ノート

順相 HPLC による単糖とオリゴ糖の同時分析法

(平成 10 年 6 月 5 日受理)

垣田 浩孝^{*1} 北村 孝雄^{*1}
小宮 克夫^{*2} 加藤 芳男^{*2}Simultaneous Determination of Monosaccharides and Oligosaccharides
by Normal-phase HPLCHirotaka KAKITA^{*1}, Takao KITAMURA^{*1}, Katsuo KOMIYA^{*2} and Yoshio KATO^{*2}(*¹Shikoku National Industrial Research Institute, AIST: 2217-14, Hayashi-cho, Takamatsu,
Kagawa 761-0395, Japan; *²Separation Center, Tosoh Corporation: 4560, Kaisei-cho,
Shin-nanyo, Yamaguchi 746-8501, Japan)

A rapid and highly sensitive method has been developed for the simultaneous determination of reducing monosaccharides and oligosaccharides by normal-phase HPLC with fluorescence detection. The technique of linear gradient elution on a TSKgel Amide-80 column was more suitable for saccharides separation. The post-column reaction was optimized for fluorometric detection. Under optimum conditions, the detection limits were 0.3~15 ng for the reducing saccharides investigated. The calibration curves were approximately linear in the range of 2,000~12.5 pmol for glucose, cellobiose, and cellopentose. The coefficient of variation for glucose was less than 1%. Application of the method for food analysis was successful.

(Received June 5, 1998)

Key words: オリゴ糖 oligosaccharide; 単糖 monosaccharide; 同時分析 simultaneous determination; 高速液体クロマトグラフィー HPLC; 還元糖 reducing saccharide; ポストカラム蛍光誘導体化 post-column fluorescence derivatization

緒 言

近年、糖アルコールやオリゴ糖などの種々の機能性糖質が開発され¹⁾、これらを含んだ食品等が多く製造されるようになった。これに伴い、平成 8 年 5 月、栄養表示基準が制定され、機能性糖質を栄養成分として食品に表示できるようになった。同基準によると、当該栄養成分含有量の付記が必要となり^{2), 3)}、栄養成分分析は製造者などが行い、公的機関が必要に応じ収去検査などすることとなっている⁴⁾。

糖質の HPLC^{5)~7)} の中で順相 HPLC は単糖間の分離能が高く^{8), 9)}、オリゴ糖の分析時間が短いため、単糖とオリゴ糖の分析に適している。しかし、順相 HPLC で

の単糖及び二糖のオリゴ糖分析用移動相と三糖以上のオリゴ糖の分析用移動相は組成が異なるため³⁾、単糖からオリゴ糖までの分析には HPLC 分析に 2 回分の時間を費やさねばならないのが現状である。単糖とオリゴ糖を同時に分析できる方法が確立できれば、糖質含有製品の品質管理や公的検査の効率を現状より更に向上させることが可能と考えられる。また糖質の検出において、一般に示差屈折計が用いられているが、感度が低いこと、有機酸など夾雑物と糖質を区別しにくいこと、均一組成の移動相しか使用できないことなど欠点がある。糖質の選択的高感度検出には、カラムの前あるいは後ろで、糖質を選択的に蛍光付与する工程^{6), 7), 10)}を組み込んだ分析方法が有望である。そこで本研究では食品中の単糖からオリゴ糖までの還元糖の同時分析方法の開発を目的として、順相 HPLC とポストカラム蛍光誘導体化法を組み合わせた方法を検討した。また、4 種類の順相 HPLC

*¹ 工業技術院四国工業技術研究所: 〒761-0395 香川県高松市林町 2217-14

*² 東ソー(株)セパレーションセンター: 〒746-8501 山口県新南陽市開成町 4560

Fig. 1. Instrument set-up for post-column detection

Abbreviations; S1: solvent 1; S2: solvent 2; R1: reagent 1; R2: reagent 2; SP1: system pump 1; SP2: system pump 2; RP1: reagent pump 1; RP2: reagent pump 2; M: mixer; I: injector; CO: column oven; C: column; R: reactor; RC: reactor coil; CL: cooler; CC: cooling coil; F: fluorescence detector; RE: recorder

