高速液体クロマトグラフィーによる乳、粉乳および 植物油脂中のビタミンKの定量法

佐藤孝義*, 八尋政利**, 下田幸三*
浅居良輝*, 浜本典男*

* 雪印乳業㈱分析センター

** 雪印乳業㈱技術研究所

A Method for the Determination of Vitamin K in Milk, Milk Powder and Vegetable Oil by High Performance Liquid Chromatography

Takayoshi SATO,* Masatoshi YAHIRO,** Kousou SHIMODA,*
Yoshiteru ASAI* and Michio HAMAMOTO*

*Central Analysis Institute, Snow Brand Milk Products Co., Ltd., Kawagoe, 350

**Technical Research Institute, Snow Brand Milk Products Co., Ltd., Kawagoe, 350

Nippon Eiyō Shokuryō Gakkaishi (*J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*) 38, 451~458 (1985)

Depending on the capacity factors and resolutions of vitamin K, YMC-PACK A-314 was selected from several kinds of commercially prepared ODS columns, and ethanol-H₂O (99:1) was found to be most suitable mobile phase for this column.

Vitamin K was extracted from liquid milk, whole milk powder and vegetable oil by using hexane-ethyl ether (1:1). Vitamin K was easily separated from fat by single-step silica gel column chromatography eluted with hexane-ethyl ether (97:3). Unsatisfactory extraction or separation of vitamin K was observed in the case of formulated milk powder for infants. Therefore, hydrolysis of fat by lipase is required before HPLC determination of formulated milk powder for infants.

Coefficients of variation were estimated as 9.2% for vitamin K₁ and 4.8% for vitamin K₂ in cow's raw milk, and recoveries were 97% for K₁ and 94% for K₂. Coefficients of variation for formulated milk powder for infants were estimated as 7.1% for vitamin K₁ and 11.6% for vitamin K₂, and recoveries were 95% both for K₁ and K₂.

The detection limit of vitamin K₁ or K₂ was calculated as 0.2 µg/l for liquid milk, 1 µg/kg for whole milk powder, 2 µg/kg for vegetable oil or 2.5 µg/kg for formulated milk powder for infants.

(Received March 12, 1985)

血液凝固因子であるビタミンK(以下 Kと略記)には、比較的多種類の類縁物質が存在するが、天然に存在するビタミンKとしては、ビタミンK₁(以下 K₁と略記)とビタミンK₂(以下 K₂と略記)のみが知られている¹⁾。

Kの定量法としては、バイオアッセイ法²⁾³⁾、吸光光度法⁴⁾、ポーログラフィー⁵⁾⁶⁾、カラムクロマトグラフィー⁷⁾、薄層クロマトグラフィー⁸⁾⁹⁾、ガスクロマトグラフィー¹⁰⁾¹¹⁾などによる方法が報告されている。しかしこれらの方法は感度が低く、多量の試料を必要とし、また操作が繁雑であるなどの難点を有している。近年、高速液体クロマトグラフィー(以下 HPLCと略記)による定

量法が報告^{12)~17)}され、精度が著しく向上した。しかし著者らは、乳児用調製粉乳(以下調粉と略記)などで、Kと妨害物質の分離がよくない例や、著しく低い定量値が得られる例を経験しており、いまひとつ信頼性に欠ける点があると考えていた。

そこで著者らは、分離能の優れているカラムの選択、クリーンアップの方法、ポストラベルの反応系などを検討し、比較的簡単でかつ分離効率が高いK₁、K₂の定量法を確立し、乳、粉乳、植物油脂中のK₁、K₂含量を測定したのでその結果を報告する。

Fig. 1. Procedures for extraction of vitamin K and pretreatment raw and powdered milk products and vegetable oils.

