

海藻多糖類の特性変化と金属類結合能 ——低分子アルギン酸ナトリウムのアルミニウムイオン結合能——

奥田 弘枝, 西田 あゆみ^{*1}, 中川 禎人^{*2}

(2005年10月8日 受理)

Relationship between Changes in Properties of Seaweed Polysaccharide and Metallic Ion Binding Capacity *in vitro* —— Aluminum Ion Binding Capacity of Low Molecular Weight Sodium Alginate ——

Hiroe OKUDA, Ayumi NISHIDA and Sadato NAKAGAWA

Abstract

The relationship between aluminum accumulated in the brain that has been absorbed through the intake of food and acknowledgment of the resulting syndrome has been reported.

Though there are differences in the levels of concentration, aluminum is included in food and intake or ingestion of eluted aluminum from aluminum tableware of food containers is a situation that cannot be avoided.

The possibility of removing aluminum from the body is being considered, because the alginate, a kind of seaweed polysaccharide which is found in large quantities in the combu fronds of brown alga, has the characteristic of combining with aluminum by the process of an ion exchange reaction allowing it to be discharged as waste from the body.

By processing and cooking combu fronds, a kind of seaweed polysaccharide, a low molecular weight of alginate is generated. It is predictable that generating a low molecular weight in such a process will influence the ion exchange. This study was conducted to review the influence on binding capacity through differences in concentration, reaction time, and the reaction temperature of aluminum nitrate and aluminum lactate using low molecular weight (Na-Alg) sodium alginate by the AOAC method.

The influence on reaction time at 0.1 M aluminum solution of Aluminum nitrate showed a binding rate of about 90% in 60 minutes. Aluminum lactate showed a binding rate of about 75% in 90 minutes.

The influence of reaction temperature on both aluminum solutions showed a binding rate of 90% to 100% at 70°C.

^{*1} 広島女学院大学大学院人間生活学研究科生活科学専攻

^{*2} 九州栄養福祉大学

Considering the influence of concentration on the aluminum solution, aluminum nitrate showed a binding rate of 80% at 0.02 M and aluminum lactate showed a binding rate of 60% at 0.05 M.

Key words: seaweed polysaccharide 海藻多糖類, low molecular weight sodium alginate 低分子アルギン酸ナトリウム, metallic ion binding capacity 金属イオン結合能, aluminum ion アルミニウムイオン

I 緒 言

昆布やひじき, わかめ等に存在するアルギン酸は, 海水中に含まれるさまざまな金属イオンと塩を形成し, ゆるやかなゼリー状態で細胞壁や細胞間隙に存在している。アルギン酸は, D-マンヌロン酸とL-グルクロン酸の2種のウロン酸を構成糖とする酸性高分子多糖(食物繊維)であり, 各ウロン酸ユニットが有するカルボキシル基はイオン交換性をもつ^{1,2,3,4,5)}。アルギン酸は, 水その他の溶媒には不溶であるが, 塩類とは粘ちような溶液(アルギン酸塩)を作り^{6,7)}, 多量の水を保持するため食物繊維として, 整腸剤^{8,9,10)}の働きがある。また, アルギン酸塩は分子のネットを作り, 摂取した食物中のコレステロールを包み込んで腸への吸収を妨げ, 結果として血液中のコレステロールを低下させる効果があり^{11,12,13)}, 更に消化管内 Na/K あるいは Na/Ca のイオン交換による血圧調整作用¹⁴⁾や, 種々の金属と不溶の塩を作ることにより, 重金属イオンによる体内汚染を防ぐ効果等が注目されている。

