

蜂蜜中の残留サルファ剤の分析法の検討

— 抽出及び前処理法の問題点 —

木内 佳伸¹・藤本 喬¹

Studies on Analytical Method of Residual Sulfonamides in Honey by High Performance Liquid Chromatography (Difficulties of extraction and pre-clean up)

Yoshinobu KIUCHI and Takashi FUJIMOTO

A solid-phase extraction method using cation-exchange column was studied for the determination of 8 sulfonamides in honey by high performance liquid chromatography (HPLC).

Samples were dissolved in 10% acetic acid and then extracted with Bond-Elut SCX cartridge. The extracts were cleaned up on a Sep-pak Florisil cartridge.

The HPLC separation was performed on a Puresil 5 C18 120 Å column (150×4.6 mm i.d.) with acetonitrile and 5 mM oxalic acid (2:8); the drugs were detected at UV-275 nm (0.02 AUFS).

The recoveries of the drugs from honey spiked at the level of 0.2 µg/g were 70.6~85.4%. But the recovery rate were lowered until 21.5~65.9%, when the samples were kept at room temperature or 80°C for 1 day. The low level recovery was caused by Maillard-reaction. Though recovery levels were low, these drug's peaks were sufficiently detected at 0.1 ppm level on HPLC chromatograms.

The present method was sufficient for residue analysis.

Key Words: サルファ剤 sulfonamides, 蜂蜜 honey, アメリカ腐蛆病 American foul brood, 陽イオン交換カラム cation-exchange column, Bond Elut SCX
高速液体クロマトグラフィー high performance liquid chromatography

I はじめに

わが国における蜂蜜の消費量は、近年の健康指向やグルメブームにより増加傾向にある。蜂蜜は1967年の輸入完全自由化以後世界各地から輸入され、その輸入量は全消費量の約9割を占めるにいたっている¹⁾。

ミツバチのアメリカ腐蛆病は、*Bacillus larvae*が原因とされる伝染病で世界各地にみられる発生頻度の高い病気である。この病気の予防や治療にはサルファ剤等の抗菌剤が有効で給餌によりミツバチに投与され蜂蜜の安定生産の確保に寄与している。しかし一方では、これらの抗菌性物質の蜂蜜への移行残留が懸念されている。

このような動物用薬品の食品への残留は、食品衛生上

重要な課題となっており食生活の安全性を確保するうえで抗菌性物質の残留検査は重要性を増している。

蜂蜜中の残留サルファ剤の試験方法は、バイオアッセイ法²⁾や比色法³⁾、薄層クロマトグラフ法⁴⁻⁵⁾、ガスクロマトグラフ(GC)法⁶⁾、高速液体クロマトグラフ(HPLC)法⁷⁻⁹⁾が報告されている。これらの方法の多くは蜂蜜の粘性が高いことから水溶液を加え希釈した後、酢酸エチル、クロロホルム、ジクロロメタン等の溶媒を用いた液-液分配法で抽出する方法(溶媒抽出法)を採用している。著者らがこれらの溶媒を用いた抽出方法で添加回収実験を行ったところ添加直後では良好な回収率が得られるが数日間放置するとほとんど回収されないという結果を得た。そこで今回、8種類のサルファ剤について試料からの抽出(及び精製)に陽イオン交換カラムを使用した固相抽出による分析法を検討した。さらにサ