実験方法

1. 標準物質

和光純薬㈱の K₁, 日清化学㈱から分与された K₂ (Menaquinone-4 : MK-4) を使用した。純度は、日本薬局方にしたがって測定した。

内部標準物質として用いた α -docosanyl naphthoate (以下 α -DN と略記) は、山野ら¹⁸⁾の方法により合成した。

2. 試薬

クリーンアップ用シリカゲル (70~230 メッシュ) はメルク社のものを用い、110°C で4時間活性化処理して使用した。また脂肪分解用のリパーゼはシグマ社 No. L-3126 を、ポストラベル用の水素化ホウ素ナトリウムは和光純薬㈱のアミノ酸分析用試薬を用いた。

3. 装置

HPLC は日本分光㈱製 Twinkl を使用した。反応液送ポンプは協和精密㈱製 KHU-26, 蛍光検出器は日立製作所製 LC-10 型を用いた。

4. 分析対象試料

製乳工場に搬入された生牛乳の合乳 (以下生牛乳と略記), 市販の超高温瞬間殺菌した牛乳 (以下殺菌乳と略記), 高知市で採取した出産 15 日前後の人乳, 北海道地方で製造した各季節の全粉乳, 市販各社の調粉のほか、植物油脂としてヤシ油, コーン油, パーム油, 大豆油, 大豆水素添加油など試料として選んだ。

5. K₁, K₂ の定量法

液状乳, 全粉乳, 植物油脂類は Fig. 1 に, また調粉は Fig. 2 に示す手順によって定量した。

Samples 2 g

Add lipase (Sigma No. L-3126) 0.5 g
0.1 M Tris-HCl buffer (pH 7.7) 100 ml
 α -docosanyl naphthoate 1.25 μ g

Incubate (37°C, 1 hr)

Add ethanol 100 ml
10 N NaOH 5 ml
Extract with *n*-hexane 100 ml $\times$ 2

n-Hexane layer

Wash with H₂O
Dehydrate with Na₂SO₄
Evaporate to dryness
Add 2-propanol 0.25 ml

HPLC

Fig. 2. Procedure for extraction of vitamin K from formulated milk powder for infants.

HPLC による K₁, K₂ の測定は, α -DN とのピーク高比により行ない, 結果は試料 kg または l あたりの μ g で示した。なお K₂ の標準物質としては MK-4 を用いたが, 他の K₂ 同族体については, 保持時間を MK-4 と対比して検討した。

結果ならびに考察

1. 定量法の検討

1) カラムの選択, 移動相の検討 市販 7 種類の逆相分配カラムについて, K₁, K₂ の標準品ならびに α -DN の分離状態を比較した。

移動相として, エタノールのみとエタノール-水 (95 :

Table 1. Capacity factors and resolutions for vitamin K₁, K₂ and α -DN on some HPLC columns.*¹

Column	100% Ethanol* ²			95% Ethanol* ²		
	K ₁ K ₂ /K ₁	K ₂ K ₁ / α -DN	α -DN* ¹	K ₁ K ₂ /K ₁	K ₂ K ₁ / α -DN	α -DN* ¹
Capacity factor* ³						
YMC-PACK : A-314 (6×300)	1.42	0.88	2.22	5.04	2.67	12.70
Nucleosil : 5C ₁₈ (4.6×250)	0.89	0.59	1.35	3.10	1.78	5.60
Zorbax ODS (4.6×250)	1.27	0.75	2.30	4.50	2.33	10.30
LiChrosorb : RP-18 (4.6×250)	0.54	0.35	0.75	1.99	1.18	3.56
Unisil : 5C ₁₈ (4.6×250)	0.82	0.52	1.20	3.06	1.74	5.92
Unisil : 5C ₁₈ (6×250)	0.85	0.55	1.23	2.93	1.72	5.43
Shodex ODS (4.6×250)	0.65	0.42	0.89	2.30	1.27	3.77
Finsil ODS (4.6×250)	0.45	0.29	0.65	1.68	0.98	2.86
Resolution* ⁴						
YMC-PACK : A-314 (6×300)	4.2	4.9		12.4	19.4	
Nucleosil : 5C ₁₈ (4.6×250)	1.8	1.7		5.6	6.7	
Zorbax ODS (4.6×250)	3.4	3.6		10.5	15.8	
LiChrosorb : RP-18 (4.6×250)	1.3	2.3		4.9	4.5	
Unisil : 5C ₁₈ (4.6×250)	2.2	2.3		6.4	7.1	
Unisil : 5C ₁₈ (6×250)	3.6	3.3		8.4	9.3	
Shodex ODS (4.6×250)	1.6	1.2		4.8	4.3	
Finsil ODS (4.6×250)	1.0	1.0		3.1	3.1	

