

Chelate 法에 의한 Phytin 分析에 관한 研究

申 載 斗

서울대학교農科大學生化學教室

Studies on the analysis of phytin by the Chelatometric method.

Jai Doo Shin

College of Agriculture, Seoul National University

目 次

SUMMARY

緒 論

實驗材料 및 方法

(1) 材 料

1) 脫脂米糖

2) Na-phytata

3) 合成 Na-phytate

4) 試 藥

(2) 實驗方法

1) Chelate 法에 의한 Na-phytate 의 分析

a) 試料溶液의 調製

乾式分解法

濕式分解法

b) 試料溶液부터 P, Ca 및 Mg 定量

2) 澱粉混入 Na-phytate 의 分析

3) 從來法에 의한 Na-phytate 의 分析

實驗結果 및 考察

1) Na-phytate 의 分解法에 關하여

2) Na-phytate 의 Chelate 및 從來分析法에 關하여

3) 澱粉混入 Na-phytate 의 分析에 關하여

4) 合成 Na-phytate 의 分析에 關하여

摘 要

參考文獻

SUMMARY

Phytin is a salt (mainly calcium and magnesium) of phytic acid and its purity and molecular formula can be determined by assaying the contents of phosphorus, calcium and magnesium in phytin. In order to devise a new method for the quantitative analysis of the three elements in phytin, the chelatometric method was developed as follows:

1) As the pretreatment for phytin analysis, it was ashified at 550~600°C in the presence of concentrated nitric acid. This dry process is more accurate than the wet process.

2) Phosphorus, calcium and magnesium were analyzed by the conventional and the new method described here, for the phytin sample decomposed by the dry process.

The ashified phytin solution in hydrochloric acid was partitioned into cation and anion fractions by means of a cation exchange resin. A portion of the cation fraction was adjusted to pH 7.0, followed by readjustment to pH 10 and titrated with standard EDTA solution using the BT [Eriochrome black T] indicator to obtain the combined value of calcium and magnesium. Another portion of the cation fraction was made to pH 7.0, and a small volume of standard EDTA solution was added to it. pH was adjusted to 12~13 with 8 N KOH and it was titrate by a standard EDTA solution in the presence of N-N[2-Hydroxy-1-(2-hydroxy-4-sulfo-1-naphy-tate)-3-naphthoic acid] diluted powder indicator in order to obtain the calcium content. Magnesium content was calculated from the difference between the two values.

From the anion fraction the magnesium ammonium

phosphate precipitate was obtained. The precipitate was dissolved in hydrochloric acid, and a standard EDTA solution was added to it. The solution was adjusted to pH 7.0 and then readjusted to pH 10.0 by a buffer solution and titrated with a standard magnesium sulfate solution in the presence of BT indicator to obtain the phosphorus content.

The analytical data for phosphorus, calcium and magnesium were 98.9%, 97.1% and 99.1% respectively, in reference to the theoretical values for the formula $C_6H_8O_{24}P_6Mg_4CaNa_2 \cdot 5H_2O$. Statical analysis indicated a good coincidence of the theoretical and experimental values. On the other hand, the observed values for the three elements by the conventional method were 92.4%, 86.8% and 93.8%, respectively, revealing a remarkable difference from the theoretical.

3) When sodium phytate was admixed with starch and subjected to the analysis of phosphorus, calcium and magnesium by the chelatometric method, their recovery was almost 100%

4) In order to confirm the accuracy of this method, phytic acid was reacted with calcium chloride and magnesium chloride in the molar ratio of phytic: calcium chloride: magnesium chloride = 1 : 5 : 20 to obtain sodium phytate containing one calcium atom and four magnesium atoms per molecule of sodium phytate. The analytical data for phosphorus, calcium and magnesium were coincident with those as determined by the aforementioned method.

The new method employing the dry process, ion exchange resin and chelatometric assay of phosphorus, calcium and magnesium is considered accurate and rapid for the determination of phytin.

緒 論

phytin은 植物體 特히 米糠에 多量¹⁾(約 14%)으로 含有되어 있는 有機磷化合物로서 發育不全, 磷缺乏症, 酵母 增殖劑 및 inositol 製造原料²⁾로 近年 注目을 끌고 있는 物質이다. 一般적으로 植物體에 들어 있는 phytin을 分離하려면 植物體를 稀酸으로 處理하여 phytin 浸出液을 만들고 이것을 NaOH 또는 $Ca(OH)_2$ 등으로 中和하여 phytin을 沈澱시켜야 한다.

이때에 NaOH를 中和劑로 사용하면 Na가 一部 置換된 Na-phytate³⁾가 된다. 그리고 이 Na-phytate

分子中에는 Na 외에 Ca 및 Mg가 含有되어 있으며 이들의 含有量에 따라 植物體에 들어 있는 phytin의 分子量과 分子式은 달라진다. 一般적으로 phytin은 phytic acid(mesoino sitol hexaphosphate)에 Ca, Mg 및 少量의 alkali 金屬이 結合되어서 생긴 鹽^{1,4)}이므로 元素分析을 하지 아니하여도 P, Ca, Mg 및 alkali 金屬등을 定量하면 그 分子式을 얻을 수 있다.

지금 주어진 phytin이 Ca 1原子, Mg 4原子를 含有하고 있는 Na-phytate 라면 分子式이 $C_6H_8O_{24}P_6Mg_4CaNa_2 \cdot 5H_2O$ 이며 大略 P=20%, Ca=4%, Mg=10%, Na=5%가 된다⁵⁾. 이와 같이 phytin은 P, Ca 및 Mg를 多量으로 含有하고 있으므로 從來의 分析法으로^{6,7,8)}는 phytin을 分析함에 있어 困難한 點이 많았다. 즉 phytin을 分解하여 分解液으로부터 P를 定量하려고 할때 常法에 따라 分解液에 ammonia 水를 넣어서 P成分만 含有하는 ammonia 沈澱을 만들어 이것을 2~3회 沈澱시키어도 P量에 比하여 많은 量의 Ca와 Mg가 共存되어 있으므로 ammonia 沈澱에 Ca와 Mg가 따라오며 또한 Ca와 Mg가 共存하는 溶液에서 Ca를 分離할 目的으로 이 溶液에 ammonium oxalate를 넣어서 calcium oxalate의 沈澱을 만들때에도 Ca와 Mg가 다같이 二價이며 Mg量이 많으면 이 沈澱에 Mg가 附隨되어 오므로 Ca와 Mg의 完全分離操作이 대단히 어렵다. Ceferina R. Ordonez¹²⁾는 phytin 中の Ca와 Mg를 定量할 目的으로 phytin을 물에 懸濁시키고 pH4.5(pH4.5에서는 phytin이 完全溶解안된다)로 조절하고 陽 ion 交換樹脂로 처리하여 phytic acid 區分과 Ca 및 Mg 區分으로 分離하고 Ca와 Mg를 定量하였다. 그러나 이 方法으로는 phytin 中の P를 定量할 수 없을 뿐 아니라 phytin의 分子量(900以上)이 대단히 커서 ion 交換能이 좋지 못할것^{13,15)}이므로 phytin 中에 있는 Ca와 Mg를 完全遊離시키기에 어려움이 있을 것이다.

그리하여 著者は phytin의 새로운 分析法을 確立 하고자 여러가지로 實驗을 거듭한 結果 phytin 中の P, Ca 및 Mg를 定量하기 위하여서는 phytin을 550~600°C에서 conc. HNO₃로 축이면서 灰化하고 灰分의 鹽酸溶液을 陽 ion 交換樹脂로 처리하여 陽 ion 區分에서 Ca와 Mg를 또 陰 ion 區分에서 P를 各各 Chelate 法으로 定量하는 方法이 少量의 試料를 가지고 가장 正確하고 迅速하게 定量할 수 있는 方法임을 알게 되었기에 다음과 같이 報告하는 바이다.

實驗材料 및 方法

(1) 材料

1) 脫脂米糠

서울大學校農科大學試驗場에서 1967 年度에 收穫한 再建品種을 Baby Rice Huller 로 製玄하고 McGill Miller No. 3 로 精米하여 (玄白率 93.41%) 얻은 生米糠을 hexane 으로 脫脂하였으^{17 18)} 그 分析値는 다음과 같다.