1. 福岡市衛生試験所 理化学課

ルファ剤を添加した蜂蜜について保存試験を行い本法と溶媒抽出法を比較したところ若干の知見を得たのでここに報告する。

II 実験方法

1. 試料

平成5年3月から平成7年3月にかけて福岡市内で入手した蜂蜜（アカシア，レンゲ，クローバー）26件を用いた。

2. 試薬

- ・サルファ剤：スルファチアゾール（STZ），スルファメラジン（SMZ），スルファジミジン（SDD），スルファクロルピリダジン（SCPD），スルファメトキサゾール（SMXZ）はsigma社，スルファモノメトキシシン（SMM），スルファジメトキシシン（SDM）は第一製薬（株），スルファキノキサリン（SQX）は大日本製薬（株）製の計8種類を用いた。
- ・10%酢酸：酢酸（特級）を蒸留水で10%に希釈して用いた。
- ・4%アンモニア-メタノール：25%アンモニア水（特級）をメタノールで4%に希釈して用いた。
- ・50%メタノール-ジクロロメタン：メタノールとジクロロメタンを等量混合した。（1：1）
- ・Bond Elut SCX カートリッジ（LRCタイプ，500 mg，Varian製）：メタノール10 ml及び蒸留水10 mlでコンディショニングした後使用した。
- ・Sep-pak Florisil カートリッジ（900 mg，Waters製）：50%メタノール-ジクロロメタン15 mlでコンディショニングした後使用した。
- ・サルファ剤標準原液：各サルファ剤10 mgを精秤し各々メタノール100 mlに溶解し，標準原液（100 μ g/ml）とした。
- ・HPLC用サルファ剤標準溶液：各標準原液を適宜HPLC移動相溶液で希釈して用いた。
- ・サルファ剤標準水溶液（添加回収用）：サルファ剤標準原液をメタノールで希釈し20，2，1 μ g/mlの3種類の濃度の溶液を調製した。ロータリーエバポレーターでメタノールを除去し同様の濃度になるよう蒸留水を加え超音波洗浄器中で溶解した。
- ・その他の試薬は，和光純薬工業（株）製の特級またはHPLC分析用を用いた。

3. 装置

ペリスタリックポンプ：アトー（株）製，SJ-1220型
ロータリーエバポレーター：東京理化学器械（株）製，N-4型

Table 1. Operating Conditions of HPLC

Column : Waters Puresil 5 C18 120 Å 150 mm × 4.6 mm i. d.
Mobile phase : CH ₃ CN - 5 mM Oxalic acid = 2 : 8
Flow rate : 0.6 ml/min
Column temp. : 35 °C
Detector : UV 275 nm
Sensitivity : 0.02 AUFS
Sample size : 10 μ l

超音波洗浄器：ヤマト科学（株）製，BRANSONIC 72

高速液体クロマトグラフ

ポンプ：Waters - 600 E
紫外検出器：Waters - 486
インジェクター：Waters - 717 (autosampler)

4. HPLC条件

測定条件はTable 1に示した。

5. 試験溶液の調製

蜂蜜5 gを50 ccビーカーに採取し10%酢酸20 mlを加え超音波洗浄器中でガラス棒を用い攪拌し溶解した。溶解した試料溶液をペリスタリックポンプを用い流速3 ml/minでBond Elut SCXカートリッジに負荷した。つぎに，蒸留水5 ml，メタノール5 mlで順次洗浄後，4%アンモニア-メタノール7 mlで溶出した。溶出液にエタノール12 mlを加えロータリーエバポレーターで減圧下乾固し50%メタノール-ジクロロメタン10 mlに溶解した。溶解液をSep-pak Florisilカートリッジに通し，さらに50%メタノール-ジクロロメタン5 mlを通した。その溶出液（計15 ml）をロータリーエバポレーターで減圧下乾固した後，残留物をHPLC移動相溶液1 mlに溶解して試験溶液とし，その10 μ lをHPLCに注入した。

6. 保存試験

1) 室温保存

アカシア，レンゲ，クローバーの各蜂蜜50 gにサルファ剤標準水溶液を10 μ g (0.2 ppm) 及び100 μ g (2.0 ppm 相当) 添加しよく混合した後室温（15~25°C）で135日間保存した。その間，本法及びジクロロメタンによる溶媒抽出法⁹⁾で添加回収実験を行った。

2) 80°C保存

前述の室温保存と同様に調製したサルファ剤添加蜂蜜を80°C水浴で一晩（18時間）保存し，本法による添加回収実験を行った。

7. 検量線の作成

各標準品の濃度が0.1, 0.3, 0.5, 0.8及び1 μ g/mlである混合標準溶液を調製し、その10 μ lをHPLCに注入した。得られたクロマトグラムよりピーク高を求め、絶対検量線法により検量線を作成した。

III 結果 及び 考察

1. 前処理方法の検討

1) 陽イオン交換カラムによる固相抽出法について

サルファ剤は、アミノ酸と同様に両性を示す物質であるがアミノ基を末端に持つことから弱塩基性物質としてとらえ弱イオン塩基性物質用の陽イオン交換樹脂であるBond Elut PRS (500 mg, プロピルスルホン酸)とSCX (500 mg, ベンゼンスルホン酸)の2種類のカートリッジカラムを用い水溶液状にした蜂蜜を直接、陽イオン交換カラムに負荷し、抽出、精製する固相抽出法を検討した。

