

남조류로부터 마이크로시스틴을 추출하는 새로운 추출법 연구

表東震* · 申鉉斗

강원대학교 자연과학대학 화학과
(2000. 11. 29 접수)

Study on New Extraction Method of Microcystins from Cyanobacteria

Dong-Jin Pyo* and Hyun-Du Shin

Department of Chemistry, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
(Received November 29, 2000)

요 약. 남조류독소, 마이크로시스틴을 초임계유체추출을 이용하여 추출하는 새로운 분석법이 개발되었다. 이 연구에서 사용된 마이크로시스틴들은 초임계 유체 CO₂에는 거의 녹지 않지만 90% CO₂, 9.0% 메탄올, 1.0% 물로 된 혼합유체를 사용한 결과 성공적으로 추출할 수 있었다. 이 연구에서 사용된 초임계 유체 추출법은 고체상 추출법보다 많은 장점들을 가지고 있다. 우선 시료처리단계가 줄어들고, 시료의 손실이 적으며, 분석시간을 단축시킬수 있다는 장점들이 있다. 또한 전처리 단계가 생략된다는 장점도 있다. ODS 카트리지를 사용하는 고체상 추출법에서 ODS 카트리가 마이크로시스틴에 대한 흡착력이 떨어지기 때문에 좀 더 극성이 있는 CN 카트리지를 대신 사용하였다. 동결건조된 세포(100 mg)을 5% 아세트산으로 추출하였고 추출물을 원심분리하여 CN 카트리지에 주입시켰다. CN 카트리지에는 물 5 mL, 0.5 M 아세트산 5 mL, 5% 아세트니트릴 5 mL로 빗은 후 70% 아세트니트릴로 최종용리시킨후 HPLC로 분리하였다. CN 카트리지를 사용하였을때 ODS 카트리지보다 더 좋은 회수율과 크로마토그램을 보여 주었다.

ABSTRACT. A new analytical method of cyanobacterial toxins, i.e. microcystins was developed using supercritical fluid extraction(SFE). The microcystins included in this study are sparsely soluble in neat supercritical fluid CO₂. However, the microcystins were successfully extracted with a ternary mixture(90% CO₂, 9.0% methanol, 1.0% water) at 40 °C and 250 atm. The SFE method developed in this study has several advantages over solid-phase extraction(SPE) sample preparation for the analysis of microcystins. Sample handling steps are minimized, thus reducing possible losses of analytes and saving analysis time. No clean-up steps are employed in this SFE method. Although many methods have been described for microcystins RR and LR, the method using solid-phase extraction with ODS cartridges is the most commonly used. However, the adsorbing power of ODS cartridges for microcystins is weak, so we have attempted to use a more polar CN cartridge, to increase the adsorbing power for microcystins. Lyophilized cells(100 mg) were extracted with 5% (v/v) acetic acid. The extract was centrifuged and then the supernatant was applied to a CN cartridge. The cartridge which contained microcystins was rinsed with 5 ml of water and 5 ml of 0.5 M acetic acid, followed by 5 ml of 5% acetonitrile in water. Microcystins were finally eluted from the CN cartridge with 70% acetonitrile in water, and were determined by HPLC. Better recoveries and chromatograms were observed than with ODS cartridge.

서 론

여름철 부영양화된 호수나 하천에서는 남조류가 대량 증식하는 현상이 나타나 물색이 변하고 남조류 세포 밀도가 높아지게 된다. 이런 현상을 물꽃 현상(water bloom) 혹은 수화 현상이라 부른다. 남조류의 물꽃 현상에 의한 피해에는 호수의 pH 상승, 용존 산소의 저하, 어류의 질식사, 악취 발생, 정수 과정에서의 어과장해 등이 있다. 또한 남조류 중에 일부는 독소를 함유하고 있어 동물이 죽는 사고를 유발하는데, 호수나 연못 등의 표면에 부유된 남조류를 불과 함께 섭취한 동물이 사망했던 예가 많은 나라에서 보고되어 있으며,¹ 특히 포유류에 대해서는 대형동물부터 소형동물까지 광범위하게 피해가 나타났다.^{1,2} 인간에 대한 피해로는 1996년 브라질에서 신장 부석을 하던 환자 60여명이 남조류 독소인 마이크로시스틴에 오염된 물로 인하여 집단으로 사망한 사례가 있었다.³ 이러한 사고를 유발시키는 독성물질은 마이크로시스틴이라고 불리는 고리형태의 펩타이드 구조를 가진 간장독성 물질임이 밝혀졌다.⁴ 지금까지 알려진 마이크로시스틴은 모두 20여 가지로 공통된 구조적인 특징을 가지고 있다. 이러한 마이크로시스틴의 특징들로는 모두가 7개의 펩타이드(peptide)가 고리를 이룬 형태를 취하고 있으며 그 기본적인 구조는 γ -linked D-glutamic acid(Glu), N-methyldehydroalanine(M-dha), 하나의 β -amino acid, 3-amino-9-methoxy-10-phenyl-2,3,8-trimethyldeca-4, 6-dienoic acid(Adda) 그리고 두 개의 L-amino acids로 구성되어 있다(Fig. 1).