しかし, 褐藻類の加工・調理によって, アルギン酸の低分子化が生じる。特に, 昆布等は長時間加熱する佃煮や煮昆布等に加工・調理されることが多いため, このような過程での低分子化が食物繊維としての働きや, イオン交換にも影響があるものと推測される。一方, アルミニウム(以下, Al とする)は土壤中に多く存在するため, 植物などの食品自体や飲料水にある程度含まれており, また食品添加物(保存料, 着色料など)にも含まれている。更に, 食品加工や調理に用いられる機械, 調理器具や保存容器からの溶出も大きい。酸性条件下の加熱によって, アルミ鍋からは 100 ppm レベルの高濃度のアルミが溶出してくることが明らかになっている。これらの Al が体内に入り, 脳内に蓄積されると, 認知症状をはじめとする毒性を発現するという報告もあり, 近年, アルツハイマー病や透析認知症との関連性が注目されている^{15,16)}。そこで, アルギン酸が生体へのアルミニウム吸収を抑制することができれば, これらの認知症状の改善につながるとともに, 褐藻類は非常に低エネルギーで無機質, ビタミン類の含有量が高いことから, 健康食品, 機能性食品の素材としての利用効果が大いと考えられる。筆者らは, アルギン酸のアルミニウム結合能に注目し, アルギン酸はアルギン酸ナトリウム(Na-Alg)を用いて, アルミニウム溶液(硝酸アルミニウム, 乳酸アルミニウム)の濃度, 反応時間, 反応温度, pH の違いによる結合率への影響^{17,18,19)}を検討したが, 本研究では低分子化したア

ルギン酸について同様な研究を行ったので報告する。

II 実験方法

1. 実験材料と実験方法

ナトリウム型アルギン酸 (Na-Alg) は、分子量 $50,000 \pm 10,000$ の商品名ソルギン ((株)カイゲン製) を使用した。

アルミニウム反応試薬として、硝酸アルミニウム (片山化学工業(株)製, 特級) および乳酸アルミニウム (キシダ化学工業(株)製, 試験研究用) を用いた。

2. アルミニウム溶液への低分子アルギン酸の浸漬

1) アルミニウム溶液への浸漬時間

Na-Alg の 250 mg を、0.1 M 硝酸アルミニウムおよび 0.1 M 乳酸アルミニウム溶液 25 ml に 25°C で 0 分～90 分間浸漬した。

2) アルミニウム溶液への浸漬濃度

Na-Alg の 250 mg を、25°C に調整した 25 ml の 0 M ～0.5 M 硝酸アルミニウム溶液に 60 分間、および 0 M ～0.1 M 乳酸アルミニウム溶液に 90 分間浸漬した。

3) アルミニウム溶液への浸漬温度

Na-Alg の 250 mg を、15°C～90°C に調整した 0.02 M 硝酸アルミニウム溶液は 60 分間、0.05 M 乳酸アルミニウム溶液は 90 分間、それぞれ 25 ml 中に浸漬した。

4) アルミニウム溶液の pH

Na-Alg の 250 mg を、pH 3 ～ pH 7 に調整した 0.1 M 乳酸アルミニウム溶液 25 ml 中に 70°C で 90 分間浸漬した。

3. アルミニウムイオン結合能の測定法

硝酸アルミニウム溶液および乳酸アルミニウム溶液に低分子 Na-Alg を浸漬した場合、これらアルギン酸塩のイオン交換基であるカルボキシル基に結合するナトリウムが浸漬液中のアルミニウムイオンと交換する。浸漬前後の硝酸アルミニウム溶液および乳酸アルミニウム溶液のアルミニウム濃度を測定し、浸漬前のアルミニウム濃度と浸漬後のアルミニウム濃度の差を求めた。得られた値をアルギン酸塩が結合したアルミニウム量とみなした。浸漬液中のアルミニウム量の測定は AOAC 法に準じたアルミノン比色法²⁰⁾ を用いて行った。アルミニウム結合能は以下の式によって算出した。

$$\text{アルミニウムイオン結合能 (\%)} = \frac{B-C}{A} \times 100$$

ここで A: 低分子 Na-Alg の総アルミニウムイオン交換容量 (mg)

B: 浸漬前の硝酸アルミニウム溶液および乳酸アルミニウム溶液中のアルミニウム量 (mg)

C: 浸漬後の硝酸アルミニウム溶液および乳酸アルミニウム溶液中のアルミニウム量 (mg)