まずサルファ剤標準品を用い両カートリッジカラムにおけるサルファ剤の保持能力を比較した。サルファ剤標準水溶液 (1 μ g/ml) に10%酢酸10 mlを加え陽イオンに解離させた後、陽イオン交換カラムに負荷した。洗浄操作として蒸留水及びメタノールを各々5 ml流し、溶出は4%アンモニア-メタノールを用いた。サルファ剤は4%アンモニア-メタノール5 mlで溶出終了となったが確実性を考慮して7 mlとした。結果をTable 2に示した。PRSカラムでは、SCPD, SMXZが回収されず他のサルファ剤の回収率も7~64%と低かった。一方SCXカラムにおいては、86~99%と良好な回収率が得られた。

この結果よりSCXカートリッジカラムを用いること

Table 2. Comparison of cation-exchange cartridge

Sulfonamides	Recovery a) (%)	
	Bond-Elut P R S (500 mg)	Bond-Elut S C X (500 mg)
STZ	12	97
SMZ	41	94
SDD	64	90
SMM	21	91
SCPD	—	99
SMXZ	—	93
SDM	31	89
SQX	7	86

a) mean for 3 samples
spiked: 1 μ g of each sulfonamide

にした。つぎに蜂蜜を用い検体のマトリックスの影響をみた。検体量は検出感度等を考慮し5 gとした。蜂蜜に加える10%酢酸を当初10 mlとしたが試料によっては溶解しにくいことから20 mlとした。なおSCXカラムに負荷する際に目詰まり等のトラブルは発生しなかった。

サルファ剤の抽出(回収)は良好であったが精製が不十分でHPLCクロマトグラムにおいてSTZ, SMZ等の保持時間の早い部分に夾雑ピークが観られた。そこでSCXカラム処理における洗浄操作の蒸留水とメタノールの量を各々10, 20 mlと増加したが夾雑ピークは完全に除くことができなかった。また、全体的に数%程度回収率が低下したことから洗浄操作における蒸留水とメタノールの量は各々5 mlとしSCXカラム処理後さらに別のカラムによる精製を行うことにした。

2) Sep-pak フロリジルによる精製について

蜂蜜や畜産食品中のサルファ剤の分析におけるカラム精製にはアルミナカラム¹⁰⁻¹²⁾やフロリジルカラム⁹⁾が用いられている。そこでこれらのカラムにより検討することにした。なお操作性の面からカートリッジタイプのSep-pakのAlumina NとFlorisisilを用いた。

Sep-pak Alumina Nによる方法は、厚生省のモニタリング検査法(改定法)¹³⁾に従って行ったが夾雑ピークを除去することはできなかった。Sep-pak Florisisilによる方法は、Horie, M.⁹⁾の方法を参考に検討したところ50%メタノール-ジクロロメタンとした試料液をカートリッジカラムに通すのみで夾雑ピークを除去することができた。

本法による添加回収の結果をTable 3に示した。0.2及び2.0 ppmのサルファ剤添加で70.6~89.1%の良好な回収率が得られた。

Table 3. Recovery rate of 8 Sulfonamides in Honey by the Proposed Method

Sulfonamides	Recovery a) (%)	
	0.2 ppm b)	2.0 ppm c)
STZ	70.6 (6.4)	72.5 (4.7)
SMZ	78.8 (3.6)	81.1 (2.2)
SDD	85.4 (1.9)	88.1 (0.5)
SMM	82.3 (1.7)	84.4 (0.9)
SCPD	75.8 (5.2)	77.8 (4.3)
SMXZ	79.9 (3.2)	70.7 (2.2)
SDM	85.0 (0.9)	87.9 (2.4)
SQX	78.2 (2.1)	89.1 (4.6)

a) mean (\pm C.V.%) for 3 samples
b) spiked with 0.2 μ g/g of each sulfonamide
c) spiked with 2.0 μ g/g of each sulfonamide

2. HPLC 測定条件

1) 測定波長について

8種類のHPLC用サルファ剤標準溶液の紫外吸収スペクトルを測定したところ260 nm～290 nm付近に吸収極大が認められた。本法では、単一波長による測定を行うことから8種類のサルファ剤の感度を考慮し275 nmで測定することにした。

