

市販コレステロールの 純度およびその精製

東京女子医科大学学生化学教室 (主任 松村義寛教授)

星 合 之 代
ホシ アヱ ノキ ヲ

(受付 昭和42年4月28日)

The Purity of Commercial Cholesterol and its Purification Method

Yukiyo HOSHIAI, M.D.

Department of Biochemistry (Prof. Y. Matsumura, Chief),
Tokyo Women's Medical College

The value of cholesterol concentration in serum which has an important meaning in diagnosis can be determined by the colorimetric method.

The standard solution of commercial cholesterol which is used in determination with five grades of purity developed considerably different value upon comparison with the melting point, coloration, ultra-violet absorption curves and thin layer chromatography.

By means of thin layer chromatography, acetone: chloroform (50:50) was found as suitable solvent for purification in column chromatography. Also testing of the purification of the solvent was done by means of the silica-gel column chromatography method and 2,4 dinitrophenylhydrazine (DNPH) purification method. After observing the changes in the ultra-violet absorption curves, coloration and melting point which accompany the purification process, the DNPH method had the lowest recovery and in comparison with the conventional purification method, it was found to be the most simple and with the best results.

The value of serum cholesterol concentration might be different due to the purity of the standard solution of the commercial cholesterol, which shows various differences in grade, so attention must be paid for the preparation of standard solution using commercial cholesterol.

I. 緒 言

動脈硬化症を始めとして、肝、甲状腺疾患、ネフローゼ、糖尿病等において、血清コレステロール値の測定は診断上重要な意義を持つている^{1)~5)}。そしてこの測定は、主として種々の比色法によつており^{6)~9)}、その場合通常市販コレステロールを用いて規準溶液をつくり、これと検体との呈

色度を比較して、検体中のコレステロール値を決定している。しかしはたして市販コレステロールがすべて均一な発色度を示すか否か、換言すれば市販製品の純度について疑問を抱き、5種の市販コレステロールについてその純度を融点測定、呈色反応における発色度、紫外部吸収曲線、および薄層クロマトグラフィーにより比較したところ、

きわめて区々な値を得た。著者はすでにエタノール、エタノールアセトン混液、エタノール・ベンゼン混液を用いた再結晶精製法、およびエタノールと NaOH 溶液を用いた加水分解精製法によって市販コレステロールを精製し、その過程について報告したが¹⁰⁾、今回はカラムクロマトグラフィーによる精製法、および著者が稲山誠一薬学博士（慶応大学医学部薬化学研究所）の御助力を得て考案した、市販コレステロールに含まれる不純物の大部分と推定される keto 化合物を 2,4-dinitrophenylhydrazone として取り除く方法により精製し、精製過程における発色度、融点、クロマトグラム、紫外外部吸収曲線の変化を観察したので報告する。

II. 実験方法

1. 発色度測定法 (Zak-Henly 変法)⁸⁾

84mg dl 塩化第二鉄水酢酸溶液 3 ml, 0.01% コレステロール水酢酸溶液 1 ml, 濃硫酸 2 ml を室温で混和し, 30 分後日立 EPO-B 型光電光度計を用い, 波長 550m μ , (フィルター No. 55) で吸光度を測定した。盲検としては, コレステロール液のかわりに水酢酸液 1 ml を用いた混合液を使用した。

2. 融点測定法

日本薬局法^{11a)}, 生物化学実験法^{11b)} に準じた。長さ約 1 cm, 内径 0.8~1.2mm, 厚さ 0.2~0.3mm の毛細管の 1 端を閉じ, 試料をよく磨砕して微細の粉末とし, 毛細管に約 1 cm つめる。測定管に毛細管をいれ, 予期の融点より 30°C 低い温度まで加熱し, 以後 1 分間に 3°C の割合で 9 分間加熱, 温度上昇を続け, 引続き 1 分間に 1°C の割合で加熱, 温度を上昇せしめる。試料の毛細管に接した部分が一樣に崩潰液化し, つづいて全部が完全に液化した時の温度を融点とした。

3. 紫外外部吸収曲線測定法

0.02% コレステロールメタノール溶液をつくり, EPS-2 U 日立自記分光光度計で 210m μ ~ 360m μ の間の吸収曲線をメタノールを対照として測定した。

