed of 3 ml of Chitosan soln. (1%) and 3 ml of enzyme soln. (0.5%) of various pH.

Fig. 3 に示されるように水に不溶性のものでは, コロイド性 Chitin, 再製 Chitin, 精製 Chitin の順に分解

Table I. Paper Chromatography of Enzyme Degradation Products

Solvent : BuOH-AcOH-H₂O (4 : 1 : 5)

Substrate	Spot	R _{Ac} * ¹	Aniline hydrogen phthalate* ²	Morgan- Elson* ³	Morgan-Elson after acetylation* ³	Ninhydrin* ⁴
Chitosan* ⁵	S ₁	0.65	+	—	+	+
" * ⁶	S ₂	0.82	+(red)	—	—	—
" * ⁷	S ₃	1.00	+	+	+	—
Regenerated Chitin * ⁵	S ₄	1.00	+	+	+	—
	S ₅	0.60	+	+	+	—
CM Chitin* ⁵	S ₆	1.00	+	+	+	—
	S ₇	0.88	+	+	+	—
Glycolchitin* ⁵	S ₈	1.00	+	+	+	—
	S ₉	1.17	+	+	+	—
Contrast	GA·HCl	0.65	+	—	+	+
	Arabinose	0.82	+(red)	—	—	—
	NAGA	1.00	+	+	+	—

*¹ R_f values, when R_f of NAGA is regarded as 1.00.*² arabinose : red, others : brown*³ + : violet*⁴ + : violet*⁵ concentrated soln. of degradation products of each substrate*⁶ The above concentrated soln. was submitted to ninhydrin decomposition¹⁶⁾.*⁷ The above concentrated soln. was submitted to *N*-acetylation with Ac₂O.

Fig. 3. Degradation Curves of Purified Chitin, Colloidal Chitin and Regenerated Chitin in Colorimetry

Reaction mixture containing 5ml of dispersed soln. (0.1%) of substrate and 2 ml of enzyme soln. (0.5%) was incubated at pH 4.5 and 37°.

I : Colloidal chitin

II : Regenerated chitin

III : Purified chitin

Fig. 4. Degradation Curves of CM Chitin and Glycolchitin in Colorimetry

Reaction mixture containing 5ml of substrate soln. (0.1%) and 2ml of enzyme soln. (0.5%) was incubated at pH 4.5 and 37°.

I : CM chitin

II : Glycolchitin

Fig. 5. Degradation Curves of Chitosan and Acetylated Chitosan

Reaction mixture containing 5ml of substrate soln. (or dispersed soln.) (0.1%) and 2ml of enzyme soln. (0.5%) was incubated at pH 4.5 and 37°.

され易かった。水に可溶性のものでは、Fig. 4 に示すように CM Chitin 及び Glycolchitin はほぼ同程度の NAGA 生成量であった。また Chitosan は非常に分解されにくい、アセチル化した Chitosan はかなり分解された (Fig. 5)。なおいずれの基質の場合も 10 時間後の GA 生成量は 5% 以下であった。ただし Chitosan から NAGA の生成、アセチル化 Chitosan から GA の生成はみられなかった。

4. CM Chitin 及び Chitosan 水溶液の粘度測定の際の塩類及び pH の影響

CM Chitin 及び Chitosan 水溶液の粘度は塩類の存在及び溶液の pH により影響をうける^{9,17)}のでこれについて検討した。

まず CM Chitin 溶液について粘度の変化をしらべると塩化ナトリウムの添加によって粘度の減少がみられ、ある程度の影響をうけることが認められた (Fig. 6)。そのため一般に試料溶液中に存在する未知濃度の塩類による影響を少なくするために試料溶液中の塩類濃度を一定とし、Na に換算して 0.3 モルにした。この条件で次に pH の変化による粘度の影響を検討したところ著しい影響はみられなかった (Fig. 7)。

これらのことは Chitosan 溶液についても同様な結果であったので酵素反応系全体の塩類濃度を Na に換算して 0.3 モルとした。

Fig. 6. Effect of NaCl on the Viscosity of CM Chitin and Chitosan

Reaction temperature : 37°

I : Reaction mixture was composed of 5ml of CM Chitin soln. (0.3%) and 5ml of NaCl soln. of various concentrations (mole/L.).

II : Reaction mixture was composed of 5ml of Chitosan soln. (1%), (pH 4.5) and 5ml of NaCl soln. of various concentrations.