2) HPLC分離用カラム及び移動相について

機器によるサルファ剤の分析において誘導体化の必要なGC法に比べHPLC法は、サルファ剤を直接分析できることから多く報告されている¹⁰⁻¹⁵⁾。そこでHPLCの分離用カラムとしてInertsil ODS-2 (GLサイエンス), TSK-gel ODS-80TM (東ソー) 及びPuresil 5 C18 120 Å (waters) を、移動相溶液として前報¹⁶⁾ で用いたアセトニトリル-シュウ酸系を用いて分離条件を検討した。検討に用いたカラムの中ではTSK-gel ODS-80 TMとPuresil 5 C18 120 Åがサルファ剤の相互分離に優れていたが、今回は、Puresil 5 C18 120 Åを用いた。移動相溶液についてはアセトニトリルと5 mMシュウ酸の混合比を(2:8)とした時、最も優れた相

互分離が得られた。また、各々のサルファ剤の保持時間の再現性の為にカラム温度を35℃一定とした。

このHPLC条件においては、8種類のサルファ剤相互の分離や他の夾雑ピークとの分離及び保持時間の再現性も良好なクロマトグラムが得られた。

3. 検量線

実験方法7. に述べた方法に従って検量線を作成した結果、いずれのサルファ剤も1～10 ngの範囲において原点を通る直線性を示した。

4. 保存試験によるサルファ剤の回収及び検出限界

1) 室温保存

サルファ剤を添加した蜂蜜の室温での保存回収実験を本法及び溶媒抽出法の代表としてジクロロメタンによる試験法⁹⁾で行い抽出法(回収率)の比較をした。

結果をTable 4に示した。また、その時得られた標準品及び0.2 ppm添加のHPLCクロマトグラムをFig. 1～2に示した。

Table 4. Recovery Rate of Honey spiked with 8 Sulfonamides during storage at room temperature (15～25℃).

spiked = 0.2 ppm	Recovery a) (%)							
	CH ₂ Cl ₂ ^{b)}			SCX ^{c)}				
method								
Days of storage	0	1	7	0	1	7	30	135
STZ	50.6	1.7	—*	70.6	23.6	30.0	32.0	28.5 (7.3)
SMZ	73.1	2.5	—*	78.8	41.1	45.0	47.9	38.0 (4.7)
SDD	72.7	2.3	—*	85.4	62.7	66.9	69.3	65.9 (4.2)
SMM	86.7	3.1	—*	82.3	49.4	53.1	56.3	55.0 (1.2)
SCPD	81.5	3.9	—*	75.8	19.4	21.6	22.1	21.5 (4.7)
SMXZ	84.6	7.3	—*	79.9	19.7	22.9	25.4	22.9 (11)
SDM	55.7	4.1	—*	85.0	59.1	62.5	65.2	65.7 (2.7)
SQX	41.0	6.7	—*	78.2	52.2	48.7	42.2	32.1 (9.8)

spiked = 2.0 ppm	Recovery a) (%)							
	CH ₂ Cl ₂ ^{b)}			SCX ^{c)}				
method								
Days of storage	0	1	7	0	1	7	30	135
STZ	52.5	1.4	1.3	72.5	29.5	30.8	31.6	30.6 (9.1)
SMZ	76.2	1.9	2.3	81.1	44.5	47.5	48.1	43.4 (11)
SDD	75.6	1.9	2.3	88.1	64.5	69.5	69.6	60.6 (1.3)
SMM	88.3	3.7	2.8	84.4	52.3	55.9	56.8	59.3 (7.5)
SCPD	84.9	3.9	2.4	77.8	25.6	23.8	22.2	17.2 (12)
SMXZ	86.8	7.6	2.6	80.7	24.1	23.7	25.9	25.8 (13)
SDM	56.1	4.1	2.0	87.9	61.3	65.0	65.7	67.8 (2.9)
SQX	29.8	12.2	13.8	89.1	63.1	55.6	47.2	36.4 (11)

