

(222) (梅津) 清酒醸造中におけるアミノ酸類及びアミン類の消長について (第1報)

6. Acetic acid のH原子をClで置換した酸は分子中にCl原子の多い程、赤色度大であつた。

7. Ascorbic acid は濃度大なる程、Callistephin を還元脱色せしめたが、N/500では比較的安定であつた。本実験では引続き兵庫県中央工業試験所の光電比色計を借用した。萩野無機化学課長に感謝の意を表す。

文 献

- 1) 芥田：本誌，35，134 (1957) 2) 芥田：本誌，35，61 (1957) (昭和32，3，29受理)

清酒醸造中におけるアミノ酸類及びアミン類の消長について

(第1報) Photodensity method によるアミノ酸の定量

梅 津 雅 裕 (鳥取大学学芸学部)

緒 言

最近における著しい分析技術の進歩発達に伴い、ここ数年の間に従来知られていなかった清酒の成分が多数発見されている。清酒中のアミノ酸についても大高¹⁾、田村等²⁾により18種類存在することが確認されているが、アミン類では古く黒野³⁾、山田⁴⁾、西田⁵⁾により僅か数種類確認されているのみでその後報告を見ない。又それ等の個々の成分の清酒醸造中における消長についても未だ充分には調べられていない。アミノ酸の消長に関する研究としては寺本等⁶⁾、橋田等⁷⁾、伊藤等⁸⁾の研究があり、又著者⁹⁾、¹⁰⁾も先に酒母中のアミノ酸の消長について報告しているが、アミン類の消長に関しては未だ首つて報告を見ない。そこで著者はアミノ酸及びアミン類個々の成分の清酒醸造過程における消長を追及し、更に進んでこれ等成分の成因並びに清酒及び清酒醸造上における意義を探究する目的を以つて本研究に着手した。

先づ清酒醸造中におけるアミノ酸の消長を追及するに当つて最も考慮されなければならないことはアミノ酸の定量法である。アミノ酸の定量法には優れた方法として乳酸菌を利用する微生物定量法¹¹⁻¹³⁾とかイオン交換樹脂を利用する定量法¹⁴⁻¹⁶⁾等が知られているが、これ等の定量法は分析結果は精密ではあるが、操作が複雑で且熟練を要し比較的長時間を要するなど色々不便な点が多い。本研究に於いては研究の性質上、多数の分析試料を比較的短時日の間に取扱わなければならない関係上、此目的に合致するものとして多少精密度は劣るが比較的簡単に多くの試料中のアミノ酸を同時に比較定量し得る Maximum color density method (Photodensity method)¹⁷⁻²⁰⁾を採用することとした。本報告に於ては Maximum color density method によるアミノ酸定量法について考究、検討した結果について報告する。

実 験 の 部

1. One-Dimensional paper chromatography によるアミノ酸の分離

(1) 標準溶液の作製

Tryptophane を除く全アミノ酸を少量の 6NHCl に溶解し、10% Isopropanol 溶液で個々のアミノ酸濃度が 1.0mg α NH₂-N/2.5ml になる様に調製し、Tryptophane は10% Isopropanol 溶液で同様に 1.0mg α NH₂-N/2.5ml 濃度にした。此等の標準溶液を適宜10% Isopropanol 溶液で稀釈して 0.75mg α NH₂-N/2.5ml, 0.50 mg α NH₂-N/2.5ml, 0.25mg α NH₂-N/2.5ml の各 Level のアミノ酸濃度の標準溶液 (Subdilutions) を調製した。

(2) 標準溶液及び試料の塗布

東洋濾紙 No. 50 (40×40cm) の下端より 5 cm, 右端より 2.5cmの間隔で左端に向つて交互に各 Level の標準溶液と試料溶液を順次に 2.5 μ l 宛塗布して行く。この際試料溶液は試料のアミノ酸濃度により適宜倍数稀釈液例えば 1/2, 1/3, 1/4 濃度稀釈液を作り塗布するか又は試料原液を同一 Spot 上に反復塗布例えば 2, 3, 4 回塗布した。

