軟体動物成分に関するポーラログラフ的研究—VI.

‘するめ’肉からポーラログラフ還元波
塩基成分の単離について

福 島 清

(1962 年 4 月 5 日受理)

POLAROGRAPHIC STUDIES ON THE MOLLUSCAN MEAT—VI.
ISOLATION OF A POLAROGRAPHICALLY REDUCIBLE
BASE FROM DRIED SQUID MUSCLE*

Kiyoshi FUKUSHIMA**

In the former papers¹⁻⁵⁾, studies have been carried out on the polarographically reducible and ultraviolet light-absorbing base (abbreviated as PRB) which is peculiar to the muscle or tissues of mollusca and crustacea. In this experiment, isolation of the PRB was tried from the extracts of dried squid muscle. The fraction precipitable with phosphotungstic acid from the above extracts was chromatographed on a cation exchanger column by the method described in the former papers^{4,5)}. Other bases and amino acids were removed by adsorbing the PRB with active charcoal or by precipitating with ammoniumreineckate or alcoholic saturated picric acid solution (in Figs. 1, 2 and 3; in Table 3).

The PRB was positive in DRAGENDORFF'S reaction (in Table 1).

Then, the PRB was compared with commercial specimens of trigonelline (N-methyl nicotinic acid betaine, an isomer of homarine), purines or pyrimidines, nucleosides and 5-hydroxy tryptamine⁴⁾ by paperchromatographic technique (in Table 2), to show the R_f values roughly resembling to those of trigonelline. The melting point of the PRB chloraurate was 188~189°C. Thus, the PRB seemed to be homarine (N-methyl picolinic acid betaine) isolated for the first time from lobster by HOPPE-SEYLER^{8,9)}.

緒 言

著者は前報¹⁻⁵⁾までに、軟体動物筋肉中に含有されるポーラログラフ還元波を示す塩基成分（以下本文中“PRB 成分”と略す）について研究を行なった。本成分については中島ら⁶⁾が食品中の核酸分析において軟体動物および甲殻類動物筋肉中に特異的に存在する物質であることを認めているが、著者も早くからこの事実を認め一般魚類肉中には存在しないところの特有成分であることをすでに報告¹⁾した。

本報では、前報¹⁻⁵⁾に引きついで実験を行ない、この PRB 成分がドラゲンドルフ反応陽性物質であることを新たに知り、また、既往の実験結果および文献⁷⁾記載の諸種塩基類の性質を比較照合し、この成分がピリジン系化合物の一種ホマリン (N-methyl picolinic acid betaine) であろうと推定した。したがって、‘するめ’肉より前報^{4,5)}でイオン交換樹脂処理法により精製された PRB 区分液と、ホマリンの異性体であるトリゴネリン (N-methyl nicotinic acid betaine) 市販標品とをペーパークロマトグラフィーにより比較し、両者の R_f 値が3種溶媒系で類似し、核酸構成塩基ならびにヌクレオシド類の R_f 値と合致しないことを確めた (Table 2)。ついで、‘するめ’肉エキスのリンタングステン酸沈澱区分を、前報^{4,5)}と同様にし

* 日本水産学会 昭和 36 年度秋季大会 (鹿児島) にて発表 (1961. 10. 18)

** 味の素株式会社 食品研究室 (Food Research Laboratory Ajinomoto Co. Ltd., Chuō-ku Tokyo, Japan).

て PRB 成分を分離精製し (Fig. 1), この精製区分液中には混在するアミノ酸類, および他種塩基類を (Table 3; Figs. 2 and 3) を分別除去して後, この PRB 成分を融点 $188\sim 189^{\circ}\text{C}$ の塩化金塩 (Fig. 4) として単離した。HOPPE-SEYLER^{8,9)} がロブスターの筋肉より分離したホマリンの正塩化金塩 ($\text{C}_7\text{H}_7\text{NO}_2\cdot\text{HAuCl}_4$) の融点と同一であることから, 著者がこれまでに追究せる PRB 成分はホマリンであることがほぼ明らかになった。

