

GPC—光散乱測定による水溶性高分子の分子量決定

福 富 誠
 福 田 三 寿
 橋 本 勉

Evaluation of Molecular Weights of Water-Soluble Polymers by GPC-Light Scattering Measurement

Makoto FUKUTOMI
 Mitsutoshi FUKUDA
 Tsutomu HASHIMOTO

Gel permeation chromatography (GPC) coupled with a low-angle light scattering photometer was used for the molecular weight characterization of various water-soluble polymers. The GPC columns used were two kinds of TSK-GEL, type-PW and type-SW, which feature high resolution and less adsorptivity. Molecular weights and molecular weight distributions could be evaluated with fairly high accuracy for both natural and synthetic polymers; dextran, polyacrylamide, and poly(ethylene oxide). Measurements were also performed for several kinds of proteins and enzymes. The differential refractometer was preferable as a concentration detector, since the refractive index increment was not so sensitive to the kind of protein and enzyme. Molecular weights here evaluated were in agreement with the published values within 10% uncertainty. From the results obtained, minor peaks appearing in elution chromatograms of myoglobin, albumin, and γ -globulin were attributed to the respective dimeric components of these proteins.

1. はじめに

ゲルパーミエーションクロマトグラフィー (GPC) は、測定が迅速である、測定の再現性が良好であるなどの理由で、ここ十数年来、合成高分子の分子量分布評価手段として急速に普及している。この間、微小ゲル粒子充填カラムの開発により、高速かつ高分離能化が飛躍的に向上し、カラム分別法、超遠心速度法などの従来の分離手段と同程度の分離能を有するようになってきている¹⁾。さらに近年、水溶媒系の GPC においても硬質で吸着性の少ない高速測定用の高分離ゲル担体の開発が進み、水溶性合成高分子、あるいは蛋白質、酵素、糖類などの分離手段として定着しつつある。しかしながら、分子量、分子量分布に関する解析手段としては、依然として検量線に関する原理的な問題が未解決のまま残されている。最近、Ouano および Kaye による、小容量フローセルを有する低角度光散乱光度計 (LALS) を GPC の分子量検出器として適用する試みは、検量線に関する諸問題を解決する可能性を示す方法として注目されている²⁾³⁾。

その後、著者ら⁴⁾ および加藤ら⁵⁾ によって、高分離能カラムを用いた GPC-光散乱測定法に関する検討が加えられ、各種合成高分子の分子量分布評価、分岐高分子の分岐度定量などについて、その有用性が確認されている。

本報告では、高速高分離能カラムを装着した水溶液系の GPC-光散乱測定法について検討し、本法の適用分野を拡大することを目的として実験を行なった。特に、蛋白質、酵素については、純粋な測定試料を得難いこと、従来の光散乱法が測定上適用困難であること、また GPC 測定については、カラムへの試料の吸着性の問題もあり、溶出位置から分子量を判定することが困難であるなどの事情から、GPC-光散乱測定の有用性が確認されると、これら試料のキャラクタリゼーションにとって有力な手段となることが期待できる。

2. 実験および方法

測定に用いた GPC 装置は HLC-802, LALS 装置は LS-8 でいずれも東洋曹達製である。LS-8 の詳細については既に報告した⁴⁾。濃度検出器には示差屈折計を用い

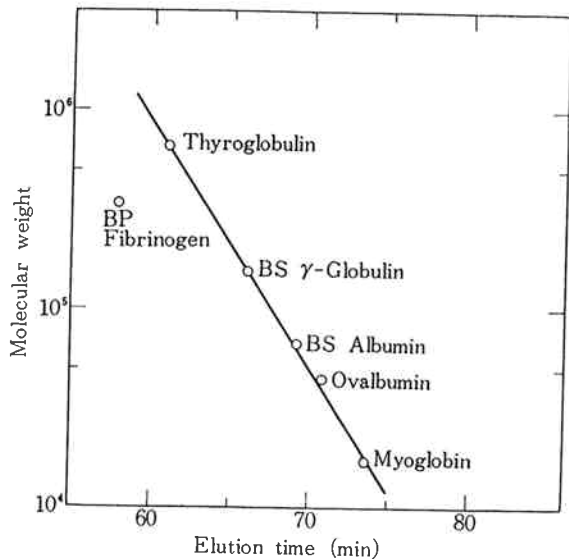


Fig. 1 Calibration curve for the column set G 6000 PW (2 ft) and G 5000 PW (2 ft) on standard proteins in 1/15 M phosphate buffer (pH 6.8 1/10 M KCl). Flow rate is 0.6 ml/min.

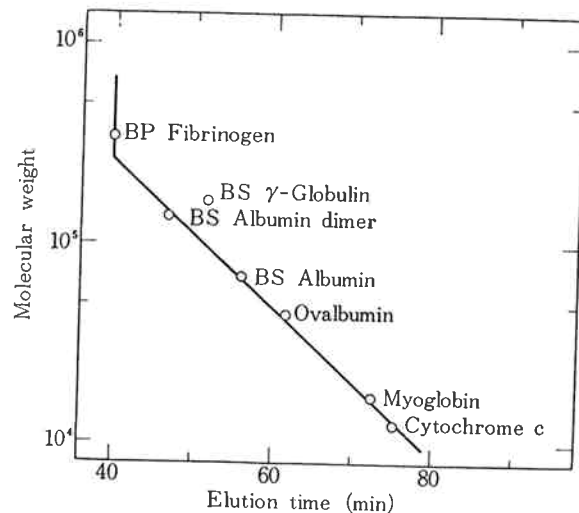


Fig. 2 Calibration curve for the column set G 3000 SW (4 ft) on standard proteins in 1/15 M phosphate buffer (pH 6.8 1/10 M KCl). Flow rate is 0.6 ml/min.