Fig. 7. Effect of pH on the Viscosity of CM Chitin and Chitosan

Reaction temperature : 37°

I : Reaction mixture was composed of 5 ml of CM Chitin soln. (0.3%) and 5 ml of McIlvaine buffer soln. of various pH.

II : Reaction mixture was composed of 3ml of Chitosan soln. (1%) of various pH and 3 ml of distilled water.

5. CM Chitin, Glycolchitin 及び Chitosan の酵素分解 (粘度法による検討)

Chitin 誘導体のうち水に可溶性である CM Chitin, Glycolchitin 及び Chitosan の酵素分解の経時変化を粘度測定により検討した結果を Fig. 8 に示した。CM Chitin 及び Glycolchitin は比色法で測定した結果とほぼ同じ結果を得たが、Chitosan の場合は異なる。すな

Fig. 8. Degradation Curves of CM Chitin, Glycolchitin and Chitosan in Viscosimetry
Reaction temperature : 37°

I : -x-x-x- CM Chitin

II : -○-○- Glycolchitin

III : -●-●- Chitosan

Reaction mixtures of I and II were composed of 5 ml of substrate soln. (1%) and 5 ml of enzyme soln. (0.5%) of pH 4.5.

Reaction mixture of III was composed of 3 ml of Chitosan soln. (1%) of pH 4.5, 3 ml of enzyme soln. (0.5%) and 3 ml of acetate buffer soln. of pH 4.5.

わち、比色法による結果では GA 生成量が少なくわずかしかな分解されないと考えられるのに反して、この粘度法による結果では CM Chitin や Glycolchitin と同程度の大きな粘度低下を示し、かなり分解されることが認められる。

考 察

著者らは今まで用いられてきた Chitinase の代表的な基質に対しカタツムリ酵素を作用させ、いずれも単量体にまで分解されることを知ったが、再製 Chitin, CM Chitin 及び Glycolchitin の場合は NAGA のほかに Morgan-Elson 反応陽性物質が検出され、これらは呈色反応及び Rf 値から N, N'-Diacetylchitobiose, NAGA の C.M. 化物及び glycol 化物と推察される。用いた基質のなかでコロイド性 Chitin は可溶性 Chitin 誘導体よりも分解されやすく、その調製法も Lunt ら¹¹⁾の方法は Barger ら¹²⁾の方法に比べれば塩酸による再沈澱を 2 回行なうが、非常に細かく分散したいわゆるコロイド状の Chitin が得られるので Chitinase の基質としては最適と考えられる。

粘度低下率から測定した CM Chitin 及び Glycolchitin の酵素分解の経時的变化は比色法で測定したそれよりも著しく大である。これは基質分子が Chitinase によって、一方では急激な不規則多様な裂開を受け、又一方では同時に単量体にまで分解を受けるためであろうと考えられる。一方 Chitosan の酵素分解では GA 生成量が非常に少ないのに反し、粘度の低下が非常に大きいという特徴がみられる。これについては、Chitosan は構成単量体の各アミノ基が大部分遊離アミノ基になったものであり、その影響のために酵素の作用を受け難いが、一部アセチルアミノ基が残存する部分には酵素が作用するので分子の裂開が起こり、粘度の低下がみられると考えられる。この遊離アミノ基の影響については Chitosan を緩和な条件でアセチル化したものは希酸に不溶であるにもかかわらず、かなり NAGA にまで分解されることからもうなずける。

総 括

1. カタツムリの胃液及び肝臓から調製したアセトン乾燥粉末は Chitinase として保存性があり、実用上も便利である。その最適 pH は 4.5~4.7, 最適温度は 55°附近であった。
2. このアセトン乾燥粉末によって精製 Chitin, コロイド性 Chitin, 再製 Chitin, アセチル化 Chitosan, CM Chitin, Glycolchitin のいずれも酵素分解を受け、それぞれ NAGA を検出確認した。これらのうちコロイド性 Chitin が最も分解され易かった。
3. Chitosan ではアセトン乾燥粉末よりもカタツムリの胃液及び肝臓抽出液を用いた方が酵素分解され易く、単量体である GA を検出確認することができた。
4. CM Chitin は、塩類による影響を考慮すると、Glycolchitin と同様に粘度低下による Chitinase 活性の測定に用いることができる。
5. CM Chitin, Glycolchitin では酵素分解による粘度の低下、NAGA の生成量が大きい。しかし、Chitosan の場合は粘度の低下は著しいが GA の生成量はわずかである。