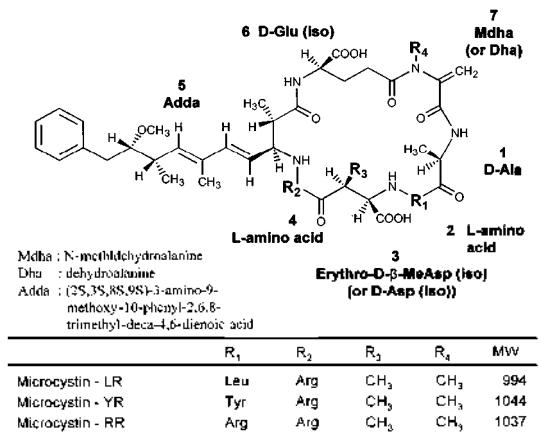


Fig. 1. Structures of Microcystins.

이러한 남조류의 독성물질들이 외국의 선진국에서는 많은 연구와 함께 화학적 구조까지 속속 밝혀지고 있지만 국내에서는 이에 대한 연구가 매우 미미한 실정이다. 우리나라의 대부분의 호수들도 부영양화가 되면서 유기물 함량이 증가하고 수중 산소 고갈과 조류 현존량의 증가 및 식물 플랑크톤의 종속성 변화를 초래하며 남조류가 늦어짐에 신한 번성을 형성하고 있다. 중영양호 수준이던 소양호에서도 1986년 남조류가 처음 출현한 이후 매년 증가추세에 있다.⁵ 이러한 호수들은 우리나라의 경우 국민의 상수원으로 사용되는 경우가 많기 때문에 남조류 독성물질에 대한 연구가 시급히 이루어져야 하는 실정이다.

이러한 마이크로시스틴을 화학적으로 분석하기 위해서 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하는 방법⁶과 얇은 판 크로마토그래피(TLC)를 이용하는 방법⁸ 등이 있다. 특히 Harada 등은 상분화된 ODS cartridge(Solid Phase Extraction: SPE)를 이용하는 HPLC 방법을 개발했으며 이 방법은 현재 마이크로시스틴의 화학적 분석을 위해 가장 많이 쓰이는 방법이 되었다.

초임계 유체를 이용한 추출법은 현재 세계적으로 주목되어지고 있다. 초임계 유체 추출(Supercritical Fluid Extraction: SFE)은 추출 시간이 빠르고, 추출 효율이 좋으며, 선택성이 좋은 장점이 있다. 초임계 CO₂ 추출은 커피에서 카페인 제거와 공업용 토지에서 PCBs 추출¹⁰에 상업적으로 사용되어져 왔으며, 다른 여러 분야에도 많이 이용되고 있다.^{11,12}

본 연구에서는 초임계 유체 CO₂를 이용하여 남조류로부터 마이크로시스틴의 효율적인 추출을 수행하였다. 기존에 아세트산 수용액을 첨가제로 사용하여 남조류로부터 마이크로시스틴을 추출하였다.¹¹ 그러나 아세트산 수용액을 첨가제로 사용하였을 경우 압력의 변화가 심했으며, 결국은 추출 line의 막힘 현상을 유발하게 되었다. 그러나 이번 실험에서는 메탄올 수용액을 첨가제로 사용하여 기존의 단점을 보완할 수 있었다.