実験の部

実験 I. ‘するめ’ 肉抽出液のイオン交換樹脂処理精製により得られた PRB 区分液のペーパークロマトグラフィー

前報¹⁻⁵⁾ までに, 本成分について明らかにされた諸性質, および既往の文献¹⁰⁾ に記載された諸塩基, ペタイン, グアニジン, アルカロイドおよびアミン類などの諸性質を比較し, 本成分が不揮発性の第3または第4級アミン類に属する可能性も考えられた。したがって, 著者はドラゲンドルフ反応による本 PRB 成分の検出を, ペーパークロマトグラム上において試みた。

a) ペーパークロマトグラフィー展開試料液の調製

区分液 A; 前報⁴⁾ において ‘するめ’ 肉抽出液を IR-120 H^+ 型および IRA-400 OH^- 型イオン交換樹脂処理により得た PRB 成分区分液

区分液 B; 前報⁵⁾ において区分液 A をさらに Dowex 50 H^+ 型イオン交換樹脂カラムを用い再クロマトグラフィーを行なつて得た PRB 成分区分液。

以上区分液 A および B の濃縮液を試料液とした。

b) ペーパークロマトグラム上における PRB 成分のドラゲンドルフ反応

3 種溶媒系^{14,15)} により PRB 成分を含む 2 種区分液のペーパークロマトグラフィーを行ない, 紫外線吸収鑑別法ならびにドラゲンドルフ呈色反応により検出し Table 1 のような結果を得た。ドラゲンドルフ試薬は刈米¹¹⁾, BREGOFF¹²⁾ らの方法により調製した。Table 1 の結果から紫外線吸収性, またはポーラログラフ還元波を示す目的成分 (PRB 成分) は, 明らかにドラゲンドルフ反応陽性であることがわかる。しかし, 区分液 A には本 PRB 成分以外に他の 1 種のドラゲンドルフ反応陽性物質の存在を認め, また, 一方区分液 B の再クロマトによる精製試料液中には PRB 成分のみが存在した。

Table 1. R_f values of DRAGENDORFF-positive spots on the paperchromatograms of polarographically reducible fractions which were obtained from ‘Surume’ (dried squid muscle) extracts with ion-exchange resin chromatography.

Solvent system No.	I ¹⁴⁾	II	III ¹⁵⁾
Sample			
Fraction A*	0.25; 0.32 (UV)	0.90 (UV)	0.69 (UV); 0.81
Fraction B**	0.32 (UV)	0.90 (UV)	0.69 (UV)

* Polarographically reducible fraction obtained from ‘Surume’ extracts by chromatographic separation with Amberlite IR-120 H^+ and IRA-400 OH^- ion type resin (in previous report⁴⁾).

** Polarographically reducible fraction obtained from Fraction A which were rechromatographed on Dowex 50-X8 H^+ ion type resin column. (in previous report⁵⁾).

Solvent System; I) $n\text{-BuOH-AcOH-H}_2\text{O}$ (12:3:5), II) Isopropanol-HCl- H_2O (1300:330:370), III) Sat. $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4\text{-Isopropanol-H}_2\text{O}$ (79:2:19)

R_f values; Figures of (UV) show the R_f values of ultraviolet-light absorbing spots.

c) トリゴネリン, 核酸構成塩基類ならびにリポンド類と PRB 成分の R_f 値の比較
多くのアミン類, ピリジン系化合物がドラゲンドルフ反応陽性であるが, 前報⁵⁾ において述べたように本

Table 2. R_f values of PRB (polarographically reducible base) contained in Fraction A, purine, pyrimidine bases, ribosides, serotonin⁴⁾ (5-hydroxy tryptamine) and trigonelline.

Solvent system No.	I	II	III ¹⁸⁾
Authentic sample			
Adenine	0.32	0.49	0.28
Guanine	0.17	0.36	0.12
Hypoxanthine	0.24	0.52	0.18
Xanthine	0.10	—	0.15
Cytosine	0.38	0.45	0.25
Thymine	0.73	0.62	0.36
Guanosine	0.12	0.34	—
Inosine	0.27	0.41	—
Xanthosine	0.26	0.33	—
Cytidine	0.41	0.30	—
Serotonin	0.25	0.51	0.28; 0.58
Trigonelline	0.59	0.28	0.10
PRB in Fraction A	0.68	0.35	0.16

Each spot was detected by ultraviolet absorption.

