薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
106 (5) 398—405 (1986)

ペプチド類の逆相高速液体クロマトグラフィー

中澤 宏,* 長瀬正之
住友化学工業株式会社 宝塚総合研究所

Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography of Peptides

HIROSHI NAKAZAWA* and MASAYUKI NAGASE
Takarazuka Research Center, Sumitomo Chemical Co., Ltd., 2-1, 4-Chome Takatsukasa, Takarazuka, Hyogo, 665, Japan

(Received July 8, 1985)

A reversed-phase high performance liquid chromatographic method for the determination of some peptides including growth-hormone releasing factor was studied.

For the column packing, the endcapping of residual silanol groups of silica gel was important to obtain symmetric elution peak with high resolution, especially for basic peptides. Other parameters were optimized as follows: particle size, 5 μm; pore size, 100Å; stationary phase, C_{18}.

For the mobile phase, a mixture of acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid containing 0.1 M sodium chloride was selected. Species and concentration of the salt and the counter ion, and pH of the mobile phase had a great influence on selectivities among peptides. The addition of the salt improved column efficiency and peak symmetry, and was effective to establish the analytical conditions in isocratic elution.

Under these chromatographic conditions, coefficient of variations in repetitive injections of each peptide were below 0.65%.

Keywords——HPLC; peptide; eluting condition; Silicagel C_{18}; residual silanol; end capping; GRF; insulin; counter ion; salt effect

ヒト成長ホルモン放出因子 (GRF) は 1982 年に Guillmin らによりヒト膵臓腫瘍より抽出され，構造決定及び化学合成が行われたN末端がチロシン，C 末端がロイシンのアミド構造を持つアミノ酸 44 個からなる分子量 5040 のポリペプチドである.[1] この GRF はヒト成長ホルモン放出活性を持ち，ヒト脳下垂体前葉の成長ホルモン産生能の検査薬あるいは小人症の治療薬として期待されている生理活性ペプチドである．この GRF をはじめ，数多くのペプチド類の化学的な合成が液相法又は固相法により試みられているが,[1,2] いずれの場合もアミノ酸を 1 個ずつ縮合させていくため，その合成工程は長く，不純物が混入する可能性が高い．したがって，GRF を含め化学合成されたペプチドの品質を厳密に調べる必要があり，そのための方法を確立することは重要である．

タンパク質，ペプチド類の純度分析法は一般に試料が限られていることから，微量分析が要求される．従来，薄層クロマトグラフィー，ゲル電気泳動，等電点電気泳動，アミノ酸組成分析などの手段が用いられていたが，微量化は達成されたもののペプチド類のわずかな構造変化を検出することは困難であった．

一方，近年，クロマトグラフィーの分野で急速に発展してきた方法として高速液体クロマトグラフィー (HPLC) がある．この HPLC はペプチドにおける類縁体相互の分離能が従来法に比べて極めて高く，極微量の成分も取り扱うことができ，簡便迅速でしかも定量化も容易なことからタンパク質・ペプチドの純度分析をはじめとするこの分野の研究に急速に利用されるようになってきた．特にペプチド類のクロマトグラフィーには逆相 HPLC が最も広く用いられているが,[3] 従来はピークを溶出させること及び類縁ペプチドの分離に主眼が置かれ，定量するための条件について議論した例は少ない.[4] 我々も化学合成されたペプチド類の純度を明らかにする上で逆相 HPLC が最も適した手段と考え，特に定量を行う際に必要な条件 (分離能，理論段数，ピークの対称性) を中心に，GRF を含む分子量 1600 から 5800 までの数種のペプチドについて溶離条件の最適化について検討したので報告する．

実　験　の　部

1. 試薬　GRF (分子量 5040, アミノ酸残基数 44, C 末端アミド, 等電点[5] 11.3, 以下同じ順序で示す), GRF (1—29) (3358, 29, アミド, 11.0) は住友製薬から提供を受けた. Neurotensin (1673, 13, カルボン酸, 10.4) 及び calcitonin (3418, 32, アミド, 9.8) は蛋白質研究奨励会, insulin (bovine; 5734, 51, カルボン酸, 5.4) は Sigma 社より, それぞれ購入した.