充てん剤について耐久性, ピーク形状の評価を行い, 最適な充てん剤を選択した。

実験方法

1. 試料及び試薬

試料: 豆乳飲料, オリゴ糖含有飲料は市販品を用いた。各種オリゴ糖製品は, 三井製糖(株)より供与された。

試薬: *N*-アセチルキトオリゴ糖, ラミナリオリゴ糖, セロオリゴ糖, マルトオリゴ糖, イソマルトオリゴ糖は生化学工業(株)製, 蒸留水, アセトニトリルは和光純薬工業(株)製の HPLC 用を, ベンズアミジン塩酸塩一水和物は, ナカライテスク(株)製特級を, その他は, すべて和光純薬工業(株)製特級を使用した。

2. 装置

2.1 示差屈折率検出システム (システム 1)

東ソー(株)製 CCPM-II 型送液ポンプ, 同 CO-8020 型カラム恒温槽, 同 RI-8022 型示差屈折計, 同 SC-8020 型データ処理装置を組み合わせ充てん剤の耐久性評価に使用した。

2.2 ポストカラム蛍光誘導体化システム(システム 2)

東ソー(株)製 CCPM-II 型送液ポンプ 2 台, 同 MX-8010 型ミキサー, 同 CO-8020 型カラム恒温槽, 同 RE-8020 型反応槽, 同 SC-8020 型データ処理装置, (株)島津製作所製 RF-550 蛍光検出器及びアドバンテック(株)製 LCH-110 型低温恒温水槽を Fig. 1 のように接続して使用した。

3. HPLC 測定条件

3.1 順相 HPLC 充てん剤の評価

TSKgel Amide-80 (東ソー(株)製 4.6 mm i.d.×25 cm), TSKgel NH₂-60 (同), YMC-Pack PA-03 ((株)ワイエムシイ製 4.6 mm i.d.×25 cm), Lichrosorb-NH₂ (ジーエルサイエンス(株)製 4.6 mm i.d.×25 cm) の 4 種類の順相 HPLC 充てん剤について耐久性とピーク形状を評価した。

- 1) 移動相: 水-アセトニトリル混液 (25:75)
- 2) 流速: 1 mL/min
- 3) 耐久性試験試料: トレハロース (1 mg/mL) 20 μ L
- 4) ピーク形状試験試料: ①グルコース (0.05 mg/mL) 20 μ L ②マンノース (0.05 mg/mL) 20 μ L
- 5) カラム温度: 25°C (TSKgel Amide-80 は 80°C)

3.2 溶離条件の検討

- 1) 移動相: ①水-アセトニトリル混液 (40:60), ②水-アセトニトリル混液 (20:80), ③水-アセトニトリル混液 (20:80) から水-アセトニトリル混液 (40:60) へ 37.5 分間で直線的に組成変化
- 2) 流速: 0.4 mL/min
- 3) 試料: リキソース, フルクトース, グルコース, マルトース, マルトトリオース, マルトテトラオース, マルトペンタオース, マルトヘキサオース, マルトヘプタオース (各 1.22 μ g/mL) 10 μ L
- 4) カラム温度: 80°C
- 5) 使用充てん剤: TSKgel Amide-80 (東ソー(株)製 4.6 mm i.d.×25 cm)

