

Original

モズクフコイダンおよびウロン酸含有多糖の蛍光標識法およびHPLC分析法の検討

高木逸子、長岡正人*、柴田英之、橋本秀介、上山貞夫、相山律男、横倉輝男

Determination of glucuronic acid containing fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* and related polysaccharides by high-performance liquid chromatography with pre-column fluorescence derivatization

Itsuko Kimura-Takagi, Masato Nagaoka*, Hideyuki Shibata, Shusuke Hashimoto, Sadao Ueyama, Ritsuo Aiyama and Teruo Yokokura

Yakult Central Institute for Microbiological Research, 1796 Yaho, Kunitachi-shi, Tokyo 186-8650, Japan

Received for review November 9, 2000. Accepted January 25, 2001.

Abstract

A simple and highly sensitive high-performance liquid chromatographic method for the direct determination of glucuronic acid containing fucoidan from *Cladosiphon okamuranus* Tokida and related polysaccharides is described. The method is based on the direct derivatization of the uronic acid residues in polysaccharides with 6,7-dimethoxy-1-methyl-2 (1 H) -quinoxalinone-3-propionylcarboxylic acid hydrazide. The derivatization reaction proceeds in aqueous solution in the presence of pyridine and 1-ethyl-3- (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide at 20 °C. The resulting fluorescent derivatives are separated on reversed phase polymer column and are detected spectrofluorimetrically at 445 nm with excitation at 367 nm. The method is useful for the detection and quantitative analysis of uronic acid containing polysaccharides.

Keywords: fucoidan, uronic acid, polysaccharide, HPLC, DMEQ-hydrazide

はじめに

食用海藻であるモズク、ワカメ、昆布などの褐藻類にはフコイダンと呼ばれるフコース及び硫酸化フコースを主要構成糖とする多糖が存在する。フコイダンは古くから抗血液凝固活性 [1] や抗腫瘍効果 [2] を示すことが知られている。また、これらの生理作用以外にもコレステロール低下作用 [3] 抗HIV作用 [4] 血圧上昇抑制作用 [5] 抗アレルギー作用 [6] なども報告され、医薬品及び食品素材として注目されてきている。

近年、我々はモズク由来のフコイダンが上記の生理作用の他に、胃潰瘍、胃炎、不定愁訴など、胃の疾病に対して優れた治療効果を示すことを見出した [7-9]、また消化性潰瘍や

慢性胃炎の原因菌として注目されている *Helicobacter pylori* の定着阻害作用も有することを見出している [10, 11]。このようにモズク由来フコイダンは優れた生理作用を有するが、食品もしくは医薬品として用いるには、その品質管理や規格化において特異的な同定、定量法が必要である。しかしながらフコイダンは多くの多糖類と同様に発色団や発蛍光団を持たないため、直接高感度検出することが困難である。このため従来は、比色法や示差屈折計による検出が行われてきたが、特異性や感度の点で問題がある。本フコイダンは 1-3 結合したフコースの重合体であり、約半分のフコース残基の 4 位に硫酸基が結合し、フコース残基の一部には グリコシド結合したグルクロン酸が側鎖として存在するという特徴を有

する [12 ,13]。そこでウロン酸のカルボキシル基を標識すれば高感度分析が可能になる。ウロン酸の検出方法としては、非水系の溶媒中で標識する方法や水系でカルボジイミドのような縮合剤を用いてウロン酸のカルボキシル基を標識する方法が考案されている [14 ,15]。特にカルボジイミドと6,7-dimethoxy-1-methyl-2 (1 H) -quinoxalinone-3-propionylcarboxylic acid hydrazide (DMEQ-hydrazide) による標識方法 [15] は水系でも標識効率が高く、実際Iwataらは尿中に排出されるステロイドのグルクロン酸抱合体を直接、標識しHPLCにて分離同定することに成功している。これより非水系の溶媒に溶解が困難なフコイダンのような多糖類にも本法が応用できる可能性が高い。そこでDMEQ-hydrazideを始めとして各種、発色団もしくは発蛍光団を有する標識試薬を用いてモズク由来フコイダンの誘導体化ならびに分析法を検討した。更に他のウロン酸含有多糖への応用についても併せて検討した。

