糖鎖 MS/MS フラグメンテーションにおける N-アセチル基・HexNAc 残基の影響

Effect of Acetylamino Group in MS/MS Fragmentation of Sugar Chains

山垣 亮

Tohru YAMAGAKI

公益財団法人サントリー生命科学財団 生物有機科学研究所 *Suntory Bioorganic Research Institute, Suntory
Foundation of Life Sciences*

(Received September 12, 2017; Accepted October 3, 2017)

1. はじめに

質量分析による糖鎖の構造解析は ESI-MS や MALDI-MS の発展、分析装置の高感度化などにより飛躍的に進歩した。しかし糖鎖の構造解析はタンパク質のアミノ酸配列解析と異なり、「質量」だけで構造同定を行うには原理的に難しい問題があった。糖鎖の例としてグルコースを挙げると 1 位～6 位の炭素にそれぞれ 5 つの水酸基 (–OH) が結合しており、環内酸素の隣である 1 位の水酸基はグリコシド結合のドナー側となり、それ以外の部分はグリコシド結合のアクセプターとなる。このように糖鎖は糖残基中にグリコシル・アクセプターが複数存在するため、結合位置異性体や分岐構造異性体など質量分析には難しい複雑な構造を含む生体分子である。これまで質量の同じ糖鎖でありながら MS/MS フラグメンテーションを利用して結合位置異性体や分岐構造異性体の識別・構造解析も行われていた^{1)~3)}。MS/MS フラグメンテーションではこの結合位置によりその化学的結合安定性が異なることからプロダクトイオンの強度などを利用して識別する試みも行われている^{4)~6)}。また、糖鎖はその構造が複雑なため MS/MS フラグメントスペクトルが非常に複雑となるが、既知の糖鎖構造のスペクトルパターンをあらかじめデータベースに取り込み、パターンマッチングを行うことで構造同定を行う試みもある^{7)~10)}。ここで重要な点は詳細な糖鎖構造のどの部分がフラグメントスペクトルの差に現れているのか？ という原理的な問題はあまり進んでいないという点である。これも糖鎖構造の複雑さに起因していると思われるが、われわれは複雑な糖鎖の中のある構造の影響を抽出するために、構造異性体同士をうまく比べながら糖鎖構造の影響を MS/MS フラグメントスペクトルとして抽出し、糖鎖の MS/MS フラグメンテーションの一般則であったり、原理的な現象を解析し

てきた。ここでは、糖鎖のアセチルアミノ基 (N-アセチル基) に注目した研究を紹介する^{11)~17)}。

2. 本 論

N-アセチル基を持つ糖鎖 N-Acetyl hexosamine (HexNAc) は、例えば N-アセチルグルコサミン (GlcNAc) などのように糖タンパク質糖鎖やラクトオリゴ糖にも広く含まれる糖残基である。糖鎖に含まれる N-アセチル基が MS/MS フラグメンテーションにどのような影響を及ぼすのかを明らかにするには、例えば構造が同じで GlcNAc と Glc だけが異なる 2 つの糖鎖を選び、MS/MS フラグメントスペクトルを測定し、両者を比較することで N-アセチル基の影響が明らかになるであろう。われわれは血液型糖鎖抗原であるルイス^x糖鎖 (Le^x) とその結合位置異性体ルイス^a糖鎖 (Le^a) 3 糖を比較して研究を行い、GlcNAc の 3 位グリコシド結合は Glc 残基のフラグメンテーションと大きく異なることを明らかにした^{11), 12)}。また、還元末端に GlcNAc が存在する場合 Glc と比べて環開裂 (ring-cleavage) が極めて進みやすいことを明らかにした。

このように糖鎖のフラグメンテーションに対して N-アセチル基、GlcNAc 残基が大きく影響することがわかる。さらに窒素原子 (N) を含んでいる糖鎖の中の官能基に注目し、アミノ基 (–NH₂)、N-アセチル基 (–NHCOCH₃) を比較した。MS/MS フラグメンテーションはさまざまな要因から影響を受けるので、アミノ基、N-アセチル基だけの官能基の影響を抽出することは難しい。そこで糖鎖の構造のうち 1 か所だけ官能基が異なる糖鎖を調製し、MS/MS フラグメンテーションにおける官能基の影響を見ることにした¹³⁾。

2.1 環状モデル糖鎖におけるフラグメンテーション

シクロデキストリンは α -D-glucopyranose が 1→4 結合した環状糖鎖で還元末端も持たないため構造は非常に単純である。このシクロデキストリンの糖 1 残基のうち、1 つの水酸基 (–OH) をアミノ基 (–NH₂)、N-アセチル基 (–NAc) に

それぞれ変換した (図1). MS測定の際, イオン化やMS/MSフラグメンテーションにどのように影響がでるのか? を直接解析することにした¹³⁾.

