

## 제작된 모세관 전기영동 시스템의 유기물 분석에의 응용

李公珠<sup>†</sup> · 許貴鏞

한국표준연구소 유기분석연구실

(1990. 11. 16 접수)

### Application of Home-made Capillary Zone Electrophoresis System to the Separation of Organic Molecules

Kong-Joo Lee<sup>†</sup> and Gwi Suk Heo

Organic Analytical Laboratory, Korea Standards Research Institute, Taejeon 302-340, Korea

(Received November 16, 1990)

**요 약.** 고도로 효율적인 분석방법인 모세관 전기영동 시스템을 최적의 감도를 갖는 상태의 기기로 국내에서 제작하였다. 50  $\mu\text{m}$  내경을 가진 모세관을 완충용액으로 채워준 후 모세관의 양끝에 20~35 kV의 전압을 걸어주는 이 분석방법은 20분 이내에 10 nI 이하의 소량의 시료를 이론단수가 20~50만 정도가 되도록 분리할 수 있는 매우 좋은 분리능을 가지고 있다. 모세관 전기영동법의 분리능과 분리도를 증가시키는데 영향을 주는 요소들을 알아보기 위하여 catecholamine과 adenine 유도체를 분석하였다.

**ABSTRACT.** Capillary zone electrophoresis (CZE) which is highly efficient separation technique has been domestically established having optimum detection sensitivity. By applying 20~35 kV of electric potential to the narrow (50  $\mu\text{m}$  i.d.) capillary tubing filled with running buffer, this technique can quickly (<20 min) separate the small quantities of sample with high separation efficiency (number of theoretical plates : 200,000~500,000). Factors affecting the separation efficiency and resolution in CZE were examined by analyzing adenine and catecholamine derivatives.

### 서 론

모세관을 이용한 전기영동법은 1979년 Mikkers 등<sup>1</sup>이 새로운 아이디어를 제공한 이래 Jorgenson 등<sup>2-4</sup>이 이를 이온성 용질을 고분리능으로 분석하는 테크닉으로 개발하였다. 수용액에서 (+) 전하나 (-) 저하를 띄고 있는 많은 분자들(유기물, 단백질, 펩타이드, DNA, RNA 등)은 외부에서 전장(electric field)를 걸어주면 각 분자이온들은 반대전하를 띤 전극으로 이동하게 된다. 이 때 이온들이 움직이는 속도는 전장의 세기에 직접 비례하여 이 비례상수를 electrophoretic mobility라 한다. 각 분자들의 electrophoretic mobility는 평균전하, 크기, 모양, 용매의 성질 등에 의해 정해진다. 이러한 원리를 이용한 종래의 전기영동법은 고전압을 걸어줌으로써 분리되는 동안 발생하는 joule heating에 의한 용액의

대류가 일어나므로 분리능이 매우 낮다.

그러나 모세관 전기영동법(capillary zone electrophoresis : 이하 CZE로 표시함)에서는 표면적 대 부피의 비가 매우 큰 100  $\mu\text{m}$  이하의 내경을 가진 모세관을 사용하여 열을 모세관벽을 통해 확산시킴으로써 전기영동의 문제점을 해결하였다. 그리하여 CZE의 분리능을 증가시킬 수 있으므로 이론단수가 백만 정도이고, nanoliter 이하의 시료를 분석할 수 있고, femtomole 이하의 양을 검출할 수 있을 정도로 감도가 좋으며, 고전압을 사용할 수 있어 분리하는 시간을 30분 이하로 단축할 수 있는 등 많은 장점이 있다. 최근 들어와서는 모세관 전기영동법에 대한 연구가 매우 활발하게 진행되어 여러 개의 review paper가 발표되었으며<sup>5-9</sup>, 1988년부터 여러 분석기기 회사에서 모세관 전기영동법을 상품화 하기 시