3.3 ポストカラム蛍光誘導体化反応条件の検討

- 1) 移動相: 水-アセトニトリル混液 (20:80) から水-アセトニトリル混液 (40:60) へ 37.5 分間で直線的に組成変化 (流速; 0.4 mL/min)
- 2) 反応液 1: 1 mol/L 水酸化カリウム溶液 (流速; 0.3 mL/min)
- 3) 反応液 2: ベンズアミジン塩酸塩を水-アセトニトリル混液に溶解した溶液 (流速; 0.3 mL/min)
 - 3-1) ベンズアミジン濃度: 50, 100, 150, 200 mmol/L
 - 3-2) アセトニトリル濃度: 20, 40, 60, 80%
- 4) 反応温度: 80°C, 85°C, 90°C, 95°C, 100°C, 105°C, 110°C
- 5) 反応時間: 0.5 分, 1.0 分, 1.25 分, 1.5 分, 2.0 分
- 6) 冷却温度 (時間): 10°C (0.1 分)
- 7) 試料: グルコース, セロトリオース, セロペンタオース (各 10 μ mol/L) 10 μ L
- 8) カラム温度: 80°C

Fig. 2. Chromatograms of reducing saccharides (20 μ L, each 1.22 μ g/mL) on TSKgel Amide-80 with various elution programmes
 Elution programmes: (A) isocratic elution with water-acetonitrile (40:60); (B) isocratic elution with water-acetonitrile (20:80); (C) linear gradient from water-acetonitrile (20:80) to water-acetonitrile (40:60) for 37.5 min. Flow-rate: 0.4 mL/min. Reducing saccharides: (1) lyxose; (2) fructose; (3) glucose; (4) maltose; (5) maltotriose; (6) maltotetraose; (7) maltopentaose; (8) maltohexaose; (9) maltoheptaose

9) 検出条件: 励起波長 288 nm, 測定波長 470 nm

10) 使用充填剤: TSKgel Amide-80 (東ソー(株) 製 4.6 mm i.d.×25 cm)

4. 試験溶液の調製法

糖質標準溶液は、移動相溶媒で 0.2 mmol/L~1.25 μ mol/L となるように溶解し、検量線用標準溶液とした。市販飲料は試料前処理用カートリッジフィルター (0.45 μ m) でろ過した液を試料原液とし、水-アセトニトリル混液 (20:80) で希釈後、再度ろ過し試験溶液とした。オリゴ糖製品についてはオリゴ糖製品 100 mg を蒸留水 100 mL に溶解して試料原液とし、試料原液を水-アセトニトリル混液 (20:80) で 91 倍希釈後、等量体積の 20 μ mol/L のリボース溶液 [水-アセトニトリル混液 (20:80) に溶解した溶液] と混合し、試料前処理用カートリッジフィルター (0.45 μ m) でろ過して試験溶液とした。カラムに試験溶液 10 μ L を注入した。

5. 容量比の算出方法¹¹⁾

トレハロースの容量比 k' は (1) 式から算出した。To はカラムに保持されない化合物 (この場合は蒸留水を用

いた) がカラムの一端から他の端まで移動する時間 (溶出時間) を示し、Tr はトレハロースの保持時間を示す。

$$k' = (Tr - To) / To \quad (1)$$

6. ピーク非対称性ファクターの算出方法¹²⁾

ピークの非対称性は (2) 式によって算出されるピーク非対称性ファクター As によって測定した。a はピーク 10% 高さでのピーク前半 (開始点から頂点) の幅を、b はピーク 10% 高さでのピーク後半 (頂点から終了点) の幅を示す。

$$As = b/a \quad (2)$$

結果及び考察

1. 順相 HPLC 充填剤の評価

168 時間連続送液後のトレハロースの k' 値は連続送液前の k' 値の TSKgel NH₂-60 で 69.2%, YMC PA-03 で 72.8%, TSKgel Amide-80 で 97.0%, Lichrosorb-NH₂ で 85.9% であった。すでに報告されていることであるが³⁾, 連続送液によりアミノ基結合型シリカ充填剤の k' 値は大きく低下した。対称性の劣ったピークは

Fig. 3. Effects of reaction temperature (A), reaction time (B), the concentration of benzamidine (C), and the percentage of acetonitrile (D) on post-column fluorescence reaction
Reducing saccharides (100 pmol) were glucose (○), cellotriose (△), and cellopentaose (■)

