

Technical Report

HPLCによる糖類の分析

Analysis of Sugar Using HPLC

平尾 美子¹、渡邊 京子¹、増田 潤一¹

Abstract:

糖類は、自然界に最も広く分布する有機化合物であり、食品中の甘味成分だけでなく、生体内のエネルギー源または生体を構成する物質として多様な形態で存在するとともに、重要な役割を担っています。糖類の分析においては、多くの場合には高速液体クロマトグラフィー (HPLC) が広く用いられていますが、糖類は紫外吸光度検出においては選択性の高い波長で検出できない、逆相クロマトグラフィーで保持しないという2つの理由により他の有機化合物の分析とは異なり、分析するためには工夫が必要となります。また糖類はその形態や種類が膨大なものであるため、その対象成分や分析目的に応じた分離法および検出法を適切に選択する必要があります。

ここでは、HPLCを用いた糖類の分離および検出の原理とそれらを用いた分析例をご紹介します。

Keywords: LC、LC/MS、糖類、ポストカラム誘導体化法

1. 糖類の分類

糖は一般に炭素、水素および酸素から構成され、ケトン基またはアルデヒド基を有しています。栄養学においては炭水化物 (Carbohydrate) として定義されており、この炭水化物はさらに消化される糖類 (単糖、二糖、糖アルコール、デンプン) と消化されない糖類 (食物繊維) 等に大別されます。主な糖類とその分類を Table 1 に示します。

Table 1 主な糖類とその分類

単糖類	四炭糖 (テトロース)	エリスロース、スレオース
	五炭糖 (ペントース)	キシロース、リボース 等
	六炭糖 (ヘキソース)	グルコース、ガラクトース、マンノース 等
二糖類		マルトース、スクロース、ラクトース 等
オリゴ糖類		ガラクトオリゴ糖、フルクトオリゴ糖、マルトオリゴ糖 等
多糖類		デンプン (アミロース、アミロペクチン)、セルロース、グリコーゲン 等
糖誘導体	デオキシ糖	デオキシリボース 等
	ウロン酸	グルクロン酸、ガラクトツロン酸 等
	シアル酸	ノイラミン酸、コロミン酸 等
	糖アルコール	キシリトール、ソルビトール、マンニトール 等
	アミノ糖	グルコサミン、コンドロイチン 等
	ラクトン	グルクロノラクトン 等

※分子量、構造以外に還元性の有無 (還元糖、非還元糖) によって分類されることがあります。

2. 糖類の分離法

糖類は親水性の高い化合物であるため、疎水性相互作用によって化合物を分離する逆相クロマトグラフィーを分離法として選択するのは適切ではありません。一般的に糖類の分析に用いる分離法とそれらの特長を Table 2 に示します。

本項では Table 2 に示した分離法の原理について説明します。

2-1. サイズ排除クロマトグラフィー (Size Exclusion Chromatography: SEC)

サイズ排除クロマトグラフィーは、ゲル浸透クロマトグラフィー (Gel Permeation Chromatography: GPC) やゲルろ過クロマトグラフィー (Gel Filtration Chromatography: GFC) とも呼ばれています。多糖とオリゴ糖、二糖、単糖を分離するなど分子量の違いにより糖類を分離したい場合には、サイズ排除クロマトグラフィーを用いるのが一般的です。糖分析を目的としたサイズ排除クロマトグラフィーでは、充てん剤としてポリヒドロキシメタクリレートゲルあるいはポリビニルアルコールゲルなどがよく用いられています。

Table 2 糖類の分析に用いられる分離法とその特徴

方法	単糖	オリゴ糖	多糖
サイズ排除クロマトグラフィー	×	×	◎
配位子交換クロマトグラフィー	◎	×	×
親水性相互作用クロマトグラフィー	○	◎	×
陰イオン交換クロマトグラフィー	◎	○	×

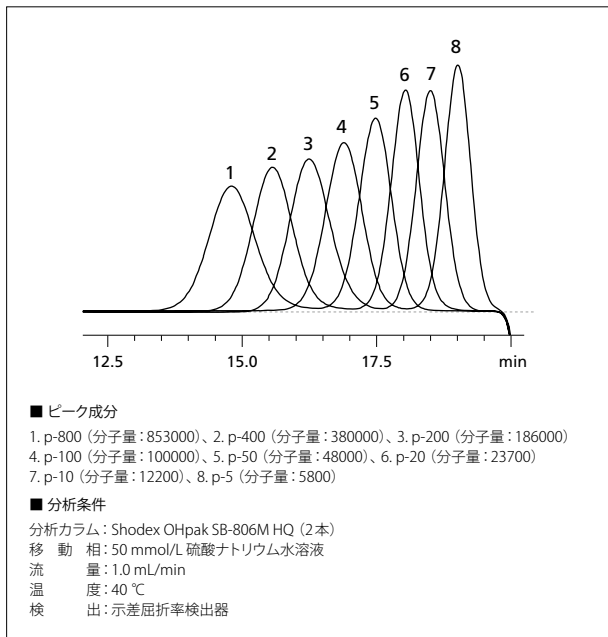


Fig. 1 プルラン標準品のクロマトグラム

ポリヒドロキシメタクリレートゲルを充てん剤としている代表的なカラムであるShodex OHpak SB-806M HQを用いたプルラン標準溶液のクロマトグラムをFig. 1に示します。プルランは、グルコースが3分子結合しているマルトトリオースが複数結合した多糖です。分子量が異なる糖類の分離のほか、ヒアルロン酸やキトサンといった多糖の分析の際にもサイズ排除クロマトグラフィーが用いられます。

2-2. 配位子交換クロマトグラフィー (Ligand Exchange Chromatography)

配位子交換クロマトグラフィーの分離原理のベースとなるのは排除限界分子量約1000のサイズ排除クロマトグラフィーですが、これだけでは分子量の小さな単糖やオリゴ糖を分離するには不十分です。そこで配位子交換クロマトグラフィーでは充てん剤であるイオン交換樹脂の金属対イオンと糖の水酸基間に作用する静電相互作用を利用します。