4. 薄層クロマトグラフィー

吸着剤は Kieselgel G (Gips 13% Merck 製品) を使用して, 厚さ 250 μ の薄層をつくり, 室温で展開を行なった¹²⁾。展開溶媒, 展開方法, 時間は第 2 表に示した。試料として 0.3% コレステロール・ベンゼン液を 0.01 ml, 展開距離は 10cm, 発色試薬は重クロム酸硫酸混液,

噴霧後 70°C で 10 分間加熱し, 紫外線ランプ (波長 2536 Å) 下でスポットの検索を行なった。

5. カラムクロマトグラフィー

100メッシュのケイ酸 (Mallinckrodt 製品) 15 g をカラム (1.5×10cm) につめたのち, 試料 (市販コレステロール No. 5) を 0.2% コレステロールクロホルム液にして, 15ml および 30ml をカラム上に添加, クロホルム: ムアセトン (30:70) (第 6 図), およびクロホルム: アセトン (50:50) (第 8 図) を用い 1.2ml/分の流速で溶出し, 溶出液は, 10ml (第 6 図), および 5 ml (第 8 図) ずつフラクションコレクターで捕集し, 減圧デシケーターの中で乾燥した後, それぞれ重量, 発色度, 紫外外部吸収曲線の測定を行なった。

6. 2,4-dinitrophenylhydrazine による精製法

2,4-dinitrophenylhydrazine (以下 DNPH と略す) 500mg に 95% エタノール 50ml を加え, 加温しながら溶解し, $\frac{1}{10}$ N 硫酸を加え pH 4.0 にする。一方コレステロール 1 g に 95% エタノール 50ml を加え, 加温溶解する。室温で両者を混和し, これに蒸留水約 500ml を加え振盪濾過する。濾液を捨て, 残渣を室温で乾かし, さらにデシケーター中で完全に乾燥する。ついで石油エーテルで抽出後, 石油エーテルを留去し, なるべく少量のベンゼンに溶解し, これを 100メッシュのケイ酸 (Mallinckrodt 製品) をつめたカラム (1×20cm) に添加し, ベンゼンで溶出させコレステロールを着色物質から分離して乾燥し, 精製コレステロールを得た。

コレステロールの精製は, 一般に Dibromide¹³⁾ 精製法によつて精度の高い純化が行なわれているが, 操作がかなり困難であるため, 著者はこの方法によつて精製された融点 147.3°C の純品の分与を得て, これをすべての実験の標準品として使用した。

III. 実験成績

1. 発色度と融点の関係

コレステロールの融点は, 文献記載によれば 148.5°C¹⁴⁾ であるが, 第 1 表にみられるように 5 種試料中最高は 146.7°C, 最低は 117.5°C で, 発色度 (Zak-Henly 変法により測定した吸光度) は最高 0.318, 最低 0.079 という値を示し, 融点の高いものほど発色度の大きくなる傾向が認められた。

Dibromide 精製法によつて得た標準コレステロールの純度を 100 とすれば, 5 種試料中最高は 98.8, 最低は 24.5 の純度で, これにより市販コレ

第1表 市販コレステロール5種の発色度と融点

番号	* 発色度	融点 (°C)	純度 (%)
1	0.293	144.5	91.0
2	0.079	117.5	24.5
3	0.289	142.5	89.8
4	0.318	146.7	98.8
5	0.227	139.5	70.5
**S	0.322	147.3	100.0

* 発色度: Zak-Henly 変法により測定した吸光度

** S: Dibromide 法精製による標準コレステロール

ステロールの純度がいかに不均一であるかが想像される。

2. 紫外外部吸収曲線と薄層クロマトグラムの関係

通常市販コレステロール中に含まれる不純物としては, cholestanol, 7-oxysterol, Δ^7 -cholestanol, 7-dehydrocholesterol, 7-ketocholesterol などが報告されている^{14)~17)}。第1図では, Δ^7 -dehydrocholesterol の存在を示す272m μ の吸収の極大

(λ max) は認められず, 237m μ に顕著な吸収をしめすのがみられるが, これは 7-ketocholesterol であろうと思われる。そして 237m μ で吸収の大きな試料ほど第2図の薄層クロマトグラムでは tailing をおこしている。