2.2 イオン化の違い

アミノ基を持つシクロデキストリン ($\text{NH}_2\text{-CyD}$) は, 通

図1. β シクロデキストリン (CyD) の官能基変換.

常のシクロデキストリン (CyD) と比べてプロトン付加分子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ としてイオン化されやすい. N -アセチル基の場合, 特にプロトン付加分子の生成が有利ではなく, ほぼ水酸基のままの通常 CyD と同じ傾向を示し, ナトリウム付加分子 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ としてイオン化した.

2.3 奇妙な同位体様ピーク

2.3.1 $\text{NH}_2\text{-CyD}$ の MS/MS フラグメンテーション

アミノ基を含む $\text{NH}_2\text{-CyD}$ の MALDI-MS 測定を行うとプロトン付加分子とナトリウム付加分子のいずれもが観測されることがわかり, それぞれの分子から MS/MS プロダクトイオンスペクトルを測定した. 全体のフラグメントスペクトルでは, どちらのイオン種から, 糖残基ごとに脱離して生成する一連のプロダクトイオンが観測された (図2).

アミノ基を含む $\text{NH}_2\text{-CyD}$ の分子量はアミノ基の部分だけ 1 Da 小さく, アミノ糖残基だけが他の糖残基より 1 Da

図2. $\text{NH}_2\text{-CyD}$ の MS/MS プロダクトイオンスペクトル (a) とプロトン付加分子 $[\text{M}+\text{H}]^+$ をプリカーサーイオンとした各プロダクトイオンの同位体ピークパターンの拡大 (b), およびナトリウム付加分子 $[\text{M}+\text{Na}]^+$ をプリカーサーイオンとした各プロダクトイオンの同位体ピークパターンの拡大 (c) (文献13).

小さい．興味深いことにNH₂-CyDのプロダクトイオンでは非常に奇妙な同位体ピークパターンを示した¹³⁾(図2)．

プロトン付加分子 [M+H]⁺からのMS/MSスペクトル(図2-a)では、プロダクトイオンの同位体ピークのパターンは通常のパターン(ここではほぼ¹²C/¹³Cの割合で示される同位体分布)を示し、CyD(-OH基)のNa⁺付加分子からのMS/MSスペクトルで示されるプロダクトイオンの同位体ピークパターンとはほぼ同じであった．一方、NH₂-CyDのナトリウム付加分子 [M+Na]⁺からのMS/MSスペクトル(図2-b)ではプロダクトイオンの同位体様ピークパターンが非常に奇妙なパターンであった．通常糖鎖分子では1,000 Da付近までの分子であれば、モノアイソトピックイオンが最も強度が高く、2番目(+1 Da)、3番目(+2 Da)のピークは強度が弱い．ところが、NH₂-CyDのNa⁺付加分子からのMS/MSスペクトル(図2-b)では、プロダクトイオンが小さくなるに従い、2番目の同位体ピーク(+1 Da)の強度が徐々に高くなり、2糖では2番目の同位体ピークの強度が最も高く観測されるようになった．これはどういうことなのか？