CN cartridge를 이용한 분석법은 본 실험실에서 처음으로 개발되었으며^{11,15} 이번 연구에서는 이러한 초기의 연구들을 바탕으로 CN cartridge용 세척용액과 마이크로시스틴의 용리 용액들을 새로 최적화시킨 결과 기존의 비극성 ODS cartridge를 이용하는 방법이나 본 실험실에서 개발된 이전의 방법들 보다 더 좋은 실험결과를 보여주었다.

재료 및 방법

SFE를 이용한 마이크로시스틴의 추출. SFE(Supercritical Fluid Extraction)를 이용한 추출법은 기존의 비극성 ODS cartridge 방법의 단점을 보완할 수 있는 획기적인 마이크로시스틴의 추출법이다.

SFE 방법을 위하여 국내의 호수나 강으로부터 남조류를 채집하였다. 채집된 남조류 시료는 동결건조 후 100 mg을 extraction vessel에 담아 실험하였다.

사용되어진 SFE system은 Jasco(Tokyo, Japan) LC-900이었다(Fig. 2). 이 장비는 3 부분으로 나뉘어 지는데, Fluid delivery section, Extraction section, 그리고 Collection section으로 나뉘어진다. Fluid delivery section은 두 개의 LC-pump로 구성되어 있으며, 각각의 pump는 액체 CO₂와 modifier solvent(90% aqueous methanol)를 이동시킨다. 이 때 사용된 액체 CO₂와 90% aqueous methanol을 이동시키기 위한 pump의 유속은 각각 2 ml/min과 0.2 ml/min이었다. Extraction section에서는 일정 온도(40 °C)하에서 90% aqueous methanol을 첨가한 초임계 유체 CO₂를 이용하여 마이크로시스틴을 추출한다. Collection section에는 extraction vessel의 압력(250 atm)을 일정하게 유지시키고, 추출 과정을 거친 고압의 초임계 유체를 일정하게 대기 밖으로 나올 수 있도록 해주는 back pressure regulator가 있다. 추출 line을 통해 대기로 나온 초임계 유체는 기화되어 대기 중으로 날아가고 원하는 분석물질과

첨가제로 사용된 aqueous methanol만 남게 된다. 장비의 상세한 목록은 Fig. 2에 수록되어 있다.

CN cartridge를 이용한 마이크로시스틴의 추출. 본 연구에서 시도한 새로운 분석방법은 마이크로시스틴이라는 분석물질이 극성 guanidine기를 갖고 있는 점을 착안하여 극성을 가지는 CN(cyano) cartridge를 이용

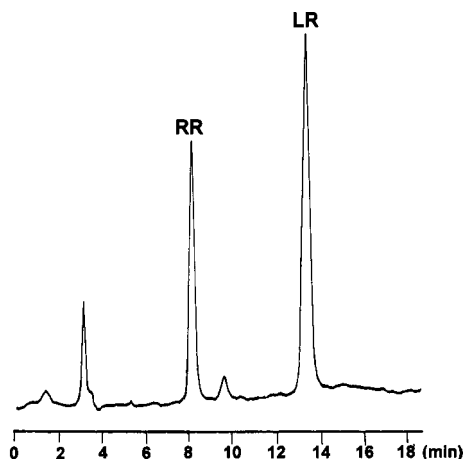


Fig. 3. High performance liquid chromatogram of the microcystins RR and LR. Microcystin RR and LR(each 5 µg) were dissolved in 1 ml of methanol. Column: Ultrasphere 5 µm Spherical 80Å Pore(C₁₈, 10 × 150 mm). Mobile phase: [methanol:acetonitrile(50:50):0.025 M phosphate buffer(pH 3.0) (52:48). Flow rate: 2 ml/min. Detection: 238 nm.

