

CHROM. 4093

## MICRO-FRACTIONNEMENT ET MICRO-DOSAGE DES GLYCOSAMINOGLYCANES PAR ÉLECTROPHORÈSE SUR BANDES D'ACÉTATE DE CELLULOSE GELATINISÉES

ANNICK GARDAIS, JACQUES PICARD ET CECILE TARASSE

*Laboratoire de Biochimie Médicale, CHU Saint-Antoine, 27, rue de Chaligny, Paris 12ème (France)*

(Reçu le 26 mars 1969)

---

### SUMMARY

*Microfractionation and determination of microquantities of glycosaminoglycans by electrophoresis on gelatinized acetate cellulose strips*

Fractionation of purified glycosaminoglycans (GAG) is obtained by electrophoresis on gelatinized acetate cellulose strips in pyridine formate, citrate or zinc acetate buffers. Qualitative and quantitative separation of GAG from a sample which does not contain more than 25  $\mu\text{g}$  of GAG can be performed on the same strip by this procedure. On staining with Alcian Blue the strips show, according to increasing mobilities, hyaluronate, dermatan sulphate, heparan sulphate, chondroitin sulphates (A and C) and heparin. The method is quantitative. For the determination of microquantities of GAG (1–25  $\mu\text{g}$ ) the different GAG are eluted from the cellulose strips and determined spectrophotometrically with an accuracy of 3%. The procedure can also be used for the preparation of pure GAG (50  $\mu\text{g}$  to 2 mg) provided several acetate cellulose strips or blocks (Cellogel) are used and GAG is precipitated by means of cetylpyridinium chloride in acetone.

---

### INTRODUCTION

L'analyse qualitative et quantitative des glycosaminoglycanes (GAG) sur de très faibles quantités de tissu est laborieuse. Plusieurs méthodes ont été proposées. Les techniques de chromatographie sur colonne de cellulose des complexes GAG-cétylpyridinium sont largement utilisées, mais dans les procédés usuels la séparation complète des GAG est délicate<sup>1-3</sup>. Des techniques électrophorétiques réalisent également la séparation qualitative des GAG<sup>4-7</sup>; mais ces dernières méthodes se heurtent à plusieurs difficultés. La séparation des différents GAG sur une même bande n'est pas complète; elle est seulement grossièrement quantitative, les GAG étant évalués par densitométrie. Elle manque de reproductibilité et ne permet pas de récupérer après électrophorèse le matériel déposé sur les bandes. La méthode que nous proposons permet la séparation des différents GAG par électrophorèse; elle est quantitative et valable pour de très petites quantités de matériel (1 à 25  $\mu\text{g}$ ); elle est aussi applicable pour la préparation d'échantillons de GAG purs.

## TECHNIQUE PROPOSÉE

*Appareillage*

L'électrophorèse est réalisée sur des bandes d'acétate de cellulose gélatinisées (Cellogel, Chemetron) de  $17 \times 20$  cm. Les bandes sont immergées dans le tampon 30 min avant l'utilisation. L'électrophorèse est réalisée dans une cuve SEBIA, générateur APELAB. La différence de potentiel appliquée aux bornes est de 150 V.

*Tampons*

Les tampons utilisés sont les suivants: citrate de sodium/acide citrique: 0.1 M, pH 3.5; durée de l'électrophorèse: 1 h; acétate de zinc: 0.15 M, pH 6; durée: 1 h 30 min; acétate de cuivre: 0.15 M, pH 6; durée: 1 h 30 min; formiate de pyridine: 0.1 M, pH 3; durée: 1 h.

*Dépôt des substances*

Le dépôt des GAG sur les bandes d'électrophorèse est effectué sur la bande imprégnée de tampon. 2 à 25  $\mu\text{g}$  de GAG sont déposés dans un volume de 10  $\mu\text{l}$ .

*Coloration*

La coloration des bandes est effectuée par immersion des bandes d'électrophorèse dans une solution de Bleu d'Alcian à 0.5 % dans le mélange acide acétique-eau-méthanol (10:40:50). Temps de coloration: 2 min.

*Décoloration*

Les bandes d'électrophorèse sont ensuite traitées pour différenciation dans quatre bains successifs du mélange décolorant acide acétique-eau-méthanol (5:45:50). Durée de chaque bain: 3 min.

*Élution*

Les zones métachromatiques correspondant aux GAG sont prélevées sur la bande humide et dissoutes dans l'acide acétique à 80 % (1 ml). Les fractions sont dosées par colorimétrie à 675 m $\mu$  en se référant à des courbes d'étalonnage préalablement établies avec des GAG standards, séparés par électrophorèse dans les mêmes milieux tamponnés.

*Substances témoins*

Les produits de référence utilisés sont les suivants: chondroïtine sulfate A de septum nasal (CSA), chondroïtine sulfate C (CSC); dermatane sulfate (CSB); héparane sulfate (HS). Ils nous ont été fournis gracieusement par le Professeur MATHEWS. D'autres échantillons d'héparane sulfate ont été préparés au laboratoire à partir des urines d'un enfant atteint de maladie de San Fillipo, par précipitation avec le chlorure de cétyle pyridinium (CPC) selon les techniques antérieurement décrites<sup>1,2</sup>. Le kératane sulfate et l'hyaluronate (de cordon ombilical) utilisés proviennent d'un don généreux du Professeur KARL MEYER. Des préparations commerciales de GAG, purifiées au laboratoire ont également été utilisées: chondroïtine sulfate A (Sigma), héparane sulfate (Upjohn), héparine (Roche, Vitrum).