アセトニトリル (MeCN) は HPLC 用 (関東化学), トリフルオロ酢酸 (TFA) はペプチド合成用 (蛋白質研究奨励会), 水はイオン交換後蒸留したものを用い, その他の試薬はすべて特級品をいずれもそのまま使用した. また, HPLC 用カラムは目的に応じ, 市販のものを購入して用いた.

2. 装置　HPLC 用ポンプは島津 LC-5A 型又はウォーターズ 6000A 型ポンプにそれぞれ GRE-3A 又は 660 型グラジエントプログラマーを装着して用いた. インジェクターはレオダイン 7125 型又はウォーターズ U6K 型, 検出器は島津 SPD-2A 型をそれぞれ用いた.

結　果　と　考　察

1. カラム充てん剤の選択

シリカゲル系の充てん剤を用いた逆相系のカラムを用いてタンパク質・ペプチド類のクロマトグラフィーを行

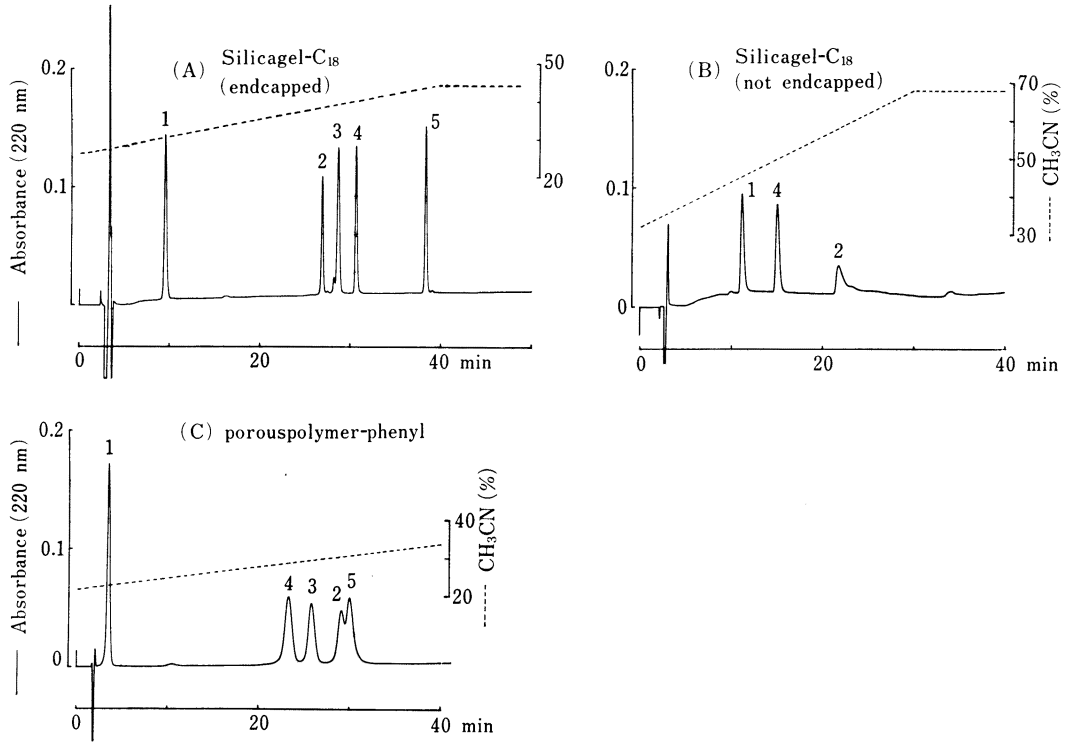

Fig. 1. Comparison of Chromatograms of Peptides on some Reversed-Phase Column Packings