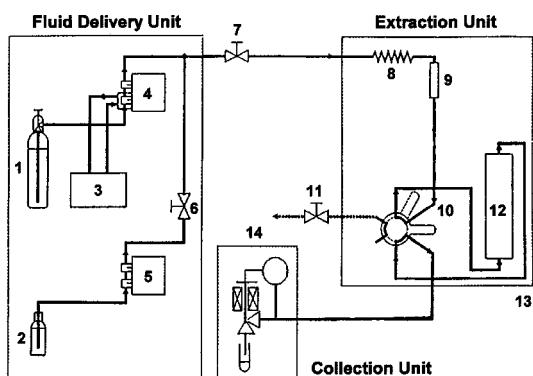


Fig. 2. Schematic flow diagram of SFE modular system: 1-liquid carbon dioxide cylinder, 2-modifier, 3-cooling circulator, 4-CO₂ pump, 5-modifier pump, 6-stop valve, 7-stop valve, 8-pre-heating coil, 9-mixer, 10-line switching valve, 11-stop valve, 12-extraction vessel, 13-oven, 14-back pressure regulator.

Lyophilized cells

Extract with 5% AcOH(aq) 10 ml
30 min (three times)

Centrifuge at 9000 rpm, 5 min

Supernatant

- CN cartridge (6 ml, 1g)
- 1) activating with 70% acetonitrile 5 ml and H₂O 5 ml
- 2) pass supernatant through cartridge
- 3) wash with H₂O 5 ml
- 4) wash with 0.5 M acetic acid 5 ml
- 5) wash with 5% acetonitrile 5 ml
- 6) elute with 70% acetonitrile 15 ml
- 7) evaporate to dryness

Residue

Dissolve with 1 ml of MeOH

HPLC

[MeOH:MeCN=50:50]:0.025 M phosphate buffer (pH=3.0) (50:50)
1.0 ml/min, 238 nm

Scheme 1. Extraction and purification procedure for microcystins using a CN cartridge.

하이 마이크로시스틴과 불순물을 동시에 흡착시킨 후 적당한 용매를 사용하여 불순물을 먼저 용리시키고 나중에 마이크로시스틴만 선택적으로 용리시키는 방법을 사용하였다. 새로 개발한 추출 방법은 다음과 같다 (Scheme 1). 기존의 비극성 cartridge에서 벗어나 극성을 갖는 CN cartridge를 사용하여 분석을 시도하였으며, 먼저 CN cartridge를 70% aqueous acetonitrile 5 ml와 H₂O 5 ml로 활성화시켰다. 그런 후 동결 건조시킨 남조류 시료를 5% acetic acid 10 ml로 30분 동안 교반시킨 다음 9000 rpm에서 5분간 원심 분리했다. 분리해 내고 남은 침전물은 2회 반복하여 다시 추출해 내고 추출액을 CN cartridge에 통과시켰다. 이때 상층액의 pH는 3 M NaOH를 이용하여 3.0으로 조절했다. 그 다음 100% H₂O 5 ml와 0.5 M acetic acid 5 ml, 5% acetonitrile 5 ml로 씻은 후 70% aqueous acetonitrile 15 ml로 용리해 내고 회전 증발기에서 완전히 말린 후 methanol 1 ml로 녹여 HPLC로 분석하였다.

결과 및 고찰

SFE를 이용한 마이크로시스틴의 추출. SFE를 이용하여 마이크로시스틴을 효율적으로 추출하기 위해 유

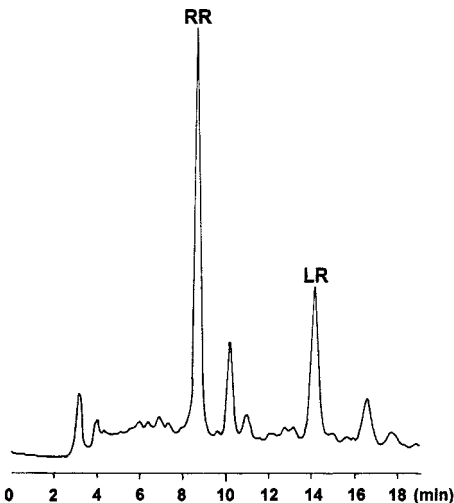


Fig. 4. High performance liquid chromatogram of extracted microcystins using SPE (solid phase extraction with an ODS cartridge). HPLC condition: Column: Ultrasphere 5 μ m Spherical 80Å Pore (C₁₈, 10 150 mm). Mobile phase: [methanol:acetonitrile(50:50):0.025 M phosphate buffer (pH 3.0) (52:48), Flow rate: 2 ml/min, Detection: 238 nm.