3. 薄層クロマトグラフィーによる展開溶剤の比較

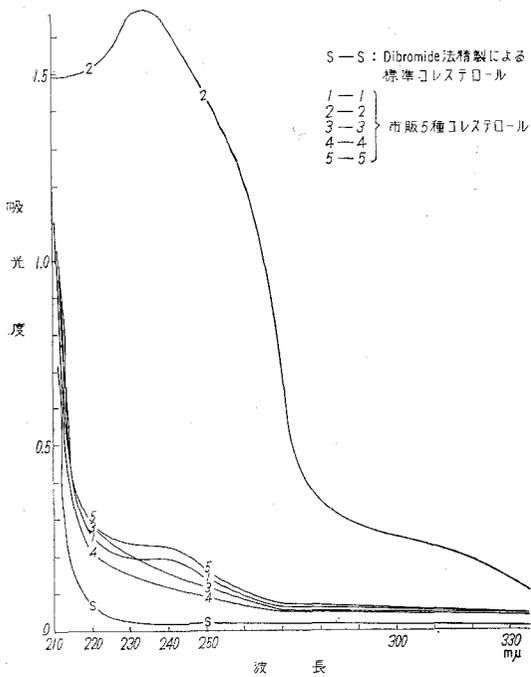
市販コレステロールをカラムクロマトグラフィーで精製するにあたり, 適当な溶媒を選択するため, 薄層クロマトグラフィーで種々の展開溶媒を比較した。この結果は第2表, 第3図, 第4図, 第5図にしめされるようにクロロホルム: 酢酸エチル (50:50上昇法)での分離が最高で, ついでクロロホルム→アセトン (段階法), クロロホルム: アセトン (50:50上昇法)の順であった。

4. カラムクロマトグラフィー精製による発色度と紫外外部吸収曲線の変化

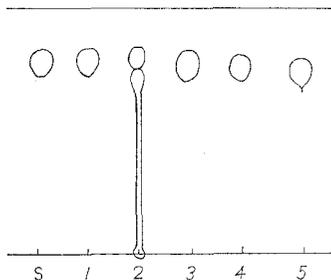
薄層クロマトグラフィーの結果により, クロロホルム: 酢酸エチル (50:50)を用いてカラムクロマトグラフィーによる試料 (市販コレステロー

第2表 薄層クロマトグラフィーにおける各種展開溶媒の比較

番号	吸着剤	展開溶媒	展開法	試料と使用量	展開時間	距離	発色試薬	温度	展開槽の溶媒による飽和の有無
1	Kieselgel G (メルク)	ベンゼン	上昇法	コレステロール (No. 2) 0.3%ベンゼン液	15分	10cm	重クロム酸硫酸混液	室温	(-)
2	//	クロロホルム	上昇法	0.01 ml	20	//	//	//	(-)
3	//	メタノール	上昇法	//	15	//	//	//	(-)
4	//	アセトン	上昇法	//	10	//	//	//	(-)
5	//	酢酸	上昇法	//	40	//	//	//	(-)
6	//	石油エーテル	上昇法	//	25	//	//	//	(-)
7	//	4塩化炭素	上昇法	//	37	//	//	//	(-)
8	//	クロロホルム→アセトン	段階法	//	23→16	//	//	//	(-)
9	//	クロロホルム: アセトン(1:1)	上昇法	//	20	//	//	//	(-)
10	//	クロロホルム: アセトン(1:1)	上昇法	//	20	//	//	//	(+)
11	//	クロロホルム: アセトン(1:9)	上昇法	//	10	//	//	//	(-)
12	//	クロロホルム: アセトン(1:9)	上昇法	//	13	//	//	//	(+)
13	//	クロロホルム: アセトン(3:7)	上昇法	//	12	//	//	//	(-)
14	//	クロロホルム: アセトン(3:7)	上昇法	//	13	//	//	//	(+)
15	//	酢酸エチル	上昇法	//	27	//	//	//	(+)
16	//	クロロホルム: 酢酸エチル(1:1)	上昇法	//	24	//	//	//	(+)
17	//	クロロホルム→酢酸エチル	段階法	//	26→37	//	//	//	(+)
18	//	クロロホルム→アセトン	二次元法	//	21→10	//	//	//	(+)
19	//	アセトン→クロロホルム	二次元法	//	10→20	//	//	//	(+)