(3) Paper Chromatography

今迄に発表されている多数の各種組成の展開溶媒を用い上昇法一次元展開を行つて各種アミノ酸の分離を試み、検討した結果 BLOCK の例¹⁷⁾に倣い分離されるアミノ酸の種類及び展開要領の相違により全アミノ酸を次の 5

群に分けて操作するのが適当であると考えた。此方法によれば全アミノ酸を一次元展開により充分に分離することが出来る。即ち各群の Paper chromatography の要領を示すと次の通りである。

Group I. Aspartic acid, Glutamic acid, Serine, Glycine, Threonine, Alanine

Solvent^{20, 16)} : Phenol : Buffer (pH 12.0) : α -Benzoinoxime = 80 : 20 : 0.1.

pH 12.0 の Buffer は 0.067M Na_2HPO_4 と 0.067M NaOH を同容混合して調製する。

Paper : 予め pH 12.0 の Buffer に浸し風乾したものを使用する。

Running time and temperature : 24 hrs, 27°C.

Development of color : 0.4% Ninhydrine-Butanol 溶液 (4% Acetic acid 添加) を濾紙に Spray 後定温乾燥器中で 60°C, 15 min 加温する。Spray の要領は発色試薬をなるべく濾紙全面に均等に Spray する様に注意して濾紙の左右に 3 回, 上下に 3 回宛, 濾紙の表裏に同様に操作する。

Amino acids separated :

Aspartic acid	Rf 0.18	Glycine	Rf 0.38
Glutamic acid	// 0.24	Threonine	// 0.48
Serine	// 0.32	Alanine	// 0.58

Group II. Cystine, Lysine, Histidine, Arginine, Tyrosine, Leucine, Isoleucine, Phenylalanine

IIa. Solvent^{17, 21)} : n-Butanol : Acetic acid : Water = 4 : 1 : 5.

Length of run : 23cm., dry, and re-run three times for 23cm.

Development of color : Group I に準ずる。

Amino acids separated :

Cystine	Rf 0.18	Tyrosine	Rf 0.65
(Lysine)	// 0.29	Phenylalanine	// 0.80
(Histidine)	// 0.32	Isoleucine	// 0.84
(Arginine)	// 0.36	Leucine	// 0.87
(Alanine)	// 0.54		

() を施したアミノ酸は本展開溶媒でも分離可能であるが、他の展開溶媒を用いた方が一般的に結果が良いことを示すものである。

IIb. Solvent²²⁾ : Ethanol : Methyl ethyl ketone : Water : Dicyclohexylamine = 10 : 10 : 5 : 2.

Running time and temperature : 24 hrs, 27°C.

Development of color : Group I に準ずる。

Amino acids separated :

Lysine	Rf 0.17	Arginine	Rf 0.08
--------	---------	----------	---------

IIc. Solvent : n-Butanol : Acetic acid : Water = 4 : 1 : 5.

Length of run : 25cm.

Development of color¹⁷⁾ : 1% Sulfanilamide の 10% HCl 溶液 5 ml, 5% NaNO_2 5 ml を 100ml 容メスシリンダーに取り 1 分間よく混合した後, 50ml の標線まで n-Butanol を加えて 1 分間振盪, 4 分間静置後, Butanol 層を傾斜して取り, 之に展開した濾紙を浸して後取出し気流中にて 5 分間乾燥後, $\frac{1}{2}$ 飽和の Na_2CO_3 溶液を Spray すれば Histidine は橙黄色に, Tyrosine は赤色に発色する (PAULY's reaction).

Amino acid separated :

Histidine	Rf 0.18	(Tyrosine)	Rf 0.47
-----------	---------	------------	---------

IId. Solvent : n-Butanol : Methyl ethyl ketone : Water : Dicyclohexylamine = 10 : 10 : 5 : 2.

Running time and temperature : 24 hrs, 27°C.

Development of color : Group I に準ずる。

Amino acids separated :

(Histidine)	Rf 0.25	(Phenylalanine)	Rf 0.60
(Valine)	// 0.38		

(224) (梅津) 清酒醸造中におけるアミノ酸類及びアミン類の消長について (第1報)

IIe. Solvent¹⁷⁾: tert-Butanol : Methyl ethyl ketone : Formic acid : Water = 160 : 160 : 1 : 39.