実はNH₂-CyD中のアミノ糖(HexNH₂)はグルコース(Glc)と1 Daの差(NH₂-とHO-との差)があり、プロダクトイオンにはアミノ糖を含むピークと含まないピークの2種類が重なり合っていることがわかる．精密質量を測定すれば分離することも可能だがFT-MS測定以外の質量分析では2種類のピークを分離することは難しい．糖残基1残基脱離して生成するイオン *m/z* 995を考えると、(C₆H₁₀O₅)₅ (C₆H₁₁O₄N) (*m/z* 995) と (C₆H₁₀O₅)₆ (*m/z* 996) の2種類のプロダクトイオンが生成する可能性がある．2~5糖残基が脱離する場合についても表1にまとめた．NH₂-CyDから糖残基がランダムに脱離すると考えると、表1のようになる．NH₂-Hexが含まれるフラグメントイオンはすべてGlcで生成するイオンに比べて1 Da小さいフラグメントである．フラグメントが6糖、5糖、4糖となるにつれてGlcだけで生成するフラグメントの生成確率は徐々に減少する．3糖になるとフラグメントの生成確率は1 Da小さいGlc₂HexNH₂のほうがGlc₃よりも高くなる．2糖ではその差がさらに大きくなり、Glc₂HexNH₂のほうが2倍以上高くなる．実験データでも表1に同位体様ピークパターンの逆転を見るこ

表1. NH₂-bCyDのプロダクトイオンの構成比

Product ion	Chemical species ratio
Hexose	Glc ₆ Glc ₅ HexNH ₂ 1:6
Pentose	Glc ₅ Glc ₄ HexNH ₂ 2:5
Tetraose	Glc ₄ Glc ₃ HexNH ₂ 3:4
Triose	Glc ₃ Glc ₂ HexNH ₂ 4:3
Biose	Glc ₂ GlcHexNH ₂ 5:1

Glc: (C₆H₁₀O₅), HexNH₂: (C₆H₁₁O₄N)

とができる．

2.4 アミノ基NH₂-へのプロトン付加とナトリウム付加への影響¹³⁾

アミノ基を含むNH₂-CyDではプロダクトイオンの同位体様パターンが前駆体イオンの違いで大きく異なっていた．プロトン付加分子から生成されたプロダクトイオンには常にアミノ基が含まれる化学種が主に観測されており、プロトンがアミノ基に局在しやすいことがわかる．一方ナトリウム付加分子から生成するプロダクトイオンは、必ずしもアミノ基を含む化学種を含んでおらず、ランダムにプロダクトイオンが生成している．これはNa⁺がアミノ基へ局在しているわけではないことを示しており、プロトンと大きく異なる点である．すなわちNa⁺はNH₂-CyDにおいて、ランダムに配位することがわかった¹³⁾．

2.5 *N*-アセチル基(HexNAc残基)とNa⁺付加

N-アセチル基を含むNAc-CyDでは主にNa⁺付加分子が生成され、プロトン付加分子はほとんど観測されなかった．Na⁺付加分子 [M+Na]⁺からMS/MSスペクトルを測定すると*N*-アセチル基を含むイオンとそうでないイオンは質量で明瞭に別れ、*N*-アセチル基を含む糖鎖を含むイオンのほうが強度高く観測された¹³⁾(図3)．

ランダムにフラグメントして生成する化学種で*N*-アセチル基を含むものとそうでないものの比を表2に示す．理論的には3糖以下のフラグメントイオンで*N*-アセチル基を含むフラグメントイオンは、グルコース3糖フラグメントイオンよりも強度が低く観測されるはずであるが、実際に観測しているピークと比較すると、いずれのフラグメントイオンでも*N*-アセチル基を含むフラグメントのほうが強度高く観測された．このことは、Na⁺が*N*-アセチル基に親和性を持ち、局在しやすい傾向を示している．

すなわち糖鎖においてNa⁺は通常の水酸基より*N*-アセチル基に強く配位し局在しやすい．CyDの水酸基を*N*-アセチル基に変換した構造は、*N*-アセチル基の影響が明瞭にわか

図3. NAc-CyDのMS/MSプロダクトイونسスペクトル．青矢印はHexNAc残基を含むプロダクトイオン．赤矢印はHexNAc残基を含まないプロダクトイオン(文献13)．

表2 NAc-bCyDのプロダクトイオンの構成比

Product ion	Chemical species ratio
Hexose	Glc ₆ Glc ₅ ,HexNAc 1:6
Pentose	Glc ₅ Glc ₄ ,HexNAc 2:5
Tetraose	Glc ₄ Glc ₃ ,HexNAc 3:4
Triose	Glc ₃ Glc ₂ ,HexNAc 4:3
Biose	Glc ₂ Glc,HexNAc 5:1