た。測定に使用したカラムは、TSK-GEL PWタイプ⁶⁾およびSWタイプ⁷⁾である。溶離液は1/15 Mリン酸緩衝液 (pH=6.8, 1/10 M KCl) あるいは純水であり、流速は0.6—1.0 ml/minである。Fig. 1およびFig. 2に、代表的な2つのカラム系について、標準的な蛋白質に対して得られた分子量と溶出時間の関係を示した。除塵のためのラインフィルターには孔径0.45—1.0 μmのテフロン製マイクロフィルター(フルオロポア, 住友電工製)を用いた。試料溶液注入量は0.5 mlとし、溶液濃度は試料の分子量によって異なるが、0.05—0.3 g/dl程度であった。溶液中に不溶物が存在する場合は、注入前0.45 μmのフィルターで濾過した。測定温度は25°Cである。本測定の流路図をFig. 3に示した。

GPC-光散乱測定で得られるRIおよびLALSの応答

に対応するクロマトグラムのベースライン上の高さをおのおの h_i^{RI} および h_i^{LS} とすると、両者の間には、

$$h_i^{LS}/h_i^{RI} = (k_2 K/k_1) M_i \quad \dots\dots(1)$$

の関係が成立する⁴⁾。ここで、 M_i は溶出量 i における溶出成分の分子量である。 k_2 はLALSの装置定数、 k_1 はRIの感度および試料溶液の屈折率の濃度勾配 $\partial n/\partial c$ に依存する定数である。 K は光散乱定数で $(\partial n/\partial c)^2$ に比例する。(1)式を用いて、両検出器の応答比から分子量を決定した。(1)式の定数 $k_2 K/k_1$ ($\equiv B$) は $\partial n/\partial c$ に比例し、試料の分子量には依存しない。この値は分子量既知の校正物質を用いて決定することができる。ここでは、校正物質として、標準ポリエチレンオキッド(東洋曹達製)あるいは牛血清アルブミンを用いた。測定試料の種

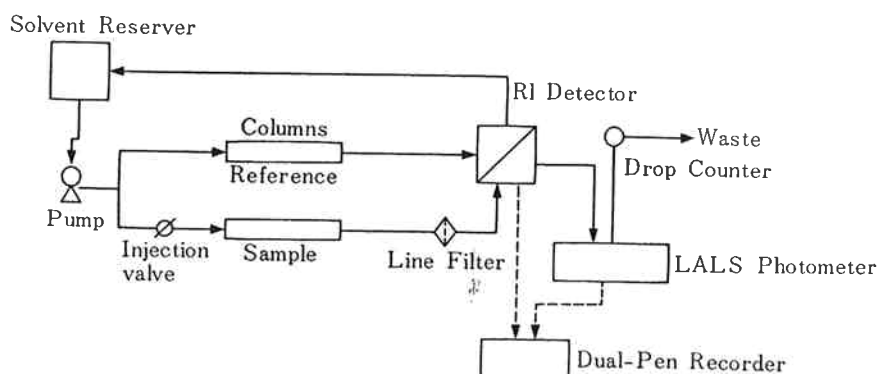


Fig. 3 Flow diagram of GPC coupled with a low-angle light scattering (LALS) photometer.

類が校正物質と異なる場合は、定数 B は

$$B = B_0 \times [(\partial n / \partial c) / (\partial n / \partial c)_0] \quad \dots\dots(2)$$

となる。添字の 0 は校正物質に対する値であることを示す。測定波長 $\lambda = 6328 \text{ \AA}$ に対する $\partial n / \partial c$ の値は示差屈折計 RM 102 (ユニオン技研製) を用いて決定した。

3. 結果と考察

[1] 水溶性合成高分子

分子量の異なる一連のデキストラン分別試料 (Pharmacia 製) を用いて、水溶液系の GPC-光散乱測定の信頼性について検討した。測定は Fig. 1 に示したカラム系で行なった。溶媒は純水であり、流速は 1.0 ml/min である。得られたクロマトグラムを Fig. 4 に示した。RI および LALS に対応するクロマトグラムの面積を S^{RI} および S^{LS} とすると、(1)式に等価な式として次式が成立する⁴⁾。

$$S^{LS} / S^{RI} = (k_2 K / k_1) \bar{M}_w \quad \dots\dots(3)$$

Fig. 5 は、Fig. 4 に示したクロマトグラムから S^{LS} / S^{RI} を計算し、試料の重量平均分子量 \bar{M}_w に対して両対数プロットを行なった結果である。 S^{LS} / S^{RI} は正確に \bar{M}_w に比例し、 $k_2 K / k_1$ は分子量に依存しないことが明らかである。ここで用いたデキストランの \bar{M}_w の値と

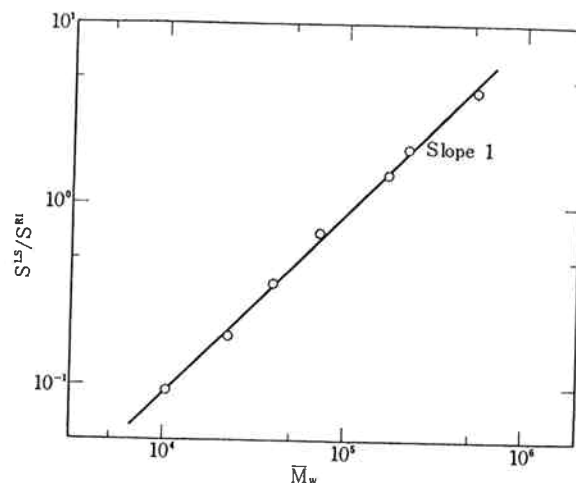


Fig. 5 Double logarithmic plots S^{LS} / S^{RI} against \bar{M}_w for dextran fractions. S^{LS} and S^{RI} are areas of chromatograms corresponding to LALS and RI detectors, respectively. Measuring conditions are shown in Fig. 4.