水分 (%)	粗脂肪 (%)	粗蛋白質 (%)	粗纖維 (%)	灰分 (%)
10.35	0.86	18.16	10.68	12.92

可溶性無窒素 (%)	phytin (%)	P (%)	Ca (%)	Mg (%)
47.03	13.50	4.02	1.13	1.26

2) Na-phytate

分析에 使用한 Na-phytate 는 다음과 같이 調製¹⁹⁾ 하였다. 上記한 脫脂米糠 40g 에 그 約 8 倍量(320 ml)의 0.3% HCl 를 넣고 가끔 저어주면서 室溫(11~13°C)에서 12 時間浸出한 後에 吸引濾過하고 殘渣를 0.3% HCl 로 4 回洗滌하고 洗液을 濾過液에 合하여 phytin 浸出液으로 하였으며 이 phytin 浸出液에 5% NaOH 를 넣어서 pH 7.0 으로 中和하여 phytin 沈澱을 얻었다. 이 沈澱을 水洗한 後 0.6%

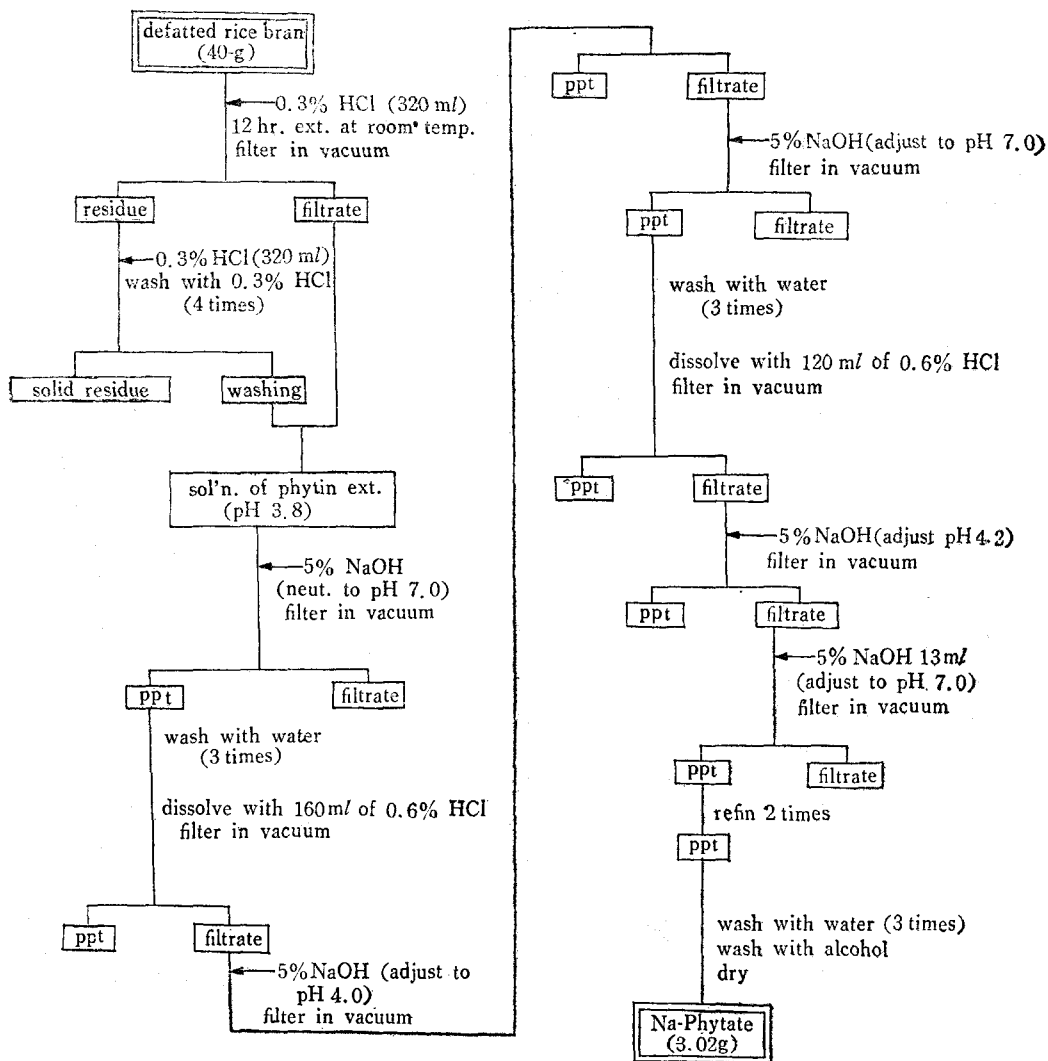


Fig. Preparation of Na-phytate from defatted rice bran.

HCl 에 녹이고 濾過後 5%NaOH 로 pH 4.0 으 中 和하여 아직 남아있는 微量의 沈澱(이것은 主로 蛋 白質等)을 濾別하고 濾液을 다시 pH 7.0 으 中 和하여 Na-phytate 를 再沈澱시켰으며 이러한 再沈過 程을 4 回反復한후 alcohol 로 씻고 乾燥하여 精製된 Na-phytate 를 調製한바 그 過程은 圖 1 과 같다. 調製한 Na-phytate 의 蛋白質檢出反應과 炭水化物 檢出反應²¹⁾은 모다 陰性이 있었으므로 本 Na-phytate 는 充分히 精製된 것으로 본다.

3) 合成 Na-phytate

脫脂米糠에서 調製한 Naphytate 의 P,Ca 및 Mg 을 Chelate 法으로 定量한 結果를 再檢討하기 爲하

여 Na-pgytate 로 부터 純粹한 phytic acid 를 만들 고 phytic acid 에 Ca, Mg 및 Na 을 結合시켜서 Na-phytate 를 合成하였다. 즉 앞에서 調製한 Na-phytate 1 g 에 12% HCl 50 ml 를 넣고 1 時間 沸騰 시켜서 Na-phytate 에 結合된 Ca 와 Mg 의 一部를 遊離시키고 減壓濃縮後 dil. NH₄OH 로 pH 를 3.5 로 調節(pH 3.5 以上에서는 Na-phytate 가 完全溶解 되지 아니한다.)하고 Dowex-50 column 에 通過시 킨다. 溶出液과 水洗液을 合하여 減壓濃縮하고 이 에 無水 ethyl alcohol 를 넣어서 phytic acid^{53 53 65)} 를 沈澱시켜서 만드는 過程은 圖 2 와 같다.

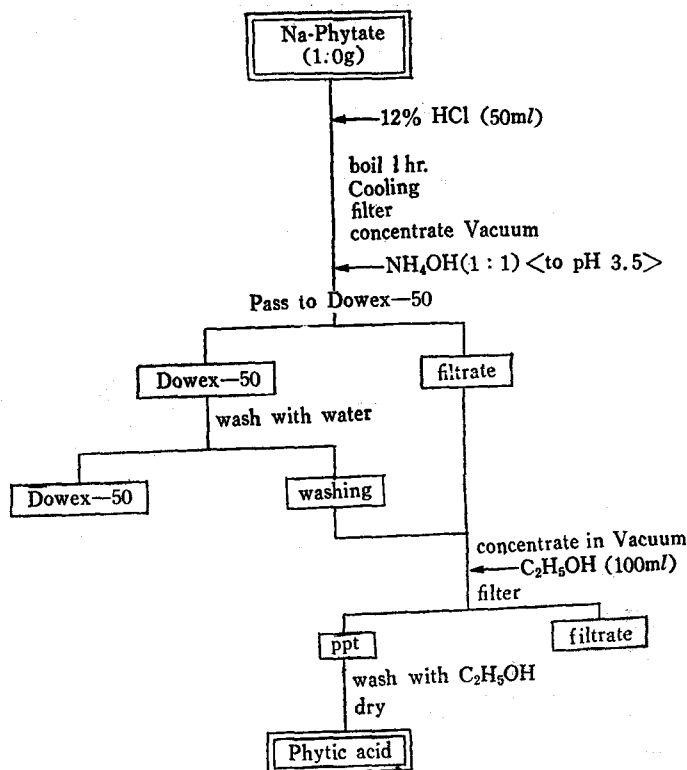


Fig 1: Preparaticp of hytic acid from Na-phytate

上記 調製한 phytic acid 의 純度를 檢定하기 위 하여 phytic acid cyclohexylamine salt 을 合成하여* 그 融點을 測定하였든바 標準 phytic acid 의 cyclohexylamine salt 의 融點과 거이 一致하였으며 또한 P 의 含有量을 測定한바 이거 역시 理論値와 一致 됨을 밝혔다.**

* 調製한 phytic acid 0.2 g 에 蒸溜水를 넣어서 0.5 % (w/w) phytic acid 水溶液을 만든다.