Na-Alg の総アルミニウムイオン交換容量は、文献値²¹⁾ の 5.35 ミリグラム等量/g を基に算出した。

Ⅲ 実験結果および考察

1. 低分子アルギン酸ナトリウム (Na-Alg) のアルミニウム結合能に及ぼす浸漬時間の影響
アルギン酸は弱酸性イオン交換体に属することから²¹⁾, アルギン酸がイオン交換の対象とするアルミニウムが強酸塩で存在するか, 弱酸塩で存在するかでイオン交換能に違いがあるのではないかと推測される。そのため, アルミニウムの強酸塩として硝酸アルミニウムを, 弱酸塩として乳酸アルミニウムをとりあげた。

低分子 Na-Alg を, 0.1 M 硝酸アルミニウム, および 0.1 M 乳酸アルミニウム溶液に 25°C で浸漬した場合のアルギン酸のアルミニウムイオン結合能の時間的変化を図 1 に示した。

低分子 Na-Alg を, 0.1 M 硝酸アルミニウムのアルミニウムイオン結合率に及ぼす経時的影響は, 浸漬後 5 分~10 分で急増した。10 分で最も結合率が高くなり約 90% に達した。浸漬 30 分で 80% まで低下するが, 60 分で再び 90% まで上昇し, 90 分で 80% まで低下する。浸漬後 10 分以降は, 約 80%~90% の結合率を保つといえる。

硝酸アルミニウム反応液の pH は, 浸漬 1 分から 90 分の間 pH 3.0~ pH 2.9 であった (図 1)。

低分子 Na-Alg と乳酸アルミニウムのアルミニウムイオン結合率に及ぼす経時的影響は, 1 分で約 9% で徐々に上昇し, 10 分では約 20% に達し, 平衡状態を保った。その後, 30 分から再び上昇しはじめ, 90 分で最大の結合率となり, 約 75% となった。

乳酸アルミニウム反応液の pH は, 浸漬 1 分から 90 分の間 pH 3.9 で, 硝酸アルミニウム反応液より pH が高かった。

硝酸アルミニウムの場合, 10 分もあればほぼ平衡に達することが分かった。乳酸アルミニウムは最大結合率に達するのに約 90 分を要した。浸漬時間の経過に従って図 1 に示したように

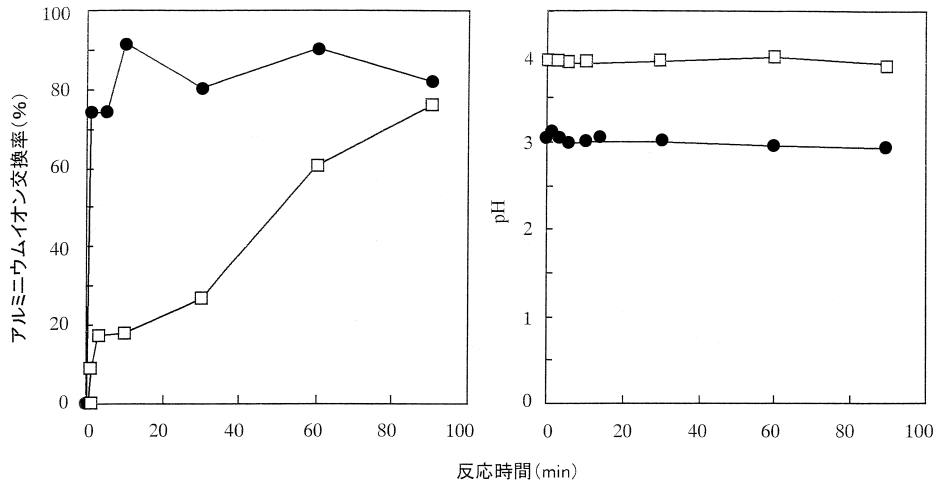


図1 低分子化アルギン酸ナトリウムのアルミニウムイオン結合能に及ぼす浸漬時間の影響および反応液のpH変化

浸漬液：硝酸アルミニウム (●) 乳酸アルミニウム (□)