不正確の原因となるため、手法開発用の HPLC 充てん剤としては As 値が 1.3 未満のものが推奨されている¹²⁾。グルコースの As 値は 4 種類の HPLC 充てん剤とも 1.0 以上 1.3 未満で許容範囲に入っていたが、マンノースの As 値は TSKgel NH₂-60 で 35.4, YMC PA-03 で 6.5, TSKgel Amide-80 で 1.2, Lichrosorb-NH₂ で 2.9 であった。マンノース添加時に 3 種類のアミノ基結合型シリカ充てん剤の As 値が増大したのは、マンノースのアルデヒド基と充てん剤のアミノ基がシッフ塩基を形成し、マンノースが充てん剤に吸着するためと考えられる。これに対し、TSKgel Amide-80 でテーリングが起こらないのはカルバモイル基を結合した充てん剤であるためと考えられる。充てん剤に吸着した糖質の量は、充てん剤への糖質添加量が微量 (1 µg 以下) になるほど無視できなくなるので、微量分析には対称性の良いピークが得られる充てん剤を選択しなければならない。

評価した 4 種類の順相 HPLC 充てん剤はすべて単糖分離能の高い充てん剤であったが、本報告では高耐久性で良好なピーク形状が得られる TSKgel Amide-80 を用いた。

2. 溶離条件の検討

単糖とオリゴ糖混合試料の溶離条件を検討した。アイソクラティック溶離法と直線グラジエント溶離法での単糖とオリゴ糖混合試料のクロマトグラムを Fig. 2 に示す。

アイソクラティック溶離法でオリゴ糖を短時間に分析する条件ではリキソースとフルクトースのピークが重な

り (Fig. 2A), リキソース, フルクトース, グルコース間の分離を保つ溶離条件では分析時間 150 分でマルトテトラオースまでしか溶離できなかった (Fig. 2B)。一方, グラジエント溶離法では単糖間の分離を保ったままで分析時間 60 分以内にマルトヘプタオースまでの分析が可能であった (Fig. 2C)。したがって, 糖質混合試料中の単糖とオリゴ糖の同時分析用の溶離条件として直線グラジエント溶離法が適していると考えられる。以下の単糖とオリゴ糖の同時分析の検討にはこの溶離法を採用した。

3. ポストカラム蛍光誘導体化反応条件の検討

ポストカラム反応によって得られる還元糖蛍光誘導体の蛍光強度 (ピーク高さ) に対する反応温度, 反応時間, ベンズアミジン濃度, ベンズアミジン溶液中のアセトニトリル濃度の影響を Fig. 3 に示す。

最大蛍光強度が得られる反応温度はグルコースで 85°C, セロトリオースとセロペンタオースで 95°C と還元糖によって異なっていた。反応時間 0.5~1.25 分までは反応時間に比例して蛍光強度が増大したが, 反応時間 1.5 分以降は減少に転じた。蛍光強度の減少は蛍光誘導体の分解と考えられる。したがって, 最適反応時間は 1~1.5 分と判定した。最大蛍光強度の得られるベンズアミジン濃度はグルコース, セロトリオースで 100 mmol/L, セロペンタオースで 150 mmol/L であった。ベンズアミジン溶液中のアセトニトリルは蛍光強度を上昇させたが, アセトニトリル濃度 60% 以上ではノイズが大きくなった。以上の結果から, 反応温度 95°C, 反応時間 1 分, 反応試薬 100 mmol/L ベンズアミジン