*¹ α -DN, α -Docosanyl naphthoate.*² Mobile phase.*³ $\left(\frac{t-t_0}{t_0}\right)$, where t_0 , dead time for column; t , retention time.*⁴ $2\left(\frac{t_2-t_1}{W_1+W_2}\right)$, where t_1 , t_2 , retention time; W_1 , W_2 , peak width at base line.

5) を使用した場合の capacity factor と分離度を Table 1 に示す。

用いたカラムでは YMC-PACK A-314 が capacity factor および分離度ともに最も優れており、ついで Zorbax ODS が良好であった。しかし、従来多く用いられていた Nucleosil 5C₁₈ は、必ずしも最良の分離能を示すものではないことがわかった。

次に YMC-PACK A-314 を用いて、移動相の条件を検討した。その結果カラムの溶媒特性と関連してエタノールに対する水の比率が高いほど、また流速が小さいほど、高い分離度が得られたが、K₁, K₂ の溶出時間は長くなった。

これらの結果から、カラムは YMC-PACK A-314 を、移動相はエタノール-水 (99 : 1)、流速は 0.8 ml/分を採用することとした。

2) シリカゲルカラムによるクリーンアップの条件
Manes ら⁷⁾はアルミナカラムによって、Haroon ら¹⁶⁾はシリカゲルカラムを用いて、油脂中の K を分離している。しかし Manes ら⁷⁾の方法では、アルミナの活性化状態が不安定なことに加えて、濃度勾配を有する石油エーテル-ベンゼン系の溶離液を用いるため、操作が複雑な難点を有している。また Haroon ら¹⁶⁾は、K₂ の分離については触れていない。そこで K と油脂を分離するのに、取扱いが比較的容易なシリカゲルカラムによるクリーンアップ条件について検討した。

20 g のシリカゲルに、ヤシ油 0.5 g と K₁, K₂ の標準品をそれぞれ 10 μ g を吸着させ、溶離液としてはヘキサン-エチルエーテルの比を変えて 1.5 ml/分 の流速で溶出した。50 ml ごとの溶離液画分について、K₁, K₂ は HPLC で、油脂は重量法によって測定し、溶出状態を検

Fig. 3. Effect of composition and volume of eluent on elution patterns of a mixture of vitamin K_1 and K_2 , and coconut oil on silica gel column.

○ Vitamin K_1 ; ● vitamin K_2 ; △ coconut oil.
 n -hexane-ethyl ether: A, 98 : 2; B, 97 : 3; C, 96 : 4.

討した結果を Fig. 3 に示す。

ヘキサン-エチルエーテル (96 : 4) では、溶離液 300 ml で K_1 , K_2 が完全に溶出するが、一方油脂も 200 ml 以後の画分に溶出されており、分離は不完全であった。ヘキサン-エチルエーテル (97 : 3) では、溶離液 300 ml で K_1 , K_2 が完全に溶出されるが、油脂はこの段階では溶出されず、550 ml 以降に溶出してくるので、完全な分離が可能であった。また (98 : 2) では、 K_1 , K_2 と油脂の分離はよいが、溶離液量が多いのが欠点とみなされた。さらにシリカゲル 20 g に対する油脂の負荷量を検討したところ、0.8 g までは十分に分離が可能であった。