(A) Column: YMC-Pack AM-303 (C_{18}, 5 μm, 4.6×250 mm); eluent: (a) 20% MeCN in 0.12% TFA, (b) 50% MeCN in 0.1% TFA.
Linear gradient of (b) from 20% to 80% in 40 min.
(B) Column: LiChrosorb RP-18 (C_{18}, 10 μm, 4×300 mm); eluent: (a) 20% MeCN in 0.12% TFA, (b) 80% MeCN in 0.1% TFA.
Linear gradient of (b) from 20% to 80% in 30 min.
(C) Column: TSKgel phenyl 5-PW RP (phenyl, 10 μm, 4.6×75 mm); eluent: (a) 20% MeCN in 0.12% TFA, (b) 50% MeCN in 0.1% TFA.
Linear gradient of (b) from 5% to 55% in 50 min; Sample: 1, neurotensin (M_r 1673, pI 10.4); 2, insulin (M_r 5734, pI 5.4); 3, GRF (M_r 5040, pI 11.3); 4, calcitonin (M_r 3418, pI 11.0); 5, GRF (1—29) (M_r 3358, pI 11.0). Other conditions were as follows; flow rate: 1 ml/min, detection: UV 220 nm; column temperature: ambient.

TABLE I. Comparison of Reversed-Phase Column Packings Commercially Available

No.	Column packing	Stationary phase	Residual silanol endcapping	Particle size (μm)	Pore size (A)	Column size (mm)	(N')
1.	LiChrosorb RP-18	C_{18}	No	10	60	4.0×300	—
2.	ERC-ODS 1161	C_{18}	No	3	120	6.0×100	800
3.	Polygosil 60-10C_{18}	C_{18}	Yes	10	60	4.0×300	—
4.	μBondapak C_{18}	C_{18}	Yes	10	125	4.0×300	11600
5.	Ultron C_{18}	C_{18}	Yes	10	150	4.6×250	7200
6.	Radialpak Nova ODS	C_{18}	Yes	5	125	8.0×100	8700
7.	Ultron N-C_{18}	C_{18}	Yes	5	100	4.6×150	9200
8.	YMC-Pack A-312 ODS	C_{18}	Yes	5	100	6.0×150	20000
9.	Ultrasphere ODS	C_{18}	Yes	5	80	4.6×250	4000
10.	Develosil ODS	C_{18}	Yes	5	100	4.6×250	19100
11.	Nucleosil 5C_{18}	C_{18}	Yes	5	100	4.6×250	19000
12.	YMC-Pack AM-303 ODS	C_{18}	Yes	5	100	4.6×250	24200
13.	TSKgel ODS 120T	C_{18}	Yes	5	120	4.6×250	24600
14.	YMC-Pack AP-303 ODS	C_{18}	Yes	5	200	4.6×250	21800
15.	YMC-Pack AP-303 ODS	C_{18}	Yes	5	300	4.6×250	17000
16.	HI-PORE RP-318	C_{18}	Yes	5	300	4.6×250	7500
17.	Vydac 218TP54.6 C_{18}	C_{18}	Yes	5	330	4.6×250	16200
18.	YMC-Pack A-203	C_8	Yes	5	100	4.6×250	10800
19.	Ultraspore RPSC	C_8	Yes	5	300	4.6× 75	2800
20.	YMC-Pack A-403	CN	Yes	5	100	4.6×250	9300
21.	YMC-Pack A-503	Phenyl	Yes	5	100	4.6×250	4800
22.	TSKgel Phenyl-5PW RP	Phenyl		10	1000	4.6× 75	3500

Column support of No. 22 is the porous polymer gel (polyacrylate) and other supports are the silica gel.
HPLC conditions were as follows: eluent; (a) 20% MeCN in 0.12% TFA (b) 50% MeCN in 0.1% TFA; Linear gradient of (b) from 25% to 75% in 50 min for No. 1—21, from 0% to 50% in 50 min for No. 22; other conditions were the same as in Fig. 7.
N' about GRF peak was calculated according to the following equation: $N'=16(t_R/W)^2$, where t_R is the retention time of GRF and W is the peak width of GRF.
Dash line indicates that no GRF peak was eluted.

う場合，これまでにも吸着の問題が議論されており，[6] 塩基性低分子においてもシリカゲル表面の残存シラノールによる吸着，テーリング現象が問題となっている．[7]