材料及び方法

実験材料および試薬

蛍光標識試薬である、DMEQ-hydrazide、2-aminopyridine、Ethyl 4-aminobenzoateは和光純薬より、DNP-hydrazine、2-hydrazinopyridine、2-aminoethylpyridineはAldrichより、Lucifer YellowはMolecular Probesより購入して用いた。縮合剤である1-ethyl-3- (3-dimethylaminopropyl) carbodiimide塩酸 (WSC) は和光純薬より購入した。N-hydroxysuccinimide (NHS) およびsulfo-NHSはPierceより購入した。前処理用カラム (陽イオン交換樹脂) としてはVarian社製Bond Elut SCXを用いた。

モズク由来フコイダンは既報に従って調製した。本多糖の平均分子量は約56 kDaで、若干の粘性を有する。本多糖の構造はフコースを主鎖とし、フコース残基の4位の水酸基の約半分が硫酸化されている。更に側鎖として結合したグルクロン酸を含有する [12]。また、他のウロン酸含有多糖としてコンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸 (生化学工業)、ペクチン、アルギン酸 (和光純薬) を購入して用いた。

2-Hydrazinopyridine誘導体の調製

モズク由来フコイダン溶液100 μ L (1 mg/mL) に各400 μ L の19.2 w/v%WSCメタノール溶液および15 mM、2-hydrazinopyridineメタノール溶液、ならびに200 μ Lの20%ピリジンのメタノール溶液を加え、45 $^{\circ}$ Cにて45分間加熱した。反応液1 mLをNAP 10カラム (Amersham Pharmacia) に導入し、水1.5 mLで溶出される画分を集めて過剰な試薬を除去し誘導体を得た。

同様にフコイダン溶液、2 mLに各1 mLの2 M、WSCメタノール溶液と1 M、2-hydrazinopyridineメタノール溶液、および20%ピリジンのメタノール溶液を加え、45 $^{\circ}$ Cにて3時間加熱した。反応液にNaClを30 mg加えた後、透析 (分画分

子量、10,000) し、透析内液を凍結乾燥した。

2-Aminopyridine誘導体の調製

フコイダン溶液 (1 mg/mL) 100 μ Lに50 μ Lの1 M、WSC水溶液を加え室温下で1時間反応した。WSC溶液を更に50 μ L、添加し、1時間反応した。反応液に300 μ Lのエタノールを加え、更に50 μ Lの20 mM、2-aminopyridineエタノール溶液を加える。20 μ Lの0.5 M、NaHCO₃水溶液を加え、室温で1時間反応後、50 μ LのWSCを加え更に17時間反応した。反応液0.5 mLをNAP 5カラムに導入し、水1 mLで溶出される画分を集め分析に用いた。

またスクシイミドを用いる場合は、フコイダン溶液100 μ L (1 mg/mL) に1 M、塩酸1 μ Lを加え、更に各50 μ Lの1 M、WSC水溶液、1 M、NHS水溶液を加え室温下で1時間反応した。WSCとNHS溶液を50 μ Lずつ追加し、更に1時間反応後、300 μ Lのエタノールを加え50 μ Lの20 mM、2-aminopyridineエタノール溶液を加えた。20 μ Lの0.5 M、NaHCO₃水溶液を加え、室温で1時間反応後、50 μ LのWSCを加え更に17時間反応した。反応液0.5 mLをNAP 5カラムに導入し、水1 mLで溶出される画分を集め分析に用いた。

2-Aminoethylpyridine誘導体の調製

上記と同様にフコイダン水溶液、1 mLに10 μ gの2-aminoethylpyridineを加え、15 μ Lの6 M、塩酸を加えた。本液に400 μ Lの1 M、WSC水溶液、100 mg/mLのSulfo-NHS水溶液を200 μ L加えた。室温にて20時間反応後、反応液1 mLをNAP 10カラムに導入し、水1.5 mLで溶出される画分を集めて分析に用いた。