配位子交換クロマトグラフィーでの保持は、充てん剤の金属対イオンの水和水と交換して錯体を生じることで起こります。糖分子中の水酸基は成分によってその数や立体配置が異なるため、金属対イオンとの錯体形成力も糖の種類によって異なります。配位子交換クロマトグラフィーでは、この錯体形成力の違いを利用して糖類を分離します¹⁾。また、金属対イオンの種類によっても錯体形成力は異なります。ナトリウム (Na) イオンを対イオンとした分離モードは、その配位子交換の作用は弱く、ほとんどサイズ排除クロマトグラフィーと同じであるため、グルコースとフルクトースが分離できる程度ですが、カルシウム (Ca) イオンや鉛 (Pb) イオンを対イオンとした充てん剤を用いると、糖アルコールや単糖に選択的な保持挙動を示します。Table 3に配位子交換クロマトグラフィーにおける3種類の金属対イオンの特徴を、Fig. 2に島津製配位子交換カラムShim-pack SPRシリーズのNa型、Ca型、Pb型カラムにおける糖類の溶出位置を示します。

Table 3 糖分析における配位子交換クロマトグラフィーの種類

	分析時間の長さ	単糖同士の分離	糖アルコールとの分離
Na型	◎	△	×
Ca型	○	○	○
Pb型	△	◎	◎

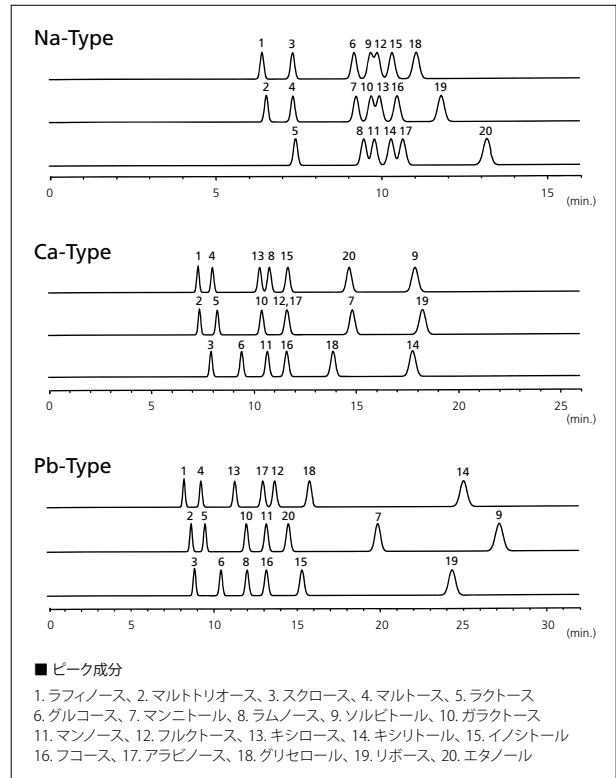


Fig. 2 Shim-pack SPRシリーズによる主な糖類の溶出位置 (模式図)

なお、配位子交換クロマトグラフィーは、移動相に水を用いるため簡便かつ環境にやさしい分離方法という見方もできますが、一方で移動相による分離のコントロールを行うことができません。また、低い温度では糖のアノマーが分離されて見かけ上ピーク割れを生じることがありますので、一般的にはカラム温度を高め設定する必要があります^{1)、2)、3)}。

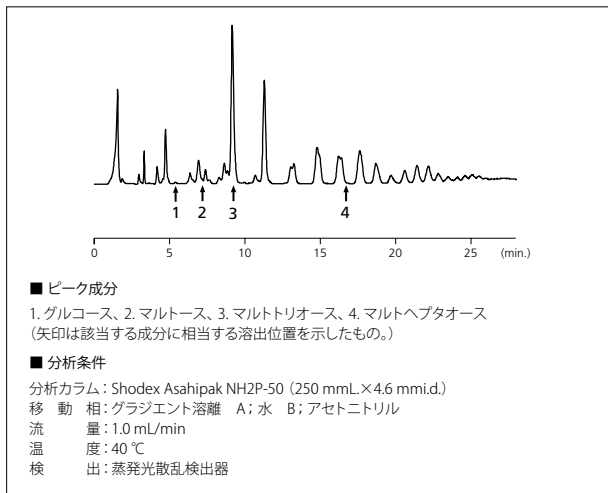


Fig. 3 Shodex Asahipak NH2P-50による
ビール中マルトオリゴ糖類のクロマトグラム

2-3. 親水性相互作用クロマトグラフィー (Hydrophilic Interaction Chromatography)

親水性相互作用クロマトグラフィーは、単糖からオリゴ糖までの比較的広い範囲の分離に適した分離モードで、特にオリゴ糖の構成糖一つ一つの違いを識別することが容易なため、この分離法を用いれば二糖類同士の分離も可能です。

親水性相互作用クロマトグラフィーの固定相には、一般的にシリカゲルやポリマーの担体にアミノプロピル基やアミド基などの極性基を結合させた充てん剤が用いられます^{4), 5)}。移動相には水とアセトニトリルの混合液が用いられ、移動相中の水の比率が大きくなるほど糖類の溶出は早くなります。また親水性相互作用クロマトグラフィーでは、グラジエント溶離が可能であるため、効率良く多成分一斉分析に適用できます。なお、固定相のアミノ基は糖類のアルデヒド基と反応してシッフ塩基を形成しますので、特に五炭糖(アラビノース、リボース等)ではピークが大きくテーリングすることがあります。これは移動相に塩を添加することにより抑制することができます。

Fig. 3には、分離カラムにポリマー担体のアミノプロピルカラムであるShodex Asahipak NH2P-50を用い、グラジエント溶離によってビール中のマルトオリゴ糖を分析した例を示します。グルコース(単糖)からマルトヘプタオース(七炭糖)までが分子量の小さな順に溶出しているのがわかります。

2-4. 陰イオン交換クロマトグラフィー (Anion Exchange Chromatography)