Table 1. Retention Times and Detection Limits of Reducing Saccharides

Reducing saccharides	Retention time (min)	Detection limit* (ng)
Ribose	13.72	0.36
Lyxose	15.20	0.37
Xylose	15.44	0.39
Arabinose	15.56	0.49
Fructose	16.80	0.28
<i>N</i> -Acetyl-glucosamine	16.90	1.5
Mannose	18.24	0.29
Galactose	19.04	0.83
Glucose	19.25	0.35
Di- <i>N</i> -acetyl-chitobiose	22.91	3.7
Tri- <i>N</i> -acetyl-chitotriose	28.98	5.8
Tetra- <i>N</i> -acetyl-chitotetraose	34.28	8.4
Penta- <i>N</i> -acetyl-chitopentaose	38.68	11
Hexa- <i>N</i> -acetyl-chitohexaose	42.28	15
Laminaribiose	25.45	0.84
Laminaritriose	31.75	1.4
Laminaritetraose	37.36	1.7
Laminaripentaose	42.08	1.9
Laminarihexaose	45.91	2.4
Laminariheptaose	49.15	3.3
Cellobiose	26.94	0.71
Cellotriose	35.00	1.0
Cellotetraose	41.97	1.6
Cellopentaose	47.64	1.9
Cellohexaose	51.91	2.5
Maltose	27.26	0.76
Maltotriose	35.26	1.1
Maltotetraose	42.11	1.5
Maltopentaose	47.64	2.1
Maltohexaose	51.91	2.7
Maltoheptaose	56.28	4.9
Isomaltose	29.63	0.74
Isomaltotriose	39.08	1.1
Isomaltotetraose	46.48	1.5
Isomaltopentaose	52.45	2.4
Isomaltohexaose	58.45	3.2

* Defined as the amount in a 10 μ L injection volume to give a signal-to-noise ratio of 3. HPLC conditions are as follows: Column; TSKgel Amide-80 (4.6 mm i.d. $\times$ 25 cm). Column temp.; 80°C. Elution programme; linear gradient from water-acetonitrile (20:80) to water-acetonitrile (40:60) for 37.5 min [flow-rate; 0.4 mL/min]. Reagent 1; 1 mol/L potassium hydroxide [flow-rate; 0.3 mL/min]. Reagent 2; 100 mmol/L benzamidine hydrochloride in water-acetonitrile (60:40) [flow-rate; 0.3 mL/min]. Reaction temp.; 95°C. Reaction time; 1.0 min. Cooling temp.; 10°C. Cooling time; 0.1 min.

[水-アセトニトリル混液 (60:40) に溶解した液] の組み合わせにより最大感度が得られることが明らかになった。

4. 検出限界, 精度及び検量線

前述の HPLC 条件における各還元糖の保持時間及び検出限界 (S/N=3) を Table 1 に示す。

検討した還元糖の検出限界は 0.3~15 ng であった。グルコースからなるオリゴ糖は、グルコース間の結合位

置の違い及び *N*-アセチル化の有無により保持時間が異なり、クロマトグラム上で相互を区別することが可能であった。しかし、セロオリゴ糖とマルトオリゴ糖のように結合様式 (α 結合, β 結合) だけが異なる場合は保持時間の差がわずかであり、五糖以上では保持時間に差は見られなかった。なお、還元糖の *N*-アセチル化体は元の還元糖よりも蛍光強度が低かった。

グルコース, セロトリオース, セロペンタオース (注

Fig. 4. Chromatograms of reducing saccharides in a soymilk drink

HPLC conditions, as Table 1. Applied samples, (A) 0.04% soymilk drink; (B) 0.8% soymilk drink. Applied volume, 10 μ L. Peaks, (1) fructose; (2) glucose; (3) maltose; (4) maltotriose; (5) maltotetraose; (6) maltopentaose; (7) maltohexaose; (8) maltoheptaose

Fig. 5. Chromatograms of reducing saccharides in an oligosaccharide drink

HPLC conditions, as Table 1. Applied samples, (A) 0.027% oligosaccharides drink; (B) 0.8% oligosaccharides drink. Applied volume, 10 μ L. Peaks, (1) fructose; (2) glucose