浸漬液濃度：0.1 M

浸漬温度：25°C

乳酸アルミニウム反応液における場合よりも、硝酸アルミニウム反応液における方がアルミニウム結合率が高くなった。これは硝酸アルミニウム反応液に浸漬後のpHが乳酸アルミニウムの場合より1以上低いことから、硝酸アルミニウム反応液における方が非解離型アルギン酸の比率が大きいと考えられるが、3価のアルミニウムイオンと1価のナトリウムイオンの交換性がより酸性下で大きくなるためと考えられる。

低分子 Na-Alg と高分子 Na-Alg¹⁹⁾ を同一条件で硝酸アルミニウム及び乳酸アルミニウム反応液に浸漬した場合のアルギン酸のアルミニウムイオン結合能の時間的変化を比較してみると、高分子 Na-Alg における硝酸アルミニウム反応液の場合は、5分～10分で結合率が急激で約80%まで上昇し、その後徐々に低下して、90分後には約50%まで低下した。低分子の場合は高分子と異なり、浸漬後、10分以降は80%～90%の結合率の平衡状態が保たれ、結合率も低分子の方が約10%高かった。乳酸アルミニウム反応液は高分子 Na-Alg の場合、5分までの結合率が急激に上昇し約80%に達したが、その後は30分にかけて低下し、30分以降は再び上昇し、90分で最も結合率が高く、約90%となった。低分子と高分子を比較すると、結合率の経時的変化の点では異なるが、両アルミニウムとも最大結合率は約80%～90%であった。

高分子 Na-Alg での硝酸アルミニウム反応液のpHは、浸漬開始前ではpH 2.9であったが浸漬3分後にはpH 2.7に低下し、その後はほとんど変化しなかった¹⁹⁾。乳酸アルミニウム反応液の場合、浸漬開始前はpH 3.7であったが、その後、浸漬90分までほとんど変化がみられな

かった。浸漬液の pH は低分子, 高分子に大きな違いはみられなかった。

2. 低分子アルギン酸ナトリウム (Na-Alg) のアルミニウム結合能に及ぼす濃度の影響

低分子 Na-Alg と硝酸アルミニウム反応液の場合は 0 M ~0.2 M 溶液に, 乳酸アルミニウム反応液の場合は, 溶解性が小さいため 0 M ~0.1 M 溶液にそれぞれ25°Cで60分間浸漬した。アルギン酸のアルミニウムイオンに対する結合率の変化を図2に示した。

低分子 Na-Alg と硝酸アルミニウムのアルミニウムイオン結合率に及ぼす濃度の影響は, 0.005 M ~0.02 M と濃度が高くなるに従い, 結合率が上昇し, 0.02 M で最も結合率が高くなり, 約75%に達した。その後は濃度が 0.05 M ~0.5 M と高くなるに従い, 緩やかに60%まで低下し, 0.2 M からは平衡状態となった。

硝酸アルミニウム反応液の pH は, 0.005 M では pH 4.9 であったが, 濃度が高くなるに従って降下し, 0.5 M では pH 2.3 となった (図2)。

低分子 Na-Alg と乳酸アルミニウムの硝酸及び乳酸アルミニウムイオン結合率に及ぼす濃度の影響は, 0.005 M では結合率は約7%であったが0.01 M ~0.05 M と濃度が高くなるに従い徐々に上昇し, 0.05 M では最も高くなり約65%となった。その後, 0.1 M でやや低下した。

乳酸アルミニウム反応液の pH は 0.005 M で pH 4.7 であったが, 0.1 M では pH 3.9 となり, 濃度が上昇するほど pH は低下した (図2)。