糖類のアルコール性水酸基は弱酸性で、その解離定数は約 10^{-12} (pKa=12)です⁶⁾。そのため強塩基性条件下では、解離して陰イオンとなった糖類を陰イオン交換カラムに保持させることができます。この場合、移動相には水酸化ナトリウム水溶液などの強塩基性溶液が用いられ、一般には単糖からオリゴ糖の順に溶出します。また、移動相中の塩濃度をグラジエント法で変化させることで、他成分の一斉分析も可能となります。

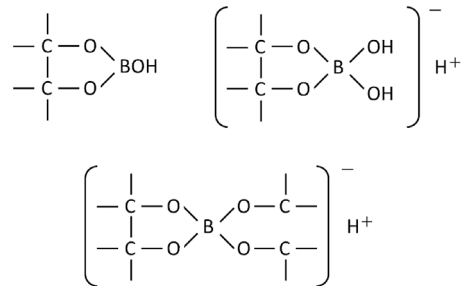


Fig. 4 ほう酸と糖の錯形成

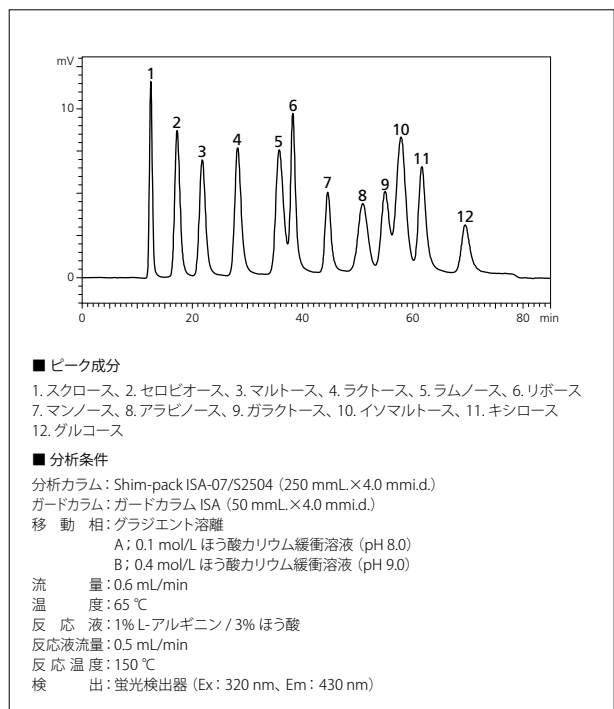


Fig. 5 陰イオン交換クロマトグラフィーによる糖類一斉分析の
クロマトグラム(ポストカラム法)

しかしながら、移動相として水酸化ナトリウムなど強アルカリ性水溶液を用いる必要があること、移動相溶液中での対象成分である糖類の安定性の問題など、いくつか課題があります。一方、糖類のようなポリヒドロキシ化合物は、ほう酸やほう酸塩と速やかに反応して、Fig. 4に示すような負電荷を持つ錯体を形成することが知られています^{7), 8)}。この性質を利用して移動相にほう酸塩緩衝液を用い、ほう酸との錯体を形成した糖分子を陰イオン交換法で分離することができます^{9)~13)}。この分離法は単糖同士、二糖同士の相互分離に優れた方法で、特に単糖同士の分離には他の分離モードでは得られない分離効果を発揮します。また、移動相中のほう酸塩濃度とpHをグラジエント法で変化させることで、単糖類やオリゴ糖を効率良く一斉分析することが可能です。Fig. 5にグラジエント法による多成分の一斉分析例を示します。本分離法は大変効率的である反面、分析時間は他の分離モードに比べて長く、ピークがブロードになり易いことが欠点です。

3. 糖の検出法

糖はその構造の特徴から、紫外吸光度検出では検出の選択性が高くない200 nm程度の短波長のみで検出できますが、移動相によるバックグラウンド吸収の影響をうけるため実用的とはいえません。

本項では Table 4 に示す糖の分析に用いる検出法について紹介します。

Table 4 糖の検出法とその特徴

検出法	感度	夾雑との選択性	定量精度
示差屈折率検出	△	×	◎
蛍光検出(誘導体化)	◎	○	○
蒸発光散乱検出(ELSD)	△	×	△
質量分析(LCMS)	○	◎	○

3-1. 示差屈折率検出

示差屈折率検出法は、移動相と試料成分との間に屈折率の差が生じる化合物を検出できる汎用の検出法で、糖類の検出法としても多用されています (Fig. 6)。Fig. 7 に示差屈折率検出法による糖類の高感度分析例を示します。

一方で、高い汎用性ゆえに検出の選択性は低いという短所もあります。特に夾雑成分が多い実試料分析の際には、夾雑成分と目的成分の分離が完全でないと成分の定量が困難となる場合があります。また、移動相それ自体の屈折率が変化しない、すなわち移動相組成が一定である必要性からグラジエント溶出法を用いることができず、親水性相互作用法や陰イオン交換法、ほう酸錯体陰イオン交換法などを分離モードに選択した場合には、その効果が十分発揮できない場合があります。