### Extraction des GAG des tissus

Après traitement à l'acétone à froid, les fragments de tissu réduits à l'état de poudre acétonique sont soumis à une digestion protéolytique. Dans un premier temps, les protéines sont digérées par la pronase (1 mg/100 mg de tissu frais) en milieu Tris 0.1 M, CaCl<sub>2</sub> 0.004 M, à pH 8.5, pendant 48 h à 50°, avec renouvellement de la pronase au bout de 24 h. Dans un second temps, après inactivation de la pronase par chauffage (2 min à 100°), l'hydrolysât pronasique est soumis à l'action de la trypsine (1 mg/100 mg de tissu frais), à pH 7.8 pendant 6 h à 37°. Après inactivation (2 min à 100°), le milieu est centrifugé et dialysé, les GAG sont précipités dans le surnageant par le CPC à 1% en milieu NaCl 0.03 M. Les complexes isolés par centrifugation sont solubilisés dans NaCl 1.25 M (ou 2.1 M) et purifiés par précipitations alternées par l'éthanol (2.5 volumes) et le CPC<sup>2</sup>.

Dans le cas de très faibles prélèvements de tissu (5 à 40 mg) la digestion est effectuée par incubation avec la papaïne cristallisée Sigma (2%), en présence d'EDTA 0.05 M et de cystéine 0.005 M à pH 7.3. La durée d'incubation est de 4 h à 65°. Après inactivation de l'enzyme et élimination de l'insoluble par centrifugation, les GAG sont précipités par le CPC.

Les GAG totaux provenant des différents tissus sont dosés par la méthode au carbazole selon la technique de Dische modifiée: à 0.25 ml d'échantillon on ajoute 1.5 ml d'acide sulfurique Merck et 0.12 ml de réactif d'Ehrlich<sup>8</sup>. Après hydrolyse des GAG dans HCl 2 N, pendant 2 h, les acides uroniques sont dosés par la méthode au carbazole<sup>8</sup>. Les hexosamines sont dosées selon la technique d'Elson-Morgan modifiée<sup>2</sup> après hydrolyse dans HCl 4 N, pendant 4 h. Les sulfates sont dosés sur les hydrolysats suivant la micro-méthode de DODGSON<sup>9</sup>.

## RÉSULTATS

### Séparation qualitative des différents GAG

La séparation des GAG effectuée par électrophorèse dans les différents systèmes tampons donne par ordre de mobilité croissante: l'acide hyaluronique, le dermatane sulfate, l'héparane sulfate, le chondroïtine sulfate A (ou C), l'héparine. Sur le Tableau I figurent les déplacements (en mm) des différents GAG standards lorsque l'électro-

TABLEAU I

#### DÉPLACEMENT DES GAG STANDARDS EN MILLIMÈTRES

Electrophorèse sur bande d'acétate de cellulose gélatinisée (Cellogel). Tampons: citrate de sodium acétate de zinc et formiate de pyridine.

| GAG      | Tampons           |                 |                      |
|----------|-------------------|-----------------|----------------------|
|          | Citrate de sodium | Acétate de zinc | Formiate de pyridine |
| HA       | 39                | 37.5            | 45                   |
| CSB      | 47                | 41              | 52                   |
| HS       | 47                | 43              | 56                   |
| CSA-CSC  | 51                | 47.5            | 59                   |
| Héparine | 59                | 47.5            | 59                   |

phorèse est réalisée en tampon citrate, formiate de pyridine ou acétate de zinc dans les conditions précédemment indiquées.

Lorsque l'électrophorèse est pratiquée avec des solutions de GAG en milieu salin (0.5 à 1.2 *M*) ou avec des complexes GAG-cétyl pyridinium en milieu NaCl 1.25 *M*, les mobilités électrophorétiques restent identiques.

*Influence du tampon.* En tampon acétate de zinc ou acétate de cuivre, le dermatane sulfate ou l'héparane sulfate sont aisément séparés des autres GAG (Fig. 1). Lorsqu'ils sont tous les deux présents dans un même tissu, une meilleure séparation est obtenue avec le tampon formiate de pyridine (Fig. 2). L'héparine est séparée des autres GAG en tampon citrate (Fig. 3). En présence d'acide hyaluronique, de dermatane sulfate, d'héparane sulfate et de chondroïtine sulfate A (ou C), la meilleure résolution est opérée en tampon formiate de pyridine (Fig. 2). Les schémas de la Fig. 4 illustrent les résultats des analyses électrophorétiques de milieux contenant différents GAG.

*Influence de la quantité déposée.* Une séparation satisfaisante des GAG est obtenue à condition de ne pas déposer d'excès de substance. L'importance du dépôt varie avec la nature du tampon utilisé: dans un mélange, la quantité de chaque GAG présent ne doit pas excéder 10  $\mu\text{g}$  en tampon acétate de zinc, 2.5  $\mu\text{g}$  en tampon formiate de pyridine, 10  $\mu\text{g}$  en tampon citrate. Même en faible quantité (2  $\mu\text{g}$ ), le kératane sulfate donne une plage métachromatique diffuse. Pour s'assurer de sa présence, il est nécessaire de le séparer des autres GAG par chromatographie en couche mince<sup>10</sup>.

*Comparaison des mobilités électrophorétiques des GAG étudiés et des GAG standards*  
Les mobilités électrophorétiques des GAG d'un mélange peuvent être directement comparées à celles des GAG standards. On dépose sur les mêmes bandes des GAG du