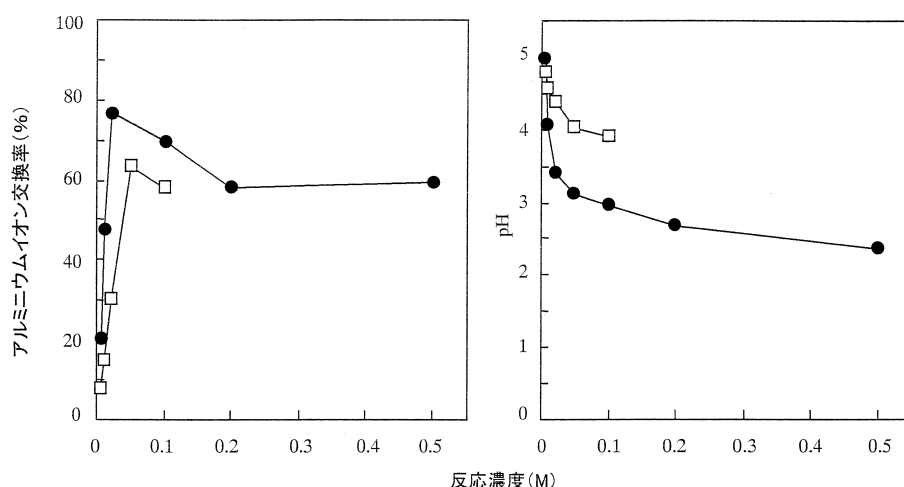


図2 低分子化アルギン酸ナトリウムのアルミニウムイオン結合能に及ぼす浸漬濃度の影響および反応液の pH 変化

浸漬液: 硝酸アルミニウム (—●—) 乳酸アルミニウム (—□—)

浸漬液濃度: 0.1 M

浸漬温度: 25°C

低分子 Na-Alg のアルミニウムイオン結合率に及ぼすアルミニウム濃度の影響をみると、アルミニウム濃度の増加 (0.005 M ~0.02 M) に従ってアルミニウム結合率が増加した。硝酸アルミニウムは 0.05 M ~0.5 M ではほぼ平衡に達し、乳酸アルミニウムの場合は 0.1 M で低下した。両アルミニウムの最大結合率は約65%~75%であった。

低分子 Na-Alg と高分子 Na-Alg¹⁹⁾ について、アルミニウムイオン結合能の濃度の影響を比較してみると、高分子 Na-Alg の硝酸アルミニウムの場合は 0.005 M ~0.05 M 濃度で急増して約70%に達し、それ以上の濃度になると、結合率の増加はややゆるやかになり、0.2 M で90%になった。低分子よりも高分子の方が最大結合率が約15%高かった。高分子 Na-Alg での乳酸アルミニウム反応液の場合は、0.005 M ~0.05 M 濃度で急増して約55%に達した。それ以上の濃度になると結合率の増加はややゆるやかになり、0.1 M で80%になった。低分子と高分子を比較してみると 0.005 M ~0.05 M までの結合率の急増は両反応液とも類似していたが、最大結合率は高分子の方が約15%高かった。

高分子 Na-Alg での硝酸アルミニウム反応液の pH 変化をみると、0.005 M では pH 4.3 であったが、浸漬濃度が高くなるに従って降下し、0.2 M では pH 2.8 に低下した¹⁹⁾。乳酸アルミニウムの場合、0.005 M では pH 4.7 であったが、0.1 M では pH 3.8 に低下した。硝酸アルミニウムは、低分子と高分子の反応液に多少 pH に違いがみられたものの大きな違いではなかった。乳酸アルミニウムでは、低分子と高分子の反応液にほとんど違いはみられなかった。

3. 低分子アルギン酸ナトリウム (Na-Alg) のアルミニウム結合能に及ぼす温度の影響

低分子 Na-Alg を 0.02 M 硝酸アルミニウム反応液および 0.05 M 乳酸アルミニウム反応液に 15°C~90°C、硝酸アルミニウムは60分、乳酸アルミニウムは90分浸漬した場合の各アルギン酸のアルミニウムイオン結合能の変化を図3に示した。

低分子 Na-Alg と硝酸アルミニウムのアルミニウムイオン結合率に及ぼす温度の影響は、温度が高くなるに従い結合率が50°Cで80%に上昇し、70°C では最も結合率が高く約85%に達した。その後、浸漬温度が90°C に上がると結合率がやや低下し80%になったが、50°C~90°Cにかけてほぼ平衡状態と言える。

硝酸アルミニウム反応液の pH は、15°Cで pH 3.4 であったが、50°Cで pH 3.1、90°Cでも pH 3.1 と、ほとんど変化がみられなかった。