작하였다<sup>10-12</sup>. 여러 장점을 가진 모세관 전기영동법을 더욱 다양하게 이용하기 위하여 여러 검출시스템과 selectivity를 높이기 위한 연구가 많이 행해지고 있다. 검출시스템은 고성능 액체 크로마토그래피에서 사용되고 있는 대부분의 시스템들이 개발되었는데, 예를 들면 UV-visible detector<sup>13</sup>, fluorescence detector<sup>14-17</sup>, electrochemical detector<sup>18,19</sup>, radiometric detector<sup>20</sup>, mass spectrometer(MS)를 연결시킨 검출법<sup>21,22</sup> 등이다. Selectivity를 증가시키기 위한 노력으로는 Terabe 등<sup>23-26</sup>이 완충용액에 micelle을 첨가하여 전하를 띄지 않은 물질을 분리하는데 성공하였고, Karger 등<sup>27-29</sup>은 capillary 안을 polyacrylamide gel을 채워 분자량이 큰 단백질이나 전하/분자량의 비가 같은 DNA를 분리하는데 적용하였다. 그 밖에 Tsuda 등<sup>30-33</sup>은 모세관 전기영동법에서 분리되는 메커니즘과 기본원리 등에 많은 연구를 하였으며, 현재에도 좀 더 나은 분리능을 얻기 위한 이론적인 근거를 마련하기 위해 많은 연구가 행해지고 있다.

이 논문에서는 완충용액으로 채워진 최적의 감도를 갖는 모세관 전기영동법의 기기의 제작에 관하여 간단히 설명하고 이를 유기물질 분석에 사용한 결과에 대해 논의하고자 한다. 생체내에서 cofactor의 구성성분이며, DNA나 에너지의 구성성분으로써, 각각 전하를 다르게 띄고 있는 adenine과 그의 유도체와 신경전달 물질로써 생체내의 측정이 중요시되고 있는 catechol과 catecholamine 유도체를 모세관 전기영동법에 의해 분리되는 최적분석 조건에 대해 설명하고, 이의 분리능에 영향을 미치는 요소들 검토하였다.

## 실 험

**시약.** Sodium borate, adenine, adenosine, adenosine-3'-monophosphate(3'-AMP), adenosine-5'-monophosphate(5'-AMP), adenosine-5'-diphosphate(ADP), adenosine-5'-triphosphate(ATP)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO)에서 얻었다. Catechol, serotonin과 catecholamine 유도체인 epinephrine, norepinephrine, L-dihydroxy-phenylalanine(L-DOPA), dopamine 역시 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다.

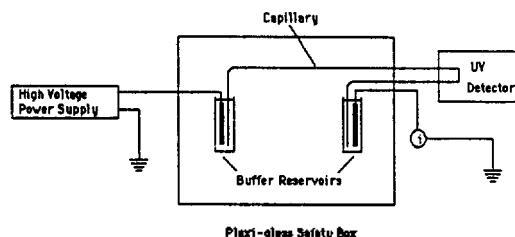


Fig. 1. Experimental set-up of home-made capillary electrophoresis system.

전기영동에 사용한 완충용액은 Milli-Q 정제시스템(Millipore, Bedford, MA)을 통과하여 역삼투압과 탈이온화를 한 물을 사용하여 준비하였다.

**기기구성 및 장치.** 모세관 전기영동에 사용한 기기는 Fig. 1에 나타난 바와 같이 이 실험실에서 디자인하여 제작한 기기는 문헌에 서술된 것과 유사한 것이다<sup>34</sup>. 시스템에 있는 모든 고전압이 걸리는 부분들은 Plexi-glass 상자안에 들어가게 하고 상자의 문이 열리면 고전압 power supply에서 나오는 전압을 자동으로 중단시킬 수 있도록 안전 인터록(interlock) 장치를 하였다.

고전압 power supply(Model PS/EH 40R 2.5 CTZR, Glassman High Voltage, Whitehouse Station, NJ)를 모세관에 전장을 걸어주기 위하여 사용하였다. Power supply에서 나오는 출력은 백금선과 연결하여 5 ml의 완충용액이 들어 있는 병에 담근다. 분리는 polyimide로 싸인 fused silica 모세관(Polymeric Technologies, Phoenix, AZ) 안에서 이루어졌다. 모세관은 평균내경이 50  $\mu\text{m}$ 이고, 외경이 360  $\mu\text{m}$ 로써 전체 길이는 100 cm이고, detector까지의 길이는 63.5 cm 이었다. 이 모세관의 양끝은 양극과 음극이 담겨 있는 수평으로 놓인 완충용액 병에 담그어지게 된다.