入量各 500 pmol) について 8 回繰り返して分析した結果, 各還元糖に基づく蛍光ピーク高さの相対標準偏差はそれぞれ 0.90%, 0.99%, 1.5%, 保持時間の相対標準偏差はそれぞれ 0.092%, 0.088%, 0.056% であり, 定量分析を行う上で満足できると考えられた。また上記 3 種類の還元糖の検量線は, 注入量 2,000~12.5 pmol の範囲において良好な直線性 (相関係数 $r=0.99999\sim0.99994$) を示した。

5. 豆乳飲料及びオリゴ糖飲料の分析

Table 1 に記載した HPLC 条件で豆乳飲料 (2,500 倍希釈試料及び 125 倍希釈試料) とオリゴ糖飲料 (3,750 倍希釈試料及び 125 倍希釈試料) を分析した結果を Fig. 4 と 5 に示す。

豆乳飲料及びオリゴ糖飲料 1 mL に還元糖標準品 (フルクトース 2 mg, グルコース 2 mg, マルトース 4 mg, マルトトリオース 6 mg) を添加して回収実験を行った。ピーク面積から回収率を求めた結果, いずれの

Fig. 6. Chromatograms of reducing saccharides in various oligosaccharide preparations. HPLC conditions were the same as described in Table 1, except flow-rates were 0.8 mL/min (mobile phase) and 0.6 mL/min (two reagents). Applied samples, (A) laminarioligosaccharides mixture (glucose~laminariheptaose) (each 100 pmol/10 μ L); (B-1) oligosaccharide preparation 1; (B-2) preparation 2; (B-3) preparation 3; (B-4) preparation 4; (B-5) preparation 5; (B-6) preparation 6. Applied volume, 10 μ L. Internal standard; ribose (100 pmol/10 μ L). Peaks, (a) glucose; (b) laminaribiose; (c) laminaritriose; (d) laminaritetraose; (e) laminaripentaose; (f) laminarihexaose; (g) laminariheptaose; (1) fructose; (2) glucose; (3) maltose; (4) isomaltose; (5) maltotriose; (6) isomaltotriose; (7) isomaltotetraose; (8) isomaltopentaose

成分も回収率は93~103%の範囲以内であった。豆乳飲料には、豆乳由来のスクロース、ラフィノース、スタキオース、ベルバスコースなどの非還元糖のほかに、添加物である液糖や麦芽エキスを由来の糖が含まれる。標準還元糖の保持時間 (Table 1) と一致するピークを飲料に存在する還元糖とした場合、内部添加検量線から、豆乳飲料に含まれる主な還元糖成分として、フルクトース 15.7 mg/mL (ピーク 1), グルコース 19.8 mg/mL (ピーク 2), マルトース 18.2 mg/mL (ピーク 3), マルトトリオース 6.4 mg/mL (ピーク 4) が定量できた。微量成分としては、マルトテトラオース 0.12 mg/mL (ピーク 5), マルトペンタオース 0.16 mg/mL (ピーク 6), マルトヘキサオース 0.22 mg/mL (ピーク 7), マルトヘプタオース 0.59 mg/mL (ピーク 8) が検出された。豆乳飲料に含まれる微量オリゴ糖成分を単糖類還元糖と同時に検出することが可能であった。

市販オリゴ糖飲料のクロマトグラム上のピーク 1 と 2 の成分は、それぞれフルクトース 22.7 mg/mL とグルコース 17.6 mg/mL と推定された (Fig. 5A)。125 倍希釈試料の分析ではピーク 1 と 2 のほかにもいくつかのピークが認められた (Fig. 5B)。

6. 迅速分析条件とオリゴ糖製品の分析

分析時間の短縮を目的として、Table 1 記載の分析条件のうち流速を 2 倍にした条件 (迅速分析条件) でラミナリオリゴ糖の分析を行った。なお、その際内部標準として 20 μ mol/L リボースを使用した。