Fig. 1 (A)—(C) に GRF を含む5つのペプチドの代表的なクロマトグラムの例を示した．

残存シラノール処理を施したシリカゲル C_{18} 及びポーラスポリマー系の充てん剤では5成分とも対称形のきれいなピークを溶出するが，残存シラノール未処理カラムでは neurotensin, calcitonin はきれいなピークを溶出するものの，insulin はテーリングを起こし，GRF 及び GRF (1—29) は溶離液のアセトニトリル濃度を高くしても溶出されなかった．これは GRF 及び GRF (1—29) の等電点が計算値でそれぞれ 11.3 及び 11.0 と塩基性のかなり高いペプチドであることから，カラムに吸着されたものと考えられた．また，各ペプチドの溶離挙動は同じ逆相系のカラムであっても充てん剤の性質によって大きく異なり，等電点，分子量，疎水性などの性質以外に様々な要素が働いているものと考えられた．したがって，充てん剤の選択は重要であるが，その基準として多くの要素が考えられ，なかでも固定相，粒子径，細孔径，担体の材質などが重要な要素になる．さらにシリカゲル系充てん剤の場合には残存シラノール処理の有無が大きな問題となる．

そこで，試料に等電点の最も高い GRF を選び，グラジエント溶出法を用いて市販の逆相系の充てん剤についてそれらの各要素が GRF の溶離挙動に及ぼす影響について検討を行い，その結果を Table I にまとめた．

カラムの評価方法としてここで用いた N' はイソクラティック条件下での理論段数 N に対する式を用いて Table I に示すグラジエント条件下で測定したピークから得た値である．溶離条件がグラジエント法であるため，理論段数としては直接この N' 値は適用できないが，特定のサンプルを用いグラジエントを含む溶離条件を一定にすれば，少なくともそのサンプルに対するカラムの評価は可能であると考え，この N' をカラム評価の1つの

指標とした．ただし，ポーラスポリマー型充てん剤1種についてはグラジエント条件を少し変更した．

シリカゲル系充てん剤の場合，残存シラノール未処理のカラムでは GRF は溶出されないか，溶出されてもかなり幅広いピークとなった (Table I, No. 1, 2). 粒子径は 10 μm より 5 μm, 細孔径は 200—300Å より 100Å, 固定相は phenyl 基, CN 基より直鎖状炭化水素でよりアルキル鎖長の長い方がそれぞれ高い N' 値を示した．細孔径については分子量 5000 前後のペプチドであれば 100Å で十分分配平衡が行われていることを示し，200—300Å のものよりも表面積がより大きい 100Å の充てん剤の方が，試料との相互作用でより有利に働くものと考えられた (Table I, No. 10—17). また固定相も本検討の限りにおいてはより疎水性の高いアルキル鎖長の長い方が保持が強くなり，高い N' 値が得られるものと考えられた (Table I, No. 8, 10—14, 18—21).

一方，ポーラスポリマー系充てん剤の場合，対称形の良好なピークを示したが，N' 値はシリカゲル系の充てん剤には及ばなかった．

以上のことから，ペプチド類の逆相クロマトグラフィーにおける充てん剤としては，粒子径 5 μm, 細孔径 100Å のシリカゲル担体にオクタデシル基 (C_{18}) を化学結合させ，残存シラノール処理を施した充てん剤が最適と考えられた．

2. 移動相の検討

(1) pH の影響 保持比 (k') に及ぼす pH の影響をイソクラティック条件で保持時間がほぼ同じである GRF, calcitonin 及び insulin について，カラムに C_{18}, 溶離液にリン酸緩衝液-アセトニトリル系を用いて調べた結果を Fig. 2 に示した．

pH の変化によって k' は各ペプチドに特有の変化を示すが，なかでも GRF が最も大きな影響を受けており，pH 5 を越えると k' は急激に増大した．これは pH が高くなることにより，塩基性の高いペプチドである GRF の疎水性が増加したこと，及び固定相の残存シラノールが解離して SiO^- となり，正電荷を持つ GRF との相互作用が増加したことによるものと考えられた．したがって，GRF の安定した溶出には pH を 4 以下に設定することが望ましい．

pH の影響についてはこれまでにも Kroeff, Pietrzyk ら[8] によって検討されており，等電点付近の pH で k' は最小となり，これより低い pH 又は高い pH では k' は増加することが示されているが，これらは短いペプチ