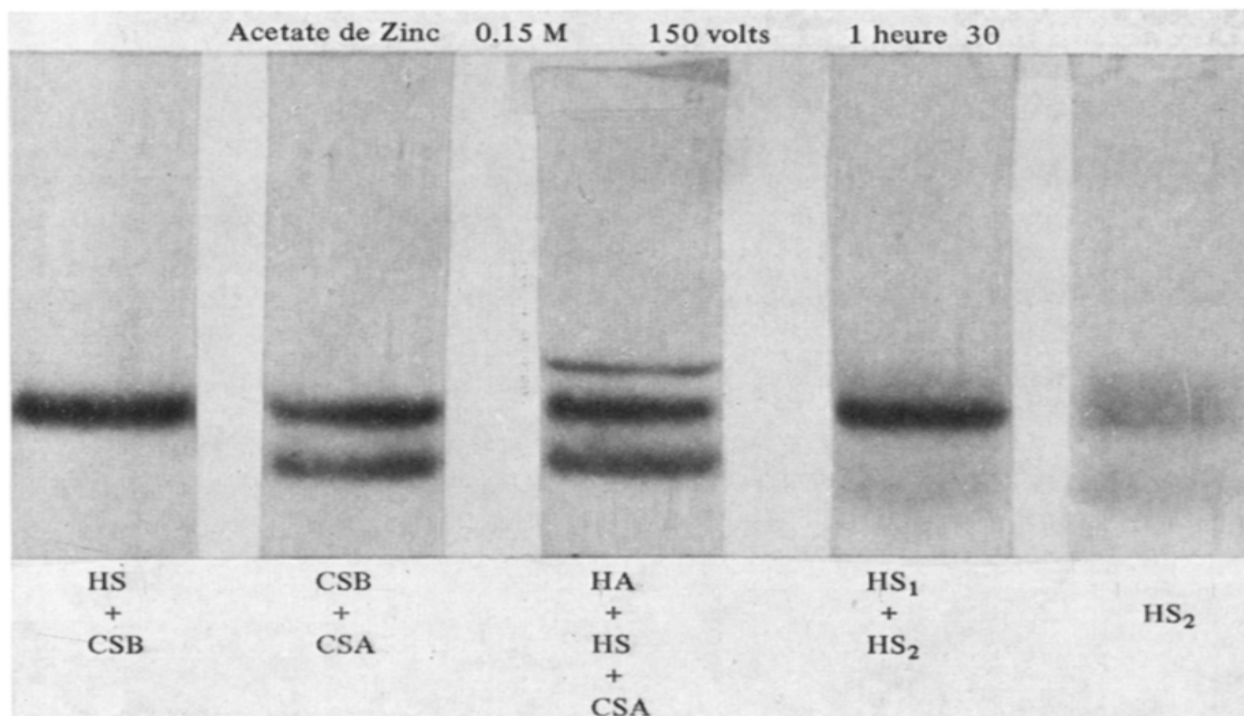


Fig. 1. Electrophorèse sur Cellogel des GAG en tampon acétate de zinc. Séparation de CSA, de CSB ou de HS, et de HA. HS<sub>1</sub> et HS<sub>2</sub> sont deux échantillons différents d'héparitine sulfate (HS<sub>1</sub> = purifié; HS<sub>2</sub> = non-purifié).

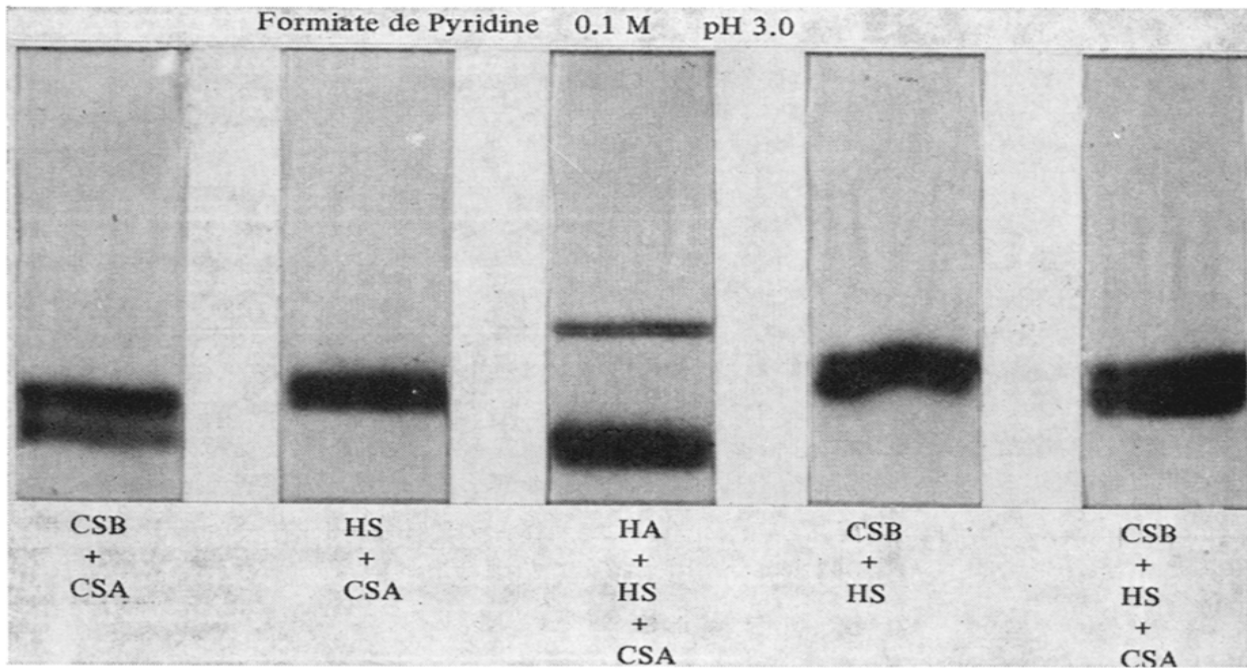


Fig. 2. Electroforèse des GAG en tampon formiate de pyridine. Séparation de CSA, CSB, HS et HA.