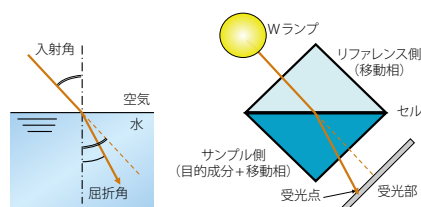


Fig. 6 示差屈折率検出器の原理

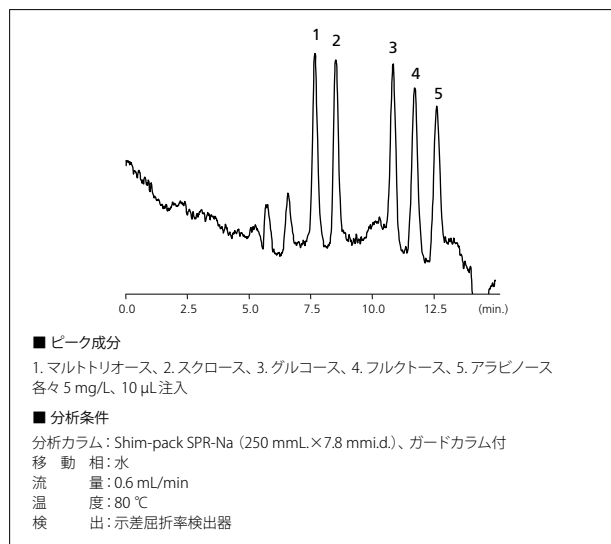


Fig. 7 示差屈折率検出器による糖類高感度分析

3-2. 蒸発光散乱検出器

蒸発光散乱検出器 (Evaporative Light Scattering Detector: ELSD) は、カラムからの溶出液を窒素などのネブライザガスとともに噴霧し移動相成分を蒸発除去することにより、分析対象成分の検出を可能にする検出器です。検出には分析対象成分により生じる散乱光を用いますので、UV吸収の無い糖、脂質などの分析に適しています。ELSDの原理図を Fig. 8 に示します。ELSDの検出原理は、1) 移動相成分の噴霧、2) 移動相成分の蒸発、3) 気化せず微粒子化した分析対象成分への光の照射、4) 散乱光の観測に大別されます。この原理からわかるように移動相成分は揮発性であり、かつ分析対象成分は移動相成分より難揮発性であることが必要となります。ELSDによる糖分析では、移動相として水あるいはアセトニトリルなどを用いる分配モードが好都合です。また、移動相成分を蒸発させるので、示差屈折率検出器では不可であったグラジエント溶出にも適用が可能です。このように、ELSDと分配モードによる分離と組み合わせることで、単糖からオリゴ糖まで幅広い範囲の分析が可能です。Fig. 9 に ELSD と示差屈折率検出器の双方の検出器によるクロマトグラムを示します。ELSDの方が感度的には示差屈折率検出器よりもやや優れている、溶媒などに由来するピークが現れにくいなどの特長があることがわかります。

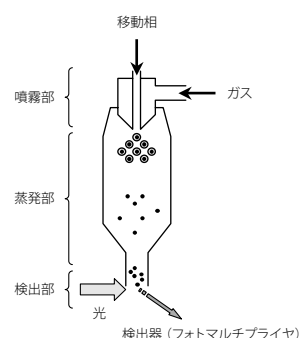


Fig. 8 蒸発光散乱検出器 (ELSD) の原理

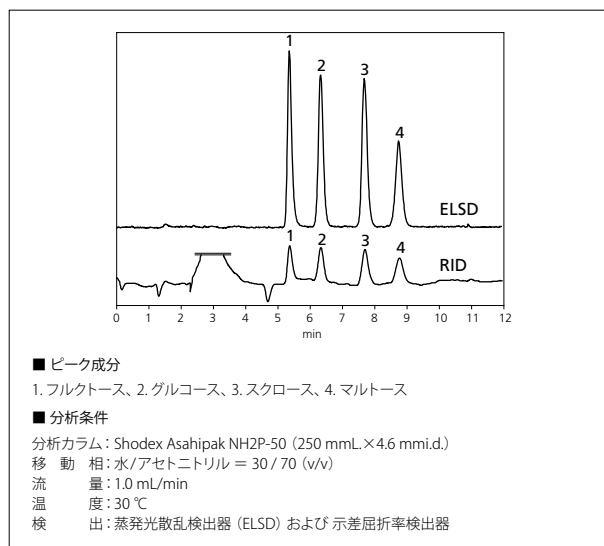


Fig. 9 蒸発光散乱検出器 (ELSD) および示差屈折率検出器 (RID) による糖類の分析

3-3. 誘導体化検出法

誘導体化検出法とは、分析対象成分を分析の直前あるいはカラムにより分離された直後などに、何らかの反応に基づき誘導体化し検出器に導入する方法です。検出の選択性を考慮すると蛍光検出法が良く用いられますので、この項では主に蛍光誘導体化法を中心に解説します。

蛍光検出法は発蛍光体を検出する方法であるため、感度および選択性に非常に優れた検出法です。糖類には発蛍光性がないため、蛍光検出法を用いる場合は糖分子の蛍光誘導体化が必要になります。

これまで、糖分析におけるさまざまな蛍光誘導体化試薬や誘導体化法が研究されてきました。誘導体化法は次のように「プレカラム誘導体化法」と「ポストカラム誘導体化法」に大別でき、それぞれに長所、短所があります。Fig. 10に「プレカラム誘導体化法」と「ポストカラム誘導体化法」のイメージ図を示します。