이 0.5% phytic acid 水溶液 10 g 에 cyclohexylamine 을⁵⁶⁾ 넣어서 pH 7.5 로 中和하고 減壓下에 餘 分の cyclohexylamine 을 蒸發시키면서 濃縮, 放冷

하여 phytic acid cyclohexylamine salt 의 無色針狀 結晶을 얻었다. 이 結晶에 90% acetone 水溶液 40 ml 를 넣고 加溫하여 結晶을 溶解하고 濾過후 放冷 하여 再結晶을 3 回 反復한 것의 融點은 193~199°C 였다. 이 測定値는 佐藤⁵⁷⁾가 測定한 標準 phytic acid cyclohexylamine salt 의 融點 189~200°C 와 거 이 一致한다.

** 上記實驗에서 만든 0.5% phytic acid 水溶液 10g (phytic acid-50mg 含有)를 conc. HNO₃로 축이 면서 550~600°C 에서 灰化한 것을 dil. HCl 에 녹 이고 蒸溜를 넣어서 約 50 ml 로 만들었고 圖 4 의 過

程에 의하여 P를 定量하였다.

P 定量值 1.410 mg(0.01 M-MgSO₄消費量 5.45ml)
調製 phytic acid 中の P%는 $1.410 \times \frac{100}{5} = 28.200$
%(이 數値는 理論值 28.180%의 100.07%이다)

脫脂米糖에서 얻은 Na-phytate 와 同一한 組成의 Na-phytate 를 合成하기 위하여 上記 實驗에서 만든 0.5% phytic acid 水溶液 13.2g(phytic acid 66 mg 에 該當한다) 蒸溜水 約 10 ml 를 넣고 0.1 M-CaCl₂⁵³⁾ 水溶液 5 ml 와 0.1 M-CaCl₂⁵³⁾ 水溶液 20 ml 를 넣어주었다. 이것은 phytic acid 1M에 對하여 Ca 5M, Mg 20M(Ca : Mg=1 : 4)를 넣어준 比이다. 다음에 0.1 M-NaOH 水溶液을 넣어서 pH 를 7.0로 調節하고 생긴 Na-phytate 의 沈澱을 걸러 받았다.

水洗液에서 Ca²⁺와 Mg²⁺가 檢出되지 아니할때까지 沈澱을 蒸溜水로 數回 洗滌한 다음 ethyl alcohol 로 씻고 乾燥하여 合成 Na-phytate 을 만들었다.

그 過程은 圖 3 과 같다.

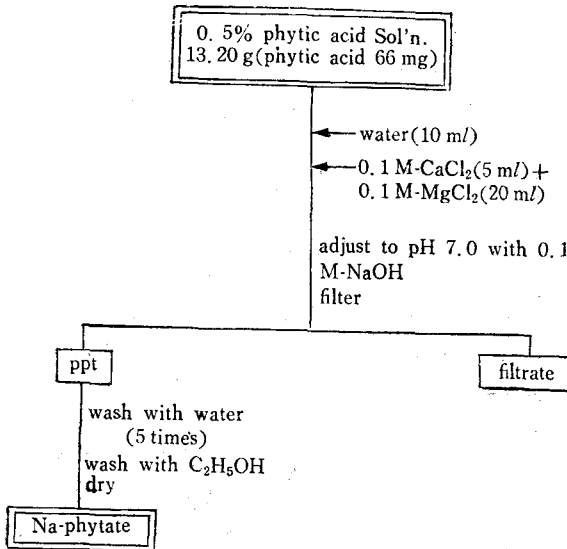


Fig. 3 : Preparation of Na-phytate from phytic acid

4) 試藥

Dowex-50 column; H⁺型陽 ion 交換樹脂 Dowex-WX-8 을 徑 1.5 cm 의 column 에 넣은 것으로써 樹脂層의 厚는 20 cm 이다.

0.01 M-EDTA 標準液²²⁾: Disodium ethylenediamine tetra acetate(EDTA)(M.W. 372.25) 3.7230 g_s를 蒸溜水에 녹이고 全量을 1000 ml 로 만든다.

0.01 M-EDTA 標準液 1ml=10⁻⁵g 原子의 金屬
= $\frac{\text{原子量}}{100} = \text{mg 金屬}$

0.01 M-MgSO₄標準液: 日本藥局方 MgSO₄·7H₂O 로 調製하고 EDTA 標準液으로 力價를 定한다.

BT 指示藥: Eriochrome black T(BT)0.5 g 와 hydroxylamine-HCl 4.5 g 에 無水 methyl alcohol 를 넣어서 100 ml 로 만든다.

pH10 緩衝液(NH₃-NH₄Cl): NH₄Cl 70 g 와 conc. NH₄OH(D=0.9)57 ml 에 蒸溜水를 넣어서 100 ml 로 만든다.

N-N 指示藥: 2-Hydroxy-1-(2-hydroxy-4-sulfo-1-naphthate)-3-naphthoic acid(Dotite N-N)粉末 1 g 를 特級 K₂SO₄100g 와 粉碎混合한 것이다.

澱粉: 日本岸田化學株式會社製 1 級品

本澱粉은 550~600°C 에서 灰化하고 P, Ca 및 Mg 의 定性試驗²¹⁾을 한 結果 陰性이었다.

(2) 實驗方法

1) Chelate 法에 의한 Na-phytate 의 分析

調製 Na-phytate 를 乾式 또는 濕式으로 分解하여 P, Ca 및 Mg 定量用試料溶液을 만들고 이 試料溶液을 陽 ion 交換樹脂 Dowex-50 column 에 通過시키어서 陽 ion 區分과 陰 ion 區分으로 完全分離하여 陽 ion 區分の 一定量을 가지고 標準 EDTA 溶液으로 滴定하여 Ca 와 Mg 를 定量하였으며 陰 ion 區分으로부터는 MgNH₄PO₄ 沈澱을 만들어서 HCl 에 녹이고 一定量의 標準 EDTA 溶液을 넣어서 Mg-EDTA 를 形成케하고 過剩의 EDTA 를 標準 MgSO 로 逆滴定하여 P 를 定量한다.

a) 試料溶液의 調製

乾式分解法

Na-phytate 0.5 g 를 取하여 白金舟안에 넣고 少量의 conc. HNO₃를 添加 550~600°C 에서 約3時間 灰化시키고 冷却한 다음 HNO₃를 少量넣고 HCl (1:1)를 넣어서 灰分을 녹이고 물을 넣어서 正確하게 250 ml 로 만들어 P, Ca 및 Mg 定量用分解試料溶液으로 한다.

濕式分解法⁵⁾

Na-phytate 0.5 g 를 取하여 kjeldahl flask 에 넣고 conc. HNO₃ 10 ml 와 70% HClO₄ 3 ml 를 數回 넣어주면서 完全 無色으로 될때까지 加熱分解시킨다. 계속 加熱하여 남은 HClO₄가 完全分解되어 白煙이 발생될때까지 分解후 冷却하고 물을 넣어서 正確하게 250 ml 로 만들어 P, Ca 및 Mg 定量用分解試料溶液으로 한다.

b) 試料溶液부터 P, Ca 및 Mg 定量

乾式 또는 濕式으로 調製한 P, Ca 및 Mg 定量用 分解試料溶液 250 ml 에서 10 ml (이중에는 大略 P=4 mg, Ca=1 mg, Mg=2 mg 含有되어 있고 Na-phytate 20 mg 에 該當한다.)를 取하여 dil. NH₄OH 로

pH를 3.5로調節한후 Dowex-50 column을 통해 約 5 drops/min.의 速度로 流下시킨다.