a) mean (±C.V.%) for 3 samples

b) Dichloromethane extraction method⁹⁾

c) This Proposed Method

* : Not measured

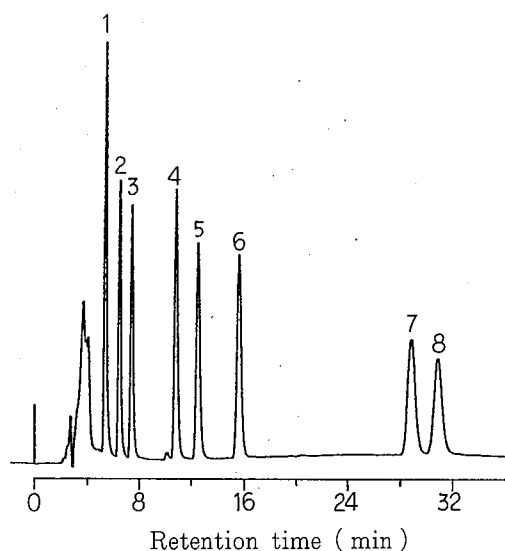


Fig. 1. HPLC chromatogram of standard mixture of 10 ng of each sulfonamide.
 Peaks : 1 = sulfathiazole (STZ) ; 2 = sulfamerazine (SMZ)
 ; 3 = sulfadimidine (SDD) ; 4 = sulfamonomethoxine (SMM)
 ; 5 = sulfachloropyridazine (SCPD) ; 6 = sulfamethoxazole (SMXZ)
 ; 7 = sulfadimethoxine (SDM) ; 8 = sulfaquinoxaline (SQX)