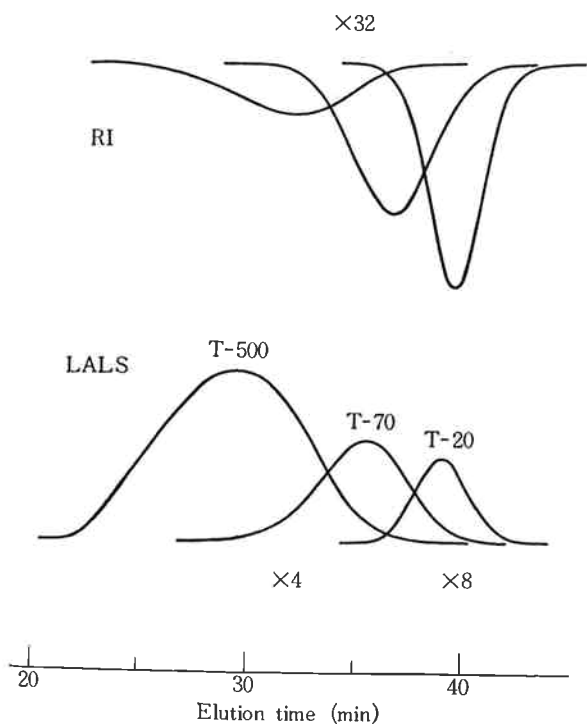


Fig. 4 Examples of chromatograms for dextran fractions obtained from GPC-LALS measurements in pure water on the column set G 6000 PW (2 ft) and G 5000 PW (2 ft). Flow rate is 1.0 ml/min.

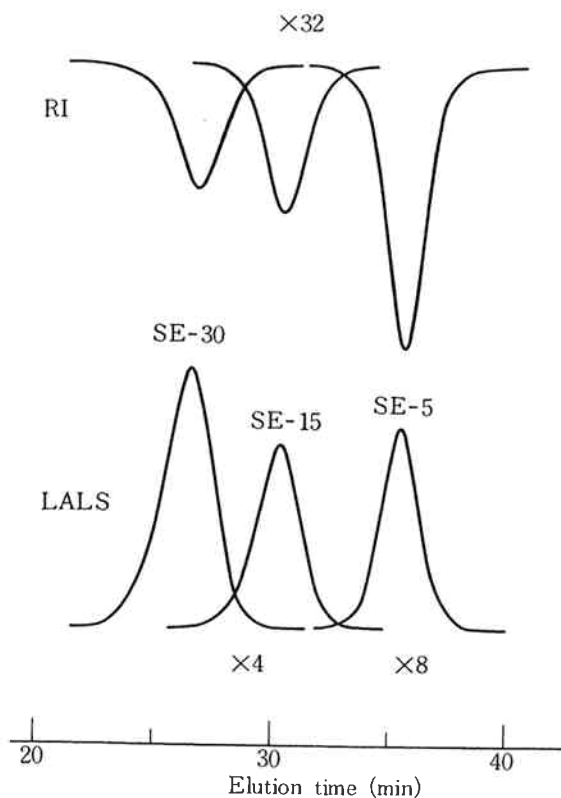


Fig. 6 Examples of chromatograms for anionically prepared poly(ethylene oxide) obtained from GPC-LALS measurements. Measuring condition is the same as in Fig. 4.

Table 1 Molecular Weight of Anionic Poly-(ethylene oxide)

Code	$\bar{M}_w \times 10^{-4}$ ¹⁾	$\bar{M}_v \times 10^{-4}$ ²⁾	\bar{M}_w/\bar{M}_n ³⁾
SE— 2	2.5	2.4	1.14
SE— 5	4.0	4.6	1.03
SE— 8	7.3	8.0	1.02
SE— 15	14.8	16.0	1.04
SE— 30	27.8	31.5	1.05
SE— 70	66.1	73.0	1.10
SE— 150	118	140	1.12

- 1) Estimated from GPC-LALS measurements in water. Measuring condition is shown in Fig. 4.
- 2) $[\eta] = (3.97 \times 10^{-4}) \bar{M}_w^{0.686}$ (in benzene at 25°C)⁹⁾
- 3) Estimated from GPC measurements in water on the column system, G 6000 PW 6 ft and G 5000 PW 2 ft.

しては Pharmacia 社の公称値であるが、この値の妥当性については、X線小角散乱の測定から確認されている⁸⁾。この結果は、(1)あるいは(3)式の要請を満たすものであり、本測定で用いた RI および LALS 装置の信頼性を示す結果であると判断した。

Fig. 5 に示した結果から決定した定数 k_2K/k_1 の値を用いて、リビングアニオン重合で合成した分子量分布の狭いポリエチレンオキッド (PEO) の分子量を評価した。分子量の異なる一連の PEO について得られたクロマトグラムの例を Fig. 6 に示した。これから、(2)および(3)式を用いて \bar{M}_w の値を決定し、結果を Table 1 にまとめた。なお、 $\partial n/\partial c$ の値はデキストランおよび PEO について、おのおの、0.141 および 0.135 ml/g ($\lambda = 6328\text{\AA}$) であった。表中 \bar{M}_v は、次に示す粘度式⁹⁾から評価した粘度平均分子量である。

$$[\eta] = (3.97 \times 10^{-4}) \bar{M}_w^{0.686} \quad \dots\dots(4)$$

(in benzene at 25°C)