Glc: (C₆H₁₀O₅), HexNAc: (C₈H₁₃O₅N)

る構造であり、研究結果が非常に単純化された¹³⁾。CyDに含まれるHexNAc残基は正確には3-acetoamido-3-deoxy-D-altoseでありGlcNAcではないが、ラクトテトラオース中のGlcNAc残基にもNa⁺の強い配位を示唆するデータを得ている¹³⁾。すなわちNa⁺のN-アセチル基への配位は糖残基の種類、-OH基の配向によらず強く、N-アセチル基へ局在しやすい。

環状糖鎖自体は特殊な構造であるため、直鎖の糖鎖においても同じ傾向が見えるのかどうか？をラクトテトラオースとマルトテトラオースの比較で検証を行った^{13), 14)}。

ラクトテトラオースにはN-アセチル基が含まれており、マルトテトラオースには含まれていない。それぞれのMS/MSフラグメントスペクトルを比較し、B₂ ionとY₃ ionに注目した。それぞれの化合物において、B₂/Y₃ ionの強度比を見ると、N-アセチル基がB₂ ionに含まれるラクトテトラオースにおいてはB₂ ionの強度が高く、一方、マルトテトラオースにおいては、Y₃ ionのほうが強度が高く観測された¹³⁾。このことは先に述べたように一連のCyDの研究結果には一般性があり、より複雑な直鎖の糖鎖においてもNa⁺がN-アセチル基に局在化しやすいことがわかる。Na⁺の配位はN-アセチル基中のC=O基の大きな分極と関与していると考えられるので、構造的な環境要因、すなわちGlcNAc, GalNAc, ManNAcなどとのNa⁺の配位の差は、水酸基とN-アセチル基との差と比べると微小な差と思われる。

2.6 HexNAc残基の位置と2-ピリジルアミノ化の影響^{15)~17)}

質量は全く同じでありながらHexNAc残基の配列位置が異なる一連の糖鎖を合成し、HexNAc残基の影響を見た。構造はグルコピラノース同士がα1→4結合でつらなった直鎖マルトヘプタオースに対し1残基だけHexNAc残基に変換したオリゴ糖を調製した(表3)。前項で挙げた市販のNH₂-CyDを出発原料に、無水酢酸で処理しN-アセチル基に変換、その後酸加水分解により環状糖鎖をランダムに開環させることでHexNAcがいろいろな位置に入った一連の直鎖糖鎖を調製した¹⁵⁾。HexNAcの位置の異なる6つの直鎖糖鎖をHPLCでそのまま分離することは困難であったので還元末端に2-アミノピリジン蛍光基で誘導体化(PA化)した。蛍光基による高感度検出が可能になること、質量分

表3. Structures of PA-maltohexaose analogs

析でもアミノ基にプロトン付加によりイオン化がしやすい利点がある^{18)~20)}。PA化された化合物1~6はHPLCにより精製単離した。それぞれの化合物の構造同定をMALDI-MS測定にて行くと、分子関連イオンとしてプロトン付加分子[M+H]⁺とNa⁺付加分子[M+Na]⁺が観測でき、その質量およびMS/MSプロダクトイオンスペクトルの解析から表3に示す構造を同定することが可能であった¹⁵⁾。

糖鎖の還元末端にPA化を行っているため、糖鎖配列の解析にはプロトン付加分子(m/z 1110, [M+H]⁺)からのMS/MSフラグメントスペクトルが有用であった(図4)。すなわち主に観測されるプロダクトイオンを追跡することで、糖鎖の配列が非還元末端から読むことができる。化合物1ではm/z 907 (Δ203)のプロダクトイオンから非還元末端に「HexNAc」があることがわかり、還元末端にはPA基が修飾されているのでPA以外の糖鎖だけが単独で脱離する可能性はない。化合物2ではm/z 948 (Δ162), 745 (Δ203)にプロダクトイオンが観測され、非還元末端には「Glc-HexNAc-」があることがわかる。化合物3ではm/z 948 (Δ162), 786 (Δ162), 583 (Δ203)のプロダクトイオンが観測され、非還元末端から「Glc-Glc-HexNAc-」の配列があることがわかる。化合物4ではm/z 948 (Δ162), 786 (Δ162), 624 (Δ162), 421 (Δ203)のプロダクトイオンが観測され、非還元末端に「Glc-Glc-Glc-HexNAc-」の配列があることがわかる。化合物5, 6についても同様で図4に示す。このようにプロトン付加分子からのMS/MSスペクトルの解析ではHexNAcの位置に左右されることなく、糖鎖の配列を非還元末端から読むことが可能である。このことは、プロトンが還元末端PAに局在し、非還元末端側からグリコシド結合が切断されたプロダクトイオンが連続して生成していることを示している¹⁵⁾。