분리되는 band들은 model CV<sup>4</sup> variable wavelength UV detector(ISCO, Inc., Lincoln, NE)에 의해 검출되었다. On-line detector는 다른 detector에 비해 감도가 높았다. 검출하는 부위는 모세관의 polyimide coating을 벗기고, 이 부위를 detector의 optical beam과 align 시킴으로써 absorbance cell로써 사용한다. 이 detector는 모세관과 beam의 alignment가 매우 쉽게 디자인 되어 있다. Detector에서 나오는 신호는 integrator(Model SP4290,

Spectra-Physics, San Jose, CA)에서 받도록 연결하였다.

**전기영동.** 시료는 20~100 µg/ml의 농도로 물에 녹였으며, 경우에 따라서는 시료를 전기영동하는데 사용하는 완충용액에 녹이기도 하였다. 모세관 안으로의 시료의 주입은 압력 차이에 의한 hydrostatic 주입을 하였는데, 이를 위하여서는 시료 주입부의 모세관을 15 cm 정도 높이 들어 시료를 주입하므로써 압력의 차이에 의해 약 5~50 nL의 시료가 들어가게 된다(Appendix 참조).

시료의 주입이 끝나면 시료를 주입한 모세관의 끝을 완충용액 안에 담그고 고전압 power supply를 켜서 분리할 때 쓰는 전압(20~35 kV)으로 올린다. 분리되는 동안 일정한 전압이 흐르도록 하고 이 때 걸리는 전류는 100 µA 이하가 되도록 한다. 모세관을 0.1 M NaOH와 전기영동에 사용하는 완충용액을 흘려 보내어 다음 시료를 주입할 수 있도록 깨끗하게 씻어준다.

**결과 및 고찰**

**Adenine과 그 유도체들의 분리.** Charge를 띄지 않은 adenine과 adenosine, (-) 전하를 띄고 isomer 형태인 3'-AMP와 5'-AMP, (-) charge를 3~4 개 가지고 있는 ADP와 ATP를 첨가제 없이 동시에 분리하기 위하여 여러 분리인자(pH, 걸여주는 전장의 세기, running buffer의 염농도)를 조절함으로써 최적의 분리조건을 얻었다(Fig. 2).

Adenine과 adenosine의 분리가 pH 8에서 가능하였으며, 완충용액의 염의 농도가 높거나 pH가 8.5 이상인 완충용액을 사용한 경우에는 ADP와 ATP의 분리능이 감소함을 보여주었다. 이 때 각각의 peak의 분리능을 살펴보기 위하여 이론단수를 계산한 것이 Table 1에 나타나 있다. AMP의 이론단수가 20~45 만 사이로 좋은 분리능을 보여주고 있으나 ATP는 이론단수가 매우 낮으며, 이것은 ATP가 불안정하여 분해된 산물로 생각된다.

걸여준 전장의 세기와 mobility와의 관계는 Fig. 3에서 처럼 전장의 세기가 커지면 움직이는 속도가 빨라지므로 retention time이 짧아지게 된다. 반면 Fig. 4에서 running buffer의 농도에 따른 mobility의 변화를 살펴보면 electroosmotic flow는 zeta poten-

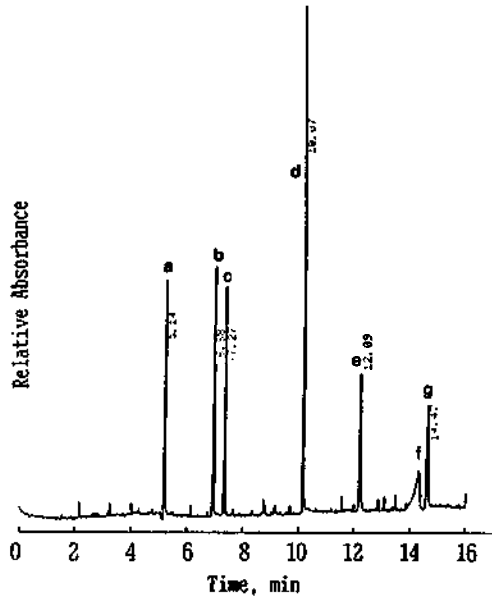


Fig. 2. Electropherogram of adenine derivatives with UV detection (200 nm) on a 50 µm-i.d. capillary: 20 mM sodium borate-boric acid (pH 8.0); separation potential, 22 kV: a, adenine; b, adenosine; c, cyclic-AMP; d, 3'-AMP; e, 5'-AMP; f, ATP; g, ADP.