Dowex-50 column을 PO_4^{3-} 가 檢出되지 않을때까지 蒸溜水로 數回씻고 洗液은 溶出液과 合해서 P 定量用試料溶液으로 한다. 水洗한 Dowex-50 column을 Ca와 Mg를 脫着시키기 위하여 4% HCl¹⁹⁾를 3回 通過시키고 數回 水洗*한다. 4% HCl 通過液과 水洗液을 合하고 蒸溜水를 넣어서 100 ml로 하여 Ca와 Mg 定量用試料溶液으로 한다.

* 水洗液에서 Ca^{2+} 와 Mg^{2+} 의 檢出이 안될때까지 水洗할 目的으로 無灰濾紙를 pH 10 緩衝液으로 측신 후 BT 指示藥 1滴을 滴下하고 그곳에 水洗液을 조금(1滴以下)칠하여 본다. 그리하여 赤色이 나타나지 아니할때까지 水洗한다.

P의 定量

PO_4^{3-} 는 EDTA와 Chelate 化合物을 만들지 아니하나 Zn^{2+} 또는 Mg^{2+} 와 定量的으로 難溶性沈澱 $ZnNH_4PO_4$ 또는 $MgNH_4PO_4$ 를 만듦으로 이 沈澱을 만들어서 間接的으로 Chelate 法에 의하여 PO_4^{3-} 를 定量할 수 있다^{24,29)}. P 定量用試料溶液으로 石橋의

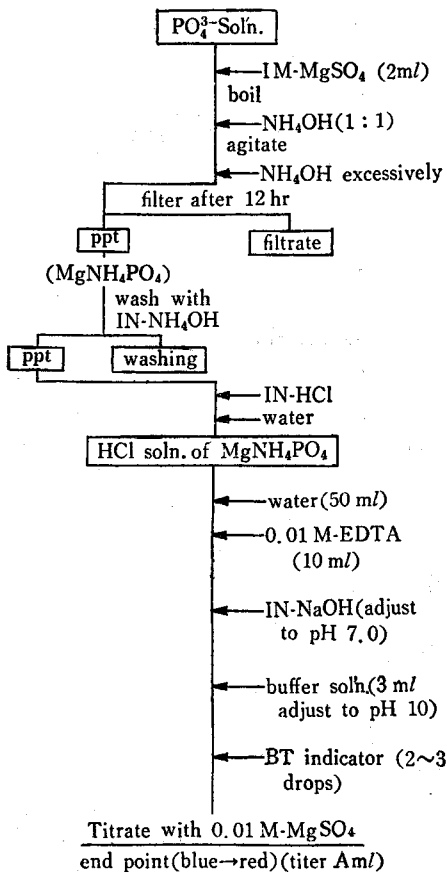


Fig. 4. Chelatometric determination of P

方法²⁷⁾을 써서 $ZnNH_4PO_4$ 를 만들고 EDTA 標準液으로 滴定하였으나 滴定終點이 素青色→素赤色으로 변하여 分明치 못하였으므로 Flaschka의 方法^{24,29)}을 使用하였다.

P 定量用試料溶液에 蒸溜水를 넣어서 約 50 ml로 만들고 1 M- $MgSO_4$ 溶液 2 ml를 넣어 沸騰시킨후 저어주면서 $NH_4OH(1:1)$ 를 過量으로 넣어서 $MgNH_4PO_4$ 沈澱을 만든다. 濾過를 容易하게 하기 위하여 12時間 放置한 후에 沈澱을 濾取하고 1 N- NH_4OH 로 數回 씻은후 沈澱을 1 N-HCl로 溶解시킨다. 이 $MgNH_4PO_4$ 의 HCl 溶液에 蒸溜水를 넣어서 約 50 ml로 만들고 0.01 M-EDTA 標準液 10 ml를 넣어 준 다음에 1 N-NaOH로 pH 7.5로 調節하고 pH 10 緩衝液 3 ml와 BT 指示藥을 加한 다음 0.01 M- $MgSO_4$ 標準液으로 逆滴定한다. 青色이 赤色으로 變하는 點이 滴定終點이다. 이 滴定值로부터 P 量을 計算한다. 이 過程은 圖 4와 같다.

Ca 및 Mg의 定量

Ca의 Chelate 洗定法은 여러가지가^{30~42 47)} 있으나 Ca에 少量의 Mg가 共存하는 試料의 경우 pH 10에서 滴定하면 Ca와 Mg의 값이 同時에 定量하여지고 pH 12~13에서 滴定하면 Mg가 $Mg(OH)_2$ 로 沈澱되어서 EDTA와 反應하지 아니하므로 Ca 值만이 定量된다는 原理²²⁾를 써서 Ca와 Mg를 各各 定量할 수 있으나 phytin 같이 Ca와 共存하는 Mg 量이 너무 많을 때는 $Mg(OH)_2$ 沈澱에 Ca의 一部가 吸着되어 誤差가 生길 수 있으므로 Ca 定量때 試料溶液에 먼저 0.01 M-EDTA 溶液一定量을 넣어주고 다음에 pH를 12~13으로 하고 滴定하여야 한다.

이와 같이 하면 Mg의 大部分이 EDTA와 먼저 Chelate 化合物을 만드므로 Ca의 吸着이 防止되어 Ca 值를 正確하게 定量할 수 있다.

上記 Ca와 Mg 定量用試料溶液에서 40 ml를 取하여 1 N-NaOH로 pH를 7.0로 調節하고 pH 10 緩衝液 3 ml와 BT 指示藥 2~3 洗을 넣고 0.01 M-EDTA 標準液으로 青色이 赤色으로 變化할 때까지 滴定하고 計算하여 Ca와 Mg의 값의 合計를 얻었다. 한편 前記 試料溶液에서 또 40 ml를 取하여 1 N-NaOH로 pH를 7.0로 調節한 다음 0.01 M-EDTA 標準液 0.5 ml를 넣고 8 N-KOH 3 ml를 넣어서 pH를 12~13으로 調節한 다음 N-N 指示藥 約 0.1 g를 넣고 0.01 M-EDTA 標準液으로 青色이 赤色으로 變化할 때까지 滴定하고 計算하여 Ca 量을 얻었다.

上記한 Ca와 Mg의 合計滴定값으로부터 Ca의

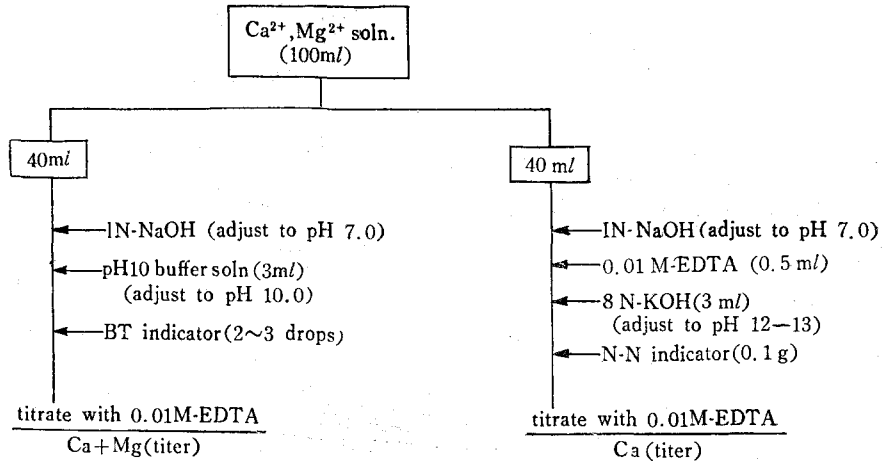


Fig. 5 : Chelatometric determination of Ca and Mg

滴定값을 빼낸 수치로부터 Mg의 값을 얻었다. 이 과정은 圖 5와 같다.