第1図 市販コレステロール5種の紫外外部吸収曲線

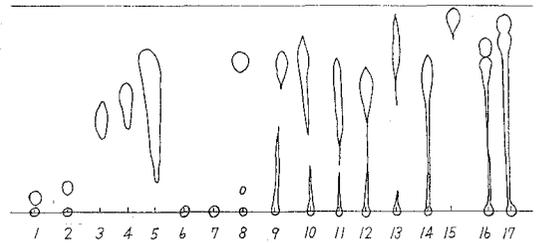


第2図 市販コレステロール5種の薄層クロマトグラム

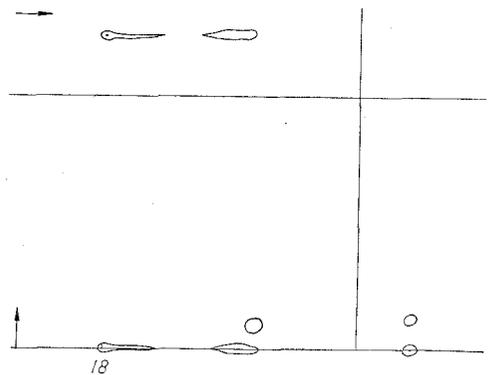
固定相: Kieselgel G メルク(ギブス13%)
 厚さ 250 μ , 100°C60分加熱
 移動相: クロロホルム: エチルアセテート (50:50)

S: Dibromide法により精製した標準コレステロール

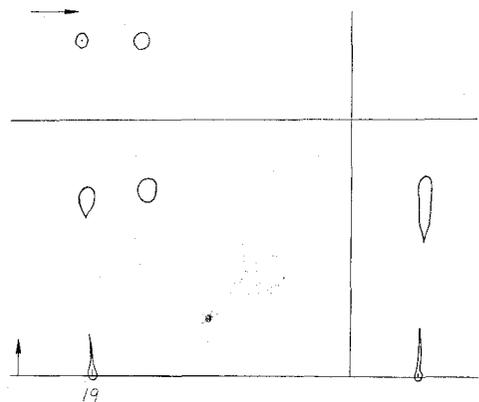
ル No. 5) の精製を行なつたが、満足な分離はえられなかつた。ついでクロロホルム: アセトン (30:70) で同じ試料の分離精製を試み、第6図、第7図、第3表に示したような結果をえた。すなわちフラクション4 (第6図、第3表) で、重量



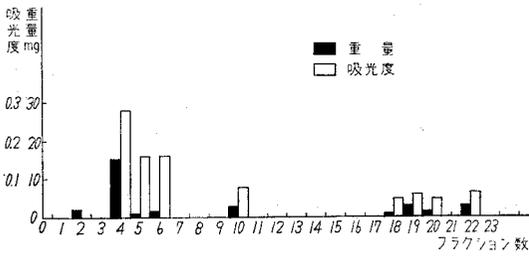
第3図 市販コレステロール (No. 2) の薄層クロマトグラム (上昇法, 段階法)
 固定相: Kieselgel G メルク(ギブス13%)
 厚さ250 μ , 100°C, 60分加熱
 移動相: 1~17 第2表



第4図 市販コレステロール (No. 2) の薄層クロマトグラム (二次元法)
 固定相: Kieselgel G メルク(ギブス13%)
 厚さ 250 μ , 100°C60分加熱
 移動相: クロロホルム→アセトン



第5図 市販コレステロール (No. 2) の薄層クロマトグラム (二次元法)
 固定相: Kieselgel G メルク(ギブス13%)
 厚さ 250 μ , 100°C60分加熱
 移動相: アセトン→クロロホルム



第6図 市販コレステロールのカラムクロマトグラムと発色度

カラム 1.5×10cm ケイ酸 100メッシュ
 試料 市販コレステロール (No. 5) 30mg
 溶出液 クロロホルム：アセトン (30：70) 流速 1.2ml/分, 10ml ずつフラクションコレクターで捕集重量と発色度 (Zak-Henly 変法により測定した吸光度) を測定