tial과 관련이 있음을 알 수 있다. 즉, 완충용액의 농도가 낮아짐에 따라 zeta potential이 증가함으로 velocity가 증가함을 보여준다. Buffer의 농도에 따라서는 electrophoretic mobility에는 변화가 없으므로 electroosmotic mobility의 조절에 따라 최고의 resolution을 갖는 조건을 얻을 수 있다.

**Catechol과 catecholamine의 분리.** 생체내의 신경계에서 일어나는 현상을 분자수준에서 이해하기 위하여는 catechol과 그 유도체의 측정이 매우 중요하다. 이는 대부분이 HPLC를 이용한 분리와 electrochemical detector를 이용하여 검출되고 있다. 여기서는 CZE를 이용하여 구조가 비슷한 catecholamine계 화합물을 첨가제를 사용하지 않고 손쉽게 분리할 수 있는 실험방법을 마련하였으며, 이를 이용하여 구조가 유사한 유기물을 분석할 수 있으리라 예상된다.

우선 이 실험에서 사용한 실험부분에서 설명한 시료주입 시스템이 적당한가를 살펴보기 위하여 시료주입 시간과 peak height와의 관계를 dopamine을 이용하여 조사한 결과가 Fig. 5에 나타나 있다. 시

Table 1. Number of theoretical plates (NTP) of capillary zone electrophoresis adenine derivatives

	$t_r(\text{min})^1$	$W_{1/2}(\text{sec})^2$	NTP <sup>3</sup>
a adenine	5.66	2.4	107038
b adenosine	7.55	3.6	87720
c cyclic AMP	7.99	2.4	221046
d 3'-AMP	11.05	2.4	422780
e 5'-AMP	13.20	3.2	339360
f ATP(X)	14.68	15.0	19102
g ADP	15.59	6.0	133786

1. retention time (min)

2. peak width at 1/2 peak height

3.  $NTP = 5.54 \left( \frac{t_r}{W_{1/2}} \right)^2$

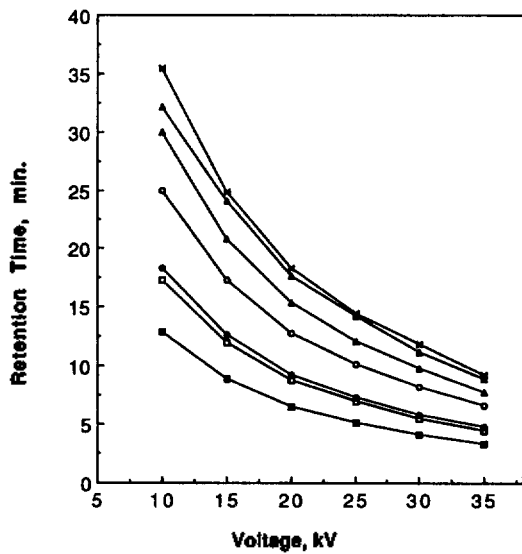


Fig. 3. Relationship between migration velocity (retention time) and applied voltages. Conditions of separation are the same as in Fig. 2 except for the applied voltages: ■, adenine; □, adenosine; ●, cyclic AMP; ○, 3'-AMP; ▲, 5'-AMP; △, AMP; ×, ADP

료주입 시간이 증가함에 따라 peak area는 비례하여 증가하나 시료부피가 증가함에 따라 peak가 broad 해지므로 peak height는 hyperbolic한 모양을 보여 준다. 따라서 주입시간이 10초 이내인 경우에만 농도와 peak height 간에 정량성이 있다고 할 수 있다. 이 때 dopamine에 의한 peak 크기와 retention time의 재현성을 살펴보면 Table 2에서와 같다. Dopamine의 peak 크기의 재현성은 RSD가 1.4%이고,