Ethyl 4-aminobenzoate誘導体の調製

フコイダン水溶液 (1 mg/mL) 100 μ Lに1 M、塩酸1 μ Lを加え、更に各50 μ Lの1 M、WSC水溶液、1 M、NHS水溶液を加え室温下で1時間反応した。WSCとNHS溶液を50 μ Lずつ追加し、更に1時間反応後、300 μ Lのエタノール、50 μ Lの20 mM、Ethyl 4-aminobenzoateエタノール溶液、および20 μ Lの0.5 M、NaHCO₃水溶液を加え、室温で1時間反応した。更に50 μ LのWSC水溶液を加え1時間反応した。反応液0.5 mLをNAP 5カラムに導入し、水1 mLで溶出される画分を集め、分析に用いた。

Lucifer Yellow誘導体の調製

フコイダン水溶液100 μ L (1 mg/mL) に30 μ Lの20%ピリジンのメタノール溶液を加え、50 μ Lの10 mg/mLのLucifer Yellowメタノール溶液を加えた。更に120 μ Lの1 M、WSC溶液を加え37 $^{\circ}$ C、1時間加熱した。反応液0.5 mLをNAP 5カラムに導入し、水1 mLで溶出される画分を集め、分析に用いた。

DNP-hydrazine誘導体の調製

フコイダン水溶液100 μ l (1 mg/mL) に30 μ lの20%ピリジンのメタノール溶液を加え、50 μ lの10 mg/mLのDNP-hydrazineメタノール溶液を加えた。更に120 μ lの1 M、WSC溶液を加え37 $^{\circ}$ C、1時間加熱した。反応液0.5 mLをNAP 5カラムに導入し、水1 mLで溶出される画分を集め、分析に用いた。

DMEQ-hydrazide誘導体の調製

フコイダン水溶液 (1 mg/mL) 100 μ lに4%ピリジンのエタノール溶液を100 μ l加えた。本液に100 μ lの50 mM、DMEQ-hydrazideジメチルホルムアミド溶液および10 μ lの0.2 M、WSC水溶液を加えてよく混和し、遮光下にて1時間、反応した。Bond Elut SCXカラム (100 mg/本) にメタノールおよび水、各1 mLを送液した後、反応液200 μ lを導入し過剰量のDMEQ-hydrazideを除去する。減圧下で通液を集め、DMEQ-hydrazide誘導体が得られた。

HPLC分析条件

HPLC条件は以下を参照。

フコイダン誘導体のHPLC分析

カラムにはYMC-Pack PolymerC 18 (内径4.6mm、長さ150 mm) を30 $^{\circ}$ Cで用いた。移動相には0.2 M酢酸ナトリウム3.7 mLに0.2 M酢酸46.3 mLを加え、水で1 Lに定容する。本液800 mLに200 mLのメタノールを加えたものを使用し、0.5 mL/minの流速で送液した。検出は島津RF 530蛍光検出器を励起波長367 nm、蛍光波長445 nmで使用した。

コンドロイチン硫酸およびヘパラン硫酸誘導体のHPLC分析

カラムにはYMC-Pack PolymerC 18 (内径4.6mm、長さ150 mm) を30 $^{\circ}$ Cで用いた。移動相には0.2 M酢酸ナトリウム3.7 mLに0.2 M酢酸46.3 mLを加え、トリフルオロ酢酸にてpHを2.0に調製し、水で1 Lに定容する。本液800 mLに200 mLのメタノールを加えたものを使用し、0.5 mL/minの流速で送液した。

結果及び考察**ウロン酸含有多糖の標識法の検討**

多糖類は発色団や発蛍光団を持たず、直接高感度検出することが困難であるため誘導体化が必要である。従来、単糖やオリゴ糖の蛍光標識法としては還元末端に2-aminopyridineなどの芳香族アミンを用いて還元アミノ化反応により導入する方法が用いられてきた [16-18]。これらの方法は発色団や発蛍光団を糖鎖に導入できるとともに脂溶性も賦与するため逆相系のカラムによる分離分析も可能となる利点もある。しかしながら、多糖は還元末端部分の分子中に占める割合が低いため、還元アミノ化反応により導入される発色団や発蛍光団の占める割合も低くなる。このため感度や分離能が確保しにくい。これに対し多糖中に一定の割合で反応性が高い官能