2) 澱粉混入 Na-phytate을 분석

phytin이 植物體와 共存하고 있을 때에도 本 Chelate法에 의한 P, Ca 및 Mg의 分析値가 phytin 單獨으로 存在할때의 分析値와 同一하게 되는지의 與否를 알기 위하여 다음과 같이 回收率에 관한 實驗을 하였다.

즉 澱粉 1g에 Na-phytate를 各各 0.5g와 0.3g 添加하여 混合試料를 만들어서 上記한 乾式으로 分解하여 試料溶液一定量을 만들고 其中 10ml를 取하여 Dowex-50 column에 通過시키고 Chelate法으로 P, Ca 및 Mg를 各各 定量하였다.

3) 從來法에 의한 Na-phytate의 分析^{8, 22, 29, 31, 43-46)} phytin 中の P, Ca 및 Mg를 定量함에 있어서 著者가 家出한 Chelate法과 從來 分析方法에 의한 分析値를 比較하기 위하여 本實驗을 하였다.

phytin의 分解法은 濕式보다 乾式이 完全하고 短時間內에 完了되므로 前記 乾式에 따라서 Na-phytate

를 分解하여 灰分의 HCl 溶液을 正確하게 500ml로 만들고 其中 100 (이것에는 大略 P=40mg, Ca=80mg, Mg=20mg 含有되어 있으며 이것은 Na-phytate 100mg에 該當한다.)를 取하여 蒸溜水를 넣어서 約 300ml로 만든 다음 NH₄Cl를 少量넣고 methyl red를 指示藥으로 하여 黃色이 나타날때까지 conc. NH₄OH를 넣어준 다음 1~2分間 沸騰시킨후 濾過한다. PO₄³⁻를 含有한 ammonia 沈澱分을 數回精製시켜서 따라오는 Ca와 Mg를 分離한 다음 ammonium molybdate 溶液²¹⁾으로 molybdenum ammonium-phosphate의 沈澱을 만들고 0.1N-NaOH로 滴定하여 P를 定量한다. 한편 ammonia 沈澱의 濾液과 再沈澱의 濾液을 合해서 離縮하여 約 300ml로 만들어서 5% ammonium oxalate 溶液으로 Ca를 calcium oxalate로 沈澱시키고 酸化滴定法으로 Ca를 定量한다. 한편 calcium oxalate의 濾液을 濃縮하여 約 500ml로 만들고 MgNH₄PO₄·6H₂O의 沈澱을 形成케하여 Mg를 定量한다.

이 과정은 圖 6과 같다.

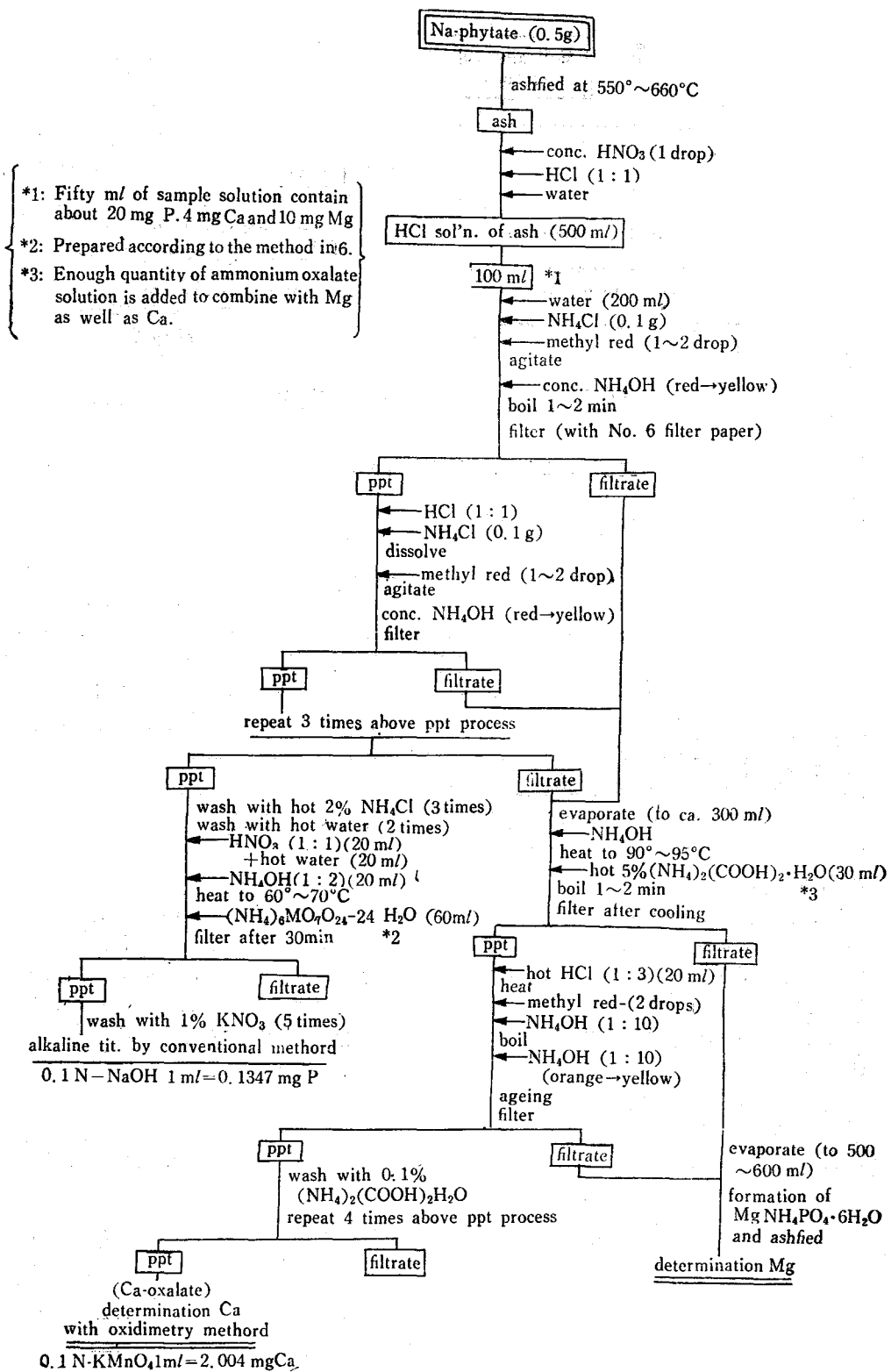


Fig. 6 : Analysis of Na-phytate with conventional method ⁴⁸⁾⁻⁵²⁾

結果 및 考察

1) Na-phytate의 分解法에 關하여

Na-phytate를 乾式 또는 濕式으로 分解한 後 Chelate法으로 P, Ca 및 Mg를 定量하고 두 分析值를 比較檢討하여 보다 좋은 phytin 分解法을 確立하기 위하여 Na-phytate에서 上記 分解法으로 만든 分解試料溶液을 陽 ion 交換樹脂에 通過시켜서 陽 ion 區分과 陰 ion 區分으로 나누어 Chelate法으로 P, Ca 및 Mg를 定量한 實驗值는 各各 表 1과 表 2와 같다.

Table 1: Analytical value of Na-phytate by the Chelate method through dry decomposition.

replication No.	P (%)	Ca (%)	Mg (%)	P : Ca : Mg
1	20.00	4.12	10.32	100:20.56:51.60
2	19.52	4.30	9.97	:22.02:51.02
3	19.32	4.25	9.88	:21.98:51.25
4	21.07	4.25	10.80	:20.17:51.24
5	19.78	4.26	10.10	:21.65:51.16
6	19.70	4.16	10.52	:21.10:53.41
average value ①	19.90 ±0.4	4.22 ±0.03	10.27 ±0.14	:21.25:51.61
*theoretical value ②	20.16	4.34	10.56	:21.50:52.60
①/②×100	98.9	97.1	99.1	
t value	N.S 0.543	N.S 4.3	N.S 2.07	

* 理論值는 Na-phytate를 $C_6H_8O_{24}P_6Mg_4CaNa_2 \cdot 5H_2O$ 로 가정 하였을때의 值이다.