\bar{M}_w と \bar{M}_v の間にはかなり良い一致がみられる。さらに、 \bar{M}_w の値の妥当性を調べるため、Fig. 1 に示した条件で PEO および牛血清アルブミン (BSA) を測定し、PEO の \bar{M}_w の値から決定した定数 k_2K/k_1 を用いて BSA の分子量を計算した。結果は $\bar{M}_w = 6.77 \times 10^4$ であり、浸透圧法で得られた値¹⁰⁾¹¹⁾、 6.9×10^4 および 7.0×10^4 、さらには沈降-拡散の測定による値¹²⁾ 6.8×10^4 と良い一致を示した。この結果から、PEO の分子量が妥当な値であると判断した。

ポリアクリル酸アミド (PAA) 分別試料¹³⁾、ポリビニルピロリドン (PVP, K-30 和光純薬製)、ポリビニルアルコール (PVA, GH-23 日本合成化学製) 分別試料⁶⁾ について、Fig. 1 に示したカラム系で測定を行なった。

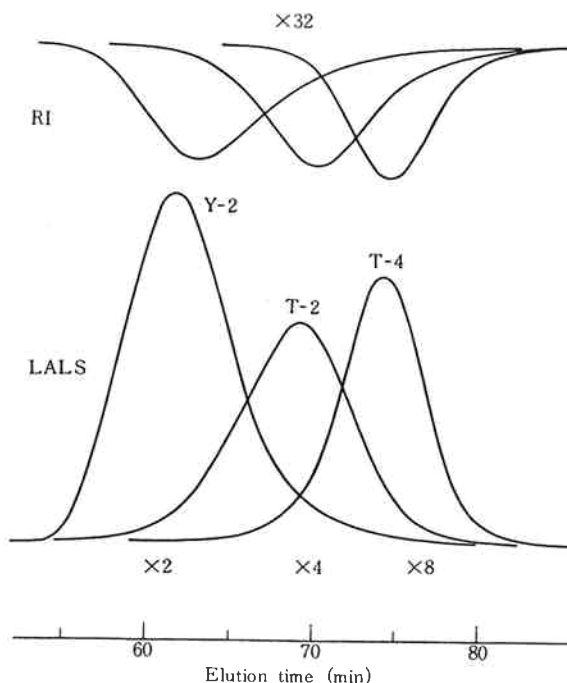


Fig. 7 Elution chromatograms for polyacrylamide fractions obtained from GPC-LALS measurements in 1/15M phosphate buffer (pH 6.8) containing 1/10 M KCl on the column set G 6000 PW (2 ft) and G 5000 PW (2 ft). Flow rate is 0.6 ml/min.

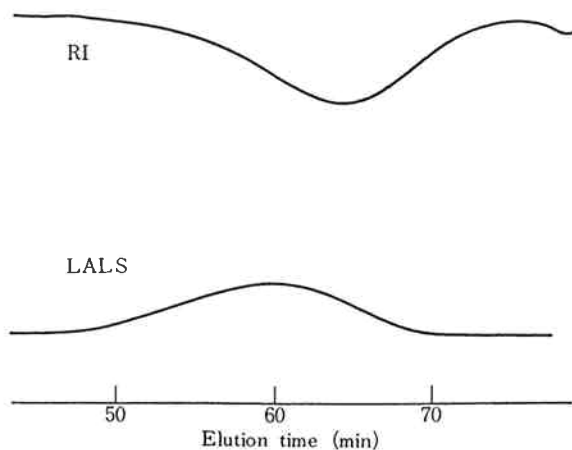


Fig. 8 Elution chromatograms for poly(vinyl pyrrolidone) K-30 obtained from GPC-LALS measurements. Measuring condition is the same as in Fig. 7.

Table 2 Molecular Weight \bar{M}_w obtained from GPC-LALS Measurements¹⁾

Samples	$\bar{M}_w \times 10^{-4}$	
	GPC-LS	LS
Polyacrylamide ²⁾		
T-4	12.9	12.2
T-2	25.0	29.5
Y-2	68.4	79.5
Poly(vinyl pyrrolidon)		
K-30	3.77	4.0 ³⁾

1) In 1/15 M phosphate buffer (pH 6.8 1/10 M KCl) on the column set G 6000 PW (2 ft) and G 5000 PW (2 ft)

2) A. Kotera et al., RPPPJ., 17, 43 (1974)

3) Nominal value.

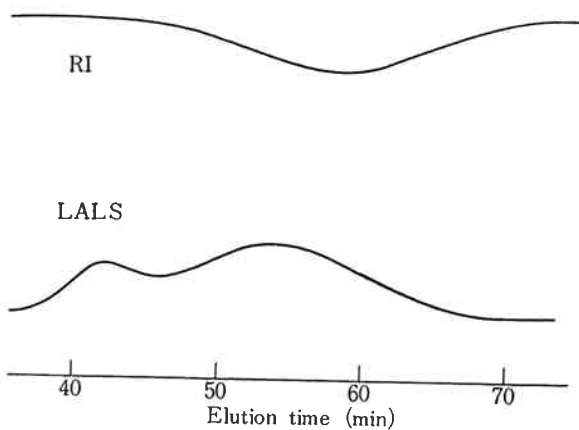


Fig. 9 Elution chromatograms for poly(vinyl alcohol) GH-23-Fr. 1 obtained from GPC-LALS measurements. Measuring condition is the same as in Fig. 7.