체의 조성, extraction vessel의 온도, 압력 등을 바꾸어 가며 실험을 하였다. 정확한 실험 결과를 위하여 의암호 시료(97. 9.)를 정확히 100 mg 취하여 extraction vessel에 넣은 후 안정화된 SFE system에 연결하여 실험하였다.

순수한 CO₂만 유체로 사용하여 추출실험을 하였을 경우 마이크로시스틴이 거의 추출되지 않았음을 알 수 있었다. 그 이유는 극성인 guanidine group 때문인 것으로 생각되어 순수한 CO 유체의 극성을 증가시키기 위해 첨가제로 물을 첨가하여 실험하였으나 같은 결과를 얻었다. 극성을 증가 시켰음에도 불구하고 마이크로시스틴의 추출이 잘 안된 이유는 물의 용매 강도가 작기 때문인 것으로 생각되어 다시 첨가제로 methanol을 첨가하여 실험을 하였다. 그러나 이 역시도 마이크로시스틴을 효과적으로 추출할 수 없었다. 그래서 유체의 극성과 용매 강도를 동시에 증가시키기 위하여 95% aqueous methanol, 90% aqueous methanol, 85% aqueous methanol, 75% aqueous methanol을 초임계 유체 CO₂에 첨가하여 실험을 하였다. 그 결과 건조된 남조류 cells로부터 마이크로시스틴을 가장 좋은 효율로 추출할 수 있었던 경우는 90% aqueous methanol을 첨가제로 사용한 유체였다. 이때 CO₂의 유속은 2.0 ml/min이었고, 90% aqueous methanol의 유속은 0.2 ml/min이었다. 그러므로 마이크로시스틴의 초임계 유체 추출에서 가장 적합한 유체의 조성은 3상으로 이루어진 90% CO₂, 9.0% methanol, 1.0% water임을 알 수 있었다. 이 때 extraction vessel의 온도는 40°C로 유지하고, 압력은 250 atm으로 유지한다. 이러한 조건으로 실험을 하여 얻은 chromatogram을 Fig. 5에서 볼 수 있다.

CN cartridge를 이용한 마이크로시스틴의 추출. 우선 의암호 시료(97. 9.)를 5% acetic acid로 추출한 상층액을 활성화된 CN cartridge에 통과시킨 후 cartridge 안에 붙잡혀있는 마이크로시스틴을 ODS cartridge를 이용한 분석 결과 이상으로 회수하기 위하여 용리액으로 H₂O, methanol, acetonitrile의 조성을 변화시켜 사용한 결과, 위의 용액으로는 ODS cartridge를 이용한 분석 결과 이상으로 회수할 수 없었다. 그 이유는 추출액으로 사용한 5% acetic acid의 pH는 20°C에서 2.49로 상당한 산성을 나타내었다. 즉 이 pH에서는 CN cartridge의 시아노(cyano)기와 마이크로시스틴의 guanidine간의 상당한 안정성을 유발하여 어떠한 용액

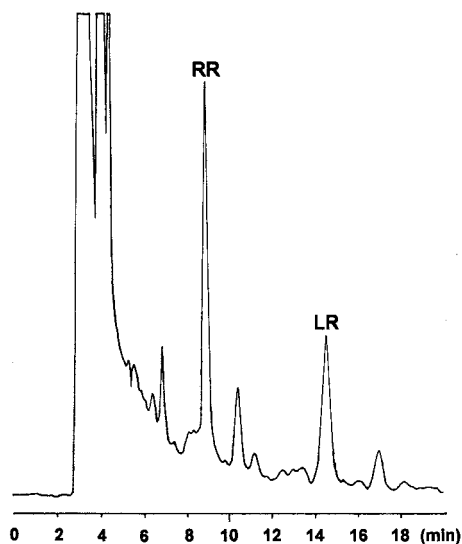


Fig. 5. High performance liquid chromatogram of extracted microcystins using SFE (supercritical fluid extraction with CO₂/90% aqueous methanol at 40 °C and 250 atm). HPLC condition: Column: Ultrasphere 5 μm Spherical 80Å Pore (C₁₈, 10 × 150 mm). Mobile phase: [methanol:acetonitrile(50:50)];0.025 M phosphate buffer (pH 3.0) (52:48). Flow rate: 2 ml min. Detection: 238 nm.