基が存在する場合、その官能基を標識することで感度や分離能を確保できる可能性がある。例えば、ウロン酸含有多糖の場合、分子中のカルボキシル基は水酸基よりも反応性、特異性が高い。また、標識に用いる発色団が疎水性を有する場合、逆相系のカラムによる分離も可能となると考えられ、還元アミノ化法よりも有効な標識法となりうる。一般に、ウロン酸のカルボキシル基は非水系では容易に標識されるが、多糖類は有機溶媒に対する溶解度が低いため非水系で用いられる標識法は利用できない。最近、水系で利用できる水溶性カルボジイミドが開発され、水系でのカルボキシル基の標識に利用されている [15]。そこで沖縄モズク由来のフコイダンの標識法としてカルボジイミドを用いるウロン酸残基の蛍光ラベルを試みた。カルボキシル基を活性化した場合、1級アミンやヒドラジン誘導体と容易に反応することから2-aminopyridine、2-aminoethylpyridine、ethyl 4-aminobenzoate、DMEQ-hydrazide、DNP-hydrazine、2-hydrazinopyridine、Lucifer Yellowを用いて反応性を検討した。その結果、DMEQ-hydrazide以外の試薬では2-aminopyridineが最も反応性が高かった。しかしながら、標識に約20時間程度の反応時間を要すること、標識率が約10~30%と低く、定量法としての利用は困難であった。カルボジイミドによるカルボキシル基の活性エステル化は可逆反応であるため水中で不安定である。そこでより安定な活性エステル体形成しかつアミンとの交換反応も容易な、スクシナミド化 [19] を試みたが、フコイダンの標識効率は改善されなかった。またカルボジイミドの濃度、用いる溶媒、反応温度および時間等についても検討したが、標識率の大きな向上は認められなかった。これは2-aminopyridine、2-aminoethylpyridine、ethyl 4-aminobenzoate、DNP-hydrazine、2-hydrazinopyridine、Lucifer Yellowは水系の溶媒において反応中に析出したりするため、反応性が減少することによるものと推定された。これより、水系溶媒でも標識効率の高いDMEQ-hydrazideについて同様の検討を行った。本試薬は水系溶媒でもカルボジイミド存在下でグルクロン酸のカルボキシル基を定量的に標識できることがIwataらにより報告されている [15]。そこでIwataらにより報告されている標識条件を基にフコイダンの標識を試みた。その結果、本試薬は多糖に対しても水系溶媒でカルボキシル基を標識できることが明らかとなった。これより本試薬を用いた標識条件、分離分析法の検討を行った。

反応条件の検討

カルボキシル基を標識する上でWSCの濃度が反応効率に影響すること、多量のカルボジイミドは分析においてカラムの劣化を招くことから、反応に必要なWSC濃度の検討を行った。その結果、6 mM以上の濃度において定常的に反応が進行するのに対し、これより低濃度のWSCではピーク面積の一時的な上昇が見られたり標識率が安定しないこと、過剰量のWSCは反応効率や分析そのものには影響しないものの

カラムの劣化を招くため、用いるWSCは6 mM程度の濃度が最適と考えられた (Figure 1)。

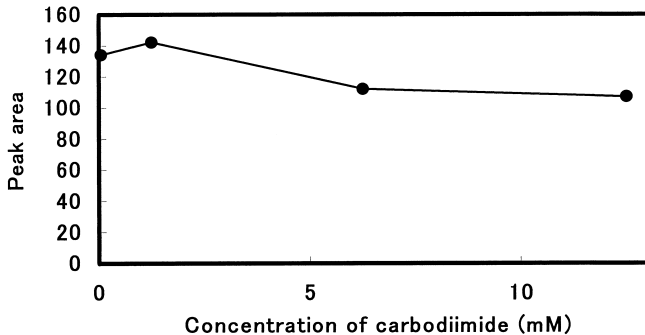


Figure 1. Effect of carbodiimide concentration on derivatization rate.