Solvent system;

- I) Isopropanol-HCl-H₂O (325 : 80 : 95),
 II) *n*-BuOH-AcOH-H₂O (4 : 1 : 5),
 III) *n*-BuOH-H₂O (86 : 14)-NH₄OH (sp. g. 0.88) (95 : 5)

PRB 成分がリンタングステン酸沈澱性物質であること, Dowex 50 H⁺型イオン交換樹脂カラムクロマトグラフィーの溶出位置が WALL 報告¹³⁾のニコチン酸区分にあることなどから, 本成分がピリジン系化合物の一種ホマリンであろうと推定された。ゆえに, 著者は PRB 成分区分液 A について, ホマリンの異性体であるトリゴネリン市販品 (東京化成製) との比較をペーパークロマトグラフィーにより行なつた。また, 参考に, 前報⁴⁾において紫外吸収曲線およびポーラログラムなどの比較を行なつた。核酸塩基およびセロトニン, ならびにヌクレオシド類標品の R_f 値を PRB 成分の R_f 値と比較し, Table 2 のような結果を得た。検出は紫外線吸収鑑別法によつた。PRB 成分の R_f 値は 3 種溶媒系¹⁸⁾においてトリゴネリンのそれよりもやや高い値を示したが, 相対的には両者ともによく類似し, 他の紫外線吸収性成分である核酸塩基, ヌクレオシド, ならびにセロトニンなどの R_f 値と異なるものであつた。なお, セロトニンについては前報⁴⁾においても触れたが, その紫外波長における吸収極大, ポーラログラム半波還元電位など, PRB 成分とよく類似していたが, 本実験結果から同一でないことが明らかとなつた。

実験 II. PRB 成分の精製および分離

a) ‘するめ’肉抽出液からリンタングステン酸沈澱部の調製ならびに IR-120 H⁺型イオン交換樹脂による分離

‘するめ’肉細片 4.9 kg の水抽出液よりリンタングステン酸沈澱区分の調製については鈴木¹⁷⁾ならびに MENSEN¹⁸⁾らの方法に大略準じた。分離の概要を Fig. 1 に示す。リンタングステン酸沈澱部よりバリタ分

Fig. 1. Procedure for separation of the PRB from ‘Surume’ (dried squid muscle) extracts.

解法により調製した遊離塩基区分液 (F-I in Fig. 1) を, 前報⁴⁾ 記載の IR-120 H⁺ 型イオン交換樹脂カラム (9.0cm²×40.0cm: 200~400 メッシュ) に流し, 吸着水洗後, 脱着液として 0.4N-NH₄OH 4.5l および 1.0N-NH₄OH 3.5l をそれぞれ使用し溶出を行なった。分割捕集液量を 100ml 宛とし, 各溶出液についてポーログラムを記録した結果, 1.0N-NH₄OH 0.6~1.7l の溶出位置に PRB 成分によるポーログラフ還元波を認めた。この PRB 区分液 (F-II in Fig. 1) を濃縮後さらに Dowex 1-X8 ギ酸型カラム (3.0cm²×40.0cm: 50~100 メッシュ) にとおし, 試料液中の着色成分を除去した。カラム洗浄液約 2l 中の PRB 成分の存在を 272mμ の吸収極大波長をもつて確認した。この洗浄液を濃縮し, 液量約 150ml とした。なお, この区分液 (F-III in Fig. 1) 150ml の総窒素量を測定の結果 3.82g であった。

b) Dowex 50-X8 H⁺ 型イオン交換樹脂カラム再クロマトグラフィーによる PRB 成分の分離

Fig. 2 に示すように WALL¹⁹⁾の方法に準じ Dowex 50-X8 H⁺ 型カラム (200~400 メッシュ: 3.0cm²×60.0cm) を用い, 上記 F-III 区分液の吸着ならびに分別溶出を行なった。脱着液としては 1N-HCl, 2N-HCl, および 4N-HCl をそれぞれ用いた。分割捕集液量を 100ml 宛とし, 各区分の紫外波長における吸光度測定, ライネケットならびにリンタングステン酸塩沈澱生成反応をも調べた。Dowex 50 カラムによる分離結果の概要を Table 3 に示す。272mμ の波長に吸収極大を有する PRB 成分区分液 (Fraction No. 1 in Table 3; F-IV in Fig. 2) の全窒素は 1.43g であった。この F-IV 区分液を濃縮し, 液量 50ml とし, これに 1.5% アンモニウムライネケット 1N-HCl 酸性溶液 600ml を加えた。0°C にて 2 時間放冷後, 生成せる多量のライネケット沈澱を冷却濾別し, この沈澱部を MENZEN¹⁸⁾の方法にしたがい硫酸銀または酸化銀処理により分解し, 遊離塩基区分の濃縮液 (F-V in Fig. 2) 75ml を得た。この区分 75ml の全窒素測定の結果 0.60g であった。F-V 区分液の一部を取りポーログラムを記録したが PRB 成分による還元波電流値僅少で, また, ペーパークロマトグラフィーにより紫外線吸収スポットの存在を認めなかった。なお, このライネケット沈澱部 (F-V) の塩基の種類については未同定である。したがって, 目的とする PRB 成分はほとんどライネケット沈澱処理により得た濾液部 (F-VI in Fig. 2) 中に存在すると思われたので, この F-VI 区分液より下記の方法により PRB 成分の単離を試みた。