Running time and temperature : 48 hrs, 27°C.

Development of color : Group I に準ずる.

Amino acids separated :

(Phenylalanine) Rf 0.15	(Leucine) Rf 0.22
(Isoleucine) // 0.19	

Group III. Methionine, Valine.

IIIa. Solvent^{17), 23)}: iso-Amyl alcohol : Pyridine : Water : Diethylamine = 50 : 50 : 35 : 2.

1% NaCN と含水 Phenol 各 5 ml 宛入れたピーカーを展開容器内に入れて展開する.

Length of run : 23cm., dry, and re-run twice for 23cm.

Development of color : Group I に準ずる.

Amino acids separated :

(Alanine) Rf 0.44	(Isoleucine) Rf 0.75
Valine // 0.52	(Phenylalanine) // 0.77
(Methionine) // 0.57	(Leucine) // 0.81
(Tyrosine) // 0.70	

IIIb. Solvent : n-Butanol : Acetic acid : Water = 4 : 1 : 5.

Length of run : 25cm.

Development of color^{17), 24)} : 0.002M PtCl₆²⁻ 4ml, INKI 0.25ml, 2NHCl 0.4ml, Acetone 76ml を混合し、此の試薬中に風乾した Chromatogram を浸すと Methionine, Cystine は桃色の地 (background) に白い Spot として発現する.

Amino acids separated :

(Cystine) Rf 0.18	Methionine Rf 0.46
-------------------	--------------------

Group IV. Proline, Hydroxyproline.

Solvent : n-Butanol : Acetic acid : Water = 4 : 1 : 5.

Length of run : 25cm.

Development of color¹⁷⁾ : 0.2% Isatin-Acetone 溶液を Spray し風乾後、水蒸気を飽和した定温器中に70~76°C, 10分間加熱すれば Proline, Hydroxyproline は青色を呈する.

Amino acids separated :

Hydroxyproline Rf 0.23	Proline Rf 0.31
------------------------	-----------------

Group V. Tryptophane.

Va. Solvent¹⁷⁾: iso-Propanol : NH₄OH : Water = 80 : 5 : 15.

Length of run : 25cm.

Development of color¹⁷⁾ : Conc. HCl 10ml, Acetone 90ml の混合液に p-Dimethylaminobenzaldehyde 1g を溶解する (EHRlich's reagent).

此発色液は使用直前に調製し、風乾した Chromatogram を此液中に浸して風乾すれば Tryptophane は暗橙黄色に発色する。此の Tryptophane の呈色は最初黄色であるが時間の経過と共に変色して紫色となり最後に暗橙黄色となる。

Amino acid separated :

Tryptophane Rf 0.60

Vb. Solvent²⁰⁾: Collidine (buffered), saturated with pH 9.0 buffer.

pH 9.0 の Buffer は 0.067M KCl に溶解した 0.067M Boric acid 50ml に対して 0.067M NaOH 21.30ml の割合で混合して調製する.

Running time and temperature : 48 hrs, 27°C.

Development of color : Group I に準ずる.

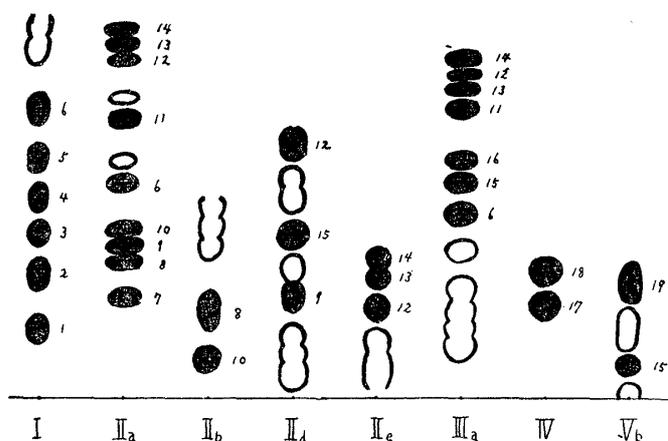


Fig. 1. One-Dimensional Chromatograms

- | | | |
|------------------|------------------|-------------------|
| 1. Aspartic acid | 2. Glutamic acid | 3. Serine |
| 4. Glycine | 5. Threonine | 6. Alanine |
| 7. Cystine | 8. Lysine | 9. Histidine |
| 10. Arginine | 11. Tyrosine | 12. Phenylalanine |
| 13. Isoleucine | 14. Leucine | 15. Valine |
| 16. Methionine | 17. Oxyproline | 18. Proline |
| 19. Tryptophane | | |