なお Manes ら⁷⁾の方法に比べ本法では、1回の溶出操作で油脂とKが完全に分離され、操作が著しく簡略化された。

これらの結果から、ヘキサン-エチルエーテル (97 : 3) の溶離液を用いて、油脂量が 0.8 g 以下になるように試料量を調製することとした。

3) 調粉からの K_1 , K_2 の抽出方法 調粉を除く試料は、Fig. 1 に示した方法、すなわち試料中のKを脂質とともにヘキサン-エチルエーテル (1 : 1) で抽出し、前述のシリカゲルカラムで処理することによって、 K_1 , K_2 の定量が可能であった。 K_1 , K_2 の標準品ならびに生牛乳で得られた HPLC のクロマトグラムを Fig. 4 に示す。

しかし調粉は、ヘキサン-エチルエーテル系溶媒では脂質の抽出が十分行なわれないため、存在するK量の30%程度しか回収されなかった。

そこで脂質の抽出効果のよいクロロホルムとメタノールを用いる Folch らの方法¹⁹⁾で油分を抽出して、シリカゲルでクリーンアップする方法と、試料を直接リバー

Fig. 4. HPLC patterns of a mixture of standard vitamin K and cow's raw milk extract 1, V. K_2 ; 2, V. K_1 ; 3, α -DN.

Column: YMC-PACK A-314 (6×300 mm), column temp.: room temp., mobile phase: C_2H_5OH - H_2O (99 : 1), flow rate: 0.8 ml/min, reagent: 0.1% $NaBH_4$, ethanol sol. (0.5 ml/min), reaction coil: 0.5×2,000 mm, detector: FP (Ex: 320 nm, Em: 430 nm), injection volume: 20 μ l.

ゼ処理して抽出する Barnett ら¹⁷⁾の方法を検討した。

この両法は、 K_1 , K_2 のピーク高では差がなかったが、Folch らの方法¹⁹⁾による場合、妨害ピークが内部標準物質のピークと重なっていた。この場合、絶対検量線法で測定するのであれば、この方法の適用も可能と思われるが、内部標準物質として α -DN を用いるのであれば不適当と考えられた。

一方、リバーゼ処理によるKの抽出については、リバーゼ処理の条件とリバーゼ処理後の抽出溶媒の適性について検討した。

調粉 2 g を 0.1 M トリス緩衝液 (pH 7.7) 100 ml に溶解しリバーゼ処理を行なったところ、0.1 g (5400 単位) 37°C で 5 時間処理によって、調粉中に存在する約 0.5 g の脂質はほとんど分解し、Kはほぼ完全に抽出されるのを認めた。この場合、微量の未分解油脂が残存したが、未分解残渣は定量限界にも関連し、できるだけ少ないほうが望ましいので、また調粉では種類の油脂が配合される可能性なども考慮して、実際の分析は 0.5 g 添加-1 時間処理によることとした。

リバーゼ処理後の抽出溶媒として、ヘキサン、ペンタン、石油エーテル、エチルエーテルの適性を比較検討したが、ヘキサン以外は妨害ピークが認められ、適当ではなかった。

4) ポストラベルによる反応系の検討 K_1 , K_2 の測

定は、水素化ホウ素ナトリウムとの反応によって生ずる蛍光を測定する阿部ら¹²⁾の方法を適用したが、多数の試料を連続的に測定する場合、時間経過とともに、定量値が減少するのを認めた。

そこで 100 ng の K_1 標準品を 25 分ごとにカラムに注入し、調製直後の水素化ホウ素ナトリウム液を用いて、 α -DN ピーク高に対する K_1 ピーク高の経時的な変化を調べた。結果を Fig.5 に示す。

α -DN のピーク高の変化は認められなかったが、 K_1 ピークは初期のうちに急速に減少し、50 分後には 90% 程度となり、以後の減少の割合は比較的緩やかであるが、500 分後には初期の 80% 程度になるのを認めた。 K_2 についてもほぼ同様の傾向がみられた。

この原因は水素化ホウ素ナトリウム液の反応性の変化によると考えられ、著者らは水素化ホウ素ナトリウム液を使用のつど調製し、調製後 2 時間以後に使うようにした。また長時間の連続測定を行なう場合には、2 時間ごとに K 標準品を測定し、誤差を少なくした。