Table 3. Separation of PRB and the other compounds which are precipitable with reineckate or phosphotungstic acid soln., by using the Dowex 50-X8 H⁺ exchange resin column (3.0cm²×60.0cm).

Eluent	Effluent ml.	Fraction No.	Phosphotungstate ppt.	Reineckate ppt.	Polarographically reducible wave	Ultraviolet absorption at 272mμ
1N-HCl	1000~1900	1*	≡	≡	≡	≡
2N-HCl	1000~2500	2	≡	≡	—	—
4N-HCl	900~1500	3	+	+	—	—
	2600~3900	4	≡	≡	—	—

* Fraction No. 1; the PRB fraction.

c) ライネケット沈澱処理濾液部 (PRB 成分区分液) 中に混在する他種成分の検出

上記 F-VI 区分液約 2l に硫酸銀または酸化銀粉末を添加し, 溶液中の塩素イオンまたは残存するアンモニウムライネケットを沈澱させた。沈澱を濾別後, 濾液中の過剰の銀ならびに硫酸根を除去し, この濾液部 560ml (F-VII in Fig. 2) を得, 全窒素測定の結果 0.62g であった。

F-VII 区分液の一部についてポーログラム記録の結果, 著量の PRB 成分による還元波電流を認めた。

また, この区分液のペーパークロマトグラフィーを行ない (使用溶媒; No. I in Table 1), 明瞭な紫外線吸収性スポットを R_f 0.32 に認め, このスポットは前記同様のドラゲンドルフ反応陽性であったが, さらに低い R_f 値 0.23~0.26 にいま一つの非紫外線吸収性のドラゲンドルフ反応陽性スポットを認めた。また

Fig. 2. Procedure for separation and isolation of the PRB from 'Surume' extracts.

ニンヒドリン反応により少量のプロリンのスポットが認められた。したがってこの F-VII 区分液をさらに IRA-400 OH⁻ 型イオン交換樹脂カラム (3.0 cm² × 30.0 cm) に流し、プロリンおよびなお少量に残存するアンモニウムライネッケートを除去した。カラム洗浄液約 2.5 l を得、これを濃縮して 100 ml とし、全窒素測定の結果 0.51 g であった (F-VIII in Fig. 2)。

F-VII 区分液 2 ml を取り、鴻巣ら²²⁾の方法により Dowex 50 X-12 H⁺ 型イオン交換樹脂カラム (0.9

cm²×60.0 cm: 200~400 メッシュ) クロマトグラフィーを行ない, Fig. 3 のような溶出曲線を得た。Fig. 3 中 P-1 区分液のライネッケート生成率の測定を FOCHT ら²¹⁾の比色定量法により行なった。P-1 区分液の一部濃縮液について, *n*-BuOH-dioxane-H₂O (4:1:5) 溶媒²²⁾で展開し, *R_f* 0.18 にドラゲンドルフ陽性スポットを認め, これがグリコールベタイン, および DL-塩化カルニチンの *R_f* 値と近似した。P-1 成分は恐らくグリコールベタインと思われる。なお, Fig. 3 中 P-2 成分は, 270 mμ の波長において吸収極大値(強塩酸溶液中)を有し, 目的とする PRB 成分区分であるが, ライネッケート沈澱の形成は僅少であつた。

Fig. 3. Elution curve of F-VIII in Fig. 2. One ml. of aliquot of the fraction was chromatographed using Dowex 50-X 8 H⁺ resin (1.0 cm²×60.0 cm), 15 ml. each of the effluent being collected.

P-1; Each 15 ml. fraction was precipitable with ammoniumreineckate soln.