低分子 Na-Alg と乳酸アルミニウムのアルミニウムイオン結合率に及ぼす温度の影響は、15°Cで結合率が約50%であった。浸漬温度が高くなるに従い結合率が高くなり、70°Cでピークに達し約100%となり、90°Cまでほぼ平衡状態であった。

乳酸アルミニウム反応液の pH は、15°Cから90°Cにかけて pH 4.0 で変化がみられなかった。

低分子 Na-Alg のアルミニウムイオン結合率に及ぼす反応液の温度の影響をみると (図3), 浸漬温度が高くなるに従い硝酸及び乳酸アルミニウムともに結合率が増加し, 特に乳酸アルミニウムの増加率が大きかった。最大結合率は硝酸アルミニウムで約85%, 乳酸アルミニウムで約100%であった。このように硝酸アルミニウムの方が乳酸アルミニウムよりも結合率が低い理由として前述したように, 硝酸アルミニウムの浸漬の方が pH が低いことから, 浸漬中に Na-Alg の加水分解が生じたために結合率が低下したことが要因と考えられる。

低分子 Na-Alg と高分子 Na-Alg¹⁹⁾ についてアルミニウムイオン結合能の温度の影響を比較してみると, 高分子 Na-Alg と硝酸アルミニウムの結合能は浸漬温度が高くなるに従い, わずかではあるが増加する傾向が認められ, 90°Cでは最高結合率の約70%に達した。最高結合率は低分子の方が高分子より約15%高かった。高分子 Na-Alg と乳酸アルミニウムの結合率は, 浸漬温度が高くなるに従い, 徐々に大きくなる傾向が認められた。15°Cで約60%, 50°Cで75%, 90°Cで最高結合率の85%に達した。低分子及び高分子ともに温度上昇とともに結合率が増加する共通の傾向がみられた。低分子の方が高分子よりも高い結合能であった。

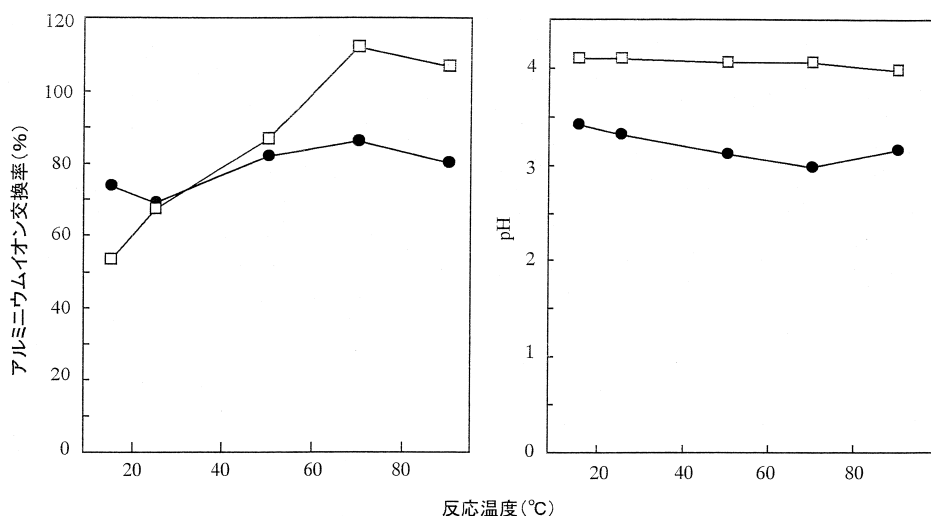


図3 低分子化アルギン酸ナトリウムのアルミニウムイオン結合能に及ぼす浸漬温度の影響および反応液の pH 変化

浸漬液: 硝酸アルミニウム (—●—) 乳酸アルミニウム (—□—)

浸漬液濃度: 0.1 M

4. 低分子アルギン酸ナトリウム (Na-Alg) のアルミニウム結合能に及ぼす pH の影響

低分子 Na-Alg を 0.05 M 乳酸アルミニウム溶液に pH 3 ~ pH 7 で 70°C で 90 分間浸漬した場合のアルミニウム結合率の変化を図 4 に示した。