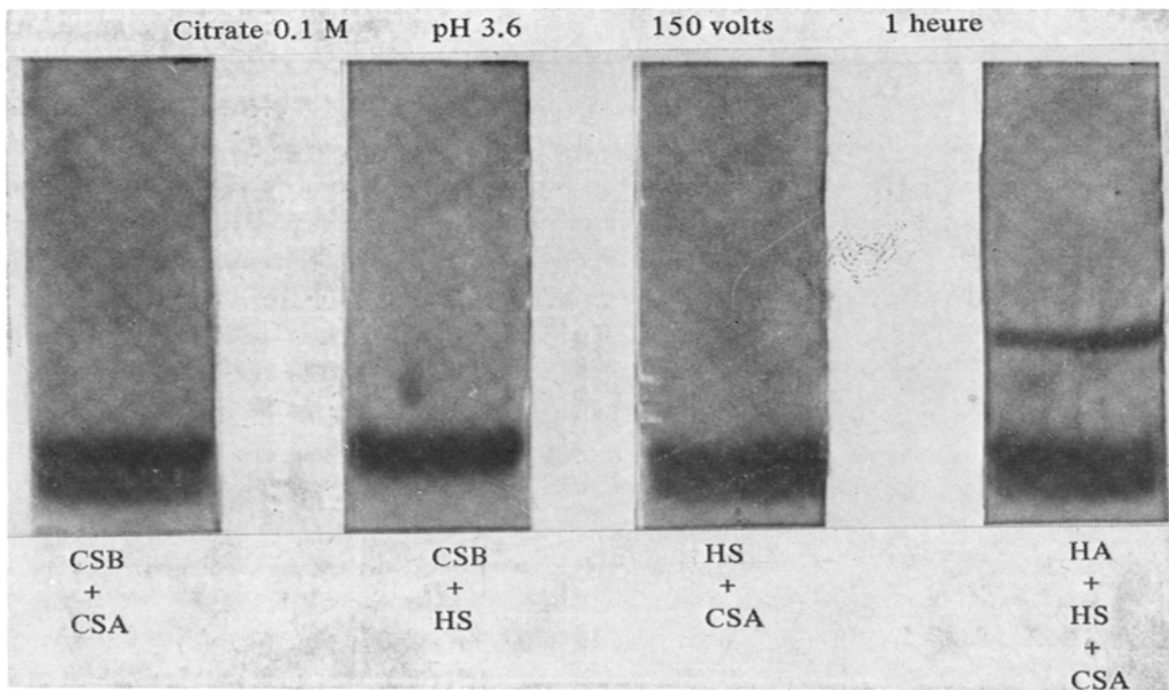


Fig. 3. Electroforèse des GAG en tampon citrate. Séparation de CSA, de CSB, de HS et de HA.

mélange et l'un des GAG standards (CSA, CSB, HS, HA). Après déplacement électrophorétique et coloration de la bande, la surcharge en GAG standard peut entraîner au niveau de l'un des GAG présents dans le mélange une augmentation de la métachromasie. Si la mobilité électrophorétique du GAG standard ne coïncide pas avec la mobilité de l'un des GAG présents dans le mélange, aucune augmentation de la colo-

ration n'apparaît, mais on décèle une bande supplémentaire provenant de la surcharge en GAG standard. Ce test de surcharge peut faciliter la comparaison des mobilités électrophorétiques des GAG avec celle des substances de référence.

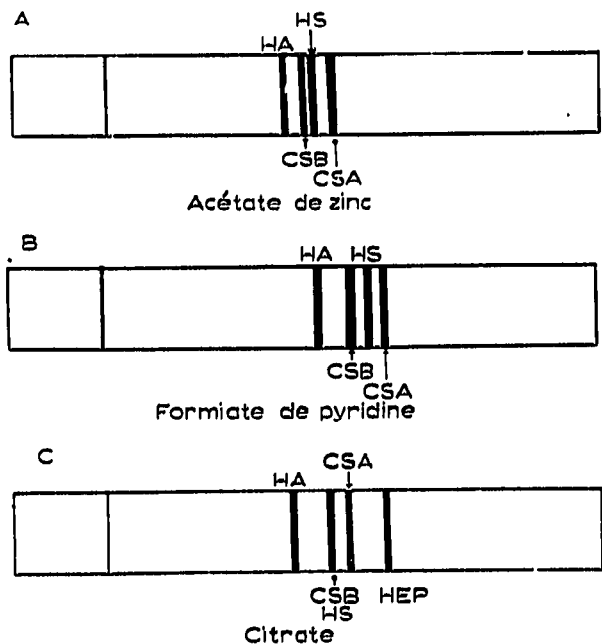


Fig. 4. Représentation schématique des séparations des GAG obtenus par électrophorèse des trois systèmes tampons.

#### Séparation quantitative des GAG

L'électrophorèse sur Cellogel des GAG est réalisée dans l'un des tampons proposés. Après migration, la bande d'électrophorèse est colorée par le Bleu d'Alcian, et les GAG sont différenciés selon la technique décrite. Les zones métachromatiques sont éluées dans l'acide acétique à 80 % (1 ml). L'intensité de la coloration est appréciée au spectrophotomètre à 675 m $\mu$  par rapport à un témoin. Un fragment, de surface identique à la partie éluée, prélevé sur la même bande d'électrophorèse en dehors des zones métachromatiques, et dissous dans les mêmes conditions constitue le témoin. Pour établir les courbes d'étalonnage, des quantités connues de chacun des différents GAG (soit 2 à 20  $\mu$ g de HA, HS, CSA, CSC, CSB et héparine) sont déposées sur bandes d'électrophorèse. Les zones métachromatiques sont éluées et l'intensité de coloration est appréciée au spectrophotomètre. La Fig. 5 représente les courbes d'étalonnage obtenues pour le CSA, l'acide hyaluronique, le CSB et l'héparane sulfate. On obtient un droite entre 2 à 20  $\mu$ g. Ce procédé exclut les erreurs qui pourraient être dues à une coloration ou une différenciation trop poussée. Il tient compte aussi de l'influence de la nature du tampon sur le développement de la coloration métachromatique.

Si l'on respecte les conditions et si l'on se reporte à des courbes d'étalonnage établies avec chaque tampon, la méthode est quantitative et les erreurs commises restent très faibles. Pour des prises d'essai de 10  $\mu$ g de GAG, l'erreur ne dépasse pas 2 % pour le dermatane sulfate et l'héparane sulfate, et 5 % pour l'acide hyaluronique et le chondroïtine sulfate A (Fig. 5).