Reineckate ppt. in each fraction was dissolved, diluted with 25 ml. of acetone, and followed by spectrophotometry at 525 mμ.

This fraction seemed to contain a reineckate of glycolbetaine (dashed line).

P-2; PRB-fraction; Only a little amount of reineckate ppt. appeared in each 15 ml. fraction, and then absorbancy at 270 mμ of each fraction was measured without additional treatments.

Fig. 3 の分離状況から理論的には, Dowex 50 大型カラムクロマトグラフィーによつて P-1 および P-2 成分の分離は可能なはずである。しかし, 供試料大量の場合には必ずしも Fig. 3 のような分離能を期待することができない。したがつてつぎのような方法で P-1 成分を分別除去し, P-2 成分 (PRB 成分) のみを単離した。

d) 活性炭吸着法ならびにピクレート分別沈澱法による PRB 成分の単離

前報²⁾にも報告したようにに著者の目的とする PRB 成分は活性炭に弱い吸着性を示す。したがつてこの性質を利用し, P-1 成分の除去を試みた。

まず, F-VIII 区分液の半量 (約 50 ml) を取り, 水を加えて液量約 1 l とし, ついでこれに Norite SX II 40 g を添加し, 3 l 試薬ビン中で 3 時間振盪吸着を行なった。吸着前後の試料液の紫外部波長 270 mμ における吸光度測定値より推定し, PRB 成分吸着率約 65% であつた。

BERGKVIST¹⁵⁾の方法により 50% エタノール-0.5% アンモニア混合液約 1 l を用いて 3 回振盪脱着を

行なつた。全脱着液約 3l (F-IX in Fig. 2) を濃縮しアルコールを溜去後、液量約 20ml とした。ついでこの濃縮液に 4-N塩酸々性-20% 塩化金酸溶液 20ml を加え 0°C に 2 時間冷却し、PRB 成分塩化金塩約 1g の粗結晶を得た。

この粗結晶の少量を取り、水で稀釈した溶液 (curve A in Fig. 4) と、塩化金塩結晶母液の水稀釈液 (curve B in Fig. 4) のそれぞれの紫外外部吸収曲線を Fig. 4 に示す。PRB 成分塩化金塩は明らかに 270~272m μ に吸収極大を有する。また、本結晶のペーパークロマトグラフィーの結果、紫外線吸収スポット位置においてのみドラゲンドルフ反応陽性で、他の R_f 値には陽性スポットが存在せず単一と思われた。

以上活性炭吸着法による単離法では PRB 成分の損失が多いので、ビクレート分別沈澱法による PRB 成分の単離実験を試みた。F-VIII 区分液の残液および上記活性炭汚液の濃縮液を合併し、これに 95% アルコール-ピクリン酸飽和溶液約 300ml を加え、0°C に一昼夜放置すると、混在する P-1 成分のみがビクレートとして針状に結晶析出する (Cry. II in Fig. 2)。これを可及的速やかに冷却濾別し、汚液部を濃縮しアルコールを溜去して液量約 20ml とした。この濃縮液中に含まれるピクリン酸を Dowex 2-X8 Cl⁻ 型カラム (3.0cm²×4.0cm) を用いて吸着除去し、カラム流下液および汚洗液約 400ml を得、濃縮して液量約 30ml とした (F-X in Fig. 2)。ペーパークロマトグラフィーの結果、PRB 成分によるドラゲンドルフ陽性スポットのみを認め単一と思われたので、この F-X 区分液に上記同様塩化金酸を加えて、目的とする PRB 成分の塩化金塩粗結晶約 2.5g を得た。

以上、活性炭吸着、ならびにビクレート分別沈澱法により得た PRB 成分塩化金塩粗結晶をそれぞれ合併し、3N-HCl より 3 回再結を行ない、真空乾燥して PRB 成分の純塩化金塩を考えられる結晶約 2.1g (Cry I in Fig. 2) を得た。融点測定の結果 188~189°C で、HOPPE-SEYLER^{8,9)} がロブスター筋肉に見出したホマリンの正規塩化金塩 (C₇H₇NO₂·HAuCl₄) の融点測定値 188~190°C) とほとんど同一である。

著者がポーラログラフ法により前報¹⁻⁵⁾ において見出せる軟体動物および甲殻類動物筋肉中の還元波成分 (PRB 成分) は、ホマリンであることがほぼ明らかになつた。