Va の Tryptophane の Spot は橙黄色を呈するので460m μ の波長のフィルターを通して Maximum color density を測定した。

最初に既知濃度の各 Level の標準溶液の Spot の Maximum color density を測定し半対数グラフ用紙の横軸に Maximum color density, 縦軸にアミノ酸濃度を対数目盛でとつて標準曲線を求める。次に未知濃度のアミノ酸の Spot の Maximum color density を測定して標準曲線より求めるアミノ酸量を算出する。

次に此様にして測定した数種のアミノ酸の標準曲線の例を示すと Fig. 2 の通りである。

図の中で Aspartic acid, Glutamic acid, Serine, Glycine, Threonine, Alanine の標準曲線は Group I の要領により展開したものを 570 m μ の波長のフィルターを通して求めたものであり, Histidine の標準曲線は Group IIc の要領により展開したものを 460m μ の波長のフィルターを通して求めたものである。

(2) 本定量法の精度の検討

本定量法の精度を検討するため Aspartic acid, Glutamic acid, Serine, Glycine, Threo-

nine 及び Alanine の6種のアミノ酸を α NH₂-N として各々 3 μ g/2.5 μ l 宛含む混合溶液を作製し, 之を基準

として更にこの $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{3}$, $\frac{1}{4}$ 稀釈液を調製し, 前述した要領により標準溶液と此の混合溶液を Spot し, Group I の展開要領により Paper chromatography を行い上述した定量法でそれ等のアミノ酸の定量を行い回収率を求めた。その結果を示すと Table 1. の通りである。

Table 1. によれば平均回収率は96~108%で誤差は8%以内であることを示している。しかし各稀釈率に応じた個々の回収率は89~117%の範囲を示し, 誤差も18%にも及んでいる。

次に下記の方法で予備処理した清酒に Aspartic acid, Glutamic acid を添加し清酒自身に含まれている Aspartic acid, Glutamic acid 以外に更に各々 0.25 μ g α NH₂-N/2.5 μ l, 0.50 μ g α NH₂-N/2.5 μ l, 0.75 μ g α NH₂-N/2.5 μ l の濃度の Aspartic acid, Glutamic acid を含む如き混合溶液を調製し, 之を試料として上述の如く Group I の展開要領により Paper chromatography を行いアミノ酸を定量して回収率を求めた。その結果は

Amino acids separated :

(Tryptophane) Rf 0.26

(Valine) // 0.075

上述の要領で展開された Chromatogram の主な模型図を示すと Fig. 1 の通りである。

2. アミノ酸の定量

(1) Maximum color density の測定及びアミノ酸の定量

前述した要領で展開, 発色した Chromatogram を 2.5 \times 20cm の短冊型に切り取り, これを α -Bromnaphthaleine と流動 Paraffine の混合溶液 (1:4)²⁶⁾ 中に浸して減圧の下に Chromatogram を半透明にした後, 濾紙枠に挟み Densitometer²⁶⁾ (夏目製作所製, 小林式濾紙光度計) を使用して570m μ の波長のフィルターを通して, Chromatogram 上に分離されたアミノ酸の Spot の Maximum color density を測定する。但し Group IIc の Histidine, Group

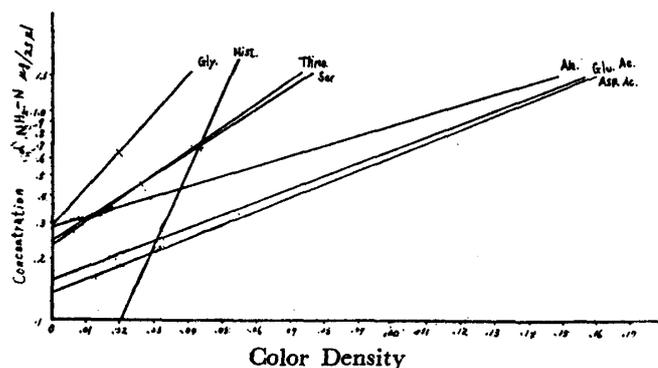


Fig. 2. Typical standard curves of several amino acids by the maximum color density method