Table 1. Recoveries of microcystins RR and LR using CN cartridge at various pH of supernatant

pH of supernatant	Recovery (%)	
	RR	LR
2.5	77.3	90.4
3.0	111.9	113.3
4.0	111.2	103.1
5.0	95.9	93.4
6.0	66.8	55.1
7.0	45.3	49.3
8.0	37.6	38.3
9.0	23.0	27.3
10.0	26.7	42.7
11.0	21.1	31.7

으므로 ODS cartridge를 이용한 분석 결과 이상으로 용리시킬 수 없었다. ODS cartridge를 이용한 분석 결과 이상으로 마이크로시스틴을 용리시키기 위해 CN cartridge의 시아노기과 마이크로시스틴의 guanidine간의 상호 작용을 완화시키기 위해 상층액의 pH를 조절하여 실험을 하였다. 추출 후 상층액의 pH를 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0으로 바꿔가면서 실험한 결과 pH 3, 4에서 ODS cartridge를 이용

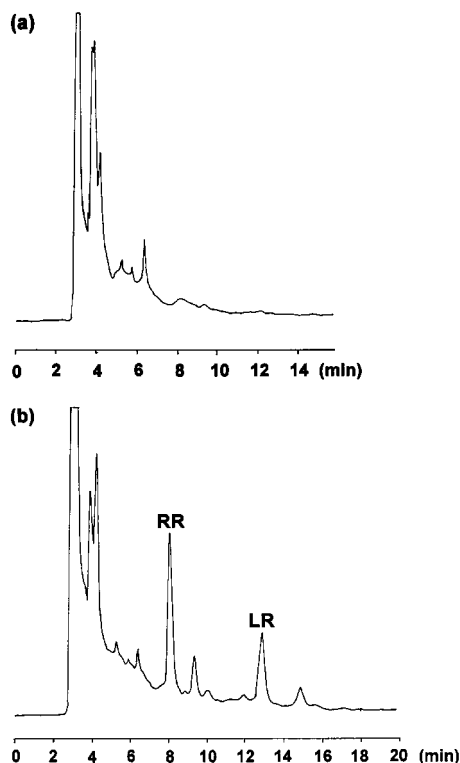


Fig. 6. High performance liquid chromatogram of trapped microcystins into an ODS cartridge during analysis of microcystins using a CN cartridge method (a) supernatant pH-2.49. (b) supernatant pH-7.0. HPLC condition: Column: Ultrasphere 5 μm Spherical 80Å Pore (C₁₈, 10 × 150 mm). Mobile phase: [methanol:acetonitrile(50:50)];0.025 M phosphate buffer(pH 3.0) (52:48). Flow rate: 2 ml min. Detection: 238 nm.

한 분석 결과 이상으로 회수할 수 있었다(Table 1). 이러한 결과로 미루어볼 때 pH 3이상에서 CN cartridge의 시아노기와 마이크로시스틴의 guanidine간의 상호 작용이 완화됨을 알 수 있었고, pH 6이상에서는 상호 작용이 현저히 떨어짐을 알 수 있었다(Fig. 6). 이 때 pH 조절은 3 M NaOH를 사용하였고, 사용한 용리액의 조성은 70% aqueous acetonitrile 15ml였다. 불순물을 씻어 내는 용액으로는 간단하고 신속하게 씻는 과정을 거치기 위하여 100% H₂O 5 ml와 0.5 M acetic acid 5 ml, 5% acetonitrile 5 ml를 이용하였다. 결국 추출 후 상층액의 pH를 3.0으로, 씻어 주는 용액을 100% H₂O 5 ml와 0.5 M acetic acid 5 ml, 5% acetonitrile 5 ml로, 용리액을 70% aqueous acetonitrile

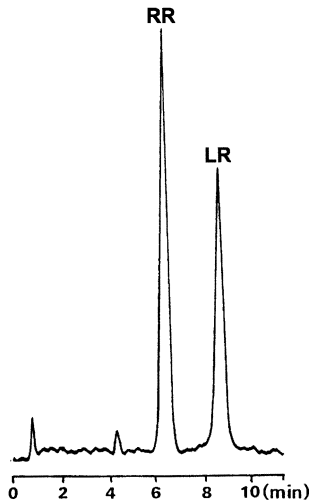


Fig. 7. High performance liquid chromatogram of the microcystins RR and LR. Microcystin RR and LR (each 10 and 5 µg) were dissolved in 1 ml of methanol. Column: Waters Spherisorb S₂ ODS₂ (4.6×150 mm). Mobile phase: [methanol:acetonitrile(50:50)]:0.025 M phosphate buffer (pH 3.0) (50:50). Flow rate: 1 ml/min. Detection: 238 nm.