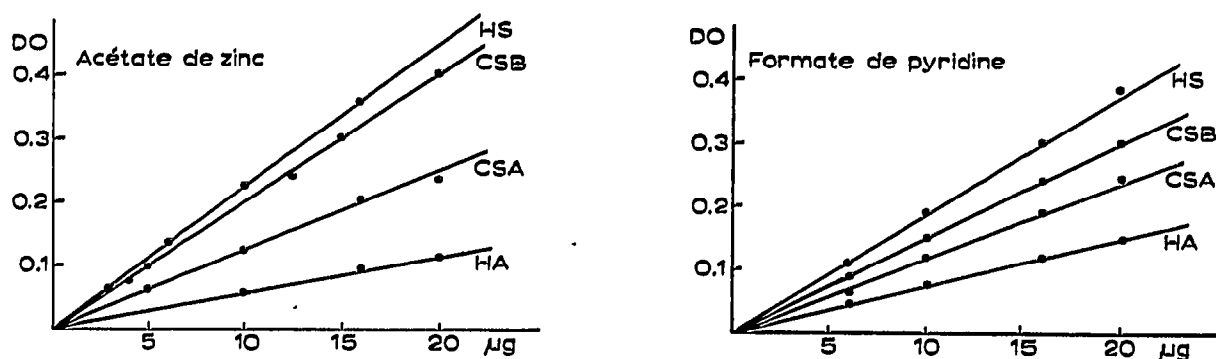


Fig. 5. Courbe d'étalonnage de CSA, CSB, HS et HA en tampons acétate de zinc et formiate de pyridine.

### Identification des GAG

L'identification est réalisée après séparation préalable par électrophorèse. Il est nécessaire de disposer d'un minimum de 100 à 150  $\mu\text{g}$  de GAG pour en faire l'identification.

Des échantillons provenant d'un mélange de GAG sont déposés sur plusieurs bandes. L'électrophorèse est pratiquée selon les conditions usuelles, puis les bandes sont découpées longitudinalement. L'emplacement des GAG est repéré par coloration sur un tiers de la largeur des bandes, et les zones correspondantes des parties non colorées sont prélevées et reprises dans un milieu acétonique à 99 % (5 ml pour 200  $\mu\text{g}$  de GAG). Les GAG sont précipités isolément par le CPC (concentration finale 1 %) en milieu acétonique pendant 15 h à 30°. Après centrifugation, les complexes GAG-cétyl pyridinium sont remis en suspension dans un nouveau volume de solution acétonique de CPC et recentrifugés. Les précipités sont alors redissous dans le NaCl 1.25 M (ou 2.1 M), 0.5 ml pour 200  $\mu\text{g}$  de GAG; les GAG sont finalement précipités par l'éthanol (2.5 volumes), 12 h à +4°.

Après redissolution en milieu aqueux du précipité, les GAG sont analysés et leur comportement vis à vis de certains enzymes (hyaluronidase, chondroïtinase) testé. Sur les hydrolysats (HCl 2 N, 2 h à 100°), les acides uroniques sont décelés par chromatographie en couche mince sur gel de silice avec le système solvant acétate d'éthylpyridine-acide acétique-eau (5:5:3:2). La révélation est effectuée par application d'oxalate d'aniline<sup>11</sup>. Sur les hydrolysats (HCl 4 N, 4 h), les hexosamines sont identifiées par chromatographie en couche mince sur "Chromagram" Eastman Kodak 511 V dans le système solvant éthanol-ammoniaque 25 %-eau (85:0.5:14.5). Les hexosamines sont révélées par application d'une solution éthanolique de chlorure de triphényl-tétrazolium<sup>12</sup>. Des échantillons de 1 à 5  $\mu\text{g}$  d'hexosamines sont nécessaires à cette identification.

### Applications

*Étude des GAG des liquides biologiques.* L'étude de la composition en GAG des urines est facilitée par l'application du procédé de surcharge (Fig. 6, 7 et 8). Dans les essais réalisés, les déplacements électrophorétiques des GAG urinaires coïncident avec ceux des GAG standards (CSA; CSB; HS; HA). L'identification complète nécessite la pratique de l'électrophorèse après traitement des GAG par l'hyaluronidase ou la

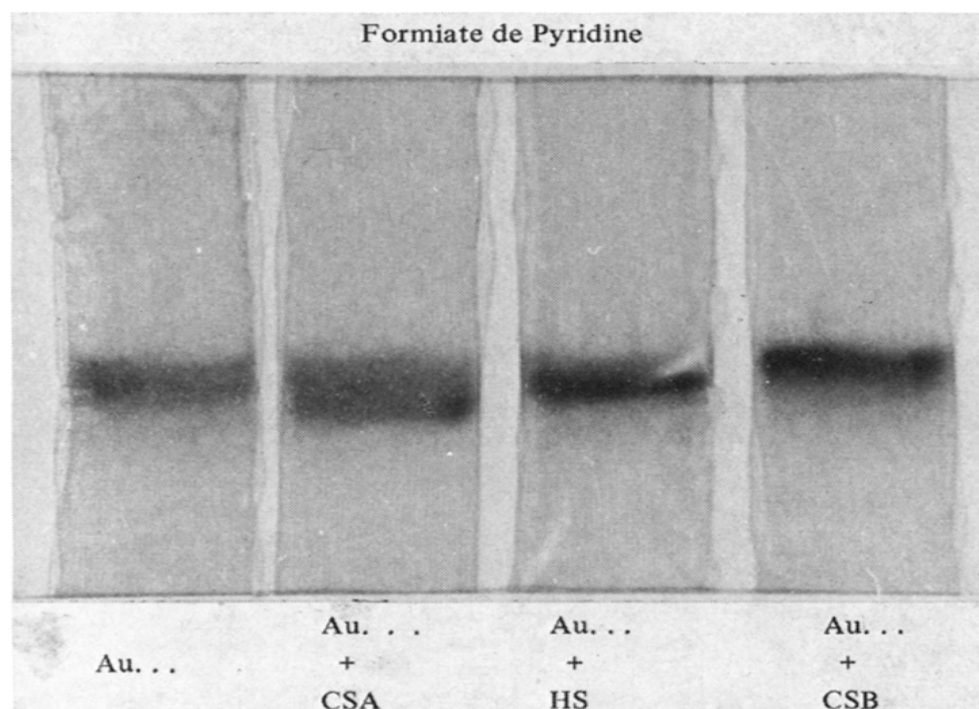


Fig. 6. Séparation des GAG de l'urine par électrophorèse en formiate de pyridine. Les GAG de l'urine ont été surchargés en CSB, HS ou CSA.