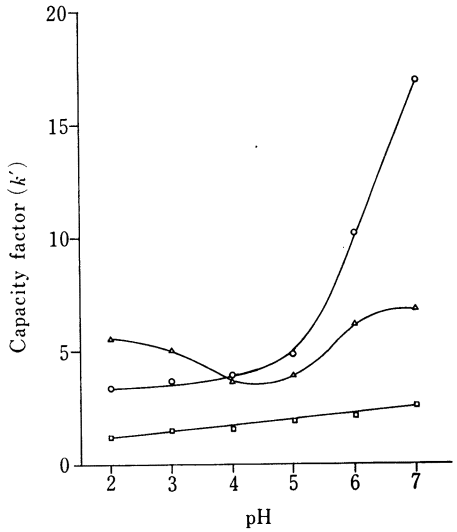

Fig. 2. Effect of pH on the Capacity Factors of Some Peptides Including GRF

Column: YMC-Pack AM-303 (C_{18}, 5 μm, 4.6×250 mm); eluent: 28.5% MeCN in 50 mM phosphate buffer; flow rate: 1 ml/min; detection: UV 220 nm; column temperature: ambient.
○—○, GRF; △—△, calcitonin; □—□, insulin.

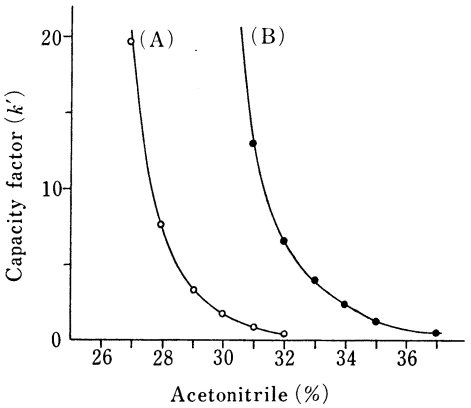

Fig. 3. Effect of Acetonitrile Concentration on the Capacity Factor of GRF

(A) Column: YMC-Pack AM-303 (C_{18}, 5 μm, 4.6×250 mm); eluent: MeCN in 0.1 M phosphate buffer (pH 2.0).
(B) Column: Nucleosil 5C_{18} (C_{18}, 5 μm, 4.6×250 mm); eluent: MeCN in 0.1% TFA containing 0.1 M NaCl (pH 1.8).
Other conditions were the same as in Fig. 2.

ドの場合であり，より大きなペプチドでは pH による k' の変化は必ずしも，このような挙動をとらないことが分かった．

(2) アセトニトリル量の影響 ペプチド類の溶出をコントロールするための有機溶媒として溶出力が高く，しかも粘性の低いアセトニトリルを選び，リン酸緩衝液又はトリフルオロ酢酸水溶液の溶媒系で，GRF の k' に及ぼすアセトニトリル量の影響を調べた結果を Fig. 3 に示す．

トリフルオロ酢酸系の方がカウンターイオンの効果でより大きく保持されているが，どちらの系もほぼ同じプロフィールを示している．ペプチド類の逆相クロマトグラフィーにおいては，わずかの有機溶媒の変化により，保持容量が大きく変化することが知られており，[8,9] GRF の場合もアセトニトリル量が 1% の変化で k' は 2 倍以上の変化を示した．したがって，溶離条件を設定する際にはアセトニトリル量の調節に注意が必要である．

(3) カウンターイオンの影響 パーフルオロカルボン酸類及びアルキルスルホン酸類をカウンターイオンに用いたときのペプチド類の溶離挙動を調べた結果を Fig. 4 (A), (B) に示した．