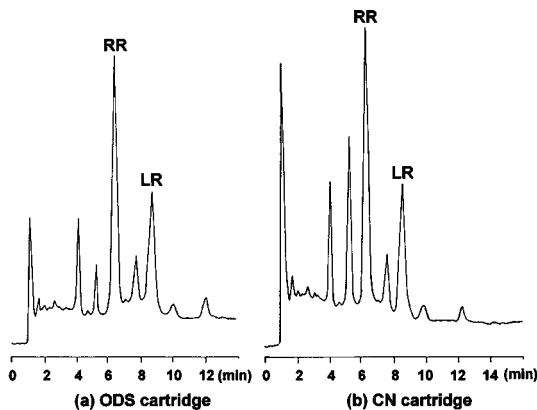
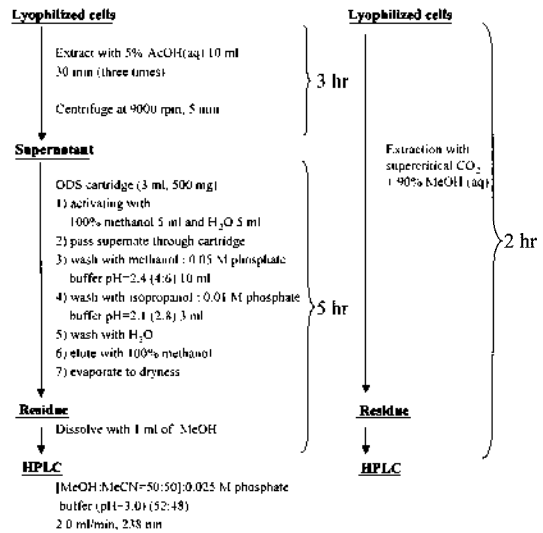


Fig. 8. High performance liquid chromatogram of extracted microcystins using (a) ODS cartridge method. (b) new CN cartridge method. HPLC condition: Column: Waters Spherisorb S₂ ODS₂ (4.6×150 mm). Mobile phase: [methanol:acetonitrile(50:50)]:0.025 M phosphate buffer (pH 3.0) (50:50). Flow rate: 1 ml/min. Detection: 238 nm.

15 ml)로 하여 마이크로시스틴을 추출한 후 HPLC로 확인하였다(Fig. 8).

결론

마이크로시스틴의 추출을 하기 위해 현재 세계적으



Scheme 2. Comparison of analysis time between ODS cartridge and SFE.

로 가장 널리 사용되고 있는 방법은 ODS cartridge를 이용한 추출법이었다.

기존의 ODS cartridge 추출법은 시료를 처리하기 위한 과정이 복잡하여 분석하고자 하는 마이크로시스틴의 손실 및 분석시간이 길다는 단점이 있었다. 그러나 본 연구에서 개발한 SFE를 이용한 마이크로시스틴의 추출법을 사용하면 시료의 처리 과정을 줄여 분석하고자 하는 시료의 손실을 막을 수 있고, 더욱이 분석 시간을 현저히 줄일 수 있었다(Scheme 2). 이러한 결과는 90% aqueous methanol을 첨가한 초임계 CO₂를 이용하여 압력을 250 atm, extraction vessel의 온도를 40 °C로 하여 첨가제와 초임계 유체 CO₂의 유속을 각각 0.2 ml/min과 2.0 ml/min으로 하였을 경우 얻을 수 있었다.