溶出曲線を Fig. 7, 8 および Fig. 9 に示した。PAA および PVP について計算した \bar{M}_w の値を文献値と共に Table 2 にまとめた。文献値は、PAA については従来の光散乱法で得られた値¹³⁾であり、PVP については公称値である。Fig. 9 の PVA 分別試料の LALS に対応するクロマトグラムの低溶出量側にショルダー（2次ピーク）が存在することがわかる。これは試料中に存在する凝集体に由来するものと思われるが、対応する溶出位置の RI クロマトグラムにピークが存在しないから、凝集体の量は極く微量であることがわかる。この結果は、感度が分子量に比例して増大する LALS 検出器の特徴を示すものである。

[2] 標準蛋白質

7 種類の標準蛋白質について、PW タイプおよび SW タイプのカラム系を用いて測定を行なった。分子量と溶出量の関係は Fig. 1 および Fig. 2 に示してある。図の直線の勾配から明らかなように、ここで用いた試料の

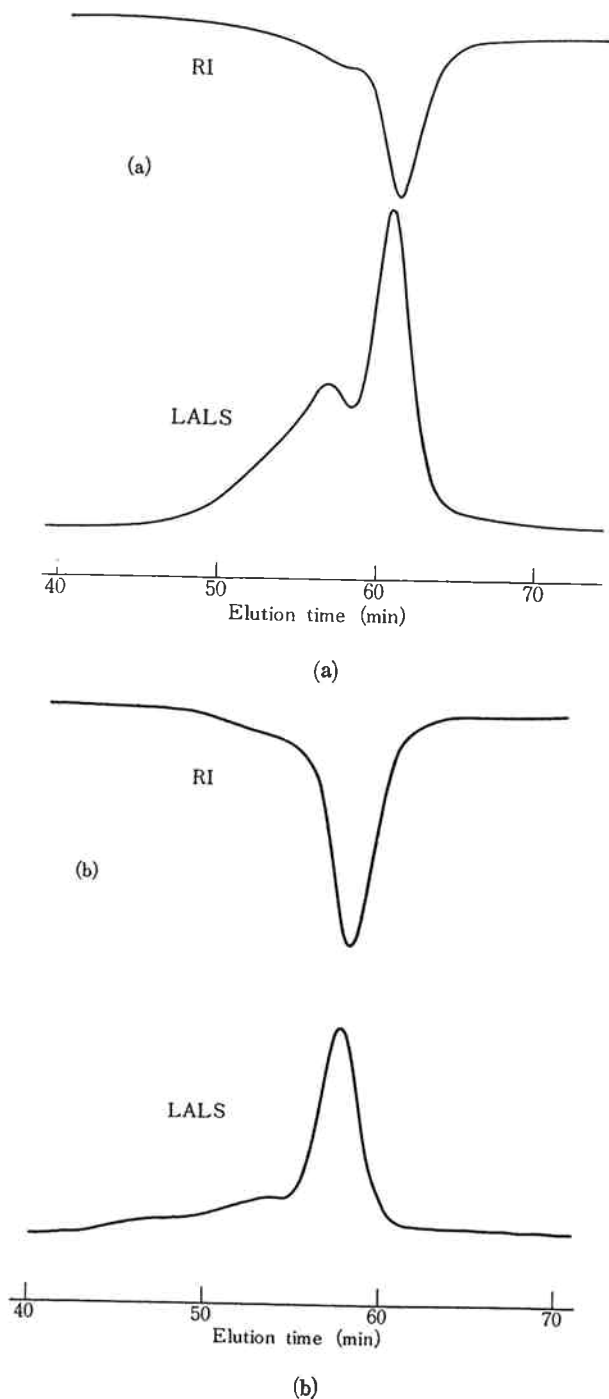


Fig. 10 Elution chromatograms for (a) bovine thyroglobulin and (b) bovine plasma fibrinogen obtained from GPC-LALS measurements. Measuring condition is the same as in Fig. 7.