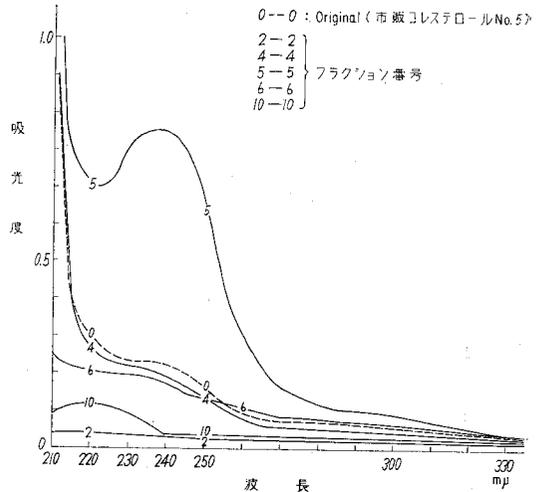
第3表 市販コレステロールクロマトグラフィ—精製前と精製後の比較

フラクション番号	重量(%) A	純度**(%) B	コレステロール量(%) C	発色度* D
精製前	100	70.5	70.5	0.227
精製後 2	6.7	/	/	/
4	50.3	86.9	43.4	0.280
5	3.3	49.7	1.5	0.160
6	5.0	49.7	2.5	0.160
10	8.7	24.2	2.1	0.078
18	3.3	15.5	0.5	0.050
19	11.0	18.6	2.0	0.060
20	5.0	15.5	0.8	0.050
22	7.3	19.3	1.4	0.062

* 発色度：Zak-Henly 変法により測定した吸光度

** 純度： $B = \frac{D}{0.322}$ $C = A \times B$

では、その 50% を回収し、発色度は、精製前の 0.227 より 0.280 と増加し、したがってその純度は 70.5% より 86.9% に上昇したと考えられる。発色度より求めたコレステロール回収量は 43.4% であった。第 7 図にみられるように紫外外部吸収曲線では、フラクション 4 で精製前に比較して 230 mμ ~ 240 mμ の間で吸収度が 0.04 ~ 0.05 の減少をしめし、標準コレステロールの標準曲線 (第 1 図) に近くなっている。さらに溶出液をクロロホルム：アセトン (50：50) に変更し、分画捕集を 5 ml にして、第 8 図、第 9 図および第 4 表の結



第7図 カラム分離コレステロールの紫外外部吸収曲線

果をえた。フラクション 6 (第 8 図、第 4 表) においては、重量の回収率は 63.3%、発色度は精製前の 0.227 より 0.287 となり、したがって純度は 70.5% より 89.1% と上昇した。コレステロールの回収量は 56.4% であった。

第 9 図の紫外外部吸収曲線においては、フラクション 6 では、220 mμ ~ 240 mμ の間で、吸収度は 0.07 ~ 0.1 減少し標準曲線に近づいた。

第4表 市販コレステロールのカラムクロマトグラフィ—精製前と精製後の比較

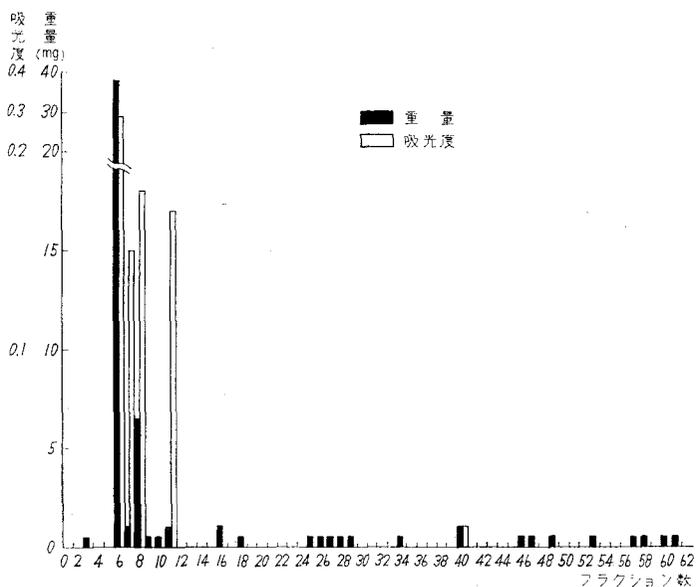
フラクション番号	重量(%) A	純度**(%) B	コレステロール量(%) C	発色度* D
精製前	100	70.5	70.5	0.227
精製後 6	63.3	89.1	56.4	0.287
7	1.6	46.6	0.7	0.150
8	10.8	56.2	6.1	0.181
11	1.6	52.2	0.8	0.168
41	2.1	4.0	0.08	0.013