(226) (梅津) 清酒醸造中におけるアミノ酸類及びアミン類の消長について (第1報)

Table 1. Recoveries of several amino acids by the maximum color density method. (1)

	Unknown dilution	Calculated concentration $\mu\text{g}/2.5\mu\text{l}$	Theoretical concentration $\mu\text{g}/2.5\mu\text{l}$	Recovery %	Mean of recovery %
Aspartic Acid	1	7.41	8.31	89.2	96.1
	$\frac{1}{2}$	4.28	4.16	102.8	
	$\frac{1}{3}$	2.66	2.77	96.0	
	$\frac{1}{4}$	2.00	2.08	96.3	
Glutamic Acid	1	8.40	9.19	91.4	107.5
	$\frac{1}{2}$	5.35	4.60	116.4	
	$\frac{1}{3}$	3.57	3.06	116.7	
	$\frac{1}{4}$	2.42	2.30	105.3	
Serine	1	6.61	6.57	100.6	100.6
	$\frac{1}{2}$	3.15	3.28	95.9	
	$\frac{1}{3}$	2.40	2.19	109.5	
	$\frac{1}{4}$	1.58	1.64	96.2	
Glycine	1	4.93	4.69	105.1	102.2
	$\frac{1}{2}$	2.25	2.35	95.9	
	$\frac{1}{3}$	1.66	1.57	105.7	
	$\frac{1}{4}$	—	—	—	
Threonine	1	7.65	7.44	102.8	97.5
	$\frac{1}{2}$	3.49	3.72	93.8	
	$\frac{1}{3}$	2.38	2.48	95.9	
	$\frac{1}{4}$	—	—	—	
Alanine	1	6.23	5.57	111.8	104.6
	$\frac{1}{2}$	2.80	2.78	100.8	
	$\frac{1}{3}$	2.13	1.86	114.5	
	$\frac{1}{4}$	1.27	1.39	91.2	

Table 2. Recoveries of several amino acids by the maximum color density method. (2)

	Amino Acid added. $\alpha \text{NH}_2\text{-N}$ $\mu\text{g}/2.5\mu\text{l}$	Amino Acid recovered. $\alpha \text{NH}_2\text{-N}$ $\mu\text{g}/2.5\mu\text{l}$	Recovery %	Mean of recovery %
Aspartic Acid	0.25	0.235	94.0	100.4
	0.50	0.47	94.0	
	0.75	0.85	113.3	
Glutamic Acid	0.25	0.24	96.0	105.7
	0.50	0.535	107.0	
	0.75	0.855	114.0	

Table 2 に示す通りである。

試料に用いた清酒の予備処理^{27,17)}であるが清酒中の蛋白とか澱粉等の高分子化合物及びそれらの高級分解物を除去するために無水アルコールを添加して清酒中の最終濃度が80%となる如くする。そして不溶解性の沈澱物を濾過後80%アルコールで洗滌し、それらの濾洗液を減圧濃縮してこの濃縮液を分液漏斗に入れて3倍量のクロロフォルム

を添加し、充分振盪して1~2日静置後上層の水層部を取つて試料とした。

Table 2 に依れば平均回収率は100~106%の範囲であり、個々の回収率も94~114%で前述の回収率測定の場合と大差がない。

以上の結果より判定するならば本定量法に於ては約8%以内の誤差でアミノ酸の定量が可能であると考へて良

い。但し個々の定量値については誤差が18%にも及ぶものがあることから考えて測定値にかなりのふれがあることが判る。

(3) 面積法による Methionine の定量と精度の検討

Group IIIb の要領に従つて Methionine を定量する場合には沃化白金の発色試薬のために Chromatogram 全体が桃色となり Methionine の存在部位のみが白色の Spot として発現するため Maximum color density を測定することが出来ない。面積法^{28, 29)}によつて測定するのが良い。即ち前述した方法に従つて Methionine の標準溶液の作製及び試料の塗布を行い、Group IIIb の要領により展開発色すれば Methionine は桃色の Background に白色の Spot として現れるから先づ標準溶液の Spot の面積を Planimeter を用いて測定し、半対数グラフ用紙の横軸に Spot の面積を、縦軸に Methionine の濃度を対数目盛でとつて標準曲線を求める。次に求めんとする試料の Spot の面積を同様に測定し標準曲線より求める試料中の Methionine の量を算出する。Methionine の標準曲線の1例を示すと Fig.3 の通りである。