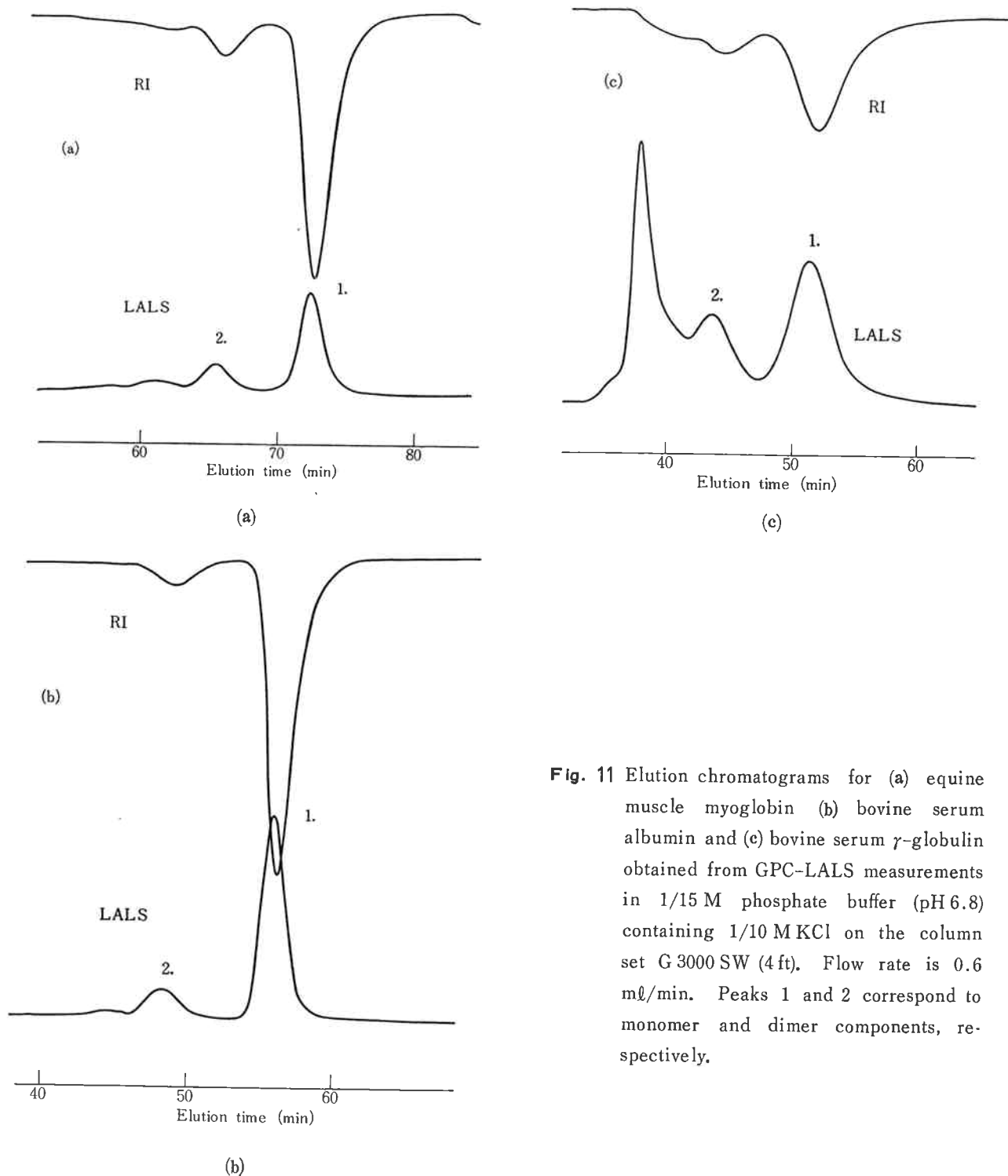


Fig. 11 Elution chromatograms for (a) equine muscle myoglobin (b) bovine serum albumin and (c) bovine serum γ -globulin obtained from GPC-LALS measurements in 1/15 M phosphate buffer (pH 6.8) containing 1/10 M KCl on the column set G 3000 SW (4 ft). Flow rate is 0.6 ml/min. Peaks 1 and 2 correspond to monomer and dimer components, respectively.

分子量範囲では、SW タイプのカラム系の方が分離能が秀れているが、測定可能な分子量範囲は PW タイプのカラム系の方が広い。用いた蛋白質の形状はフィブリンノーゲン以外はいずれもほぼ球状であることが知られている。**Fig. 1** でフィブリンノーゲンの溶出時間が早くなっているのは、この蛋白質が棒状に近い形状であるため、分子量当りの分子の大きさが他の球状蛋白質に比較して大きいことに由来する結果である。また、**Fig. 2** で γ -グ

ロブリンの溶出時間が遅くなっているのは、溶質とゲル担体との相互作用に起因するものと思われる。2つのカラム系で得られたクロマトグラムの例を、**Fig. 10** および **Fig. 11** に示した。図には示されていないが、ゴミ粒子の通過に由来するスパイク状ノイズが若干認められた。これを完全に除去することは困難であったが、ベースラインの安定性は非常に良好であり、解析に影響を及ぼすことはなかった。(1)式に従って、ピーク位置におけ

Table 3 Molecular Weights of Proteins Evaluated from GPC-LS Measurements¹⁾

Protein	Molecular Weight $\times 10^{-4}$		
	PW Type ²⁾	SW Type ³⁾	Ref.
Cytochrome c	—	1.35	1.3
Myoglobin	2.14	2.00	1.7
Ovalbumin	4.61	4.03	4.4
BS Albumin	6.77	(6.80)	6.8
BS γ -Globulin	14.0	13.2	15.3
BP Fibrinogen	30.6	38.6	33
Thyroglobulin	66.8	—	65-70

- 1) In M/15 phosphate buffer (pH 6.8) + M/10 KCl
- 2) TSK-GEL G 6000 PW 2 ft G 5000 PW 2 ft.
- 3) TSK-GEL G 3000 SW 4 ft.

る両検出器の応答比 h_p^{LS}/h_p^{RI} から分子量を計算し、結果を文献値と共に **Table 3** にまとめた。両カラム系での結果と文献値との一致はほぼ良好であった。較正物質として、PW タイプカラム系の測定では、**Table 1** に示した標準 PEO を、SW タイプカラム系の測定では牛血清アルブミンを用い、(1)式の定数 k_2K/k_1 の値を決定した。また、生の蛋白質溶液の屈折率の濃度勾配 ($\partial n/\partial c$) の値は蛋白質の種類にほとんど依存しない¹⁴⁾ので、ここで用いた蛋白質についてこの値がすべて同じであるとして分子量を計算している。なお、注入液濃度を变化させた (0.02—0.2 g/dl) 測定結果から、溶出時間の濃度依存性がないこと、および(1)式による分子量の値が濃度に依存しないことが明らかとなったので、蛋白質の測定に際して試料濃度に特に注意を払う必要はない。

Fig. 11 のクロマトグラムから明らかなように、ミオグロビン、アルブミン、 γ -グロブリンにはメインピーク

Table 4 Height ratios h_p^{LS}/h_p^{RI} for peak 1 and peak 2 of the chromatograms shown in **Fig. 11**

Protein	h_p^{LS}/h_p^{RI}	
	peak 1	peak 2
Myoglobin	0.38	0.67
Albumin	0.64	1.25
γ -Globulin	1.24	2.18

- 1) h_p^{LS} and h_p^{RI} represent heights of chromatograms for LALS and RI detectors at peak top position, respectively.