2. 定量精度の検討

1) K_1 , K_2 ピークの確認 生牛乳 2 l を Fig.1 によって処理し、 K_1 , K_2 に相当するピーク画分を採取し濃縮して、質量分析計（日立製作所製-80 型）ならびに三次元クロマトグラフ（日本分光製 Maluti 320 型）で確認した。

直接導入法によって得られたマスペクトルを Fig.6 に、三次元クロマトグラフによる UV 吸収スペクトルを Fig.7 に示す。

マスペクトルで、 K_1 , K_2 の標準品と K_1 , K_2 画分を比較すると、それぞれ分子イオンピーク 450, 444 m/e は一致し、さらに主要なフラグメントイオンも一致した。三次元クロマトグラフにおいても K_1 , K_2 画分は標準品の UV 吸収スペクトルと一致することから、これらの画分は K_1 , K_2 であることを確認した。なお三次元クロマトグラフでは、 K_1 のほかにゴーストピークの存

Fig.5. Decrease in peak height of vitamin K_1 during continuous operation.

Reagent for vitamin K_1 : see in Fig.4.

Fig.6. Direct inlet mass spectra of vitamin K_1 and K_2 fractions of cow's raw milk on HPLC.

Fig.7. Three dimensional UV spectra of vitamin K₁ and K₂ fractions of cow's raw milk on HPLC.

在が認められた。このゴーストピークは、K₁との保持時間が異なり、しかもポストラベル反応時に蛍光を認めなかったことから、定量にはさしつかえないと判断した。

2) 繰返し測定、添加回収試験 Fig.1 については生牛乳を、Fig. 2 は調粉を対象試料として、それぞれ10回の繰返し測定を行なった。

添加回収試験は、K₁、K₂のそれぞれ0.1 µgを生牛乳10 mlに、調粉ではそれぞれ0.1 µgを2 gの試料に添加して検討した。結果をTable 2に示す。

生牛乳の場合には、K₁については1.8~2.5 µg/l(平均2.06 µg/l)の測定値が得られ、標準偏差は0.19、変動係数9.2%であり、変動係数はやや大きい、平均回収率は97%と良好な結果が得られた。K₂の回収率は94%で、K₁と比較するとやや低い、変動係数は4.8%と良好な結果が得られた。調粉の場合は、K₁では変動

係数が7.1%、回収率が95%であり、K₂では変動係数が11.6%、回収率が95%で、ほぼ満足すべき結果が得られた。

3) 定量限界 K₁、K₂の定量限界は、シリカゲル法ではシリカゲル量に対する油脂負荷量、すなわち採取できる試料が定まることから、またリパーゼ法による場合には、油脂の未分解残渣によって操作上の制約をうけた。

K₁、K₂の検量線は0.4~500 ngの範囲でともに直線性を有し、Fig.1の手順による場合、定量限界は液状乳で0.2 µg/l、全粉乳で1 µg/kg、植物油脂類で2 µg/kg、Fig.2のリパーゼ法による調粉の場合には2.5 µg/kgであった。

3. 乳、粉乳、植物油脂中のK₁、K₂の測定

生牛乳10、殺菌乳16、人乳18、全粉乳12ならびに植物油脂68検体はFig.1の手順により、調粉5検体はFig.2によって、K₁、K₂は支障なく測定可能であっ

Table 2. Repeatability and recovery of vitamin K₁ and K₂.

Run	Silica gel column method* ¹		Lipase method* ²	
	Vitamin K ₁ ($\mu\text{g/l}$)	Vitamin K ₂ ($\mu\text{g/l}$)	Vitamin K ₁ ($\mu\text{g/kg}$)	Vitamin K ₂ ($\mu\text{g/kg}$)
1	2.0	8.3	110	28
2	2.1	8.7	102	27
3	2.0	8.0	105	25
4	2.1	8.9	111	26
5	2.2	8.1	111	22
6	2.5	8.5	107	23
7	2.0	8.8	107	25
8	1.8	8.7	93	21
9	1.9	9.4	92	21
10	2.0	8.8	96	29
Mean value	2.06	8.62	103.4	24.7
Standard deviation	0.19	0.41	7.32	2.87
Coefficient of variation (%)	9.2	4.8	7.1	11.6
Recovery* ³ (%) ($n=10$)	97	94	95	95

*¹ Cow's raw milk.*² Formulated milk powder for infants.*³ Added 0.1 μg vitamin K₁ and K₂ to 10 ml cow's raw milk or 2 g formulated milk powder for infants.Table 3. Vitamin K₁ and K₂ contents of milk, milk powder and vegetable oils.