* 発色度：Zak-Henly 変法により測定した吸光度

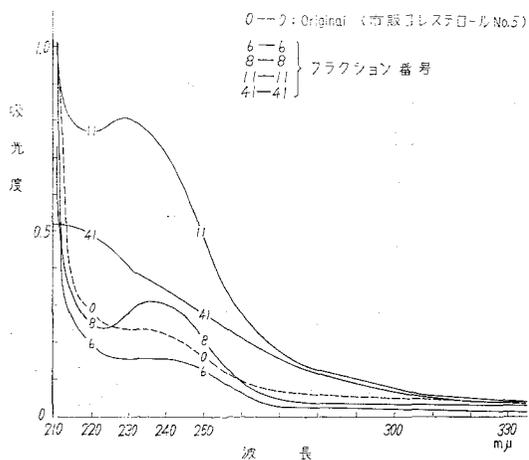
** 純度： $B = \frac{D}{0.322}$ $C = A \times B$

5. DNPH 精製による発色度、融点、紫外外部吸収曲線の変化

第 10 図にしめす方法により精製を試みたところ、第 5 表のように、融点は精製前の 139.5°C より



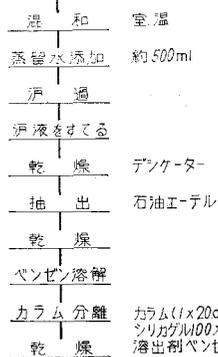
第8図 市販コレステロールのカラムクロマトグラムと発色度
 カラム 1.5×10cm ケイ酸 100メッシュ
 試料 市販コレステロール (No. 5) 60mg
 溶出液 クロロホルム：アセトン (50：50) 流速 1.2 ml/分, 5 ml ずつフラクションコレクターで捕集, 重量と発色度 (Zak-Henly 変法により測定した吸光度) を測定



第9図 カラム分離コレステロールの紫外外部吸収曲線

り精製後 146°Cに, 発色度は 0.227より 0.303と増加し, 純度は70.5%より94.1%に上昇した。しかし重量回収率は悪く38%にしか達せず, コレステロールの回収量は35.8%であつた。

2,4-Dinitrophenylhydrazine 500mg 市販コレステロール 1000 mg
 95%エタノール 50ml 95%エタノール 50 ml
 1/10N硫酸を加えpH4.0にする



第10図 市販コレステロールのDNPHによる精製法

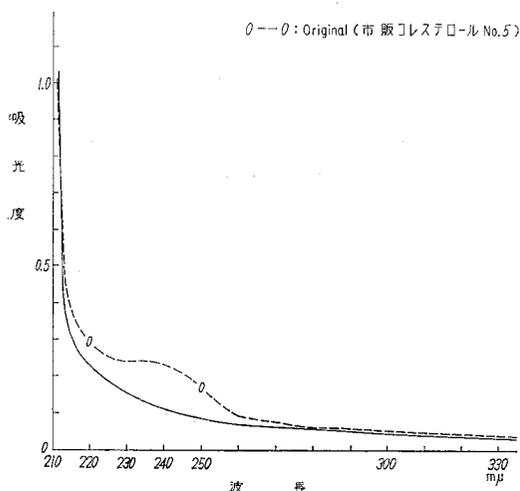
紫外外部吸収曲線は(第11図) 230mμ~ 250mμの間で, 吸収度は0.08~0.11の減少をしめて最も標準曲線に近づいた。

第5表 市販コレステロールのDNPH法精製前と精製後の比較

	重量 (%) A	純度** (%) B	コレステ ロール量 (%) C	発色度* D	融点°C
精製前	100	70.5	70.5	0.227	139.5
DNPH法 精製後	38.0	94.1	35.8	0.303	146.0

* 発色度：Zak-Henly 変法により測定した吸光度

** 純度： $B = \frac{D}{0.322} \quad C = A \times B$



第11図 DNPH法精製コレステロールの紫外外部吸収曲線

以上の成績を紫外外部吸収曲線を別にして第6表にまとめた。DNPH精製法では、純度、発色度において精製前の70.5、0.227より、精製後の

第6表 市販コレステロールのカラムクロマトグラフィー精製法(1)(2)とDNPH精製法との比較

	重量 (%)	純度 (%)	コレステ ロール量 (%)	発色度*	融点°C
精製前	100	70.5	70.5	0.227	139.5
*カラム法(1) 精製後	50.3	86.9	43.4	0.280	/
*カラム法(2) 精製後	63.3	89.1	56.4	0.287	/
DNPH法 精製後	38.0	94.1	35.8	0.303	146.0