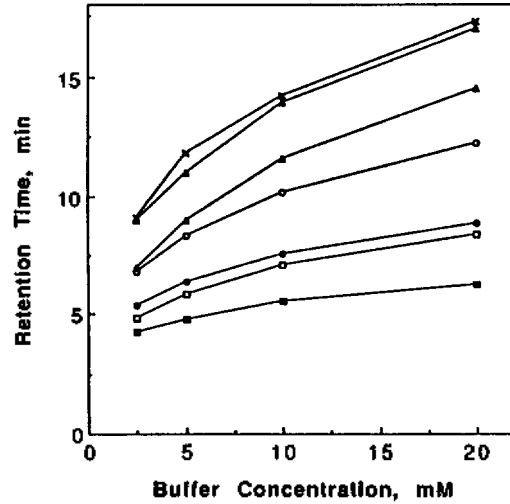


Fig. 4. Relationship between migration velocity and concentrations of running buffer conditions of separation are the same as in Fig. 2 except for the buffer concentrations. Symbols are the same as in Fig. 3.

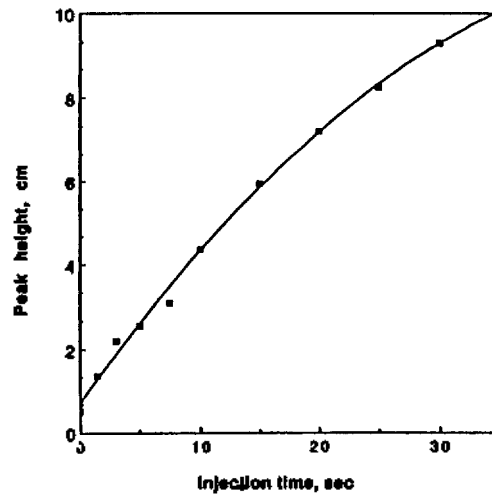


Fig. 5. Relationship between hydrostatic injection time and peak height of dopamine with 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) on the 50  $\mu\text{m}$ -i.d.-capillary.

retention time의 RSD는 0.57%로써 일반적인 CZE의 재현성을 보여준다.

Fig. 6C에서는 catecholamine mixture를 sodium phosphate buffer(pH 7.4)를 사용하여 22 kV에서 분리한 결과를 보여주고 있다. 가장 염기성인 serotonin이 가장 빨리 이동함을 보여주고 그 뒤로 do-

Table 2. Reproducibility of peak height and retention time in dopamine separation with 50 mM sodium phosphate buffer, pH 7.4 at 22 kV voltage supply

Sample	n	Peak height	Retention time
Dopamine	4	9	
	$\bar{x}$	5.800	7.353
	s	0.082	0.042
	% RSD	1.410	0.570

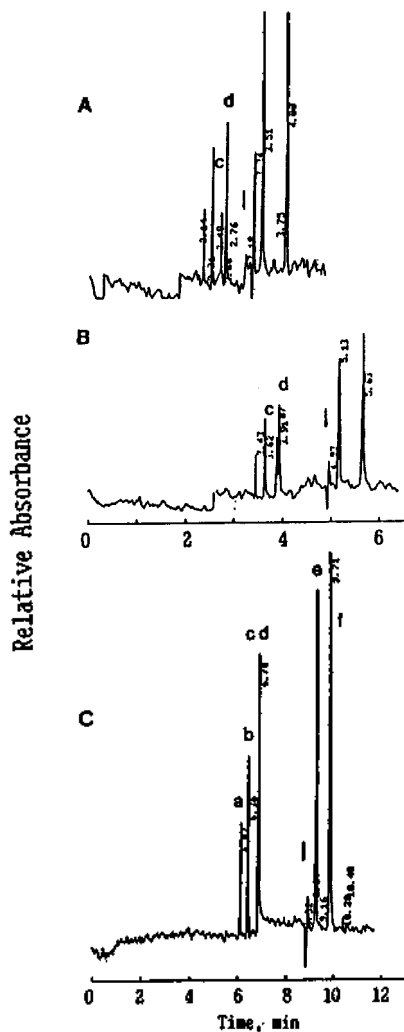


Fig. 6. Electropherogram of catecholamine derivatives with UV detection (200 nm) on a 50  $\mu$ m-i.d. capillary : 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.4) ; separation potentials ; A, 35 kV ; B, 30 kV ; C, 22 kV ; a, serotonin ; b, dopamine ; c, epinephrine ; d, norepinephrine ; e, catechol, f, L-DOPA. Arrows represent the electroosmotic flow front.