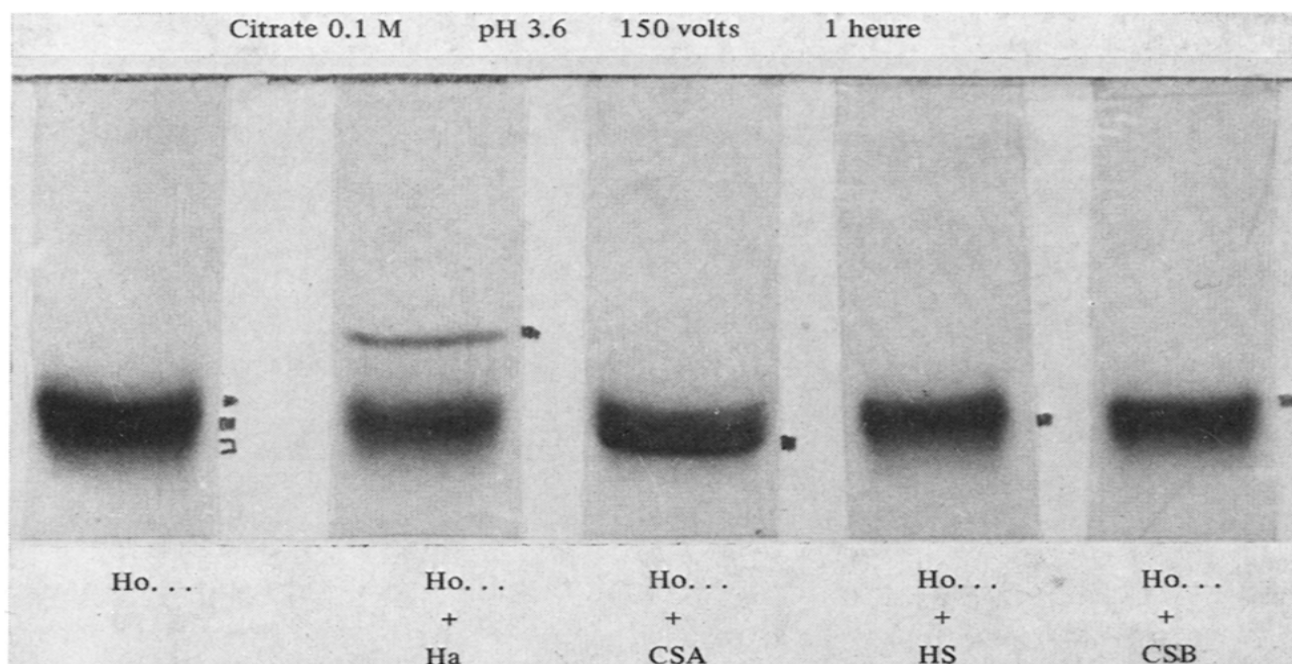


Fig. 7. Séparation des GAG de l'urine par électrophorèse en tampon citrate. Les GAG de l'urine ont été surchargés en CSB, HS ou CSA.

chondroïtinase. Elle comporte en outre l'étude des constituants provenant des GAG de l'urine séparés par électrophorèse et précipités par le CPC en milieu acétonique. La Fig. 9 représente un chromatogramme des hexosamines provenant de l'hydrolyse des GAG de l'urine d'un enfant atteint de la maladie de Hurler.



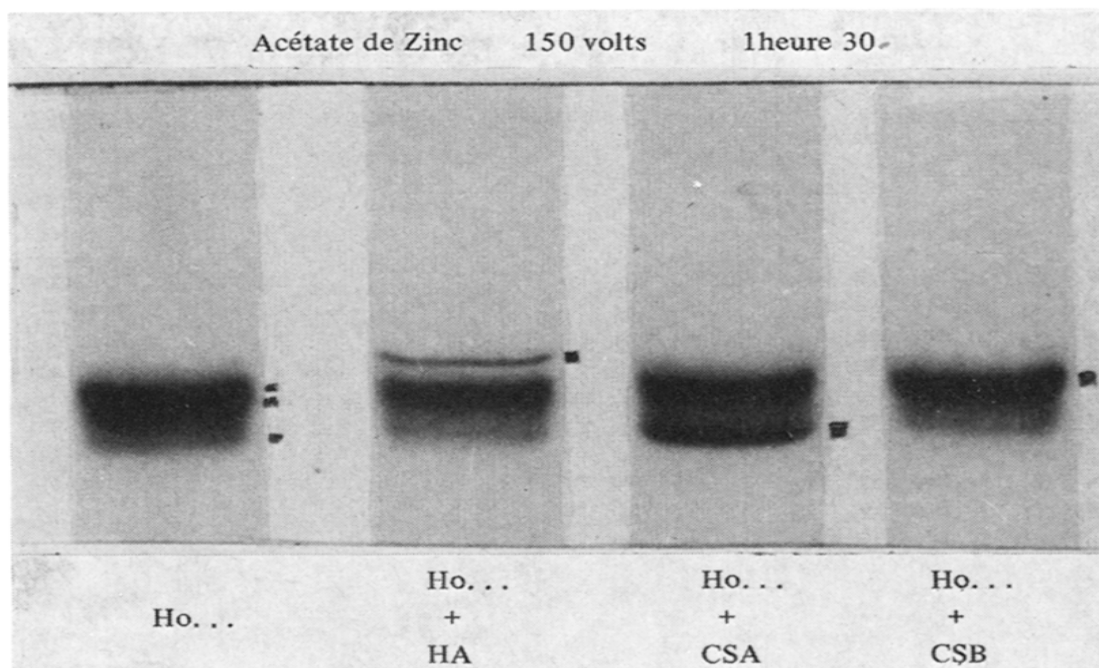


Fig. 8. Séparation des GAG de l'urine par électrophorèse en tampon acétate de zinc. Les GAG ont été surchargés en HS, CSB ou CSA.