* 発色度：Zak-Henly 変法により測定した吸光度

* (1)：第7図，第3表よりフラクション番号4

* (2)：第8図，第4表よりフラクション番号6

94.1、0.303と上昇し、ついでカラムクロマトグラフィー精製法(2)の89.1、0.287、カラムクロマトグラフィー精製法(1)の86.9、0.280の順になっている。しかしコレステロールの回収率については、カラムクロマトグラフィー精製法(2)、カラムクロマトグラフィー精製法(1)、DNPH精製法の順序になり、ことにDNPH精製法では約35%のみが回収された。

IV. 考 按

血清コレステロールの定量は、現在臨床化学分析のうちで最も重要なものの1つであるにもかかわらず、その分析精度は決して満足なものではない。その主たる原因の1つとして、標準試薬として使用する市販コレステロールの純度が考えられる。FieserはDibromide法によりコレステロールを精製^{13)~15)}し、cholestanol¹⁶⁾、7-dehydrocholesterol、lathosterol、cerebrosterol、2,5-hydrocholesterolを含まない融点149.5°C~150°Cの精製品をえたと報告している。永井^{17)~19)}は市販品に多い不純物として、cholestanolをあげ、これはDibromide法で除くことはできるが、5%から18%にわたって存在する7-ketocholesterolおよびそれに由来する着色物質は、Zak-Henly法の発色度を大きくさまたげ、Dibromide法で完全にとり除くことはできないので、メタノールで再結晶を行なう必要があるとしている。

そしてこれは多分自動酸化によつて生じるものであろうと推定している。Radin²⁰⁾は、エタノール再結晶法、酢酸再結晶法、Dibromide法により市販コレステロールの精製を行なつて、融点、硫酸-鉄反応²¹⁾、Lieberman-Burchard法によるモル吸収値などを検討し、Dibromide法がもつとも効果的な精製法で、メタノール再結晶法ではcholestanolをとりのぞけないが、Dibromide法によれば7-ketocholesterol、cholestane-3β, 25-diol、cholestanolなどをとりのぞけると報告している。しかし永井はDibromide法で精製した試料においても、そのエタノール溶液の紫外外部吸収値を測定する時、237mμに極大吸収を示すものがあり、これは7-ketocholesterolの存在を意味す

ると報告している。

著者は今回カラムクロマトグラフィー精製法、D N P H精製法により試料の精製を行ない、その精製度を融点、発色度、紫外外部吸収曲線により検討した結果、重量、コレステロール量の回収率は低い、発色度、純度、融点が著しく上昇し、紫外外部吸収曲線においても著明な改善をみたD N P H精製法は、著者が前回発表したエタノール再結晶精製法、加水分解精製法、今回のカラムクロマトグラフィー精製法、Radin の酢酸再結晶精製法などにくらべ、よりすぐれた精製法であると考えられる。Dibromide 法に比べても比較的操作が簡単なので、大量に精製試料を得たい場合効果的であろう。

従来からコレステロール定量の方法については、本邦においても多くの報告があるが、臨床検査のうえで現今 Zak-Henly 法が広く採用されており、それに使用する試薬の純度について、外国では水酢酸²²⁾、わが国では硫酸²³⁾の純度が問題とされることが多く、標準試薬として使用する市販コレステロールの純度についての報告は多いが¹⁰⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁷⁾²⁴⁾、精製後の純度をたしかめる指標は一定していない。その点に関し今後解決さるべき重要な問題を含んでいるものと考えられる。