Table 2: Analytical value of Na-phytate by the Chelate method through wet decomposition.

replication No.	P (%)	Ca (%)	Mg (%)	P : Ca : Mg
1	18.26	3.96	9.40	100:20.60:51.08
2	17.62	3.52	8.90	:19.98:50.45
3	16.80	3.56	8.58	:21.20:51.07
4	19.72	4.38	10.90	:22.25:55.25
5	16.92	3.60	8.62	:21.30:50.90
6	18.10	3.62	9.26	:20.00:51.16
average value ①	17.90	3.74	9.28	
theoretical value ②	20.12	4.34	10.56	
①/②×100	89.1	84.2	88.4	

調製 Na-phytate의 Na 含有量을 flame photometer로 測定한 平均値는 4.86%로서 理論值 4.99%의

97.3%이다.

Na-phytate의 無水物에 대한 各成分의 %는 다음 式에 의하여 計算하였다.

$$P = \frac{0.00003098 \times (10 - A) \times 100}{0.5 \times 10 / 250} \times \frac{100}{(100 - \text{水分})} \%$$

$$Ca = \frac{0.000408 \times (0.5 + C) \times 100}{0.5 \times 10 / 250 \times 40 / 100} \times \frac{100}{(100 - \text{水分})} \%$$

$$Mg = \frac{0.0002432 \times [B - (0.5 + C)] \times 100}{0.5 \times 10 / 250 \times 40 / 100} \times \frac{100}{(100 - \text{水分})} \%$$

表 1과 表 2로 Na-phytate 中の P, Ca 및 Mg의 分析平均値를 比較하여보면 乾式에 있어서는 P, Ca 및 Mg의 分析值는 各各 19.90%, 4.22% 및 10.27%이며 濕式에 있어서는 17.90%, 3.74% 및 9.28%이다. 그러므로 乾式에 對한 濕式의 P, Ca 및 Mg의 分析值의 比率는 各各 90.2%, 86.6% 및 89.2%에 不過한 적은 分析值를 나타냈음을 알 수 있으며, 그 原因은 Na-phytate가 濕式일 때에는 分解가 不充分하였기 때문이라고 생각된다. 특히 Na-phytate를 濕式으로 分解할때 8時間以上 長時間걸어도 分解液을 pH 7.0로 中和하면 Na-phytate와 비슷한 沈澱이 생기므로 分解完了點을 알기 어려운 缺點이 있다.

또 各分析實驗值의 正確度를 確認하기 爲해 理論值와의 比率를보면 乾式에있어서 P, Ca 및 Mg는 各各 98.9%, 97.1% 및 99.1%로서 이들의 平均은 98.4%이고 濕式에 있어서는 89.1%, 84.2% 및 88.4%로서 그 平均은 87.2%이다. 이와같이 乾式의 分析值는 濕式의 것보다 理論值에 近似하다. 그리하여 Na-phytate를 分析함에 있어서는 이를 3時間의 分解로서 分解가 充分한 乾式法을 擇함이 좋다고 생각한다.

調製한 Na-phytate에는 原料인 脫脂米糠 및 調製過程으로 보아서 不純物로 蛋白質, 炭水化物, Ca鹽 및 Mg鹽 등의 含有를 생각할 수 있으나 調製한 Na-phytate에 있어서 蛋白質과 炭水化物 反應이 陰性이고 또 phytin 浸出液에서 phytin을 沈澱시키는 pH 7.0에서는 無機態의 Ca鹽이나 Mg鹽의 沈澱은 起지 생기지 아니하며 또 調製한 Na-phytate의 P%는 19.9%로서 理論值 20.12%에 對하여 98.9%임으로 調製한 Na-phytate는 充分히 純粹한 것으로 생각된다.

또 原料 脫脂米糠은 Phytin 13.50%, P 4.02%, Ca 1.13%, Mg 1.26%를 含有하고 있으며 phytin은 P 19.90%, Ca 4.22%, 및 Mg 10.27%를 含有하고 있으므로 脫脂米糠中の 全 Ca+Mg量의 約

82%가 phytin 態 Ca+Mg 로 되어있으며 脫脂米糠 中の 全 P 量의 約 66.2%가 phytin 態 P 로 含有되 어 있음을 알수 있다.

2) Na-phytate 의 Chelate 및 從來分析法에 關하여 Na-phytate 를 乾式分解하여 P,Ca 및 Mg 定量用 分解試料溶液을 調製하고 前記 Chelate 法 및 從來 法으로 P,Ca 및 Mg 를 定量한 分析値는 各各 表 1 및 表 3 과 같다.

Table 3 : Analytical value of Na-phytate by the conventional method through dry decomposition.

replication No.	P (%)	Ca (%)	Mg (%)	P : Ca : Mg
1	19.12	3.68	10.75	100:19.25:56.30
2	18.66	3.77	9.47	:20.22:50.80
3	18.21	3.80	9.40	:20.88:51.60
4	18.87	4.00	6.88	:21.20:52.40
5	17.82	3.62	10.10	:20.30:56.70
6	18.62	3.73	9.80	:19.74:51.84
average value ④	18.60 ±0.2	3.77 ±0.05	9.90 ±0.2	:20.24:53.20
*theoretical value ⑤	20.12	4.34	10.56	:21.60:52.60
④/⑤×100	92.40	86.80	93.80	
t value	7.6**	10.6**	6.8**	

Chelate 法과 從來法으로 P,Ca 및 Mg 를 定量한 分析平均値는 表 1 과 表 3 에서 보는바와 같이 乾式에 있어 各各 19.90%, 4.22% 및 10.27%이며 濕式에 있어 18.60%, 3.77% 및 9.90%를 보였다. 또 理論値에 對한 分析値의 比率는 乾式에 있어 各各 98.9%, 97.1% 및 99.1%이고 濕式에 있어 92.4% 86.8% 및 93.8%이며 各成分의 이들 比率의 平均値는 乾式에 있어 98.3%이며, 濕式에 있어 91.0% 로서 乾式은 理論値와 1.7%밖에 差가 없는데 比較하여 濕式은 9%나 差가 있다. 또 上記 두 方法의 分析値사이의 有意差 有無를 알기위하여 P,Ca 및 Mg 分析値의 t 値를⁵⁰⁾ 檢定한 結果는 다음과 같다.

	P	Ca	Mg
t 値	4.020	7.460	6.100

즉 $t_{0.05;10} = 2.228$ 보다 全部 크다. 그러므로 Chelate 法과 從來法사이에는 統計의으로 高度의 有意差가 있어 두 方法은 같다고 볼 수없다. 또한 前 上記한 두 方法의 實測値와 理論値와의 一致與否를 알기위 하여 t 値를 檢定한 結果는 다음과 같다.

	P	Ca	Mg
Chelate 法	0.543	4.300	2.070
從來 法	7.600	10.600	6.800

즉 $t_{0.05;5} = 2.571$ 보다 從來法의 値는 많으므로 이 方法으로 分析한 P, Ca 및 Mg 分析値는 理論値와 高度의 有意差가 있고 Chelate 法의 P, Mg 値는 이 t 値보다 적으므로 Chelate 法에 의한 P, Mg 分析値는 理論値와 一致하며 Ca 値는 多少 差가 있으나 從來法으로의 分析値보다는 理論値에 近似하다.

그러므로 phytin 의 分析法은 本 Chelate 法이 從來法에 比較하여 越等하게 正確한 方法이라고 할 수 있다.

鈴木⁵¹⁾는 米糠 phytin 을 從來法으로 分析하여 P=23.5% Ca 5.2%, Mg 17.5%와 K,Na 혼적이라는 分析値를 얻은바 이로부터 P : Ca : Mg 를 計算하면 100 : 22.1 : 74.5 로서 이것은 그 1 分子中에 Ca 1 原子, Mg 5 原子들어 있는 phytin 으로 推測이되나 Ca 1 原子, Mg 5 原子含有 phytin 의 P : Ca : Mg 의 理論値는 100 : 21.5 : 65.5 로 위의 計算値와는 相當한 差가 있으므로 鈴木의 從來分析法은 좋은 方法이 못된다고 생각된다.