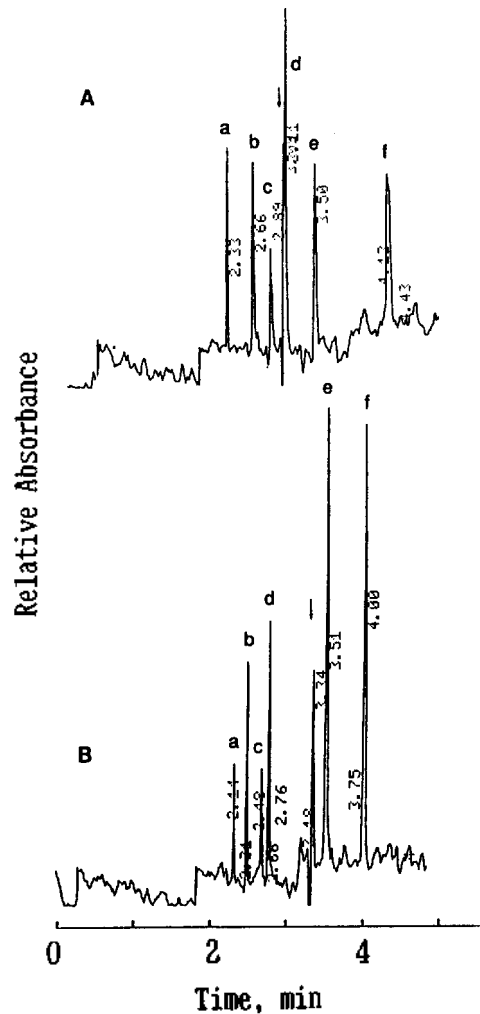


Fig. 7. Electropherogram of catecholamine derivatives with running buffer at different pH : A, pH 8.0 ; B, pH 7.4. Conditions of separation and symbols are the same as in Fig. 6A. Arrows represent the electroosmotic flow front.

pamine이 나오고, norepinephrine과 epinephrine은 peak가 겹쳤음을 알 수 있다. 그 뒤로 중성분자인 catechol이 flow front 바로 뒤따라 나오고 마지막으로 carboxyl group을 가진 DOPA가 나옴을 알 수 있다. 여기에서 겹쳐서 나오는 epinephrine과 norepinephrine을 분리하기 위하여 전장의 세기를 변화시켰다. Fig. 6B와 6A에서 보듯이 걸어준 전장의 세기가 증가함에 따라 분리속도가 빨라지고 작은 pK<sub>a</sub>의 차이에 따라 epinephrine과 norepinephrine을

35 kV에서는 완전히 분리할 수 있었다.

모세관 전기영동에서는 완충용액의 pH가 용질의 전하의 세기와 종류에 영향을 준다. 그러므로 모세관 전기영동법에서 완충용액의 pH는 electrophoretic mobility를 변화시킴으로 분리조건에서 매우 중요한 요소가 된다. Catecholamine의 분리에서 pH의 영향을 Fig. 7에서 나타낸다. Norepinephrine은 pH가 증가함에 따라 norepinephrine이 deprotonate되어 charge가 바뀌게 되고 electrophoretic mobility의 벡터 방향도 바뀌므로 electroosmotic flow보다 늦게 통과함을 알 수 있다. Data는 나타나 있지 않으나 완충용액의 pH가 9.3 이상인 경우에는 serotonin 이외에 dopamine, epinephrine, norepinephrine이 모두 electroosmotic flow 보다 늦게 나오게 된다.

## 결 론

모세관 전기영동법을 사용하여 adenine 유도체와 catecholamine 유도체를 분리하여 분석하였다.

(1) 유기물의 이성체를 전하의 세기와 종류에 따라 신속하게 (<15분) 분리하여 분석할 수 있었다.

(2) 모세관 전기영동에서는 극미량으로(약 1~5 nI) 충분히 분석이 가능하였다.