Fig. 6A に示すようにグルコースからラミナリヘプタオース (ピーク a~g) まで分析時間を約 10 分近く短縮可能だった (Fig. 6A)。迅速分析条件下で 6 種類のオリゴ糖製品を分析した結果を Fig. 6B1~B6 に示す。Fig. 6B1~B6 のクロマトグラム上のピーク成分のうち、標準還元糖と保持時間が一致したピーク成分に 1~8 の番号を付けるとともに、推定された還元糖の名称を記した。Fig. 6B1, B3, B4 では、フルクトース (ピーク 1) 及びグルコース (ピーク 2) などの単糖とオリゴ糖と考えられる成分との同時検出が可能であった。Fig. 6B2 と B5 にラクトースを原料として酵素反応により合成した 2 種類のオリゴ糖製品の分析結果を示す。Fig. 6B2 と B5 のクロマトグラムのパターンの違いから含有オリゴ糖種の違いや量の違いが明らかである。イソマルトオリゴ糖含有製品は、多くの還元糖を含んでいた (Fig. 6B6)。Fig. 6B6 のピーク 3~8 の成分はそれぞれマルトース、イソマルトース、マルトトリオース、イソマルトトリオース、イソマルトテトラオース、イソマルトペンタオースと推定された。

以上の結果から、順相 HPLC とポストカラム蛍光誘導体化法を組み合わせることにより、飲料及びオリゴ糖製品中の単糖とオリゴ糖が再現性良く高感度で同時分析可能であることが明らかになった。今回開発した分析方法は、食品の品質管理及び公的検査の効率を向上させることができる有効な分析方法であると考えられる。

7. ま と め

順相 HPLC とポストカラム蛍光誘導体化法を組み合わせることによって、単糖とオリゴ糖の還元糖の同時分析法を確立することができた。本法の利点は、高感度分析が可能なこと、有機酸など夾雑物から選択的に還元糖が検出可能なこと、一回の分析で単糖とオリゴ糖が定量可能なこと、再現性がよいことなどが挙げられる。更に、試料原液の希釈液を注入して高感度分析ができるため、カラム寿命が長くなり安定な分析を長時間続けられることも利点の一つである。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、各種オリゴ糖製品を提供して下さいました三井製糖(株)に深謝いたします。

文 献

- 1) 須見洋行: “食品機能学への招待” p. 80~81 (1995) 三共出版。
- 2) 厚生省告示第 146 号: “栄養表示基準” 平成 8 年 5 月 20 日 (1996)。
- 3) 厚生省生活衛生局食品保健課新開発食品保健対策室長通知: “栄養表示基準の導入に伴う栄養成分等の分析方法等について” 平成 8 年 5 月 23 日, 衛新第 47 号 (1996)。
- 4) 厚生省生活衛生局食品保健課新開発食品保健対策室監修: “早わかり栄養表示基準” p. 67~70 (1997) 中央法規出版。
- 5) 南原利夫, 池川信夫編著: “最新高速液体クロマトグラフィー・応用編 I” p. 1~51 (1983) 廣川書店。
- 6) Honda, S.: Anal. Biochem. **140**, 1~47 (1984)。
- 7) Ben-Bassat, A. A., Grushka, E.: J. Liq. Chromatogr. **14**, 1,051~1,111 (1991)。
- 8) Linden, J. C., Lawhead, C. L.: J. Chromatogr. **105**, 125~133 (1975)。
- 9) Schwarzenbach, R.: *ibid.* **117**, 206~210 (1976)。
- 10) Kai, M., Tamura, K., Yamaguchi, M., Ohkura, Y.: Analytical Sciences **1**, 59~63 (1985)。
- 11) Snyder, L. R., Kirkland, J. J. 著, 小島次雄, 春木達郎ほか訳: “高速液体クロマトグラフィー” p. 19~22 (1976) 東京化学同人。
- 12) Snyder, L. R., Glajch, J. L., Kirkland, J. J. 著, 高橋昭, 荒木 峻訳: “高速液体クロマトグラフィーの実際” p. 66~67 (1996) 東京化学同人。