(ピーク 1) の他に低溶出量側にサブピーク(ピーク 2) が認められる。両ピーク位置における応答比 h_p^{LS}/h_p^{RI} の値を計算した結果を **Table 4** に示した。サブピークに対する h_p^{LS}/h_p^{RI} の値はいずれの試料についてもメ

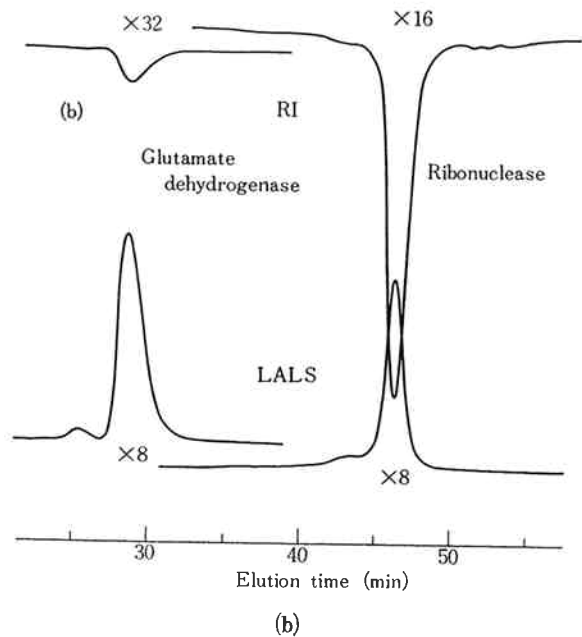
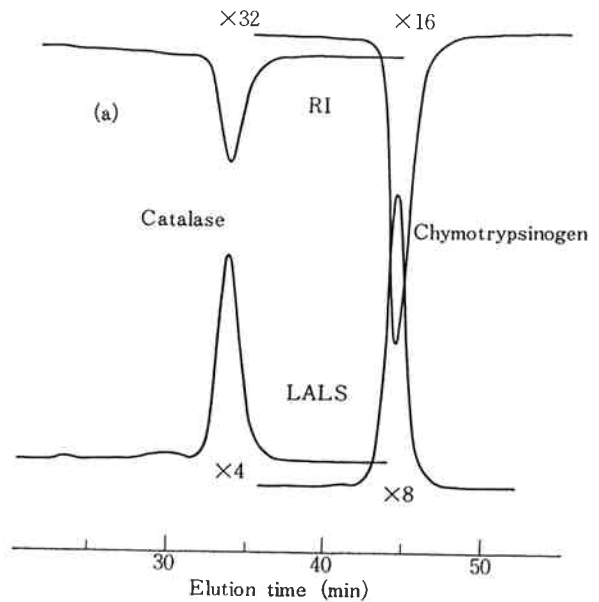


Fig. 12 Elution chromatograms for (a) bovine liver catalase and bovine pancreas chymotrypsinogen (b) bovine liver glutamate dehydrogenase and bovine pancreas ribonuclease obtained from GPC-LALS measurements in 1/15 M phosphate buffer (pH 6.8) containing 1/10 M KCl on the column set G 3000 SW (4 ft). Flow rate is 1.0 ml/min.

インピークの約2倍であることから、これが2分子会合体に対応する成分であると判定した。 γ -グロブリンについては、量はわずかであるが、さらに高次の会合体が含まれていることが明らかである。なお、これら会合体の含有比率は濃度に対して変化しなかった。

[3] 酵素

Fig. 2 に示した SW タイプカラム系で、蛋白質および代表的な精製酵素 (Sigma 社製) について測定を行なった。得られた溶出曲線の例を Fig. 12 に示した。牛血清アルブミンの分子量 (6.80×10^4) から(1)式の定数を決定し、測定試料の分子量を計算した結果を、溶出時間と共に Table 5 にまとめた。分子量については文献値も示してある。この場合も、 $\partial n/\partial c$ の値はすべての蛋白質、酵素について同一であるとして計算した。ヘモグロビンについて文献値との不一致が見られるが、原因は明らかではない。その他の試料については10%以内で文献値と一致していることから、本測定法は蛋白質、酵素の分子量決定に対して充分適用できることがわかった。図に示したクロマトグラムからわかるように、蛋白質、酵

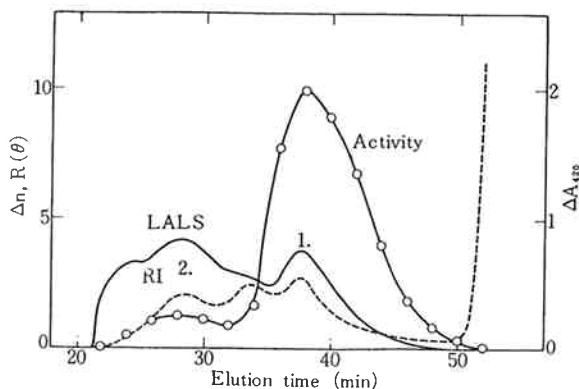


Fig. 13 Elution chromatograms for β -galactosidase obtained from GPC-LALS measurements in 1/15 M phosphate buffer (pH 6.8) containing 1/10 M KCl on the column set G 4000 SW (2 ft). Flow rate is 0.6 ml/min. Activity of the enzyme for hydrolysis of ONPG is also shown.