いずれの場合もカウンターイオンのアルキル基が大きくなるにつれてペプチド類の保持は増大したが，パーフ

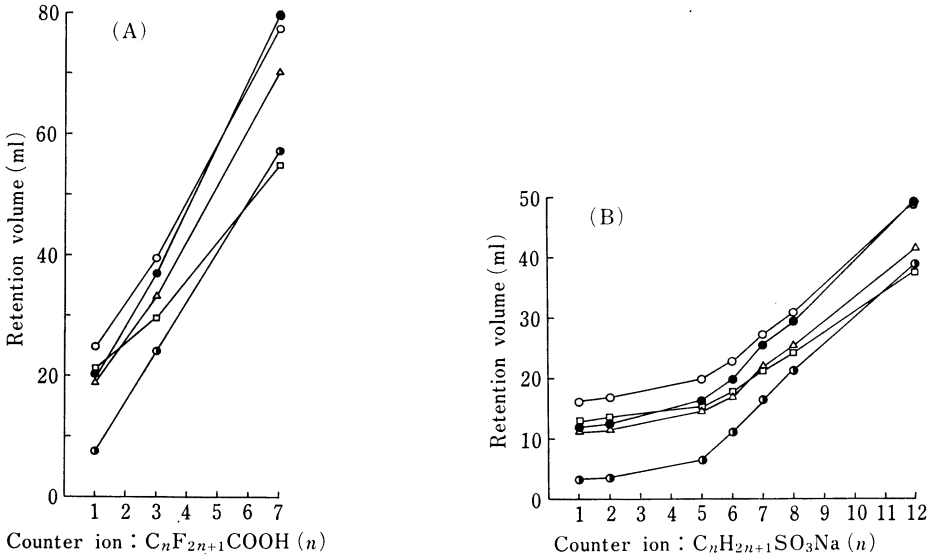

Fig. 4. Effect of Counter Ions on the Capacity Factors of Peptides

(A) Perfluorocarboxylic acids as counter ion, eluent: (a) 10 mM counter ion in water, (b) 10 mM counter ion in MeCN.
Linear gradient of (b) from 25% to 55% in 60 min.
(B) Alkyl sulfonates as counter ion, eluent: (a) 10 mM counter ion in 20 mM triethylamine-formate buffer (pH 3.5), (b) 65% MeCN in water.
Linear gradient of (b) from 40% to 90% in 50 min. Other conditions were the same as in Fig. 2.
○—○, GRF (1—29); □—□, calcitonin; ●—●, GRF; △—△, insulin; ◑—◑, neurotensin.

TABLE II. Effect of Counter Ions on the Theoretical Plates of GRF

Mobile phase		k'	Theoretical plates (N)
Counter ion	Acetonitrile (%)		
0.1% TFA	31	4.1	1100
0.1% HFBA	38	3.5	1200
0.01 M Ethanesulfonic acid (ESA)	28	3.8	150
0.01 M HSA	40	3.1	1090
0.08% Perchloric acid ($HClO_4$)	34	3.1	800

HPLC conditions were the same as in Fig. 7 except for the eluent.
The theoretical plates (N) was calculated by the same equation as described in Table I.

ルオロカルボン酸類の方がより大きな効果を示した．また，アルキルスルホン酸類の場合はアルキル鎖長 C_6 以上で保持の変化がより大きくなることが認められた．

一方，各ペプチドの溶出順は，パーフルオロカルボン酸とアルキルスルホン酸とでは，それぞれのアルキル鎖 C_1 では同じであり，アルキル鎖長が長くなるとペプチド間の相対的な溶出順は変化していくが，パーフルオロカルボン酸では C_7，アルキルスルホン酸では C_{12} で，再び同じ溶出順を示した．このことはいずれの種類のカウンターイオンを用いてもペプチドの溶出順に及ぼすカウンターイオンのアルキル鎖長の効果は同じであると考えられ，大変興味深い．

これらのカウンターイオンを含め，代表的なものについて GRF の理論段数を測定したところ，トリフルオロ酢酸，ヘプタフルオロ酪酸 (HFBA)，又は 1-ヘプタンスルホン酸 (HSA) が適当と考えられたが，定量条件の設定に際しては操作性のよいトリフルオロ酢酸をカウンターイオンとして選定した (Table II).

(4) 塩の影響 ペプチド類の溶離挙動に及ぼす塩の添加効果を調べた結果を Fig. 5 及び Table III に示した．

添加する塩が塩化ナトリウムなどの塩化物イオン系では，塩濃度をゼロから 0.01 M, 0.05 M へと増加させると，3 種のペプチドはいずれも k' が増大したのに比べ，硫酸ナトリウムなどの硫酸イオン系では，0.01 M で k' が増加したあと，0.05 M で k' は減少し，insulin, calcitonin では塩が無添加の場合より k' が小さくなった．塩の添加はペプチド類の溶出を早めることが多いとされている[9] が，必ずしも k' が減少するわけではなく，用いる塩の種類と濃度によって挙動が異なることは大変興味深い．