Reaction condition: Each of 100 μ L of 0.1% fucoidan solution, 4% pyridine in ethanol and DMEQ-hydrazide solution (50mM in N, N-dimethylformamide) was mixed and then 10 μ L of 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide solution was added. The resulting mixture was reacted at 20 $^{\circ}$ C, for 20 min. Aliquots of derivatized solution (10 μ L) were injected into the column.

次に反応温度および時間についても同様に検討した (Figure 2)。その結果、20、60分で反応が定常状態に達することが明らかとなった。20、20分まで、もしくは37 $^{\circ}$ Cでの反応で一時的にピーク面積が増大するのは硫酸基とヒドラジル基が一時的に反応することによる可能性も考えられるが、詳細については不明である。また37 $^{\circ}$ Cではピーク面積が安定しないことから反応は20、60分と設定した。

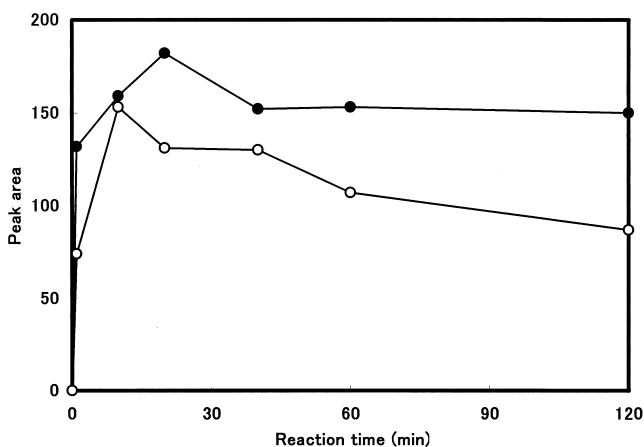


Figure 2. Effect of reaction temperature on peak area.

The concentration of 1-ethyl-3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide was 6 mM. Another conditions were the same described in Figure 1. Temperature: $^{\circ}$ C, 20 ; $^{\circ}$ C, 37 .

以上の様にして求めた標識操作を反応機構とともにFigure 3に示す。

HPLC分析条件の検討

フコイダン誘導体化の反応条件が決定したことから、HPLCによる分析法の検討を行った。本誘導体化法によりフコイダンには脂溶性が付加されることにより逆相クロマトグラフィーにおいても分離が可能と考えられた。しかしながら、本多糖は硫酸基も含有するため、通常の場合 (中性条件) では保持されなかった。そこで酸性条件下で分離条件を検討した結果、10 mM酢酸緩衝液 (pH 3.6)メタノール混合液 (8:2) の移動相にポリマー系C-18カラムを用いて分析することにより2.0分付近にフコイダンを検出できた。本条件では、素通り画分は1.2分に溶出された。さらに通常用いられるトリフルオロ酢酸ではピーク形状が著しく悪くなること、pH 2.5以下の条件では溶出が困難になることから、上記、分析条件が本フコイダンの分析には最適と考えられた。また、Iwataらの方法では標識後、HPLCに直接注入して分析しているが、この場合、過剰量のDMEQ-hydrazideがベースラインの安定性や検出感度へ影響する。しかしながら反応液を予め、陽イオン交換樹脂であるSCXカラムに通液させ、余分なDMEQ-hydrazideを除いておくことで、より高感度でベースラインの安定した分析が可能となった (Figure 4)。

次に定量性について検討した。注入フコイダンの量とピーク面積をプロットするとFigure 5のようになった。

Figure 5に示すように、0.5 μ gから3 μ gまでの範囲で注入量とピーク面積の間に直線性が認められ、65 μ g以上ではほぼ飽和に達した。検出限界は0.15 μ g (S/N = 3) と求められた。また同じ試験を繰り返し注入した場合の再現性は相対標準偏差にして1.7%であった。