Table 5 Molecular Weights of Proteins and Enzymes Evaluated from GPC-LALS measurements¹⁾

Sample	Source	Te ²⁾ (min)	$\bar{M}_w \times 10^{-4}$	
			GPC-LALS	Ref.
Protein				
γ -Globulin	Bovine serum	32.8	13.9	15.3
Albumin	Bovine serum	35.4	—	6.8
Albumin dimer		30.4	13.3	13.6
Hemoglobin	Human	41.9	5.12	6.45
β -lactoglobulin	Bovine milk	39.5	3.45	3.50
Trypsin inhibitor	Soybean	42.1	2.22	2.1
Myoglobin	Equine muscle	45.6	2.06	1.75
Cytochrome c	Equine heart	47.0	1.43	1.26
Enzyme				
Glutamate DH ³⁾	Bovine liver	28.3	36.3	30-34
Catalase	Bovine liver	33.7	21.4	24.0
Alcohol DH ³⁾	Yeast	33.4	14.7	14.1
α -Amylase	—	44.0	5.70	5.0
Peroxidase	Horse-radish	39.8	3.76	4.0
Chymotrypsinogen	Bovine pancreas	44.5	2.72	2.58
Lysozyme	Egg white	50.6	1.56	1.47
Ribonuclease	Bovine pancreas	46.3	1.51	1.37

1) Columns: TSK-GEL G 3000 SW 4 ft

Solvent: 1/15 M Phosphate buffer (pH 6.8 1/10 M KCl)

Flow rate: 1 ml/min

2) Te: Elution time

3) DH: dehydrogenase

素については単一のピークを示すような純粋な試料は期待できないので、できるだけ分離能の高いカラム系で測定することが、高い精度で測定結果を得る上で重要である。表に示した結果から明らかなように、これらの試料について分子量と溶出時間の関係は、普遍曲線とならない。これは、溶出時間から分子量を判定することができないことを示す結果であるが、GPC-光散乱測定では、解析に際して溶出時間は問題にならないので、この場合でも、正しい分子量の値を得ることができる。

粗精製酵素に対する適用例として、 β -ガラクトシダーゼ (Gist 社製) のクロマトグラムを Fig. 13 に示した。測定カラムは、G 4000 SW (2 ft) である。ピーク 1 に対応する成分の分子量は 1.7×10^5 と計算され、文献値に近い値である。この酵素の ONPG (o-nitrophenyl- β -D-galactopyranoside) に対する分解活性を調べた結果、1 のピーク位置が最大活性を示す位置と一致することがわかった。ピーク 2 に対応する成分の分子量は 2.3×10^5 であり、ONPG 分解活性はわずかしか認められなかった。粗精製酵素 GPC 溶出成分の分子量から酵素活性成分を予測できることを示す結果である。

4. ま と め

低角度光散乱光度計を分子量検出器とする GPC-光散乱測定を水溶液系に適用した本報の結果は以下のようにまとめられる。本測定から分子量を評価する場合、1) 濃度既知の試料を必要としない、2) 高純度に精製された試料である必要がない、3) 分離モードは GPC に限定されない、などの特長的な利点を挙げることができる。1) については本測定法の原理的な特長である。蛋白質について、屈折率の濃度勾配がその種類にほとんど依存しないという特徴を生かすために、濃度検出器としては示差屈折計を用いるの方が有利であろう。2) については、測定カラムの分離能に関連した問題であり、分離能の高いカラム系を選択することが、測定精度を良くする上で重要となる。また、3) については、カラムの吸着性(溶出時間の遅れ)などによる影響が少ないので、信頼度の高い結果が得られる。蛋白質、酵素の分子量決定については、特に1) および2) の特長は、従来の測

定法(超遠心平衡法など)に見られない魅力的な利点と言えよう。さらに、測定時間、操作の面でも従来法より有利であり、測定精度についても充分満足しうることが確認された。分子量決定と同時に、純度、会合体に関する知見が得られるのも本測定法の有利な点である。

謝 辞

本研究を進めるに当り、御協力いただいた、有近健二、加藤喬雄、固屋義己の各氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Y. Kato, S. Kido, and T. Hashimoto; *J. Polymer Sci., Polym. Phys. Ed.*, **11**, 2329 (1973).
- 2) A. C. Ouano and W. Kaye; *J. Polymer Sci., Polym. Chem. Ed.*, **12**, 1151 (1974).
- 3) A. C. Ouano; *J. Chromatogr.*, **118**, 303 (1976).
- 4) 福田三寿, 福富 誠, 馬場信行, 加藤芳男, 有近健二, 相浦 惇, 橋本 勉; “東洋曹達研究報告”, **23**, 111 (1979).
- 5) T. Kato, A. Kanda, A. Takahashi, I. Noda, S. Maki, and M. Nagasawa; *Polymer J.*, **11**, 575 (1979).
- 6) T. Hashimoto, H. Sasaki, M. Aiura, and Y. Kato; *J. Polymer Sci., Polym. Phys. Ed.*, **16**, 1789 (1978).
- 7) K. Fukano, K. Komiya, H. Sasaki, and T. Hashimoto; *J. Chromatogr.*, **166**, 47 (1978).
- 8) S. K. Garg and S. S. Stivala; *J. Polymer Sci., Polym. Phys. Ed.*, **16**, 1419 (1978).
- 9) G. Allen, C. Booth, S. J. Hurst, M. N. Jones and C. Price; *Polymer*, **8**, 391 (1967).
- 10) G. Scatchard; *J. Amer. Chem. Soc.*, **68**, 2315 (1946).
- 11) G. S. Adair and M. E. Robinson; *Biochem. J.*, **24**, 1864 (1930).
- 12) E. J. Cohn; *Trans. Coll. Phys. Phila.*, **10**, 149 (1942).
- 13) A. Kotera, K. Furusawa, N. Onda and Y. Koya; *RPPPJ*, **17**, 43 (1974).
- 14) G. D. Fasman; *Handbook of Biochemistry and Molecular Biology*, **2**, CRC Press Inc., (1976).