Fig.3 より明かな様に Spot の面積とアミノ酸の濃度の対数とは直線関係を示していることが判る。面積法によつて Methionine を定量する場合の精度を検討するために前節2の(2)に準じて Methionine の回収率を求めた結果は Table 3 の通りである。Table 3 に依れば平均回収率は97.6%を示し誤差は3.5%以内である。但し個々の回収率については92~103%の範囲を示し誤差も8%に及んでいる。

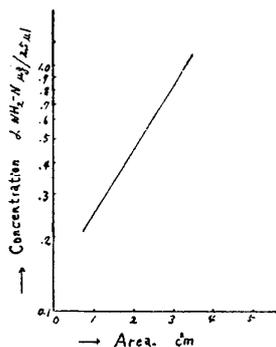


Fig.3. Typical standard curve of methionine by area method.

Table 3. Recovery of methionine by area method.

	Unknown Dilution	Calculated concentration $\mu\text{g}/2.5\mu\text{l}$	Theoretical concentration $\mu\text{g}/2.5\mu\text{l}$	Recovery %	Mean of recovery %
1 st	1	8.88	9.36	94.9	96.7
	$\frac{1}{2}$	4.49	4.68	95.9	
	$\frac{1}{8}$	3.10	3.12	99.3	
2 nb	1	9.31	9.36	99.5	98.4
	$\frac{1}{2}$	4.82	4.68	103.0	
	$\frac{1}{8}$	2.89	3.12	92.6	

考 察

MC FARREN³⁰⁾によれば Maximum color density method により1~5%の誤差で定量可能であると述べ、ROLAND¹⁹⁾によれば Lysine, Glutamic acid, Glycine 以外のアミノ酸は信頼限界 $P=0.95$ 以内で測定可能であると述べているが本実験に於いては0.4~8%の誤差を示し MC FARREN や ROLAND の結果に比較すれば若干誤差が大きい。本定量法は測定操作が簡便であるので同一試料に対して更に定量回数を増加するならば誤差が更に減少するであろうと考えられる。

BLOCK²⁸⁾によれば面積法による定量誤差は5%であると述べ、FISCHER²⁹⁾によれば2%の誤差で測定可能であると述べており、市川³¹⁾は2次元展開の場合であるが9%の誤差で定量可能であると述べているが、本実験では3.5%以内の誤差で定量可能であることを示した。

Maximum color density method に於いても、面積法に於いても定量誤差を最小に止めるためには Paper chromatography によるアミノ酸の分離方法が最も重要であり、展開された Chromatogram もなるべく次の如き条件を満足する必要がある。

- (1) 1次元展開に於いてアミノ酸の相互分離が完全に行われること。
- (2) 分離されたアミノ酸の Spot がなるべく小さく円形乃至隋円形を呈して Tailing を起さないこと。即ち分離されたアミノ酸の Spot の形が概して一定していること。
- (3) 分離されたアミノ酸の Rf が大きくないこと。即ち定量しようとするアミノ酸の Rf の大きくなならない展開溶媒を使用すること。

Group IIIb の Histidine 及び Group Va の Tryptophane の Spot は橙黄色に呈色するので360 μm 内至420

(228) (梅津) 清酒醸造中におけるアミノ酸類及びアミン類の消長について (第1報)

$m\mu$ の波長のフィルターを使用した方が良結果が得られると考えられるが、該当する波長のフィルターが得られなかつたので $460m\mu$ の波長のフィルターを使用して測定したが充分定量可能であつた。