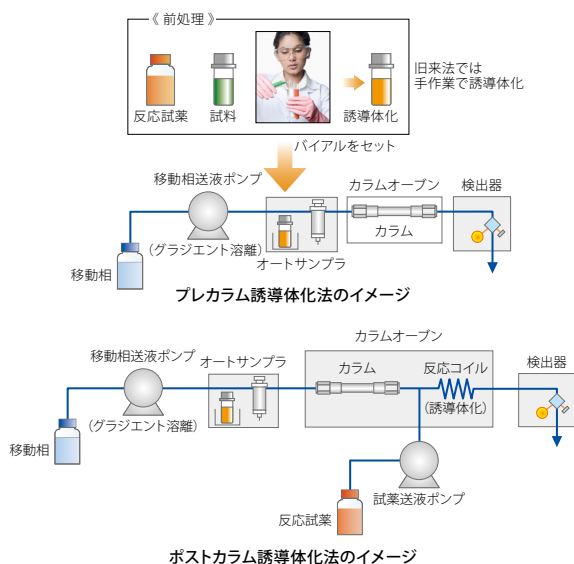


Fig. 10 誘導体化法の比較

1) プレカラム誘導体化法

試料と誘導体化試薬をあらかじめ反応させ、発蛍光体にしてからカラムに導入し、分離・検出する方法です。そのため分離および検出は、分析対象成分そのものではなく、誘導体生成物に対して行われます。糖たんぱく質の糖鎖構造解析などの領域では、pmolレベルの検出が可能な2-アミノピリジンを誘導体化試薬に用いるピリジルアミノ誘導体化法が広く用いられています^{14)~17)}。その他、誘導体化試薬としてダンシルヒドラジンをを用いる方法も知られています¹⁸⁾。プレカラム誘導体化法は、分析を行う前に個別に反応を行うため、分析条件の制約を受けることなく反応時間、温度あるいは試薬の種類などを容易に変更することが可能な自由度が高い標識法といえます。半面、試料マトリックスの影響、反応から分析までの待ち時間などを十分に考慮し、再現性が得られるような誘導体化条件を設定する必要があります。また、残存する未反応誘導体化試薬がカラムに保持されピークとして検出される場合があるため、未反応試薬の除去や詳細な分析条件検討が求められることがあります。

2) ポストカラム誘導体化法

試料をカラムで分離した後、分析対象成分を主としてオンラインにて誘導体化して検出する方法です。この場合、反応試薬がカラムの直後に溶出した対象成分と混合する様に連続的に加えられており、対象成分は分離後、順次蛍光誘導体化されます。誘導体化を行う段階では分析対象成分は分離されているので、試料マトリックスの誘導体化反応に対する影響はほとんどありません。また、ポストカラム法では分析の前処理段階での誘導体化は必要がなく、オンラインにて誘導体化を行うため、誘導体化反応から検出器までの時間が極めて短く、かつ一定となります。これらのことから一般に、プレカラム誘導体化法に比べてポストカラム誘導体化法の方が、再現性は良いとされています。半面、反応試薬が常時検出器に流入しているため、未反応誘導体化試薬はそれ自身が発蛍光性ではないか、誘導体化により励起あるいは蛍光波長が著しく変わるなど、検出におけるバックグラウンド蛍光を抑えた誘導体化試薬を選択する必要があるという欠点があります。また誘導体化反応は、移動相など分離条件も含めた検討が求められます。

古くから糖分析に対するポストカラム誘導体化試薬としてさまざまな試薬が報告されており、エチレンジアミン¹⁹⁾、エタノールアミン²⁰⁾、²¹⁾、2-シアノアセトアミド²²⁾、2-アミノプロピオニトリルフマレート²³⁾、タウリン-過ヨウ素酸²⁴⁾、*p*-メトキシベンズアミジン²⁵⁾、アルギニン²⁶⁾、²⁷⁾などが知られています。

以降、アルギニンを反応試薬に用いたポストカラム誘導体化による糖類の分析を中心に解説します。アルギニンを反応試薬としたポストカラム誘導体化検出法は、ほう酸存在下でアルギニンと糖を加熱反応すると、強い発蛍光性誘導体が生成される性質を利用したものです。対象となる糖類をそのまま分離するため、サイズ排除クロマトグラフィー、配位子交換クロマトグラフィー、親水性相互作用クロマトグラフィーなどの分離手法と組み合わせることができます。

島津製作所では、この検出法とほう酸錯体陰イオン交換クロマトグラフィーによる分離手法を組み合わせた還元糖分析アプリケーションを開発し、システムの最適化を行ってきました。「島津還元糖分析システム」では、グラジエント溶出法を用いることで単糖からオリゴ糖までの一斉分析が可能となり、また蛍光検出法を用いることで糖類の検出の感度、選択性の向上が期待できます。Fig. 11に島津還元糖分析システムの流路図を、Fig. 12にクロマトグラムを示します。本手法は主として還元糖を分析対象とした分析手法であるため、スクロースなどの非還元糖の感度は劣ります。スクロースの感度は同じ二糖のマルトースと比較して、反応液を個別送液する基本システムでは約10分の1程度、移動相に反応試薬を添加する兼用システムでは約100分の1から50分の1程度となります。