	Number of samples	Vitamin K ₁		Vitamin K ₂	
		Range	Mean	Range	Mean
Cow's raw milk ($\mu\text{g/l}$)	10	1.7-2.7	2.2	5.1-9.3	7.0
Ultra-high-temperature pasteurised milk	16	1.3-10.0	2.5	2.8-11.6	8.9
Breast milk	18	nd-3.4	1.4	nd-4.6*	0.94*
Whole milk powder ($\mu\text{g/kg}$)	12	6-22	15	29-48	40
Coconut oil ($\mu\text{g/kg}$)	15	nd	—	nd	—
Corn oil	15	nd-110	56	nd	—
Palm oil	15	24-89	55	nd	—
Soy bean oil	10	720-2,000	1,690	nd	—
Hydrogenated soy bean oil	13	54-1,030	—	nd	—
Formulated milk powder for infants ($\mu\text{g/kg}$)	5	81-189	—	20-28	—

* Except 2 samples, determined as 92, 310 $\mu\text{g/l}$.

nd, not detected.

た。測定結果を Table 3 に示す。

生牛乳、殺菌乳ならびに全粉乳の K₁, K₂ 含量については、K₁ よりも K₂ がかなり多く、2.5~3.5 倍程度存在した。人乳 18 検体中の 2 検体は K₂ が 92, 310 $\mu\text{g/l}$ と著しく高い結果が得られたため異常値として処理した。異常値の発生原因は不明であった。残り 16 検体は K₁, K₂ が検出されないものがそれぞれ 1 検体ずつあ

たが、K₁, K₂ の平均値では牛乳とは逆に K₁ のほうがやや多い結果を得た。植物油脂類からはいずれも K₂ は検出されずヤン油には、K₁ も検出されなかった。大豆油では著しく K₁ が多かったが、大豆水素添加油のヨウ素価と K₁ 含量の関連は、参考までに Fig. 8 に示すようにヨウ素価が低くなると K₁ 含量が少なくなる傾向があり、水素添加処理によって K₁ が消失したものと考えら

Fig. 8. Relationship of iodine value and vitamin K₁ content of hydrogenated soy bean oil.

れた。調粉の K₁ は 81~189 μg/kg, K₂ は 20~28 μg/kg の範囲の測定値が得られた。

生牛乳, 殺菌乳, 全粉乳および調粉では K₂ 群として MK-4 のみが検出され, 他の K₂ 同族体のピークは認められなかった。しかし人乳では, 保持時間の関係から MK-6, MK-7 と推定されるピークが認められたが, 18 検体中 4 検体と検出例は少なかった。

要 約

HPLC による乳, 粉乳, および植物油中の K₁, K₂ の定量法を検討し, 以下の結果を得た。

1) HPLC のカラムは, 市販 7 種類の ODS カラムを比較し, K₁, K₂ の分離能が最も優れていた YMC-PACK A-314 を選択した。移動相は, エタノール-水 (99:1) が適当であった。

2) 調粉以外の試料では, HPLC の前処理として, ヘキサン-エチルエーテル (1:1) で抽出したのちに, シリカゲルカラムに K を吸着し, ヘキサン-エチルエーテル (97:3) で溶出することによって, 油脂と K を分離できたが, この際の油脂負荷量についても検討した。この結果, 1 回の吸着-溶脱で, クリーンアップ操作を完結できた。