3) 澱粉混入 Na-phytate 의 分析에 關하여

本 Chelate 法에 의한 phytin 의 分析値가 phytin 이 他植物體와 共存하고 있을때에도 phytin 單獨으로 있을때와 같이 正確性을 갖이고 있는지 與否를 알기위하여 Na-phytate 에 澱粉을 一定量넣고 分析한 結果는 다음表 4 와 表 5 와 같다.

Table 4 : Recovery test of P, Ca and Mg in 1 g starch+0.5g Na-phytate mixture.

material	P (mg)	Ca (mg)	Mg (mg)
starch 1 g alone	0	0	0
0.5 g of Na-phytate. alone ④	9.64	2.08	5.05
1g starch+0.5g Na-phytate mixture ⑤	9.65	2.08	5.06
⑤/④×100	100.1	100.0	100.2

Table 5 : Recovery test of P, Ca and Mg in 1g starch+0.3g Na-phytate mixture

material	P (mg)	Ca (mg)	Mg (mg)
starch 1g alone	0	0	0
0.3g of Na-phytate alone ④	5.78	1.25	3.03
1g starch+0.3g Na-phytate mixture ⑤	5.79	1.25	3.03
⑤/④×100	100.17	100.0	100.0

本 Chelate 法에 의한 phytin 의 P, Ca 및 Mg 分析는 表 4, 表5 에서 보는바와 같이 phytin 單獨으로 存在할 때와 phytin 이 澱粉과 共存하고 있을

때와는 0.2%의 誤差範圍內에서 一致된다.

4) 合成 Na-phytate의 分析에 關하여

本 Chelate 法에 의한 Na-phytate 分析의 正確性을 再確認하기 위하여 Phytic acid 水溶液에 Ca : Mg=1 : 4의 mole 比로 CaCl₂溶液과 MgCl₂溶液을

過量 넣고 NaOH 溶液으로 pH 7.0 이 되도록 中和하여 Ca 가 1 原子, Mg 가 4 原子 含有되게 Na-phytate 를 合成하고 合成 Na-phytate 中の Ca 와 Mg 또 合成 Na-phytate 沈澱의 濾過液中の Ca 와 Mg 를 各 各 本 Chelate 法으로 定量한 結果는 表 6 과 같다.

Table 6 : Amount of Ca²⁺ and Mg²⁺ bound to phytic acid.

	added amount to mg of phytic acid(mg)	amount in filtrate (mg)	amount in Na-phytate (%) [Ⓐ]	theoretical value of Na-phytate(%) [Ⓑ]	Ⓐ/Ⓑ×100	number of atom-bound to phytic acid 1 mol.
Ca	20.04	16.06	4.29	4.34	98.6	0.98
Mg	48.64	38.96	10.45	10.56	99.2	3.98

表 6에서 보는바와 같이 合成 Na-phytate의 Ca 및 Mg 分析値는 各各 4.29%, 10.45%로써 理論値 Ca=4.34%, Mg=10.56%와 1%內外의 僅少한 差로 分析値가 理論値와 一致된다. 또 한편 分成 Na-phytate에 結合하지 아니고 濾過液에 殘存하는 Ca 와 Mg의 定量値는 各各 16.06 mg 및 38.96 mg 로써 phytic acid 66 mg 에 結合한 Ca 와 Mg는 各各 3.98 mg 및 9.68 mg 가 된다. 즉 phytic acid 1 分子에 Ca 가 39.8/40≒1 原子, Mg 가 66.8/24.32 ≒4 原子 結合하였다. 그러므로 合成된 Na-phytate는 Ca 1 原子, Mg 4 原子含有 Na-phytate 라고 생각 된다.

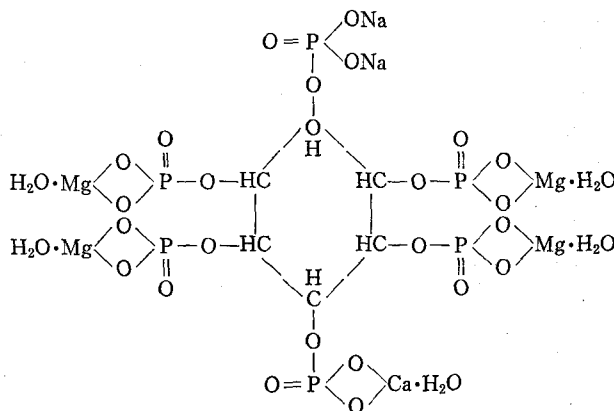
Na-phytate 合成에 使用한 phytic acid의 純度는 그 P 含有量 28.2%가 理論値의 100.07%이고 또 이 phytic acid의 cyclohexylamine 鹽의 融點 193~199° C가 標準 phytic acid의 cyclohexylamine 鹽의 融點

189~200°C와 잘 一致되므로 純度가 높은것으로 본다.

表 1과 表 6의 分析値에서 製造 및 合成한 Na-phytate의 Ca 및 Mg 値를 比較하면

Na-phytate 1 分子中の Ca%, Mg%
Ca의 原子數 Mg의 原子數
調製 Na-phytate 4,22 10,27 0,97 4,22
合成 Na-phytate 4,29 10,45 0,99 4,28
로서 調製 Na-phytate도 合成 Na-phytate와 같이 1 分子中에 Ca 1 原子 Mg 4 原子가 含有되어 있는 것으로 推定되며 그 分子式은 C₆H₆O₁₄P₆Mg₄CaNa₂·5H₂O 라고 생각된다.

그러므로 金屬元素의 位置를 고려하지 아니하면 調製한 Na-phytate의 構造式은 다음式과 같다고 생각된다.



摘 要

phytin은 phytic acid의 金屬鹽(主로 Ca 와 Mg) 鹽으로 그中の P, Ca 및 Mg를 定量하면 純度를 알

수 있고 또 分子式을 推定할 수 있다. 著者는 phytin 中の P, Ca 및 Mg를 定量分析하는 새로운 方法으로서 phytin을 乾式 分解하고 ion 交換樹脂로 처리한 다음 Chelate 法으로 定量하는 方法을 確立했으며 그 結果를 要約하면 다음과 같다.

1) phytin 分析의 前處理工程으로서는 phytin 을 conc. HNO₃로 적시면서 550~600°C에서 灰化하는 乾式分解法을 썼다. 이 方法은 濕式分解法보다 分析結果가 正確하다.

2) phytin 을 乾式分解한 試料를 가지고 從來法과 새로운 分析法(木法)에 의하여 P, Ca 및 Mg 를 定量하였으며, 本法은 다음과 같다.

phytin 灰分의 HCl 溶液을 陽 ion 交換樹脂로 처리하여 陽 ion 區分과 陰 ion 區分으로 分離하고 陽 ion 區分의 一部를 pH 7.0로 한다음 緩衝液(NH₃-NH₄Cl)으로 pH 10으로하고 BT 指示藥을 써서 標準 EDTA 溶液으로 滴定하여 Ca 와 Mg 의 合計值를 얻었다. 또 陽 ion 區分의 一部를 pH 7.0로 하고 標準 EDTA 溶液을 少量넣고 8N-KOH로 pH 12~13으로하고 N-N 稀釋粉末을 指示藥으로써 標準 EDTA 溶液으로 滴定하여 Ca 值를 얻었다. Ca 와 Mg 의 合計滴定値와 Ca 滴定値의 差로 Mg 值를 얻었다 陰 ion 區分으로부터 常法에 의하여 MgNH₄PO₄의 沈澱을 만들어서 HCl에 녹이고 一定量의 標準 EDTA 溶液을 넣어 pH 7.0로 한다음 緩衝液으로 pH 10으로하고 BT 指示藥을 써서 標準 Mg SO₄溶液으로 滴定하여 P 值를 얻었다.

本法으로 Na-phytate 를 分析한 結果 Na-phytate 의 分子式을 C₆H₆O₂₄P₆Mg₄CaNa₂·5H₂O 라고 하였을 때의 理論値에 比하여 P가 98.9% Ca가 97.1%, Mg가 99.1%이고 統計處理한 結果分析値와 理論値는 잘 一致된다. 그러나 從來法에 依한 分析値는 理論値에 比하여 P가 92.40%, Ca가 85.80%, Mg가 93.80%로서 理論値와 一致하지 않는다.