終りに臨み種々有益なる御助言、御鞭撻などを賜った阪大教授川崎近太郎博士に深謝致します。

文 献

- 1) P. Karrer, A. Hofmann : *Helv. Chim. Acta*, **12**, 616 (1929).
- 2) A. Neuburger, R. V. P. Rivers : *Biochem. J.* **33**, 1580 (1939).
- 3) L. Zechmeister, G. Toth, E. Vajda : *Enzym-*

- ologia, **7**, 170 (1939).
- 4) P. H. Hackman : Australian J. Biol. Sci., **7**, 168 (1954).
- 5) F. L. Meyers, D. H. Northcote : Biochem. J. **69**, 54P (1958).
- 6) L. Zechmeister, W. Grassmann, G. Tóth, R. Bender : Ber. dtsch. chem. Ges., **65**, 1706 (1932).
- 7) 沖増哲, 大宝明 : 農化, **34**, 873 (1960).
- 8) A. Otakara : Agr. Biol. Chem., **25**, 50, 54, 494 (1961); **26**, 30 (1962).
- 9) M. V. Tracey : Biochem. J., **61**, 579 (1955).
- 10) 倉田軍一, 酒井立夫, 宮原竜郎, 伊藤誉志男 : 本誌 **11**, 46 (1965).
- 11) M. R. Lunt, P. W. Kent : Biochim. Biophys. Acta, **29**, 522 (1958).
- 12) 千手諒一, 沖増哲 : 農化, **23**, 432 (1950).
- 13) 沖増哲 : *Ibid.*, **32**, 303 (1958).
- 14) C. T. B. Thor, W. F. Henderson : Amer. Dystuff Repr., **29**, 461 (1929).
- 15) 泉邦彦 : 蛋白質核酸酸素, **5**, 678 (1960).
- 16) 同上 : *Ibid.*, **5**, 611 (1960).
- 17) E. Hultin : Acta Chim. Scand., **9**, 192 (1955).
- 18) L. R. Barger, D. N. Reynolds : Biochim. Biophys. Acta, **29**, 522 (1958).

ビタミン K₁ の螢光による定量法

堺 敬 一 (宮城県衛生研究所)

Fluorometric Determination of Vitamin K₁.

Keiichi Sakai (Miyagi Prefecture Institute of Health*1)

Vitamin K₁ was separated by thin-layer chromatography with silicagel (gips 5 %) using *n*-hexane-chloroform (20 : 10) as a solvent system.

The V. K₁ extracted with ethylacetate from the spot of the thin-layer were irradiated with ultra violet ray to be converted into fluorescent substances.

Thus 0.5 ~ 5 µg/ml of V. K₁ can be estimated quantitatively by measuring the strength of fluorescence.

(Received October 3, 1964)

ビタミン K 群は, K₁, K₂, K₃ などがあり, いずれも naphthoquinone 誘導体であり, 同様の生理作用を有するものとされている。

ビタミン K₁ は化学構造の側鎖として phytyl 基 (C₂₀) を持ち, 植物組織中ばかりでなく, 動物組織中にも含有されているものと考えられている。

ビタミン K₂^{1,2)} は, 細菌の菌体内に含有され, 側鎖として isoprene (C₅) が数個繋がった構造を持っている, isoprene の数は細菌の種類によって異なり, その炭素の数によって, ビタミン K₂-35, K₂-45, K₂-45 など知られている。

ビタミン K₃³⁾ は人工的に作られたもので, 強いビタミン K の作用を示す化合物で, メナジオンと呼ばれ 2-methyl-1,4-naphthoquinone である。

その他, ビタミン K₃ 類似のものに menadion sodium bisulfite, 2-methyl-1,4-naphthohydroquinone, 2-methyl-1,4-naphthohydroquinone diacetate, menadiol sodium diphosphate などがある。

ビタミン K₃ の定量^{3~9)} には, 2,4-dinitrophenylhydrazine を反応させたのち, アルカリを加え, amyl alcohol などの有機溶媒で緑色の反応生成物を抽出して, 比色定量する方法などが用いられている。

ビタミン K₂ の定量について, Bishop^{1~2)} らは, アルミナカラムを用いて分離したのち, 目的物を cyclohexane 溶液とし, 249 mμ で吸光度を測定している。

*1 宮城県仙台市覚性院丁16; Kakuseiin-cho, Sendai-shi, Miyagi-ken.