ウロン酸含有多糖のDMEQ-hydrazideによる誘導体化

モズクフコイダンが定量的に標識可能であることが明らかとなったことから、他のウロン酸含有多糖 (コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、ペクチン、アルギン酸) についても同様の条件で標識をおこなった。これらの多糖に対し種々の濃度で標識後、SCXカラムおよび透析により反応試薬を除いた後、その蛍光強度を測定すると濃度依存的に蛍光強度が増加し、定量的な標識は可能と考えられた。しかしながらペクチンやアルギン酸は逆相系のカラムでは検出できなかった。これは、これらの多糖はウロン酸含量が非常に高いため、標識により逆相系のカラムへの親和性が非常に高くなるため溶出が困難となったためと推定された。これに対しコンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸は溶離液のpHが3.6ではほとんど保持されなかったがpH 2.5以下では2分台にピークが検出された。しかしながら、これらの多糖は構成成分が類似した多糖であるため、本条件では完全に分離することはできなかった (Figure 6)。またフコイダンは本条件では溶出されな

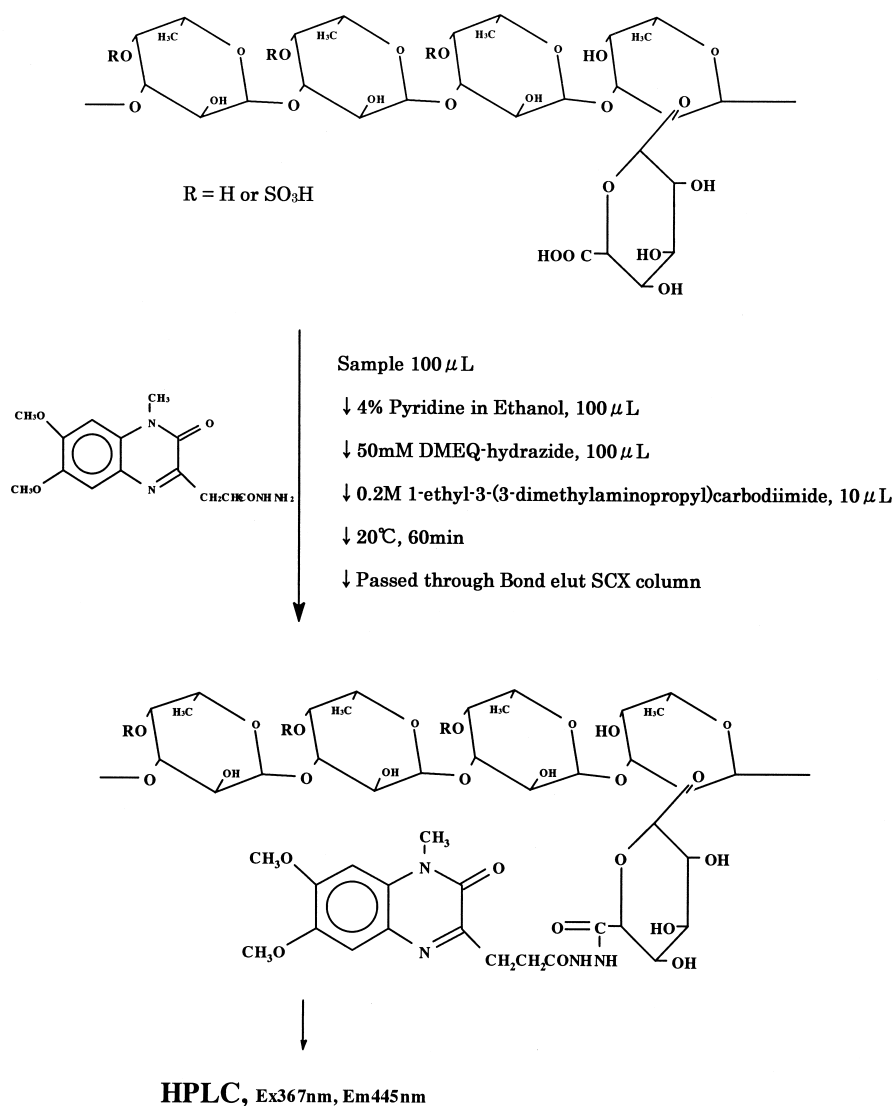


Figure 3. Scheme of derivatization condition of fucoidan.