一方、Na⁺付加分子からのMS/MSフラグメントスペクトルを測定するとプロトン付加分子からのスペクトルとは対

図4. 直鎖糖鎖1~6のプロトン付加分子からのMS/MSフラグメントスペクトル (文献15).

照的に、非常に複雑なスペクトルとなった¹⁶⁾(図5). 化合物1~6の化合物のスペクトルを見ると、HexNAc残基を含むイオンが観測されており、1~4までの化合物ではHexNAc

残基を含む非還元末端側のプロダクトイオン (青■) が観測されており、4~6までの化合物はHexNAc残基を含む還元末端側のプロダクトイオン (赤●) が確実に観測されて

図5. 直鎖糖鎖1~6のNa⁺付加分子からのMS/MSフラグメントスペクトル(文献16).

- 赤円は還元末端側のイオンで, HexNAcを含むイオン.
- 青四角は非還元末端側のイオンで, HexNAcを含むイオン.
- ▼赤逆三角は還元末端側のイオンで, HexNAcを含まないイオン.
- ▲青三角は非還元末端側のイオンで, HexNAcを含まないイオン.

いる. ここではまず, HexNAc残基が還元末端側にある化合物5の場合を考える. Na⁺がHexNAc残基に局在するというイオン生成の規則だけで説明できる. 還元末端側のイオン(赤●)だけがMS/MSスペクトルで観測されている. ここではPA基も還元末端にあるので, Na⁺がPA基に局在している可能性を否定できない. われわれはマルトオリゴ糖でPA化修飾をした糖鎖としていない糖鎖とを比較し, N-アセチル基がない化合物でPA基だけの影響を見ることにした¹⁷⁾. その結果, Na⁺のPA基への配位は非常に弱く通常の糖残基と変わらない程度であり, Na⁺はPA基に局在しないことがわかった¹⁷⁾. このことから化合物5についてはN-アセチル基の影響で, 図5に示すMS/MSスペクトルが説明できる. HexNAcが還元末端にある化合物6についても還元末端側のイオン(赤●)が主に観測されてお

り, Na⁺のN-アセチル基への局在化でほぼ説明できる.

一方, 化合物1, 2, 6のMS/MSスペクトルではHexNAc残基を含まないイオン(赤▼, 青▲)も生成しており, Na⁺のHexNAc残基への強い配位はあるのだが, 単にそれだけの規則性だけでは簡単に説明することは難しい. では, 他の化合物についてのプロダクトイオン生成にはどんな要素が影響してMS/MSスペクトルが得られるのだろうか? 残念ながら現在でもすべてを説明できるフラグメンテーション・メカニズムは明らかになっていない. これまでの研究でNa⁺のN-アセチル基への配位が高いことはわかったので, 今後の研究に期待したい.

3. まとめ

糖鎖は生体分子の中でも複雑な構造を持つ分子であり,

図5. 直鎖糖鎖1~6のNa⁺付加分子からのMS/MSフラグメントスペクトル (文献16) (続き).

- 赤円は還元末端側のイオンで, HexNAcを含むイオン.
- 青四角は非還元末端側のイオンで, HexNAcを含むイオン.
- ▼赤逆三角は還元末端側のイオンで, HexNAcを含まないイオン.
- ▲青三角は非還元末端側のイオンで, HexNAcを含まないイオン.