3) しかし調粉では, リバーゼ処理によって油脂を分解したのちに, ヘキサンで抽出する操作が必要であった。

4) ポストラベルに用いた水素化ホウ素ナトリウムは, 試薬調製後の時間経過とともに K の測定値が低下するので, 長時間の連続測定を行なう場合には, 誤差補正が必要であった。

5) 生牛乳のシリカゲル処理, 調粉のリバーゼ処理によって繰返し測定, 添加回収試験を行ない, いずれも満

足すべき結果が得られた。

定量限界は, 液状乳で 0.2 μg/l, 全粉乳で 1 μg/kg, 植物油脂類で 2 μg/kg, 調粉で 2.5 μg/kg であった。

6) 乳, 粉乳および植物油脂の K₁, K₂ は支障なく測定が可能であった。

生牛乳, 殺菌乳ならびに全粉乳では K₁ よりも K₂ がかなり多く, 人乳では K₂ よりも K₁ のほうがやや多い結果を得た。植物油脂からはいずれも K₂ は検出されなかった。K₁ は, ヤシ油では検出されず大豆油に著しく多く含まれていた。

本報の要旨は, 第 38 回日本栄養・食糧学会総会 (昭和 59 年, 京都) で発表した。

K₂ 標準品を分与いただいた日清化学㈱に深謝いたします。

文 献

- 1) Parrish, D.B. : *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **13**, 337 (1980)
- 2) Dam, H., Glavind, J., Larson, E.H. and Plum, P. : *Acta Med. Scand.*, **112**, 210 (1942)
- 3) Goldm, J.I. and Amadio, P. : *Pediatrics*, **44**, 745 (1969)
- 4) Dumphy, P.J., Phillips, P.G. and Brodie, A.F. : *J. Lipid Res.*, **12**, 442 (1971)
- 5) Takamura, K., Sakamoto, M. and Hayakawa, Y. : *Anal. Chim. Acta*, **106**, 261 (1979)
- 6) Hart, J.P. and Catterall, A. : *Anal. Chem., Symp.*, Ser. 2, 145 (1980)
- 7) Manes, J.D., Fluckiger, H.B. and Schneider, D.L. : *J. Agric. Food Chem.*, **20**, 1130 (1972)
- 8) Rittich, B., Simek, M. and Coupek, J. : *J. Chromatogr.*, **133**, 345 (1977)
- 9) Lichtenthaler, H.K., Boermer, K. and Liljeborg, C. : *J. Chromatogr.*, **242**, 196 (1982)
- 10) 高松富夫, 松浦恒雄, 木下健策, 堤 淳三, 片山幸一, 大和干靱, 堀江 透, 藤田 孟, 宮尾興平: *応用薬理*, **5**, 525 (1971)
- 11) 中田泰造, 三田泰弘, 河野重治: *薬学雑誌*, **96**, 53 (1976)
- 12) 阿部皓一, 広島 修, 石橋恭子, 大前雅彦, 阿部 靖, 勝井五一郎: *薬学雑誌*, **99**, 192 (1979)
- 13) 宮地良和: *日児誌*, **86**, 1320 (1982)
- 14) 米久保明得, 一丸 泉, 山本良郎, 土屋文安: *医学のあゆみ*, **126**, 1037 (1983)
- 15) Haroon, Y., Shearer, M.J. and Barkan, P. : *J. Chromatogr.*, **206**, 333 (1981)
- 16) Haroon, Y., Shearer, M.J., Rahim, S., Gunn, W.G., McEnern, G. and Barkhan, P. : *J. Nutr.*, **112**, 1105 (1981)
- 17) Barnett, S.A., Frick, L.W. and Baine, H.M. : *Anal. Chem.*, **52**, 610 (1980)
- 18) 山野喜昭, 池谷 理, 安瀬真知子, 大前雅彦, 阿部 靖: *薬学雑誌*, **98**, 774 (1978)
- 19) Folch, J., Lees, M. and Sloame-Stanley, G.H. : *J. Biol. Chem.*, **226**, 497 (1957)

(昭和 60 年 3 月 12 日受理)