또한 이번 연구에서 CN cartridge를 이용한 마이크로시스틴의 추출을 통해 알아본 결과 ODS cartridge 추출법은 전량의 마이크로시스틴을 분할하지 못한다는 것이었다. 그 이유는 산성용액에서 존재하는 guanidine의 (+)전하를 CN cartridge의 시아노기와 상호작용을 미갈할 수 있기 때문에 상층액을 cartridge에 통과 시전량의 microcystins가 CN cartridge에 붙잡히는 것으로 생각된다. 실험 결과로부터 이 사실을 확인할 수 있었다. 결국 이러한 이유로 인하여 CN cartridge를 이용한 분석 방법이 기존의 ODS cartridge를 이용한

Table 2. Comparisons of peak areas after extraction by ODS and CN cartridge

	ODS cartridge		CN cartridge	
	RR	LR	RR	LR
sample 1	8.4830	4.9089	9.8497	5.5592
sample 2	8.6523	4.7990	9.9018	5.3695
sample 3	8.3317	4.9856	9.8625	5.3371
average	8.4890	4.8978	9.8713	5.4219
S.D	0.1604	0.0938	0.0272	0.1120

분석 방법보다 훨씬 정확한 정량을 할 수 있다(Table 2). 또한 미량의 남조류 독소를 검출하는데 있어 CN cartridge가 ODS cartridge보다 더욱 유리하다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과는 상층액의 pH를 3.0으로 washing solution을 water 5 ml, 0.5 M acetic acid 5 ml, 5% aqueous acetonitrile 5 ml를 사용하고, elution solution을 70% aqueous acetonitrile 15 ml를 사용하였을 경우 얻을 수 있었다.

이 논문은 2000년도 학술진흥재단 기초과학연구지원(KRI: 2000-015-DPO0234)에 의하여 연구하였으며, 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

- Carmichael, W. W.; Salfermann, S. R. *A Status Report on Planktonic Cyanobacteria (Blue-Green Algae) and Their Toxins*. EPA-600/R 92-079, 1992.
- Galey, F. D.; Beasley, V. R.; Carmichael, W. W.

Kleppe, G.; Hooser, S. B.; Haschek, W. M. *Am. J. Vet. Res.* **1987**, *48*, 1415.

- Pouria, S.; De Andrade, A.; Barbosa, J.; Cavalcanti, R. L.; Barreto, V. T. S.; Ward, C. J.; Prieser, W.; Poon, G. K.; Neild G. H.; Codd, G. A. *THE LANCET*. **1998**, *352*, 21.
- Botes, D. P.; Tainman, A. A.; Wessel, P. L.; Viljeon, C. C.; Kruger, M.; Williams, D. II.; Santikarn, S.; Smith, R. J.; Hammond, S. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1984**, *1*, 2311.
- Cho, K. S.; Kim, B. C.; Heo, W. M.; Cho, S. J. *Korean Journal of Limnology*. **1989**, *22(3)*, 179.
- Berg, K.; Carmichael, W. W.; Skulberg, O. M.; Benestad, C.; Underdal, B. *Hydrobiol.* **1987**, *144*, 97.
- Harada, K. I.; Matsura, K.; Suzake, M.; Oka, H.; Watanabe, M. F.; Oishi, S.; Dahlin, A. M.; Beasley, V. R.; Carmichael, W. W. *J. Chromatogr.* **1988**, *448*, 275.
- Poon, G. K.; Priestley, I. M.; Hunt, S. M.; Fawell, J. K.; Codd, G. A. *J. Chromatogr.* **1987**, *387*, 551.
- Rosellus, W.; Vitzthum, O.; Hubert, P.; *U. S. Patent 3843824*, **1974**, 22.
- Bowadt, S.; Johansson, B.; Wunderl, S.; Zennegg, M.; Alencastro, L. F.; Grandjean, D. *Anal. Chem.* **1995**, *67*, 2424.
- Steinheimer, T. R.; Pfeiffer, R. L.; Scoggin, K. D. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 645.
- Blanch, G. P.; Ibanez, E.; Herráiz, M.; Regiero, G. *Anal. Chem.* **1994**, *66*, 888.
- Pyo, D.; Park, K.; Shin, H.; Moon, M. *Chromatographia*. **1999**, *49*, 539.
- Pyo, D. J.; Song, K. S.; Yoon, S. C.; Kim, B. C.; Lee, D. W. *Journal of the Korean Chemical Society*. **1994**, *38(10)*, 741.
- Pyo, D.; Lee, M. *Chromatographia*. **1994**, *39(7-8)*, 427.