生命現象の中でもその機能がまだまだ明らかにされていないことが多い。糖タンパク質糖鎖においては、タンパク質のどのアミノ酸にどのような糖鎖がどれくらい修飾しているのか? はマイクロヘテロジェネイティーと呼ばれ、膨大な多様性(ヘテロジェネイティー)が存在している。リン酸化のスイッチのon-offよりも飛躍的に複雑なバリエーションを持つ翻訳後修飾である糖鎖修飾は、まだまだ定量的に分析できる研究段階ではない。糖鎖のヘテロジェネイティーが生物の多様性を担っているのかどうか? はわからないが、「質量分析」で生体中の糖鎖発現の全容を明らかにし、生命現象との直接因果関係を明らかにできれば、糖鎖の生物学(グライコバイオロジー)も飛躍的に進むに違いない。「質量分析」による生命科学のブレークスルー

は「糖鎖構造解析・定量解析」の分野にまだまだ埋もれている。「糖鎖のMS/MSフラグメンテーション」という地味な研究が、将来の生命科学のブレークスルーと結びつくことを期待している。

謝 辞 一連のPA化糖鎖1~6は大阪府立大学大学院理学系研究科・牧野泰士助教からいただいた。ここで感謝したい。

文 献

- 1) R. A. Laine, "Glycoconjugates: Overview and Strategy," ed. by J. A. McCloskey, Methods in Enzymology, Vol. 193, Academic Press (1990), pp. 539-553.

- 2) W. J. Richter, D. R. Muller, and B. Domon, "Tandem Mass Spectrometry in Structural Characterization of Oligosaccharide Residues in Glycoconjugates," ed. by J. A. McCloskey, *Methods in Enzymology*, Vol. 193, Academic Press (1990), pp. 607–623.
- 3) D. J. Harvey, *Mass Spectrom. Rev.*, **18**, 349 (1999).
- 4) T. Yamagaki, Y. Ishizuka, S. Kawabata, and H. Nakanishi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 1887 (1996).
- 5) S. Daikoku, A. Kurimoto, S. Mutsuga, T. Ako, T. Kanemitsu, Y. Shioiri, A. Ohtake, R. Kato, C. Saotome, I. Ohtsuka, S. Koroghi, S. K. Sarkar, A. Tobe, S. Adachi, K. Suzuki, and O. Kanie, *Carbohydr. Res.*, **344**, 384 (2009).
- 6) S. Daikoku, T. Ako, R. Kato, I. Ohtsuka, and O. Kanie, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **18**, 1873 (2007).
- 7) A. Kameyama, N. Kikuchi, S. Nakaya, H. Ito, T. Sato, T. Shikanai, Y. Takahashi, K. Takahashi, and H. Narimatsu, *Anal. Chem.*, **77**, 4719 (2005).
- 8) A. Kameyama, S. Nakaya, H. Ito, N. Kikuchi, T. Angata, M. Nakamura, H. K. Ishida, and H. Narimatsu, *J. Proteome Res.*, **5**, 808 (2006).
- 9) Y. Takegawa, S. Ito, S. Yoshioka, K. Deguchi, H. Nakagawa, K. Monde, and S. Nishimura, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 385 (2004).
- 10) Y. Takegawa, K. Deguchi, S. Ito, S. Yoshioka, A. Sano, K. Yoshinari, K. Kobayashi, H. Nakagawa, K. Monde, and S. Nishimura, *Anal. Chem.*, **76**, 7294 (2004).
- 11) T. Yamagaki and H. Nakanishi, *J. Mass Spectrom.*, **35**, 1300 (2000).
- 12) 山垣 亮, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **51**, 374 (2003).
- 13) T. Yamagaki, K. Sugahara, and T. Watanabe, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **25**, 95 (2014).
- 14) T. Yamagaki and H. Nakanishi, *Anal. Sci.*, **17**, 83 (2001).
- 15) M. Nakamura, Y. Makino, C. Takagi, T. Yamagaki, and M. Sato, *Glycoconj. J.*, **34**, 563 (2017).
- 16) T. Yamagaki and Y. Makino, *Mass Spectrom. (Tokyo)*, **6**, S0073 (2017).
- 17) 山垣亮, 牧野泰士, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **65**, 297 (2017).
- 18) S. Suzuki, K. Takehi, and S. Honda, *Anal. Chem.*, **68**, 2073 (1996).
- 19) M. Okamoto, K. Takahashi, T. Doi, and Y. Takimoto, *Anal. Chem.*, **69**, 2919 (1997).
- 20) M. Okamoto, K. Takahashi, and T. Doi, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **9**, 641 (1995).