(3) 모세관 전기영동법에서는 이론단수가 20~40만 되는 고분리능을 쉽게 얻을 수 있었다.

(4) 모세관 전기영동법에서의 retention time과 peak 크기의 재현성이 매우 좋았다.

(5) 모세관 전기영동법의 분리능 및 resolution은 용액의 pH, 전해질의 농도, 걸여준 전장의 세기에 의해서 크게 영향을 받았다.

## Appendix

**모세관 전기영동의 기본 원리.** 모세관 전기영동법에서 모세관의 양끝에 전장을 걸어줄 때 시료가 움직이는 속도는

$$V = V_e + V_{eo} = (\mu_e + \mu_{eo})E$$

로 표시할 수 있다. 이 때  $V_e$ 는 electrophoretic velocity,  $V_{eo}$ 는 electroosmotic velocity로써 각각은 electrophoretic mobility,  $\mu_e$ 와 electroosmotic mobility,  $\mu_{eo}$ 와 전장의 세기  $E$ 와 관련된다. 여기에서 electrophoretic mobility는 용질의 전하의 종류와 세기에 따라 다르므로 벡터량으로 방향성을 갖는다. 반면

electroosmotic mobility는 모세관 전기영동에서 유체가 항상 일정방향으로 움직이게 하는 힘으로써 fused silica인 모세관의 표면의 silanol group이 이온화되어 수용액(>pH 2.5)에서 음전하를 띤다. 그러므로 전해질 중의 양이온이 silica 표면에 모이게 되고 이 층이 양쪽에 전장을 걸어주면 음극쪽으로 이동하게 된다. 이 때 움직이는 속도는 Zeta potential,  $\zeta$ 에 의해 지배되게 된다. zeta potential은

$$\zeta = 4\pi\eta\mu_{eo}/\epsilon$$

로 쓸 수 있고, 이 때  $\eta$ 는 용액의 viscosity,  $\epsilon$ 는 용액의 dielectric constant이다. 그러므로 electroosmotic flow의 속도,  $V_{eo}$ 는

$$V_{eo} = (\epsilon/4\pi\eta)\zeta \cdot E$$

로 나타낼 수 있다. 이 electroosmotic flow는 용액 중의 전해질의 농도와 pH 등에 의하여 변하게 된다. 그러므로 electroosmotic flow의 속도를 조절함으로써 resolution과 retention time을 조절할 수 있다.

**모세관 전기영동법에서 hydrostatic pressure에 의한 시료주입.** 이 때 주입되는 시료의 양,  $Q$ 는<sup>35</sup>

$$Q = n\pi r^2 C$$

로 표현될 수 있는데,  $n$ 은 모세관 안에서 시료부위의 길이,  $r$ 은 모세관의 내경,  $C$ 는 시료의 농도로 쓸 수 있다. 여기서 압력의 차이에 의해 시료를 주입하는 경우 모세관안에서의 시료부위의 길이  $n$ 은

$$n = V_{hf} t_i$$

로 쓸 수 있다. 이 때  $V_{hf}$ 는 유체역학(hydrodynamic) 유체의 평균속도이고,  $t_i$ 는 주입하는 시간이다. 모세관을 흐르는 평균 유체의 속도는 Poiseuille 식에 의해 다음과 같이 쓸 수 있다.

$$V_{hf} = \frac{gr^2 \Delta h}{8L}$$

여기에서  $g\Delta h$ 는 유체의 압력,  $\Delta h$ 는 시료주입 부위와 모세관 끝이 담겨 있는 완충용액의 높이차,  $L$ 은 모세관의 전체길이는 시료의 점도이다. 이 식으로부터 시료부위의 길이  $n$ 은

$$n = \frac{gr^2 \Delta h t_i}{8L}$$

로 나타낼 수 있다. 예를 들어  $h$ 가 15 cm이고, 시료가 풀인 경우 10초 injection하면,  $n$ 이 1.25 mm이므로 전체 시료의 부피( $=\pi r^2 l$ )는 25 nL가 된다. 실제로 재현성이 좋은 범위는 약 5~50 nL의 시료의 양이다.