硝酸アルミニウムのアルミニウムの結合能に及ぼす pH の影響は、硝酸アルミニウムに pH を調整するためのトリス緩衝液を反応液に加えたところ、コロイドの生成による白濁現象が生じ、測定が不可能となった。この現象はアルミニウム塩にアルカリ溶液を加えるとコロイド状沈殿物を形成するという報告²²⁾を裏づけるものとなった。

低分子 Na-Alg と乳酸アルミニウムのアルミニウムイオン結合率に及ぼす pH の影響は、pH 3 では結合率が約80%であったが pH 4 で最大結合率の100%に達した。その後、pH が高くなるに従い pH 5、pH 6 で約80%~90%、pH 7 で50%まで低下する M 字型を描いた。

高分子 Na-Alg での乳酸アルミニウム反応液でのアルミニウムイオン結合率の変化をみると¹⁹⁾、pH 5 におけるアルミニウムイオン結合率を最小とする下に凸の曲線を描いて変化した。

低分子 Na-Alg と高分子 Na-Alg¹⁹⁾ について乳酸アルミニウムのアルミニウムイオン結合能への pH 変化の影響は、低分子及び高分子ともに弱酸性領域 (pH 5) でのアルミニウムイオン結合率が小さくなる傾向が認められた。

Na-Alg のアルミニウム結合能に及ぼす pH の影響については、トリス緩衝液添加によるコロイド生成の影響等も考えられることから、今後さらに検討を要する。

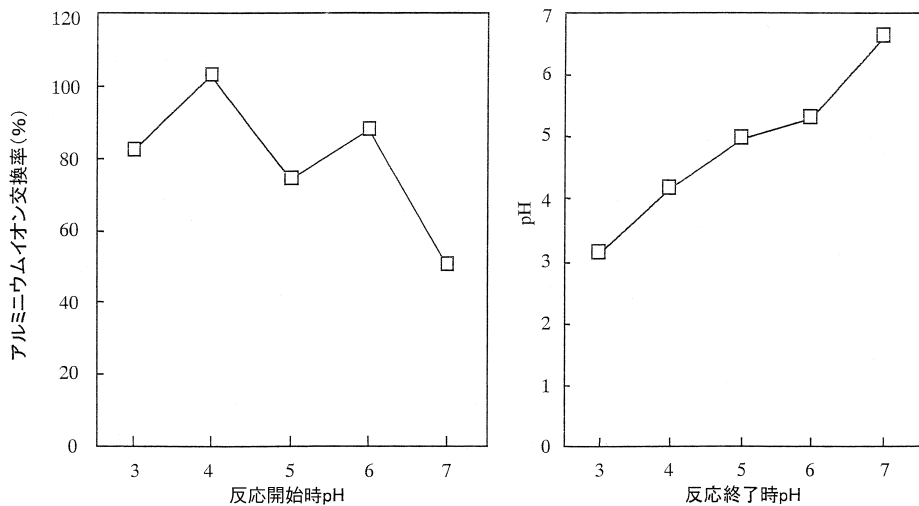


図4 低分子化アルギン酸ナトリウムのアルミニウムイオン結合能に及ぼす浸漬 pH の影響および反応液 pH の変化

浸漬液：乳酸アルミニウム

浸漬液濃度：0.1 M

浸漬温度：25°C

IV 要 約

低分子アルギン酸 (Na-Alg) を用いて, 硝酸アルミニウム及び乳酸アルミニウムとの結合能について, 浸漬時間, 濃度, 温度及び pH を変化させた場合の影響を検討した。