TABLE III. Effect of Salts on the Theoretical Plates and Asymmetry Factor of GRF

Salt	k'	Theoretical plates (N)	Asymmetry factor (A_s)
No salt	1.3	1500	0.74
0.05 M NaCl	4.6	2200	0.95
0.05 M KCl	3.9	2200	1.04
0.05 M $MgCl_2$	5.8	2160	0.94
0.05 M $CaCl_2$	5.8	2050	1.05
0.05 M Na_2SO_4	4.3	2070	1.74
0.05 M K_2SO_4	4.6	2010	1.80

HPLC conditons were the same as in Fig. 5.
The theoretical plates (N) was calculated by the same equation as described in Table I.
Asymmetry factor (A_s) was calculated according to the following equation: $A_s = B/A$, where A or B is the distance between left or right slope and bisector measured at 10% of height.

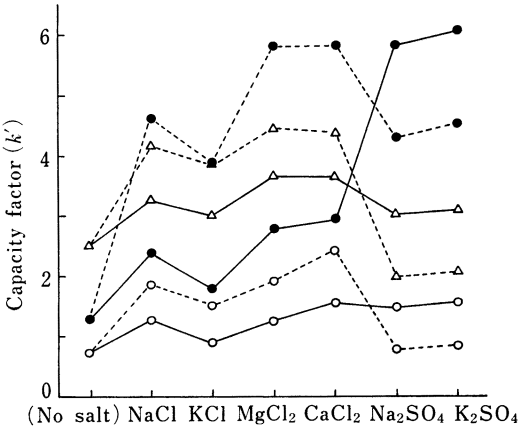

Fig. 5. Effect of Salts and their Concentration on the Capacity Factors of Some Peptides Including GRF

Eluent: 30% MeCN in 0.1% TFA containing various salt. Other conditions were the same as in Fig. 2.
△, calcitonin; ●, GRF; ○, insulin.
Salt concentration, — 0.01 M; --- 0.05 M.

また，Table III には GRF のカラム効率に及ぼす塩の添加効果をまとめたが，いずれの場合も理論段数及びピークの対称性が改善されることが認められた．しかし，理論段数の改善効果はどの塩もほぼ同じであったのに対し，ピークの対称性では塩化物イオン系の方が明らかに良好な結果を示した．他のペプチド類についても同様な結果であった．これらの塩のうち，添加する塩として塩化ナトリウムを選び，その濃度についての効果を調べたところ，0.05—0.2 M の範囲で保持比は若干変化するものの，理論段数，ピークの対称性とも明らかな変化は認められなかったので，塩濃度は 0.1 M に設定した．

このように添加する塩の種類と濃度を変えることにより，ペプチド類の保持の選択性をコントロールすることが可能であり，また分離能や定量性の向上にも寄与するので，これらの条件を適切に設定することは重要である．

3. カラム温度

カラム温度の溶離挙動に及ぼす影響について，GRF を試料として調べた結果を Fig. 6 に示した．

カラム温度 20—70°C の範囲で，温度が高くなるにつれて保持は徐々に減少したが，理論段数は 40—50°C 付近で極大値を示した．しかし，室温付近と比べてその差は小さく，操作性及びカラムの寿命を考えて，室温が望ましいものと考えられた．

4. 検出波長

紫外線検出器を用いたときの GRF の各波長での検出感度比は 87 : 44 : 22 : 4 : 1 : 3 (それぞれ 210, 220, 230, 240, 254 及び 280 nm) であり，ペプチド類の検出には 210—230 nm が有利と考えられた．この波長領域での S/N 比はほぼ同じであるため，ここでは 220 nm を選択した．

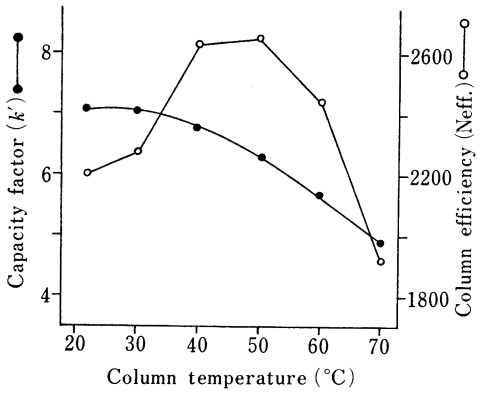

Fig. 6. Effect of Column Temperature on the Capacity Factor and Column Efficiency of GRF

Column: Nucleosil $5C_{18}$ (C_{18}, 5 μm, 4.6×250 mm), eluent: 31% MeCN in 0.1% TFA containing 0.1 M NaCl. Other conditions were the same as in Fig. 2.