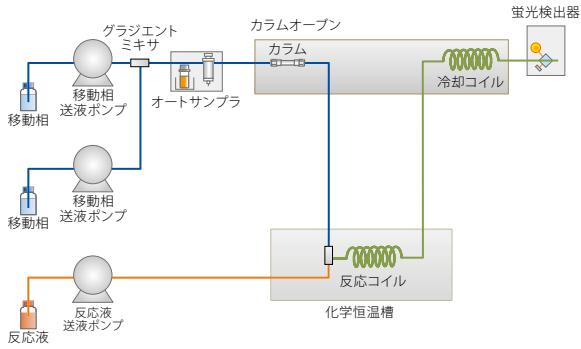


Fig. 11 島津還元糖分析システム流路図

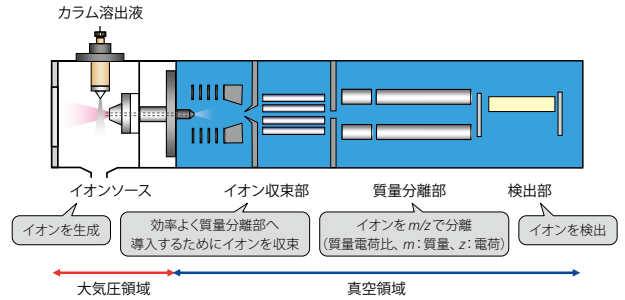


Fig. 13 LCMSの内部図

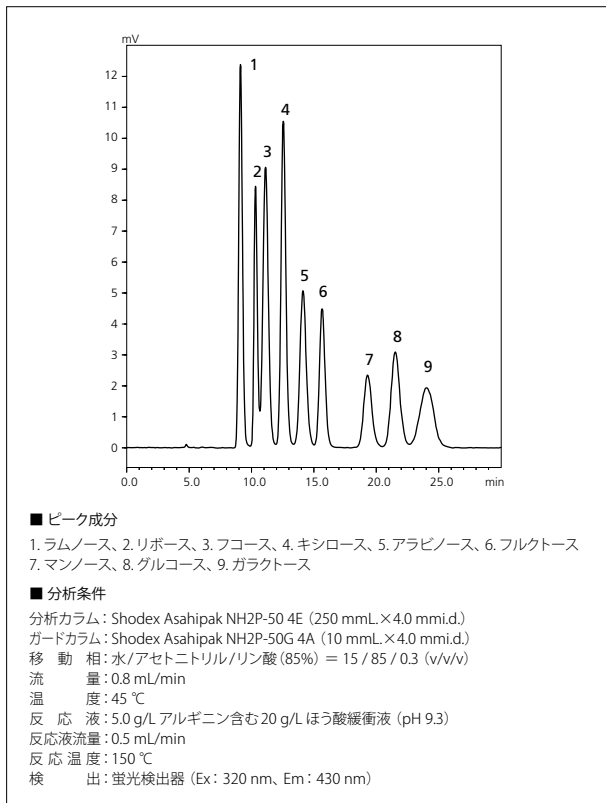


Fig. 12 親水性相互作用クロマトグラフィー法—
島津還元糖分析システムによる糖類の一斉分析

3-4. 質量分析法

液体クロマトグラフ質量分析計 (LCMS) は、カラムから溶出した成分をイオン化し、その成分の分子量 (m/z) を検出する方法です (Fig. 13)。LCMSは万能検出器とも呼ばれ、示差屈折率検出器やELSDと並んで、糖のような検出の選択性が低い化合物を誘導体化なしに検出することができます。特にLCMSは分子量 (m/z) によってクロマトグラムを得るため、夾雑成分との分離が不十分でも m/z が異なれば分離することができます。LCMSのイオン化には、電子スプレーイオン化法 (Electrical Spray Ionization: ESI) と大気圧化学イオン化法 (Atmospheric Pressure Chemical Ionization: APCI) の2つに大別されます。

- ESI法…高電圧を印加した細管から溶出した帯電している液滴に、高流量のガスを吹き付けて液滴を蒸発させ、対象成分をイオン化させる方法
- APCI法…試料溶媒由来の反応イオンと対象成分の分子との間で、イオン-分子反応を用いて、対象成分をイオン化する方法

高極性化合物のイオン化に適用されるESI法では、化合物は通常1価のイオンになります。しかし糖類の場合には、プロトン以外の複数のアダクトイオンが生成しやすく、使用する分析条件によっては検出感度や再現性に影響を与えることがあります。しかし、複数のアダクトイオンが生じることにより、未知の化合物の分子量が特定されやすくなるというメリットもあるため、定性分析に適用できるともいえます。

LCMSを糖の定量分析に用いるには、カラム分離後にポストカラムでクロロホルムを添加し、APCI法でハロゲン化したイオンを検出します。本法により生じるアダクトイオンの種類が減少し、高感度かつ再現性良く分析することが可能です。

Fig. 14に本法を適用し、シングル四重極型LCMSで糖類 (100 mg/L、1 μ L 注入) を一斉分析した例を示します。LCMSでの糖類の定量分析には本法は有力な選択肢の一つと成り得ますが、鎖長の長いオリゴ糖の中には感度が悪くなる成分もあります。

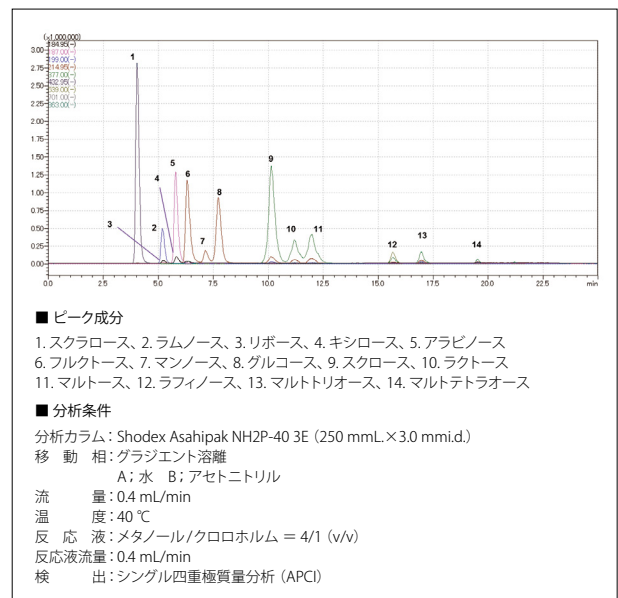


Fig. 14 LCMSによる糖類の一斉分析

4. 糖の分析例

ここでは、糖分析の代表的な分析例をご紹介します。

4-1. 飲料、嗜好品中の糖類の分析

糖類は、食品分野において重要な役割を果たす化合物です。糖を多く含む天然食品もあれば、糖を原料として製造される加工食品もあり、その存在形態もさまざまです。こうした食品中の糖含有量を知ることは、品質管理や栄養管理の面から大変重要な作業となります。

Fig. 15 に市販オレンジジュースの分析例を示します。果汁100%濃縮還元タイプ (Fig. 15a) とオレンジ味の清涼飲料水 (Fig. 15b) を比較すると、糖の含有量や比率が異なります。また、Fig. 16 にLCMSによって4種類の清涼飲料水を分析した例を示します。