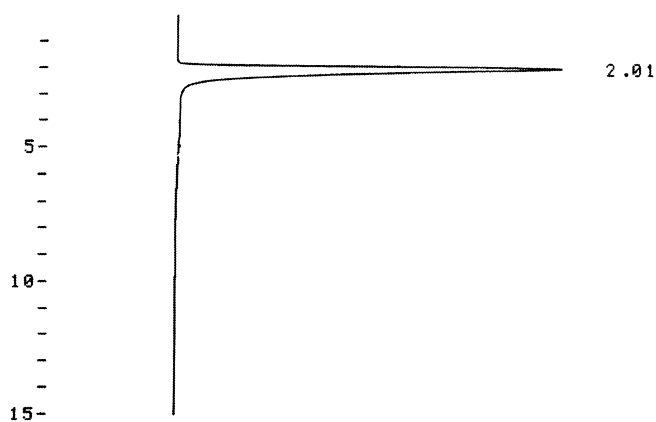


Figure 4. Chromatogram of DMEQ derivative of fucoidan.
Analytical condition: YMC-Pack Polymer C-18, 4.6 × 150 mm,
Flow rate: 0.5 mL/min, Ex 367 nm, Em 445 nm.

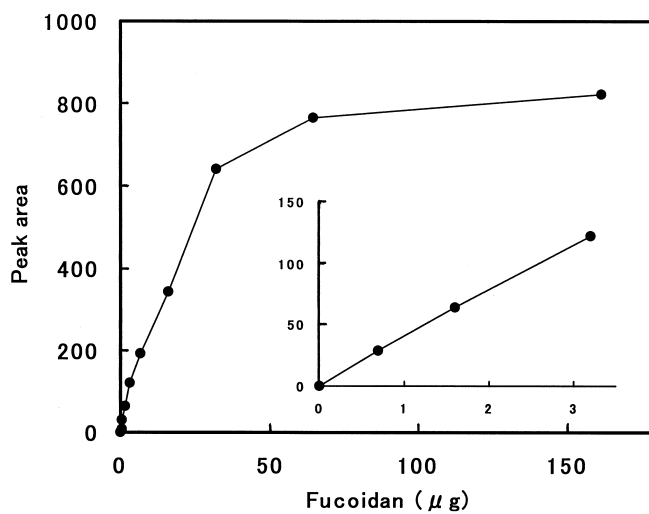


Figure 5. Fluorometric response linearity of DMEQ-derivatized fucoidans.

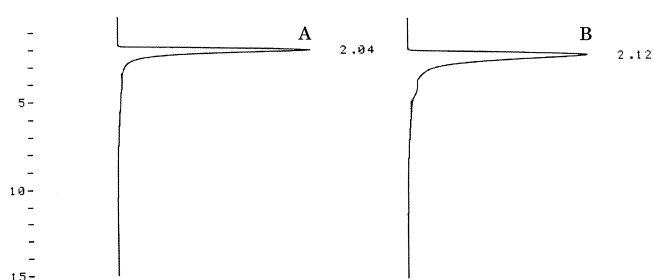


Figure 6. Chromatogram of DMEQ derivatives of chondroitin sulfate and heparan sulfate.

Analytical condition: YMC-Pack Polymer C-18, 4.6 × 150 mm, Flow rate: 0.5 mL/min, Eluent buffer: pH 2.5, Ex 367 nm, Em 445 nm. Samples: A, chondroitin sulfate; B, heparan sulfate.

かった。

結論

以上示してきたように、DMEQ-hydrazideを用いたフコイダンの標識法は定量性、再現性、操作性に優れた方法である。また本法はウロン酸含有多糖もしくはカルボキシル基を分子中に含む多糖であれば標識可能である。ただし、分子中のウロン酸含量や構造により用いるカラムや溶出条件を適宜選択する必要があるが、このことは特定の多糖に適した溶出条件を選択することにより特定の多糖のみを検出できる可能性も示すものと考えられる。また天然物の分析においては他のカルボキシル基含有物、例えば数種のウロン酸含有多糖やタンパク質の混合物などでは、定量の妨げとなる可能性がある。本条件で用いるDMEQ-hydrazideは過剰量であり、他のウロン酸含有多糖との混合液においては標識効率に変化は認められなかった。またIwataらはタンパク質の共存によってもDMEQ-hydrazideの標識は影響されないことを報告している[15]。しかしながらBSAとフコイダンを共存させ標識率への影響を検討した結果、0.2%以上のBSAの添加で濃度依存的に標識率が低下する減少が認められた。これはフコイダンはBSAなどのタンパク質と複合体を形成する性質があること、0.2%以上のBSAは本標識条件において不溶化し沈殿するためと考えられた。実際、1 M程度のNaClを添加しフコイダンとBSAの複合体の形成を阻害すると共沈を防ぐことができることから、タンパク質を含む溶液においては塩濃度の高い条件で除タンパクをした後、標識を行うことが必要と考えられた。