1. 時間の影響は, 硝酸アルミニウム浸漬液では数分のうちにアルミニウム結合率が増加し, 平衡に達した。乳酸アルミニウムのアルミニウム結合率は徐々に上昇後, 90分で最も高くなった。最大の結合率は硝酸アルミニウムで約90%, 乳酸アルミニウムで約75%であった。
2. 濃度の影響は, 硝酸及び乳酸アルミニウムともに濃度が高くなるに従いアルミニウム結合率が上昇した。最大の結合率は硝酸アルミニウムで約75%, 乳酸アルミニウムで約60%であった。
3. 温度の影響は, 浸漬温度が高くなるに従い, 硝酸及び乳酸アルミニウムともに結合率が増加した。硝酸アルミニウムでは50°C以上でほぼ平衡状態となり, 乳酸アルミニウムでは70°C以上で平衡状態に達した。最大の結合率は硝酸アルミニウムで約85%, 乳酸アルミニウムで約100%であった。弱酸型アルミニウム塩である乳酸アルミニウム反応液における方が, 強酸型アルミニウム塩である硝酸アルミニウム反応液よりも結合率が大きかった。これは高分子 Na-Alg についても同じ結果¹⁹⁾ が得られている。
4. pH の影響は, 低分子 Na-Alg の乳酸アルミニウムに対するアルミニウム結合率は pH 4 で最大の約100%となった。

本研究を行うにあたり, 実験の一部に対してご協力を頂いた古田礼香さん, 岡森寿子さん, 坂本愛さん及び更井薫さんに感謝の意を表します。

文 献

- 1) 受田浩之, 飯田倫子, 沢村正義, 楠瀬博三: 日本食品科学工学会誌, **43**(5), 107-111 (1996)
- 2) 中村照夫: フードリサーチ, 76-79 (1996)
- 3) 西沢一俊: フレグランスジャーナル, **73**, 100-105 (1985)
- 4) 辻 啓介, 中川靖枝, 市川富夫: 日本家政学会誌, **44**(1), 3-9 (1993)
- 5) 笠原文善: 藻類 Jap. J. Phycol. (Sorui) **46**: 173-178 (1998)
- 6) 土屋靖彦: 水産化学 399-412, 恒星社厚生閣, 東京 (1985)
- 7) 小原哲次郎, 細谷憲生: 簡明食事林, 41, 樹村房, 東京 (1985)
- 8) 松田清司: 月刊フードケミカル **3**, 41-44 (1989)
- 9) C. Nisiyama, & T. Tano: Agric. Biol. Chem., **55**(3), 797-802 (1991)

- 10) C. Nisiyama, & T. Tano: *Biosuci. Biotech. Blochem.*, **56**(7), 1100-1103 (1992)
- 11) 辻 啓介, 大島寿美子, 松崎悦子, 中村敦子, 印南 敏, 手塚朋道, 鈴木慎次郎: *栄養学雑誌*, **26**, 113-122 (1968)
- 12) 木村哲寛, 高橋恵子, 上田善継, 小比賀秀樹, 小林良生, 辻 啓介: *日本農芸科学雑誌*, **67**(8), 13-19 (1993)
- 13) 辻 啓介, 辻 悦子, 鈴木慎次郎: *栄養学雑誌*, **32**(4), 155-160 (1974)
- 14) 辻 啓介, 辻 悦子, 中川靖枝, 鈴木慎次郎: *日本家政学会誌*, **39**(3), 187-195 (1998)
- 15) 川原正博, 黒田洋一郎: *季刊化学総説*, **27**, 107-119 (1995)
- 16) 内田博之, 永井正規: *日本公衛誌*, **44**(9), 671-679 (1997)
- 17) 奥田弘枝, 中川禎人: *広島女学院大学生生活科学部紀要*, 第9号, 59-69 (2002)
- 18) 奥田弘枝, 中川禎人, 藤田 梢, 竹内歌苗, 柄本照美: *広島女学院大学論集*, 第54集, 97-106 (2004)
- 19) 中川禎人, 奥田弘枝: *九州栄養福祉大学研究紀要*, **1**, 69-81 (2004)
- 20) AOAC International, 「AOAC Official Methods of Analysis」, 16th edition, 4 th Revishion, vol 1, Chapter, pp. 7 (1995)
- 21) 高橋武雄, 江村悟: *工業化学雑誌*, **63**(6), 1022-1024 (1960)
- 22) 大木道則, 大沢利明, 田中元治, 千原英昭: *科学辞典*, (1994)