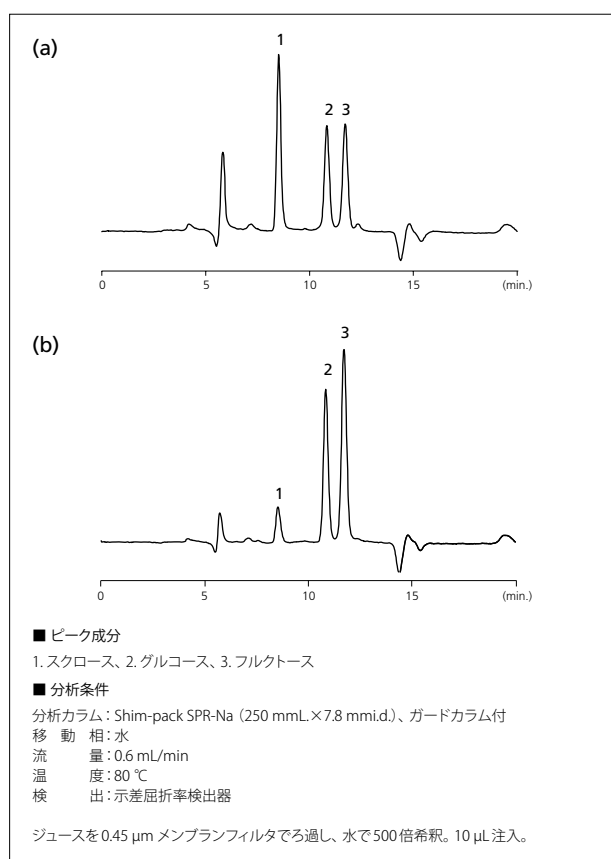


Fig. 15 オレンジジュース中の糖類の分析

4-2. 醸造食品中の糖類の分析

醸造食品にも糖が含まれていることが知られています。しかし醸造食品は一般的に夾雑成分が非常に多く、また糖の含有量はそれほど多くないため、示差屈折率検出器では定量が困難です。アルギニンを反応試薬とした島津還元糖分析システムは、夾雑成分の影響を極力抑えながら分析対象となる糖を高感度に検出できるため、醸造食品のような複雑なマトリックス中の糖類の分析にも適しています。Fig. 17 に日本酒中の糖を島津還元糖分析システムで一斉分析した例を示します。

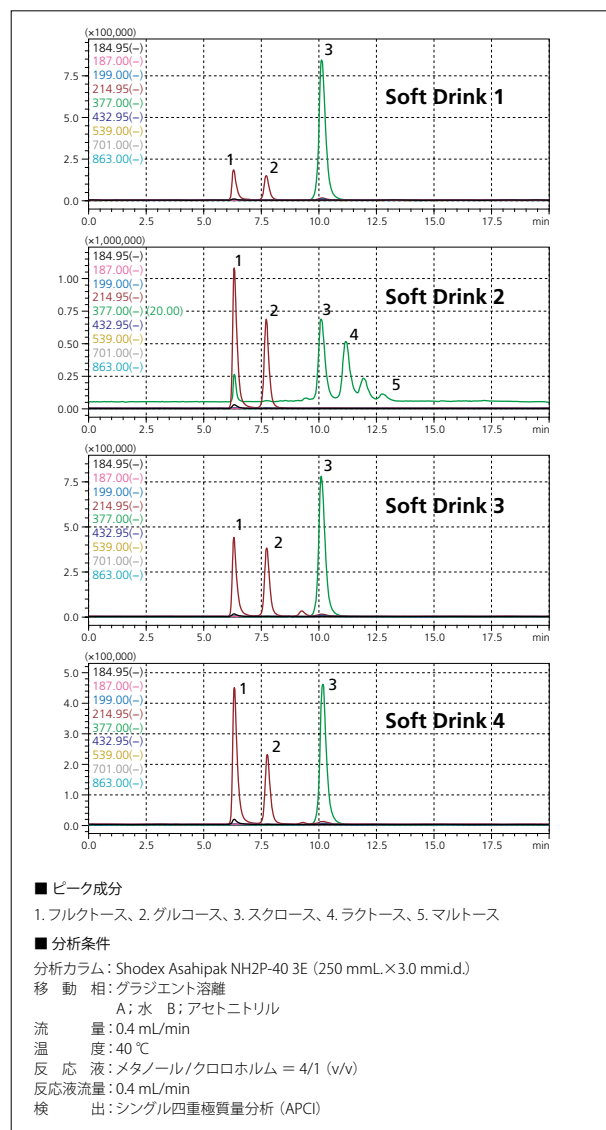


Fig. 16 清涼飲料水中の糖類の分析

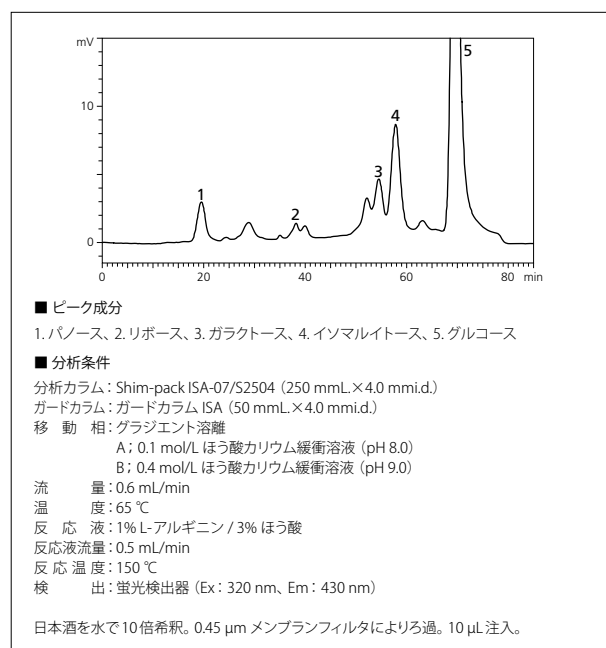


Fig. 17 日本酒中の糖類の分析

4-3. 糖アルコールの分析

キシリトールやソルビトールなどの糖アルコール類は、アルドースあるいはケトースのカルボニル基の還元により得られる鎖状の多価アルコールです。糖アルコール類は糖類と同様に光吸収性に乏しい物質であり、検出器として一般に示差屈折率検出器やELSDが用いられます。糖アルコールは、主にシュガーレス製品や低カロリー飲料などに用いられており、近年その消費量は増加傾向にあります。Fig. 18にシュガーレスキャンディー中の糖アルコールをELSDで分析した例を示します。なお、食品中の親水性の高い夾雑成分は親水性相互作用モードのカラムに強く保持されることから、一分析内にカラム洗浄工程を加えたグラジエント溶離を適用しています。