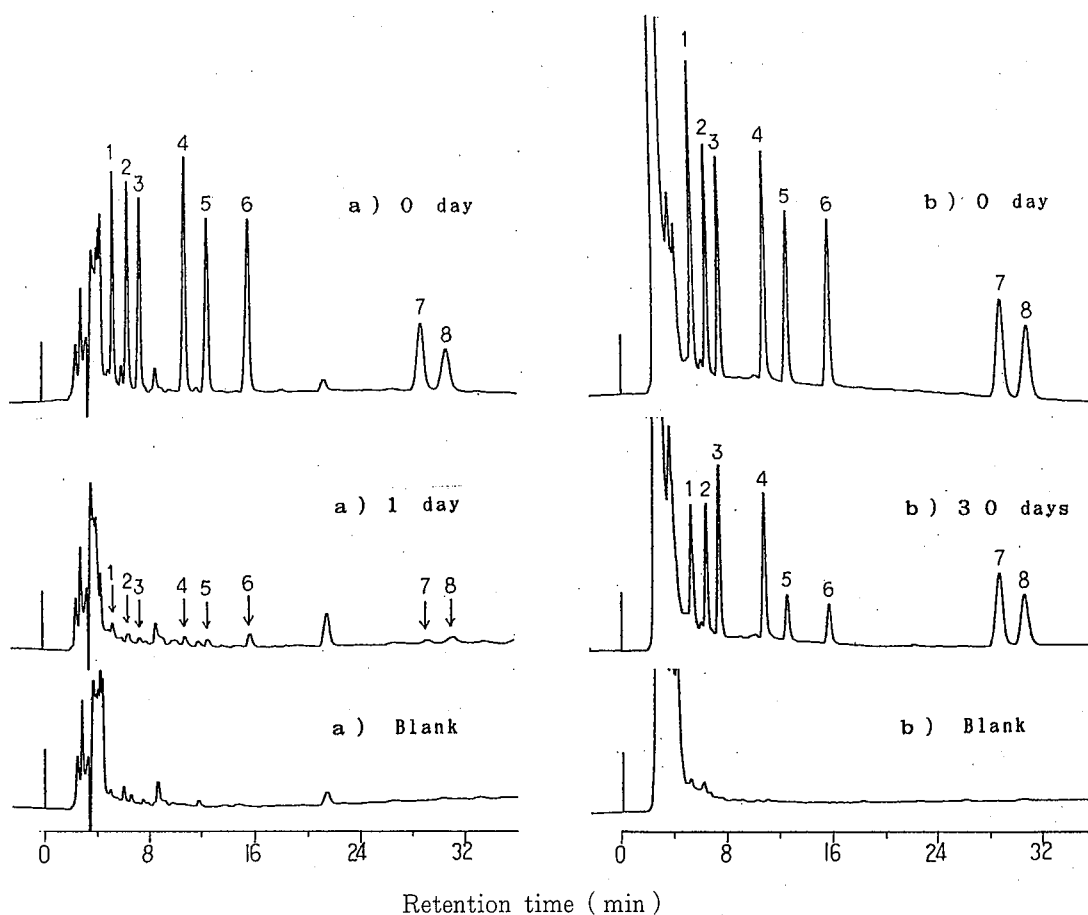


Fig. 2. HPLC chromatograms of Honey spiked with 8 sulfonamides during storage at room temperature (15 ~ 25 °C) [spiked with 0.2 $\mu\text{g/g}$ of each sulfonamide]
 Peaks ; 1= STZ, 2 = SMZ, 3 = SDD, 4 = SMM, 5 = SCPD, 6 = SMXZ, 7 = SDM, 8 = SQX
 a) Dichloromethane extraction method⁹⁾
 b) This Proposed Method

蜂蜜の種類及びサルファ剤の添加量の違いによる回収率に大きな差はみられなかった。

本法による回収率はサルファ剤添加直後の70.6～89.1%から1日後に19.4～64.5%に低下したがHPLCクロマトグラムにおいてサルファ剤のピークは十分に確認可能であった。その回収率は以後135日まで横ばい状態であった。一方、溶媒抽出法においては、添加直後の良好な回収率が1日後に1.4～12.2%にまで低下しHPLCクロマトグラムにおいてピークはノイズレベルとなった。この結果は、抽出溶媒に酢酸エチルやクロロホルムを用いても同様であった。

2) 80℃保存

蜂蜜は、採取したものをそのまま消費することもあるが、通常、市販の蜂蜜は60～80℃で加温溶解し口過や数種類の蜂蜜をブレンドした後、容器に充填されている。

そこで温室保存の結果を踏まえ80℃における保存を行い本法によるサルファ剤の回収実験を行った。

結果をTable 5に示した。サルファ剤の回収率は、0.2及び2.0ppmの添加量の違いによる大きな差はなく室温保存と同様な結果を得た。なお蜂蜜の色が一晩保存(18時間)で著しく褐色に変色したためこの時点で80℃保存は終了とした。HPLCクロマトグラム上において特に妨害となるピークは出現しなかった。

蜂蜜は、その主成分が還元糖でありメイラード反応による褐変を起こしやすいことが知られている¹⁷⁾。

Low, N.H.ら¹⁸⁾は、蜂蜜に類似した組成の還元糖(D-glucose & D-fructose)溶液中でのSTZの安定性について実験を行い還元糖の存在下ではメイラード反応によりSTZが減少していくことを報告している。つまり還元糖の水酸基とサルファ剤のアミノ基が結合し遊離状態にあったサルファ剤が化学結合型に変化したため見かけ上サルファ剤が減少していったものとしている。

蜂蜜中でのサルファ剤の減少がメイラード反応とするならばその反応の速度や強さには温度や時間の影響が考えられる。

今回著者らが行った実際のサンプルである蜂蜜にサルファ剤を添加した保存試験においては、Low, N.H.らの報告よりサルファ剤の減少速度が速い結果となった。このことは蜂蜜中にサルファ剤が存在(残留)した場合すみやかにそしてかなりの比率で化学結合型に変化していることを示唆している。

これらのことから溶媒抽出法による蜂蜜からのサルファ剤の検出事例は遊離状態のサルファ剤を検出したものと考えられ本来多量に含有していた可能性がある。また、検出下限に疑問が残る結果となった。本法における検出下限は、保存一日後の回収率がサルファ剤の種類により低下したりバラツキも大きくなり定量性に欠けるものの

Table 5. Recovery rate of Honey spiked with 8 Sulfonamides during storage at 80℃

spiked	Recovery a) (%)			
	0.2 ppm b)		2.0 ppm c)	
	0	1 (18 hours)	0	1 (18 hours)
STZ	70.6	25.9 (6.6)	72.5	26.4 (2.3)
SMZ	78.8	31.8 (3.6)	81.1	35.3 (8.6)
SDD	85.4	45.8 (0.8)	88.1	48.5 (5.0)
SMM	82.3	58.1 (5.4)	84.4	56.2 (5.9)
SCPD	75.8	22.3 (7.5)	77.8	25.7 (3.6)
SMXZ	79.9	24.5 (16)	80.7	25.9 (4.5)
SDM	85.0	57.9 (3.8)	87.9	58.8 (1.5)
SQZ	78.2	31.8 (2.1)	89.1	32.9 (9.0)

a) mean (±C.V.%) for 3 samples

b) spiked with 0.2µg/g of each sulfonamide

c) spiked with 2.0µg/g of each sulfonamide

温度や時間の影響をあまり受けず今回用いた試料において夾雑ピーク(ベースラインノイズ)がないことなどから0.1ppmは検出可能であった。

食品中の残留薬剤の分析において目的物質をいかに抽出するかは重要な要素であり、操作の第一歩であることから遊離及び化学結合型に変化したとみられるサルファ剤のいずれの型体をも定量する方法を検討しなければならないと考える。