### 인 용 문 헌

1. F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts, and Th. P. E. M. Verheggen, *J. Chromatogr.*, **169**, 11 (1979).
2. J. W. Jorgenson and K. D. Lukacs, *J. Chromatogr.*, **218**, 209 (1981).
3. J. W. Jorgenson and K. D. Lukacs, *Anal. Chem.*, **53**, 1298 (1981).
4. J. W. Jorgenson and K. D. Lukacs, *Science*, **222**, 266 (1983).
5. M. J. Gordon, X. H. Huang, S. L. Jr., Pentoney, and R. N. Zare, *Science*, **242**, 224 (1988).
6. P. D. Grossman, J. C. Colburn, H. H. Lauer, R. G. Nielson, R. M. Riggan, G. S. Sittampalm, and E. C. Richard, *Anal. Chem.*, **61**, 1186 (1989).
7. A. G. Ewing, R. A. Wallingford, and T. M. Olefirowicz, *Anal. Chem.*, **61**, 292A (1989).
8. W. G. Kuhr, *Anal. Chem.*, **62**, 403R (1990).
9. 이공주, 한국생화학뉴스, **9**, 289 (1990).
10. N. A. Guzman, L. Hernandez, and B. G. Hoebel, *Biopharm*, **2**, 22 (1989).
11. M. V. Pickering, *LC-GC*, **7**, 752 (1989).
12. H. M. Widmer, *Chimia*, **43**, 134-141 (1989).
13. M. Martin, G. Guichon, Y. Walboehl, and J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, **57**, 561 (1985).
14. Y. -F. Cheng and N. J. Dovichi, *Science*, **242**, 562 (1988).
15. P. Gozel, E. Gassmann, H. Michaelson, and R. N. Zare, *Anal. Chem.*, **59**, 44 (1987).
16. J. S. Green and J. W. Jorgenson, *J. Chromatogr.*, **352**, 337 (1986).
17. W. Kuhr and E. S. Yeung, *Anal. Chem.*, **60**, 1832, 2642 (1988).
18. X. Huang, J. A. Luckey, M. J. Gordon, and R. N. Zare, *Anal. Chem.*, **61**, 766 (1989).
19. R. A. Wallingford and A. G. Ewing, *Anal. Chem.*, **61**, 98 (1989).
20. S. L. Jr., Pentoney, R. N. Zare, and J. F. Quint, *Anal. Chem.*, **61**, 1642 (1989).
21. R. D. Smith, J. A. Olivares, N. T. Nguyen, and H. R. Udseth, *Anal. Chem.*, **60**, 436 (1988).
22. C. M. Whitehouse, R. N. Dreyer, M. Yamashiita, and J. B. Fenn, *Anal. Chem.*, **57**, 675 (1985).
23. S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya, and T. Ando, *Anal. Chem.*, **56**, 111 (1984).
24. K. Otsuka, S. Terbe, and T. Ando, *J. Chromatogr.*, **348**, 39 (1985).
25. A. T. Balchunas and M. T. Spaniak, *Anal. Chem.*, **60**, 617 (1988).
26. J. Liu, K. A. Cobb, and M. Novotny, *J. Chromatogr.*, **468**, 55 (1988).
27. H. Drossman, J. A. Luckey, A. J. Kostichka, J. D'Cunha, and L. M. Smith, *Anal. Chem.*, **62**, 900 (1990).
28. A. Guttman, A. S. Cohen, D. N. Heiger, and B. L. Karger, *Anal. Chem.*, **62**, 137 (1990).
29. A. S. Cohen and B. L. Karger, *J. Chromatogr.*, **397**, 409 (1987).
30. T. Tsuda, K. Nomura, and G. Nakagawa, *J. Chromatogr.*, **264**, 285 (1983).
31. G. Roberts, P. Rhodes, and R. Snyder, *J. Chromatogr.*, **480**, 35-68 (1989).
32. X. Huang, W. Coleman, and R. N. Zare, *J. Chromatogr.*, **480**, 95 (1989).
33. J. Giddings, *J. Chromatogr.*, **480**, 21 (1989).
34. J. W. Jorgenson and K. D. Lukacs, *J. Chromatogr.*, **218**, 209 (1981).
35. D. J. Jr., Rose and J. W. Jorgenson, *Anal. Chem.*, **60**, 642 (1988).