V. 総 括

I. 市販コレステロール5種の純度を融点、発色度 (Zak-Henly 変法により測定した吸光度)、紫外外部吸収曲線、薄層クロマトグラムにより比較検討して、つぎの成績を得た。

1) 5種試料はすべての点で異なる値を示し、試料の純度は発色度、融点に平行すると考えられる。

2) 紫外外部吸収曲線においては、試料の純度が高くなるほど吸収度は減少し標準曲線に近づいた。

3) 薄層クロマトグラムでは、純度の高いものほど tailing 現象が認められなかつた。

II. 薄層クロマトグラフィーにより、試料のカラムクロマトグラフィー精製に適切な溶媒の選択をおこなった結果、アセトン：クロロホルム

(50 : 50) がもつとも適当であつた。

III. シリカゲルカルムクロマトグラフィー精製法とD N P H精製法で試料の精製を試み、精製過程に伴う融点、発色度 (Zak-Henly 変法により測定した吸光度)、紫外外部吸収曲線の変化を観察して、つぎの結果を得た。

1) 精製後発色度は、未精製時の 0.227 にくらべ、カラムクロマトグラフィー法による精製後 (1) 0.280, (2) 0.287, D N P H法によれば精製後は、0.303と増加した。純度は未精製時の70.5%よりカラムクロマトグラフィー法精製後 (1)86.9%, (2) 89.1%, D N P H法による精製後は94.1%と上昇した。発色度より求めたコレステロール量の回収率はカラムクロマトグラフィー法精製後、(1) 43.4%, (2) 56.4%, D N P H法精製後35.8%となつた。重量の回収率はカラムクロマトグラフィー法精製後 (1)50.3%, (2)63.3%, D N P H法精製後は38%であつた。

2) 融点は D N P H 法精製により未精製時の 139.5°Cより精製後 146°Cに上昇した。

3) 紫外外部吸収曲線においては、精製段階が進むに依りて、特に 230m μ ~ 240m μ の間で吸収度の減少が認められ発色度から判定した純度の高いものほど標準曲線に近づいた。

IV. 以上の成績により、D N P H精製法は簡単で効果的な精製法であると考えられる。

また使用する市販コレステロールの純度により発色度 (Zak-Henly 変法により測定した吸光度) に大差があり、このため血中コレステロール測定値に相当の差異が生じると思われるので、その測定にあつては、商品の選択、保管状態、保存期間に注意し、純度の検査と簡単な精製を行なつてつねに一定した規準溶液を使用する事がのぞましい。

稿を終るに当り、終始御指導御校閲を賜りました松村義寛教授に深謝し、御教示御指導戴きました当教室小峰仙一講師、昭和医科大学松村剛教授、慶応大学医学部稲山誠一助教授、当教室諸姉に深く感謝いたします。

文 献

- 1) Katz, L.N. & D.V. Dauber: J Mt Sinai Hosp N.Y: 12 382 (1945)

- 2) **Adlersberg, D.:** N.Y. Acad Med 25 651 (1949)
- 3) **Gould, R.G.:** Amer J Med 11 209 (1951)
- 4) **Page, I.H.:** Circulation 10 1 (1954)
- 5) **Gofman, J.W. et al.:** Circulation 14 691 (1965)
- 6) **Bloor, W.R.:** J Biol Chem 24 231 (1916)
- 7) **Sperry, W.M. and M. Wobb:** J Biol Chem 187 97 (1950)
- 8) **Zak, B.:** Amer J Clin pathol 27 583 (1957)
- 9) **Henly, A.A.:** Analyst 82 286 (1957)
- 10) 小峰仙一・星合之代: 東女医大誌 32 311 (1962)
- 11) a) 鈴木正二: 第6改正日本薬局方南山堂東京(昭26) 458頁 b) 生物化学実験研究会: 生物化学実験法朝倉書店東京(昭39) 33頁
- 12) 石川正幸・他: 薄層クロマトグラフィー 南山堂 東京(昭38) 18頁
- 13) **Fieser, L.F.:** Org Synth 35 43 (1955)
- 14) **Fieser, L.F.:** J Amer Chem Soc 75 4395 (1953)
- 15) **Fieser, L.F. et al.:** J Org Chem 22 1380 (1957)
- 16) **Scönheimer, R.:** Z Klin Med 123 749 (1933)
- 17) 永井諄爾・樋口かをる: 日新医学 50 195 (1963)
- 18) 永井諄爾: 日本臨床 23 156 (1965)
- 19) 永井諄爾: 臨床検査 6 485 (1962)
- 20) **Radin, N. and A.L. Gramza:** Clin Chem 9 121 (1963)
- 21) **Rosental, H.L. et al.:** J Lab Clin Med 50 318 (1957)
- 22) **Bowman, R.E. and R.C. Wolf:** Clin Chem 8 302 (1962)
- 23) 北村元仕: 日新医学 48 456 (1961)
- 24) **Karavolas, H.J. et al.:** J Biol Chem 240 1568 (1965)