要 約

1. Maximum color density method (Photodensity method) によるアミノ酸の定量について検討した結果、本定量法によれば8%以内の誤差でアミノ酸の定量が可能であることを認めた。

2. 面積法による Methionine の定量の精度を検討した結果、3.5%以内の誤差で定量可能である。

3. Maximum color density method に於いても、面積法に於いてもアミノ酸の定量誤差をなるべく少なくするためには1次元 Paper chromatography によるアミノ酸の分離が充分に行われることと同一試料について多数回の展開及び測定を行うことが最も重要である。又比較的簡便迅速に定量出来ることが本法の特徴でもあるので多数回の展開及び測定を行うことが必要である。

4. 1次元 Paper chromatography によるアミノ酸の分離に於いて分離されるアミノ酸の種類及び展開要領の相違によつて全アミノ酸を操作上5群に大別した。此方法によれば全アミノ酸を1次元展開により充分分離することが出来る。

本研究を行うに当つて種々御指導を賜つた恩師阪大教授寺本四郎先生及び実験に御協力を賜つた本学の田中洋美氏に謹んで感謝の意を表します。

(本研究は大阪醸造学会第8回講演会に於いて「清酒醸造中におけるアミノ酸類及び有機塩基類の消長について」と題して発表したものであるが都合により表記の如く「清酒醸造中におけるアミノ酸類及びアミン類の消長について」と改題したので悪しからず御了承を乞う次第である。)

文 献

- 1) 大高：農化，**24**，366 (1951).
- 2) 田村，角田，桐村，宮沢：農化，**26**，480 (1952).
- 3) 黒野：東化，**38**，171 (1916).
- 4) 山田：農化，**2**，246 (1926).
- 5) 西田：農化，**9**，930 (1933).
- 6) 寺本，吉野，橋田，森，渡辺：大阪醸造学会第8回講演会 (昭31，10，13).
- 7) 橋田，吉野，森，渡郎：本誌，**34**，178 (1956).
- 8) 伊藤，古谷野：醸造論文集，第11輯，11 (1954).
- 9) 梅津：本誌，**32**，267 (1954).
- 10) 梅津：本誌，**33**，349 (1955).
- 11) 田村，桐村：醸酵学の進歩，**1**，194 (1950).
- 12) 田村，有馬：薬学，**4**，110 (1950).
- 13) 田村，角田，桐村，宮沢：農化，**26**，464 (1952).
- 14) MOORE, S. and STEIN, W.H. : J. Biol. Chem., **192**, 663 (1951).
- 15) KUNIN, R. : Anal. Chem., **21**, 87 (1947).
- 16) 丸田，鮫島，田中：農化，**28**，775 (1954).
- 17) BLOCK, R.J. : A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis, 61~112 (1955) : Anal. Chem., **22**, 1327 (1950).
- 18) MC FARREN, E. F. and MILLS, J. A. : Anal. Chem., **24**, 650 (1952).
- 19) ROLAND, J. F. and GROSS, A. M. : Anal. Chem., **26**, 502 (1954).
- 20) MC FARREN, E. F. : Anal. Chem., **23**, 168 (1951).
- 21) SLOTTA, K. H. and PRIMOSIGH, J. : Nature, **168**, 696 (1951).
- 22) HARDY, T.L., HOLLAND, D.O., and NAYLER, J.H.C. : Anal. Chem., **27**, 971 (1955).
- 23) HEYNS, K., and ANDERS, G. : Z. Physiol. Chem., **287**, 1 (1951).
- 24) TOENNIES, G., and KOLB, J.J. : Anal. Chem., **23**, 823 (1951).
- 25) GRASSMANN, W., and HANNING, K. : HOPPE-SEYLER's Z. Physiol. Chem., **290**, 1 (1952).
- 26) 小林，森：濾紙電気泳動法の実際，118 (1955).
- 27) AWAPARA, J. : Arch. Biochem., **19**, 172 (1948).
- 28) BLOCK, R.J. : A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis, 56 (1955).
- 29) FISCHER, R.B., PARSONS, D.S., and MORRISON, G. A., : Nature, **161**, 764 (1948) : **164**, 183 (1949).
- 30) MC FARREN, E. F., BRAND, K., and BUTKOWSKY, H.R. : Anal. Chem., **23**, 1146 (1951).
- 31) 市川：本誌，**30**，77 (1952).

(昭和32，4，19受理)