TABLE IV. Reproducibilities of Repetitive Injections of Five Peptides

Sample	Coefficient of variation (%) (n=7)
Neurotensin	0.63
GRF (1—29)	0.30
Insulin	0.27
Calcitonin	0.65
GRF	0.62

HPLC conditions were the same as in Fig. 7 except for the acetonitrile concentrations for neurotensin and GRF (1—29), which were 25% and 33%, respectively.

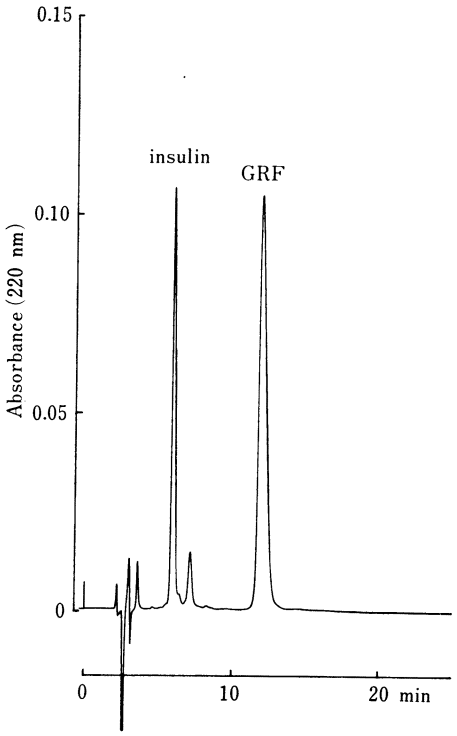

Fig. 7. Chromatogram of GRF and Insulin on the Isocratic Eluting Condition

Eluent: 31% MeCN in 0.1% TFA containing 0.1 M NaCl. Other conditions were the same as in Fig. 2.

5. 再現性

GRF 及び検討したペプチド類のイソクラティック条件で，ピーク面積を測定したときの繰り返し注入による再現性は，変動係数で 0.65% 以下と良好であった (Table IV)．また，これら 5 成分の検量線もともに 0.1—5.0 μg まで原点を通る直線を示し，220 nm での検出限界は S/N=2 で 1 ng 前後であった．GRF のような塩基性の強いペプチド，あるいは insulin のようなテーリングを起こし易いペプチドなどの高分子のペプチドであっても，完全にシラノール処理を施した充てん剤を用い，適切な溶離条件を設定すれば，Fig. 7 に示したように，対称性に優れ，理論段数も十分にあり，かつ再現性のよいピークを得ることができた．

引用文献及び注

1) R. Guillemin, P. Brazeau, P. Böhlen, F. Esch, N. Ling, W. B. Wehrenberg, *Science*, **218**, 585 (1982).
2) N. Fujii, M. Shimokura, M. Nomizu, H. Yajima, F. Shono, M. Tsuda, A. Yoshitake, *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 520 (1984).
3) 笹川　立，千谷晃一，蛋白質核酸酵素，**27**, 1056 (1982); 木村定雄，化学増刊，**102**, 127 (1984).
4) 太田美矢子，徳永裕司，木村俊夫，佐藤　浩，川村次良，薬誌，**102**, 1092 (1982).
5) 真鍋　敬，化学の領域，**36**, 470 (1982).
6) K. Hayakawa, E. Okada, H. Higashikuze, T. Kawamoto, *Chem. Pharm. Bull.*, **31**, 3732 (1983).
7) A. Nakum, C. Horváth, *J. Chromatogr.*, **203**, 53 (1981).
8) E. P. Kroeff, D. J. Pietrzyk, *Anal. Chem.*, **50**, 1353 (1978).
9) M. J. O'Hare, E. C. Nice, *J. Chromatogr.*, **171**, 209 (1979); M. T. W. Hearn, B. Grego, *ibid.*, **203**, 349 (1981); S. Terabe, H. Nishi, T. Ando, *ibid.*, **212**, 295 (1981).