なお、本法を用い実験方法1。試料に示した蜂蜜26検体についてサルファ剤の分析を行ったが、いずれも検出されなかった。

IV ま と め

陽イオン交換カラムを用いた固相抽出による蜂蜜中の8種類の残留サルファ剤について分析法を検討した。

さらにサルファ剤を添加した蜂蜜の保存試験を行い次の結果を得た。

1. 蜂蜜に酢酸水溶液を加え溶解後、Bond Elut SCXによる固相抽出を行いさらにSep-pak Florisilによる精製を行った。
2. HPLCカラムは、Waters Puresil 5 C18 120 Å (150mm×4.6mm i.d.)、移動相は、アセトニトリル-5mM Oxalic acid = (2:8)を用いた。検出は、UV-275nmで行った。
3. 本法における分析操作上の回収率は、0.2及び2.0ppm添加で70.6～89.1%であった。
4. サルファ剤を添加した蜂蜜を温室及び80℃で保存したところ一日後に回収率は19.4～64.5%に低下した。この原因は、メイラード反応と考えられた。

5. 保存試験の結果、回収率は低下したがHPLCクロマトグラムにおいて0.1 ppmのサルファ剤のピークは十分に検出可能であった。
6. 蜂蜜26件について本法を適用した結果いずれの検体からも今回対象とした8種類のサルファ剤は検出されなかった。

この報告の要旨は、第31回全国衛生化学技術協議会年会（1994年東京都）において発表した。

文 献

- 1) 吉田忠晴：食の科学，156，29～33，光琳（東京），1991
- 2) 神保勝彦，門間千枝，松本昌雄，丸山務：食衛誌，33（3），217～222，1992
- 3) Schwartz,D.P., & Sherma,J. : J.Assoc.Off.Anal.Chem., 69（1），72～74，1986
- 4) Neidert,E., Baraniak,Z., & Sauve,A. : J.Assoc.Off.Anal.Chem., 69（4），641～643，1986
- 5) Sherma,J., Bretschneider,W., Dittamo,M., Dibiase,D., D.Huh, & Schwartz,D.P. : J.Chromatogr., 463（1），229～233，1989
- 6) 竹葉和枝，神崎政子，村上文子，松本昌雄，：東京都衛研年報，34，150～154，1983
- 7) Barry,C.P., & MacEachern,G.M. : J.Assoc.Off.Anal.Chem., 66（1），4～7，1983
- 8) 江連陽子，寺門信子，鈴木洋一：栃木衛研所報，19，71～73，1989
- 9) Horie,M., Saito, K., & Nose, N. : J. AOAC.Int., 75（5），786～789，1992
- 10) 堀義宏：食衛誌，24（5），447～453，1983
- 11) 永田知子，佐伯政信：食衛誌，29（1），13～20，1988
- 12) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課編：畜水産食品中の残留物質検査法，103～107，中央法規出版（東京），1990
- 13) 厚生省生活衛生局乳肉衛生課：衛乳第79号，平成5年4月1日付，平成5年度畜水産食品の残留有害物質モニタリング検査の実施について，別添2
- 14) 堀江正一，齊藤貢一，星野庸二，能勢憲英，浜田尚樹，中澤裕之：食衛誌，31（2），171～176，1990
- 15) Long,A.R., Hsieh,L.C., Malbrough,M.S., Short,C.R., & Barker,S.A. : J.Agric.Food Chem., 38（2），423～426，1990
- 16) 木内佳伸，藤本喬：福岡市衛試報，18，51～57，1993
- 17) 杉田浩一，堤忠一，森雅夫 編：新編日本食品事典，59～61，医師薬出版（東京），1982
- 18) Low,N.H., Standish,J.L., & Sporns,P. : Can.Inst.Food Sci.Technol.J., 22（3），212～215，1989