参考文献

[1] Pereira, M.S.; Mulloy B.; Mourao, P. A. S. *J. Biol. Chem.*

- 1999**, 274, 7656-7667.
- [2] Itoh, H.; Noda, H.; Amano, H.; Zhuang, C.; Mizuno, T.; Ito, H. *Anticancer Res.* **1993**, 13, 2045-2052.
- [3] 上原めぐみ; 田幸正邦; 川島由次; 福永隆生; 尚弘子; 知念功; 本郷富士弥, *応用糖質科学*, **1996**, 43, 149-153.
- [4] Baba, M.; Snoeck, R.; Pauwels, R.; Clercq, E. De. *Antimicrob. Agents. Chemther.* **1988**, 32, 1742-1745.
- [5] Ren, D.; Noda, H.; Amano, H.; Nishino, T.; Nishizawa, K. *Fish. Sci.* **1994**, 60, 83-88.
- [6] 桐原修; 服部隆史; 谷久典; 大石一二三; 日本農芸化学会1997年度大会, 講演要旨集, **1997**, 71, 176.
- [7] 柴田英之; 長岡正人; 竹内由美; 高木逸子; 橋本秀介; 上山貞夫; 横倉輝男, *薬理と治療*, **1998**, 26, 1211-1215.
- [8] 山本佳洋; 鈴木剛; 平野正憲; 長岡正人; 橋本秀介; 柴田英之; 高木逸子; 上山貞夫; 工藤辰幸; 芳川雅樹; 横倉輝男, *薬理と治療*, **2000**, 28, 63-70.
- [9] 鈴木剛; 山本佳洋; 小貫純一; 平野正憲; 渋谷文則; 長岡正人; 橋本秀介, *薬理と治療*, **2000**, 28, 931-935.
- [10] 山本佳洋; 鈴木剛; 平野正憲; 長岡正人; 橋本秀介; 柴田英之; 高木逸子; 相山律男; 上山貞夫; 横倉輝男, *薬理と治療*, **2000**, 28, 937-941.
- [11] Shibata, H.; Takagi, I.K.; Nagaoka, M.; Hashimoto, S.; Sawada, H.; Ueyama, S.; Yokokura, T. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **1999**, 45, 325-336.
- [12] Nagaoka, M.; Shibata, H.; Takagi, I.K.; Hashimoto, S.; Kimura, K.; Makino, T.; Aiyama, R.; Ueyama, S.; Yokokura, T. *Glycoconjugate. J.* **1999**, 16, 19-26.
- [13] 酒井武; 石塚久美子; 児島薫; 嶋中一夫; 猪飼勝重; 加藤郁之進; 糖質学会年会, 要旨集, **2000**, 21, 64.
- [14] Leroy, P.; Chakir, S.; Nicolas, A. *J. Chromatogr.* **1986**, 351, 267-274.
- [15] Iwata, T.; Hirose, T.; Nakamura, M.; Yamaguchi, M. *J. Chromatogr. B.* **1994**, 654, 171-176.
- [16] Honda, S. *Anal. Biochem.* **1984**, 140, 1-47.
- [17] Takemoto, H.; Hase, S.; Ikenaka, T. *Anal. Biochem.* **1985**, 145, 245-250.
- [18] Wang, W.T.; LeDonne, N.C.; Ackerman, Jr., B.; Sweeley, C.C. *Anal. Biochem.* **1984**, 141, 366-381.
- [19] Staros, J.V.; Wright, R.W.; Swingle, D.M. *Anal. Biochem.* **1986**, 156, 220-222.