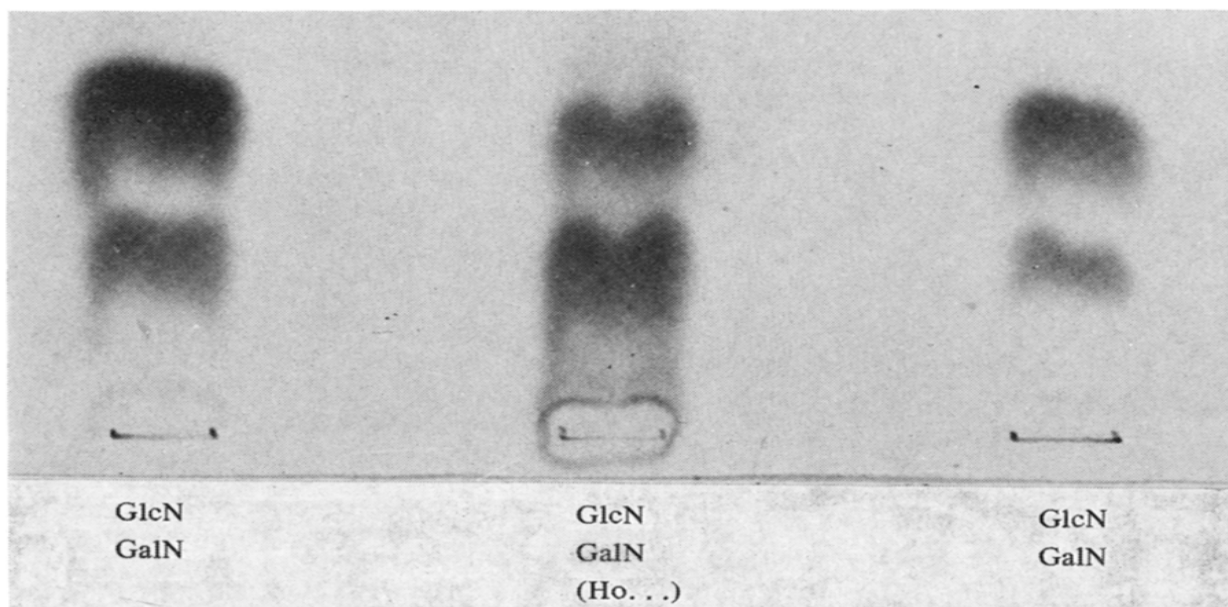


Fig. 9. Séparation sur "Chromagram" Kodak des hexosamines. Les hexosamines sont identifiées sur un hydrolysate de GAG isolés des urines (Ho...). Témoins: glucosamine (GlcN); galactosamine (GalN).

*Préparation des GAG.* En opérant simultanément sur plusieurs bandes de Cellogel on peut préparer de petites quantités de GAG purs (200 à 500  $\mu$ g) avec un excellent rendement: 95 %. Pour des quantités plus élevées (1 à 3 mg) de GAG, l'électrophorèse peut être pratiquée sur des blocs de Cellogel SEBIA (dimensions 6  $\times$ , 17 cm) dans les

mêmes tampons que précédemment (150 V, 3 h), selon la technique déjà décrite pour les bandes de Cellogel. Le rendement varie notablement avec la nature des GAG et il est plus élevé pour le CSA (90 %) que pour les autres GAG.

*Étude des GAG des tissus. Application à des problèmes métaboliques.* La méthode proposée a été appliquée à la séparation et à l'identification des GAG de divers tissus, cartilage épiphysaire, peau, tissu hépatique et tissu rénal et paroi artérielle, après extraction des GAG selon les procédés décrits (voir chap. TECHNIQUE PROPOSÉE). Les déplacements des GAG extraits des tissus et des standards de référence sont identiques. Toutefois, dans certains tissus (paroi artérielle), le déplacement électrophorétique de l'héparitine sulfate diffère de celui de l'héparitine sulfate standard.

L'incorporation des précurseurs marqués  $^{35}\text{S}$  dans les GAG des différents tissus peut être suivie en isolant de ces tissus les GAG et leurs précurseurs et en soumettant ces différentes substances à un fractionnement électrophorétique sur Cellogel. Les autoradiogrammes des bandes permettent de déceler les polysaccharides et leurs précurseurs marqués. Ils sont superposés aux bandes d'électrophorèse colorées au Bleu d'Alcian. La Fig. 10 représente un autoradiogramme obtenu à partir d'une séparation électrophorétique des GAG isolés de la paroi de l'oviducte de poule après administration de radiosoufre à l'animal.



Fig. 10. Autoradiogramme des GAG isolés de l'oviducte de poule. À gauche: bande d'électrophorèse colorée au Bleu d'Alcian. À droite: la même colorée, avec en surimpression l'autoradiogramme. Marquage au  $^{35}\text{S}$ .

## DISCUSSION

Les méthodes de microfractionnement des GAG se heurtent à de nombreuses difficultés. Suivant le traitement mis en oeuvre pour extraire les GAG des différents tissus ou des liquides biologiques, la *masse moléculaire* des GAG peut être trouvée différente pour certains d'entre eux. Suivant le traitement protéolytique utilisé, la *structure* même des GAG risque d'être altérée. En raison des difficultés liées à l'obtention des GAG étudiés, la variabilité des différents critères de masse moléculaire, de structure et de charge électrique limite la reproductibilité des méthodes de fractionnement. La séparation des GAG par gel filtration ou sur colonnes d'échangeurs d'ions et le fractionnement des GAG par chromatographie sur colonnes de cellulose des complexes des GAG-CPC se heurtent à des difficultés et ne peuvent éviter complètement le chevauchement de plusieurs constituants.