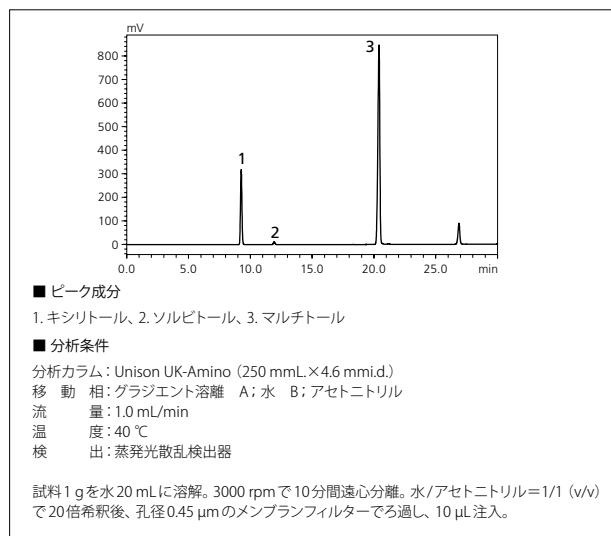


Fig. 18 シュガーレスキャンディー中の糖アルコールの分析

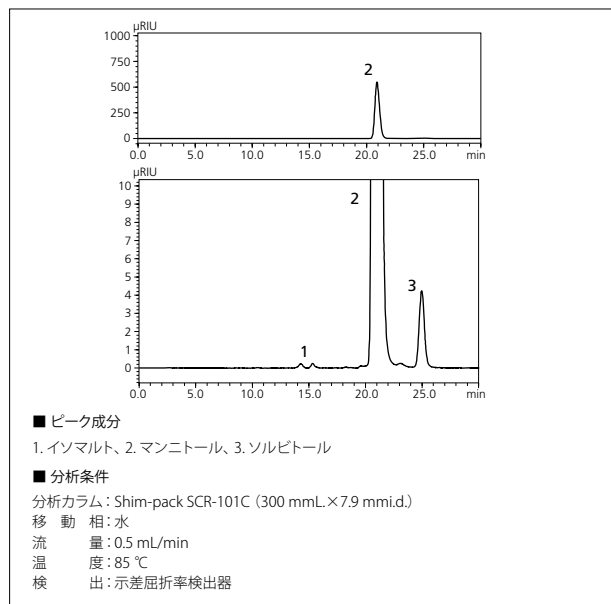


Fig. 19 医薬品賦形剤中のマンニトールの分析

また、マンニトールも糖アルコールの一種で低吸湿性、低反応性という特徴を持つため、医薬品の賦形剤として近年利用されています。2014年2月に告示された第十六改正日本薬局方第二追補にD-マンニトールの試験法が追加されました。この試験法において、マンニトールの定量法に示差屈折率検出器を用いたHPLC法が採用されています。Fig. 19に局方に記載されている試験法に準じてマンニトールを分析した例を示します。

HPLCを用いた糖類の分析について、分離、検出の両面から代表的な手法、原理および注意点などについて述べ、あわせて具体的な事例も紹介してきました。糖類の分析目的に応じて適切な分離法および検出法を選択しましょう。

参考文献

- [1] R. W. Goulding; *J. Chromatogr.*, 103, 229 (1975)
- [2] H. F. Walton; *Anal. Chem.*, 48 (5), 52R (1976)
- [3] H. F. Walton; *Ind. Eng. Chem. Res.*, 34, 2553 (1995)
- [4] R. Schwarzenbach; *J. Chromatogr. A*, 177 (1), 206 (1976)
- [5] S. A. Wise, W. E. May et al.; *Anal. Chem.*, 49 (14), 23068 (1977)
- [6] 阿武喜美子、瀬野信子; 糖化学の基礎、講談社サイエンスフィク (1984)
- [7] J. Boeseken; *Adv. Carbohyd. Chem.*, 4, 189 (1949)
- [8] N. Soh, K. Kitano & T. Imato; *Anal. Sci.*, 18, 1159 (2002)
- [9] J. X. Khym & L. P. Zill; *J. Am. Chem. Soc.*, 73, 2399 (1951)
- [10] J. X. Khym & L. P. Zill; *J. Am. Chem. Soc.*, 74, 2090 (1952)
- [11] J. X. Khym & W. E. Cohn; *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 1153 (1953)
- [12] L. P. Zill, J. X. Khym & G. M. Cheniae; *J. Am. Chem. Soc.*, 75, 1339 (1953)
- [13] Y. S. Ovodov; *Russ. Chem. Rev.*, 40 (4), 406 (1971)
- [14] S. Hase, T. Ikenaka & Y. Matsushima; *J. Biochem.*, 90 (2), 407 (1981)
- [15] N. Takahashi, S. Teijima et al.; *Biochemistry*, 26, 1137 (1987)
- [16] E. Tsuda, G. Kawanishi et al.; *Biochemistry*, 27, 5646 (1988)
- [17] R. Jefferis, N. Takahashi et al.; *Biochem. J.*, 268, 529 (1990)
- [18] W. F. Alpenfels; *Anal. Biochem.*, 114 (1), 153 (1981)
- [19] K. Mopper, H. P. Hansen et al.; *Anal. Chem.*, 52, 2018 (1980)
- [20] T. Kato & T. Kinoshita; *Anal. Biochem.*, 106 (1), 238 (1980)
- [21] 三上博久、石田泰夫; 島津評論, 37, 23 (1980)
- [22] S. Honda, S. Ganno et al.; *Anal. Chem.*, 52, 1079 (1980)
- [23] 加藤武彦、木下俊夫; 分析化学, 31, 615 (1982)
- [24] 加藤武彦、飯沼文夫、木下俊夫; 日本化学会誌, 1603 (1982)
- [25] 田村和彦、甲斐雅亮、大倉洋甫; 日本薬学会第105年会 (1985)
- [26] H. Mikami & Y. Ishida; *Bunseki Kagaku*, 32, 207 (1983)
- [27] 三上博久、石田泰夫; 島津評論, 40, 249 (1983)