なお、本 PRB 成分の塩化金塩、約 1g を取り、これに 1N-HCl 50ml を加えて加温溶解し、硫化水素により金を除去せる汚液を濃縮し乾固寸前に至らしめ、これに純エタノールおよびエーテルを加えると直ちに白色の塩酸塩小針状結晶を析出した。この結晶をマイクロ汚過装置により捕集し、同溶媒で 2 回再結し PRB 成分の塩酸塩を得た。この塩酸塩を後報での合成ホマリン標品との比較試験用の試料とした。

要 約

前報⁵⁾ に引きついで、‘するめ’肉抽出液中のポーラログラフ還元波を示す塩基成分 (PRB) の単離を行なつた。

1) ‘するめ’肉抽出液のリンタングステン酸沈澱区分をイオン交換樹脂により処理し、さらにライネケット分別沈澱法、活性炭吸着法またはビクレート分別沈澱法などの諸操作を経て、他種塩基類およびアミノ酸類を分別除去して後、目的とする PRB 成分を塩化金塩ならびに塩酸塩として単離した。

2) 本 PRB 成分はドラゲンドルフ反応陽性で、ホマリンの異性体であるトリゴネリンとペーパークロマ

Fig. 4. Ultraviolet absorption spectra of PRB-chloraurate and its mother liquor obtained from the F-IX or F-X in Fig. 2. A, PRB-chloraurate; B, mother liquor of PRB-chloraurate.

トグラフィーでの R_f 値が3種溶媒系でそれぞれ近似していた。

3) 本 PRB 成分塩化金塩の融点 (188~189°C) はホマリンのそれとよく一致した。

以上の結果から本 PRB 成分はホマリンであることがほぼ明らかとなった。

終りに臨み、本研究を行なうに当たり、終始御懇篤なる御指導と御鞭撻をたまわりました京都大学教授舘勇博士、東京水産大学教授岡田郁之助博士、味の素株式会社食品研究室顧問戸井文一博士および食品研究室長小原正美氏に深甚の謝意を表する。

文 献

- 1) 福島・菊池・小坂部・岡田: 本誌, **23**, 331 (1957).
- 2) 福島・菊池・小坂部・岡田: 本誌, **24**, 144 (1958).
- 3) 福島・岡田: 本誌, **26**, 1222 (1960).
- 4) 福島・岡田: 本誌, **27**, 171 (1961).
- 5) 福島・岡田: 本誌, **27**, 178 (1961).
- 6) 中島・市川・鎌田・藤田: 農化誌, **35**, 803 (1961).
- 7) たとえば 大谷・富士川: “軟体動物の化学”, 厚生閣, pp. 31~60 (1934).
- 8) HOPPE-SEYLER, F. A.: *Z. Physiol. Chemie*, **221**, 45 (1933).
- 9) HOPPE-SEYLER, F. A.: *Z. Physiol. Chemie* **222**, 105 (1933).
- 10) たとえば 宮道・嶋野: “動植物成分”, 共立, pp. 147~181 (1955).
- 11) 刈米: *Nature*, **168**, 739 (1951).
- 12) BREGOFF, H. M., ROBERTS, E. and DELWICHE, C. C.: *J. Biol. Chem.*, **205**, 565 (1953).
- 13) WALL, J. S.: *Anal. Chem.*, **25**, 950 (1953).
- 14) たとえば SMITH, I.: “*Chromatographic Technique (Clinical and Biochemical Applications)*”, William Heinemann, Medical Books Ltd. (London), p. 159 (1958).
- 15) BERGKVIST, R.: *Acta Chem. Scand.*, **10**, 1303 (1956).
- 16) MERKHAM, R. and SMITH, J. D.: *Biochem. J. (London)* **45**, 294 (1949).
- 17) 鈴木: 薬誌, **71**, 195 (1951).
- 18) MENGEN, H. G.: *Z. Physiol. Chemie*, **318**, 59 (1960).
- 19) WALL, J. S., CHRISTIANSON, D. D., DIMLER, R. J. and SENTI, F. R.: *Anal. Chem.* **32**, 870 (1960).
- 20) 鴻巣・葛西: 本誌, **27**, 194 (1961).
- 21) FOCHT, R. L. and SCHMIDT, F. H.: *J. Agr. Food Chem.*, **4**, 547 (1956).