La séparation des GAG par électrophorèse est basée sur les valeurs différentes du pH isoélectrique de chaque GAG. Cette méthode, comme les précédentes, ne peut être considérée comme un critère exclusif d'identification des GAG. La correspondance entre les mobilités électrophorétiques des GAG des tissus et des GAG standards donne une indication sur leur nature. Pour identifier en toute certitude les GAG ainsi séparés, il est nécessaire de vérifier la composition en leurs constituants suivant les procédés décrits dans le présent travail.

Dans le cas où cette méthode est appliquée à l'analyse de GAG provenant des urines de malades, des vérifications doivent être effectuées en raison de la pluralité des formes d'excrétion des GAG dans l'urine et de l'absence de critères de pureté certains<sup>13</sup>.

Mais, lorsqu'elle est adaptée à l'analyse d'un tissu déterminé, la méthode électrophorétique proposée permet l'identification sans difficulté des GAG. Elle est hautement reproductible.

Parmi les différents GAG examinés, seul le kératane sulfate est mal séparé par électrophorèse: toutes les analyses effectuées sur les échantillons de kératane sulfate ont mis en évidence l'hétérogénéité de ce GAG. Une bande prédominante est décelée en électrophorèse sur Cellogel à proximité de la bande de CSA, mais d'autres bandes sont parfois visibles. Du reste, les analyses portant sur la structure et la masse moléculaire des kératane sulfates montrent de nombreuses variables et les expériences métaboliques ont prouvé l'hétérogénéité de ce type de GAG<sup>14</sup>.

La méthode proposée offre différents avantages. Elle permet la séparation qualitative de cinq GAG différents, et cette méthode peut être vérifiée en analysant les constituants des GAG isolés.

La méthode est quantitative et les erreurs commises dans les déterminations des GAG restent comprises entre 2 et 5 %, même pour des prises d'essai de quelques  $\mu\text{g}$ . La méthode de dosage colorimétrique est supérieure à la méthode densitométrique et tient compte de l'affinité particulière de chaque GAG pour les colorants en présence de différents tampons.

La méthode est préparative ou micro-préparative; elle permet de récupérer les GAG séparés et de procéder à l'analyse de chacun d'entre eux. Elle est applicable à des séparations portant sur de très petites quantités de GAG (2 à 20  $\mu\text{g}$ ). La méthode est rapide et se prête à des séparations et à des dosages en série.

#### REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé grâce à une subvention de la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique à laquelle nous adressons nos remerciements (Contrat No. 6801488).

Nous remercions les Professeurs MATHEWS et K. MEYER pour leurs dons généreux d'échantillons de glycosaminoglycanes.

#### RÉSUMÉ

Le fractionnement des glycosaminoglycanes (GAG) est effectué par électrophorèse sur bandes d'acétate de cellulose gélatinisée, en tampons: formiate de pyridine, citrate et acétate de zinc. Cette technique permet la séparation qualitative et quanti-

tative sur la même bande, de GAG provenant d'un échantillon n'excédant pas 25  $\mu\text{g}$  de GAG au total. L'examen des bandes obtenues après coloration au Bleu d'Alcian donne par ordre de mobilité croissante l'hyaluronate, le dermatane sulfate, l'héparane sulfate, les chondroïtines sulfates (A et C) et l'héparine. La méthode est quantitative. Pour la détermination de très petites quantités de GAG (1 à 25  $\mu\text{g}$ ), les différents GAG sont élués des bandes d'électrophorèse et dosés par spectrophotométrie avec une précision de  $\pm 3\%$ . La méthode est aussi valable pour la préparation de GAG purs (50  $\mu\text{g}$  à 2 mg) en opérant sur plusieurs bandes d'acétate de cellulose ou sur blocs préparatifs (Cellogel) et en précipitant les GAG par le chlorure de cétyle pyridinium en milieu acétonique.

## BIBLIOGRAPHIE

- 1 C. A. ANTONOPOULOS, E. BORELIUS, S. GARDELL, B. HAMNSTROM ET J. E. SCOTT, *Biochim. Biophys. Acta*, 54 (1961) 213.
- 2 C. A. ANTONOPOULOS, S. GARDELL, J. A. SZIRMAI ET E. R. DETYSSONSK, *Biochim. Biophys. Acta*, 83 (1964) 1.
- 3 C. A. ANTONOPOULOS ET S. GARDELL, *J. Atheroscler. Res.*, 5 (1965) 9.
- 4 K. D. VON BERLEPSCH, *Federation Proc.*, 21 (1962) 171.
- 5 F. HARUKI ET J. E. KIRK, *Biochim. Biophys. Acta*, 136 (1967) 391.
- 6 V. STEFANOVICH ET I. GORE, *J. Chromatog.*, 31 (1967) 473.
- 7 J. KENNETH HERD, *Anal. Biochem.*, 23 (1968) 117.
- 8 J. PICARD ET A. GARDAIS, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 49 (1967) 1689.
- 9 K. S. DODGSON, *Biochem. J.*, 78 (1961) 322.
- 10 G. MARZUCCO ET J. W. LASH, *Anal. Biochem.*, 18 (1967) 3.
- 11 S. M. PARTRIDGE, *Nature*, 164 (1949) 443.
- 12 E. MOCZAR, M. MOCZAR, G. SCHILLINGER ET L. ROBERT, *J. Chromatog.*, 31 (1967) 561.
- 13 D. P. VARADI, J. A. CIFONELLI ET A. DORFMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 141 (1967) 103.
- 14 E. A. DAVIDSON ET W. SMALL, *Biochim. Biophys. Acta*, 69 (1963) 459.

*J. Chromatog.*, 42 (1969) 396-407