3) Na-phytate 를 澱粉과 一定한 比로 混合하고 本法으로 P, Ca 및 Mg 를 定量한 結果 이들의 回收率은 거의 100%이었다.

4) 本分析法의 正確性을 再確認하기 위하여 phytic acid 水溶液에 CaCl₂水溶液과 MgCl₂水溶液을 phytic acid 1M:CaCl₂5M:MgCl₂20M 의 比로 反應시키어서 Ca 1原子, Mg 4原子含有된 Na-phytate 를 合成하였으며 이것의 P, Ca 및 Mg 分析値는 本法에 依한 調製 Naphytate 의 分析値와 一致되었다.

以上과 같이 phytin 試料를 乾式分解하고 ion 交換樹脂로 處理한 다음 Chelate 法으로 P, Ca 및 Mg 를 定量하는 本法은 正確하고 迅速한 phytin 의 新 分析方法이라고 思料되는 바이다.

謝 辭

著者が 遂行中에 있는 phytin 에 關한 一聯의 研究에 있어 最初부터 積極的인 指導鞭撻과 激勵을

아낌없이 하여주신 本大學 李成煥博士님과 助言을 하여주신 金浩植學長님, 李春寧博士님께 深深한 謝意를 드립니다.

또 本研究있었어 便利를 봐주신 陸軍技術研究所 黃世鳳科學部長님과 實驗에 있어 誠心껏 도와주신 金貴淳, 格仁喆, 溫永坤研究官各位께 厚謝합니다.

參 考 文 獻

1. 木村年朗; 油化學, 12, No.1 (1963)
2. 木村年朗; 油化學, 12, No.2 (1963)
3. 鈴木, 吉村; 日本 東大 農科大學報告. 7, 495 (1906)
4. Posternak, S.; Compt. Rend., 147, 337 (1908)
5. 申載斗; 서울大學校論文集, 生農系, 18, 49, (1967)
6. 東京大學農學部; 實驗農藝化學; 上卷 11, 13, 23 朝倉書店 (1965)
7. Henry Bassett; The Theory of Quantitative Analysis, 72, George Routhedge & sons. LTD. (1925)
8. Wilfred W. Scott, Sc. D.; Standerd Methods of Chemical Analysis, 121, 528, 690, D. Van Nostrand Co., (1955)
9. 松井元興; 標準定量分析法, 143, 405, 509, 丸善. Co.
10. Hundeshagn; Chem. Ztg, 18 (1894)
11. Handy; J. Am. Chem. Soc., 22 (1900)
12. Ceferine R. Ordonez and Santiag. A. Celsi; Rev. Farm. (Buenos Aires) 104, No.3, 3-4, 55-61 (1962)
13. 小田良平; Ion 交換樹脂, 215, 學術圖書出版社 (1950)
14. Myers, R.J., Easters, J.W.; Ind. Eng. Chem., 33, 1203 (1941)
15. Porker, A; Nature, 149, 184 (1942)
16. Ashton, W.M. and Evans. C; J. Soci. Food Agr., 13, 168-172 (1962)
17. Herd, C.W.; Food 12, 93-96 (1943)
18. Earley, E.B.; Ind. Eng. Chem.; Anal, Ed. 16, 389-391 (1944)
19. 申載斗; 韓國農化學會誌 6, 71~81 (1968)
20. Bertrand, G.; Bull. Soc. Chim. (Paris), 35, 1285 (1906)
21. 日本分析化學會編; 分析化學便覽 477, 271, 276, 丸善. Co., (1961)
22. 上野景平; Chelate 滴定法, 191, 南江堂 (1956)

23. 日本分析化學會; 分析化學講座 I-X., 共立出版 (1959)
24. Flaschka, H. Holasek, A; *Mikrochemie ver. Mikrochim. Acta*, 39, 101 (1952)
25. 若松茂雄; 分析化學, 6, 579 (1957)
26. Eschmann, H. Brochon, R.; *Chemist-Analyst*, 45, 38 (1956)
27. 石橋雅義, 田伎正之; 分析化學, 7, 376 (1958)
28. Kinnunen, J., Wennerstrand, B.; *Chemist-Analyst*, 46, 92 (1957)
29. Huditz F., Flaschka, H., Petzold, I.; *Z. anal. Chem.* 135, 333, (1952)
30. Pattom, J., Reeder, W; *Anal. Chem.*, 28, 1026 (1956)
31. Biedermann, W., Schwarzenbach, G.; *Chimia (Switz)*, 2, 56 (1948)
32. Schwarzenbach, G., Biedermann, W., Bangerter, F.; *Helv. Chim. Acta*, 29, 811 (1946)
33. Karsten, P., Kies, H.L., et al; *Anal. Chem. Acta*, 12, 64 (1955)
34. Hildebrand, G.P., Reilley, C.N.; *Anal. Chem.*, 29, 258(1957)
35. Lott, P.F., Cheng, K.L.; *Chemist-Analyst*, 46, 30 (1957)
36. Belcher, R., Close, R.A., West, T.S.; *Chemist Analyst*, 46, 86 (1957)
37. Belcher R. Close, R. A., West, T.S.; *Chemist-Analyst*, 47, 2 (1958)
38. Pribibil, R., Körbl, J., Kysil, B., Vobora. J.; *Chem. Listy*, 52, 243 (1958)
39. Flaschka, H., Abd El Raheem, A.A., Sadek, F.; *Z. Physiol. Chem.*, 310, 97 (1958)
40. Styunkel, T.B., Yakimets, E.M., Savinovs. Kii, D.A.; *Zhur. Anal. Khim.*, 8, 163 (1953); *C.A.*; 47, 10407 (1953)
41. Kovarik, M. Moucka, M.; *Z. anal. Chem.*, 150, 416 (1956)
42. Lacourt. A. Heyndryckx, P.; *Mikrochim. Acta*, 61 (1955)
43. Betz. Noll; *J. Am. Waterworks Assoc.* 42, 49 (1950)
44. 木村健二郎; 無機定量分析, 253, 268, 共立出版 (1949)
45. *Official Methods of Analysis of the Association of American Official Agricultural Chemists*. 8th Ed., 115, A.O.A.C., (1955)
46. 日本化學會編; 實驗化學講座, 15, 369, 丸善 Co., (1964)
47. Schwarzenbach, G.; *Die Komplextometrische Titration*, 53, F. Enke, (1955)
48. Charlot, G. and Denise Bezier; *Quantitative Inorganic Analysis*, 366, 474, 526, London, Methuen and Co. Ltd. (1957)
49. Kolthoff, I.M. and Stenger, V.A.; *Volumetric analysis* 143-145, Interscience publishers, Inc., New York (1942)
50. Hillebran, W.F., Lundell, G.E.F.; *Applied Inorganic Analysis*, 611, 632, 694., John Wiley, (1953)
51. Wilfred W. Scott; *Standard Methods of Chemical Analysis*; 205, 528, 690, The Technical Press Ltd. (1939)
52. Treadwell, F.P. and William T.H.; *Analytical Chemistry, Qualitative Analysis*, 270, 406, John Wiley (1955)
53. Cowen, J.C. et. al.; U.S.P. 2750400 (1956)
54. Staley, A.E.; *Chem. Eng.*, No.1 27, 61(1958)
55. Barre, R., Courtois, J.E. and Wormser, G.; *Bull. Soc. Chem. Biol.*, 36, 455-474 (1954)
56. Hall, N.F., Sprinkle, N.R.; *J. Am. Chem. Soc.*, 54, 3,469 (1932)
57. 佐藤二夫; 日化 88, 985 (1967)
58. 三堀, 石原, 加藤; 試薬註解 I-IV 南江堂(1953)
59. Garl A. Bennett & Norman L. Franklin; *Statistical Analysis in Chemistry and Chemical Industry* 6, 68, John Wiley.
60. Starkeinstein, E.; *Biochem. Z.*, 30, 56 (1910)