

모세관 전기영동을 이용한 박테리아의 분리

문병근 · 최규성 · 이상천 · 김용성*

경남 대학교 공과대학 화학공학부

(2003. 7. 16 접수)

Separation of Bacteria Using Capillary Electrophoresis

Byoung-geoun Moon, Kyu Seong Choi, Sang Chun Lee, and Yongseong Kim*

Division of Chemical Engineering, Kyungnam University, Masan 631-701, Korea

(Received July 16, 2003)

요약. 모세관 전기영동을 이용한 박테리아의 분석에 영향을 주는 다양한 실험적인 요인을 연구하였다. 여러 완충액 농도에서 gram-positive 박테리아에 비해 gram-negative 박테리아는 높은 전기장 하에서 다른 분리 거동을 보임을 확인하였다. 한편, 모세관 내부로 주입되는 박테리아의 농도에 따른 분리 효율의 차이가 연구되었다. 완충액에 존재하는 박테리아 시료의 농도가 비교적 높은 1.0 mg/ml일때 좋은 분리 효율이 얻어졌으며, 이것은 박테리아의 높은 농도에서 발생하는 focusing effect에 의한 결과로 보인다. 선형 고분자인 poly(ethylene)oxide(PEO), polyvinylpyrrolidone(PVP)와 가지형 고분자인 dextran을 크기와 형태적 차이로서 박테리아를 분리하기 위하여 테스트하였다. 다른 고분자와 달리 보다 유연하며 입체 장애가 적은 선형 고분자인 PEO를 포함하는 완충액에서 gram-positive 박테리아인 *Micrococcus lysodeikticus*와 gram-negative 박테리아인 *Aerobacter aerogenes*의 혼합물을 높은 효율로 분리하였다.

주제어: 모세관, 전기영동, 박테리아, 고분자

ABSTRACT. Various experimental factors that affect the separation of bacteria were investigated using capillary electrophoresis. At different buffer concentrations, gram-positive bacteria and gram-negative bacteria showed somewhat different migration behavior under high electric field. The separation efficiency was also investigated as a function of concentration of bacterium injected into the capillary. In order to separate bacteria as the difference of size and shape, water soluble polymers such as poly(ethylene)oxide (PEO), polyvinylpyrrolidone (PVP), and dextran were studied. PEO, which is more flexible and has lower steric hindrance, showed the best separation efficiency. The mixed bacteria sample of *Micrococcus lysodeikticus* as gram-positive bacteria and *Aerobacter aerogenes* as gram-negative bacteria were successfully analyzed with PEO.

Keywords: Capillary, Electrophoresis, Bacteria, Polymer

서 론

박테리아의 분리와 특성화에 대한 연구는 생명공학과 생물학의 영역에서 중요한 분야로서 발전되어 왔다. 박테리아 세포의 특성화에 대한 연구는: 성장 단계 (growth stage)와 성장 상태(growth condition)와 같은 여러 요인에 따른 표면 구성 성분의 변화에 대한 연구가 수행되었다.^{1,2}

미생물의 분리에 있어 최근 몇 년 동안 모세관 전기영동을 이용하여 박테리아를 빠르고 효율적으로 분리하기 위한 연구가 시도되었다. 모세관 전기영동은 박테리아의 분리에 있어, 낮은 시료 요구량, 높은 분해능, 빠른 분리 시간으로 인하여 효과적인 분석 기술로서 이용되어져 왔다.^{3,4} 몇 가지 사례를 보면 모세관 전기영동을 이용하여 요도관 염을 야기하는 *Escherichia coli*와 *Staphylococcus saprophyticus*가 분리되었고,⁵ 또한 의약

품 및 건강 보조 식품에 첨가되는 *Saccharomyces cerevisiae* 와 *Enterococcus faecalis*, *Bifidobacterium infantis*와 *Lactobacillus acidophilus*의 분리가 보고되었다.^{6,7}

모세관 전기영동을 이용하여 박테리아를 검출하는 경우 대부분 형태, 크기, 표면의 구성 성분들의 차이에 기반을 두고 있다.^{8,9} 그러나, 박테리아 표면의 구성 성분은 다양할 뿐만 아니라, 미생물은 실험적 변인(온도, pH, 완충액의 농도, 박테리아의 분산의 여부)에 의하여 직접적인 영향을 받는다.^{8,11} 이와 같은 다양한 변인에 의한 박테리아에 대한 영향은 모세관 전기영동을 이용한 미생물의 특성화 및 분리에 있어 반드시 고려되어야 한다.

박테리아와 같은 원핵 미생물의 경우, 표면 구성 성분의 차이에 따라 크게 gram-positive 박테리아와 gram-negative 박테리아로 나누어진다. 이러한 분류는 gram-stain이라고 부르는 특별한 staining 반응의 차이에 기반을 두고 있으며, 세포 벽 구조는 외형에서 상당한 차이를 보인다.¹¹ Gram-negative 박테리아는 peptidoglycan 과 더불어 lipopolysaccharide(LPS)와 단백질을 이루어진 복잡한 나중 층을 형성하고 있는 반면, gram-positive 박테리아의 경우 두꺼운 peptidoglycan의 단일 층으로 이루어져 있다. Gram-positive 박테리아와 gram-negative 박테리아는 화학적, 물리적으로 차이를 보이며, 외부 환경에 의한 영향에 대해 다른 반응을 보이게 된다. 그럼에도 불구하고 gram-positive 박테리아와 gram-negative 박테리아는 생리학적 pH에서 음 전하를 나타내며, 물리적 형태 및 크기에서 유사점이 관찰된다.^{8,11} 이러한 점들은 박테리아의 특성화 및 분리를 어렵게 만드는 중요한 요인으로 고려되어져 왔다. 특히, 미생물의 분리에 있어 실험적 변인들에 따른 분리 효율에 대한 자료와 연구가 부족한 편이다. 따라서, 이번 연구에서는 모세관 전기영동을 이용하여 완충액의 농도, 박테리아 시료의 농도와 시료에 대하여 형태적 선택성이 있는 고분자에 대한 박테리아의 거동의 변화가 연구되었다.

실 험

시약. *Aerobacter aerogenes*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus lysodeikticus*, *Escherichia coli*는 Sigma-Aldrich, Co.(St. Louis, MO, USA)에서 냉동 건조 상태로 구입되었다. Tris(hydroxymethyl)aminomethan(Tris), Boric acid, ethylenediaminetetraacetate(EDTA), poly(ethylene-

oxide(PEO, Mw = 600,000), dextran(Mw = 513,000), polyvinylpyrrolidone(PVP, Mw = 1,300,000), hydrochloric acid, potassium hydroxide은 Sigma-Aldrich, Co.에서 구입하였다. 실험에 사용된 75, 100 μ m fused silica capillary는 Polymicro Technologies(Phoenix, AZ, USA)에서 구입하였다. 실험에 사용된 물은 Milli-Q reagent water system을 통하여 탈 이온화하여 준비하였다.

기기의 구성. 모세관 전기영동에 사용된 CE system은 Lambda 1010 UV detector(Bischoff, Germany), Spellman high voltage power supply로 구성되었고 전류 측정을 위하여 DM-340 digital multimeter(MilTek, Korea)가 사용되었다. 모세관 세척을 위하여 diaphragm-type pump (Gast, OH, U.S.A)가 사용되었다. 완충액의 pH측정은 MP 220 pH meter(Mettler Toledo, Switzerland)를 사용하였다. 미생물의 분산 및 완충액 내의 기체를 제거하기 위해 1050 초음파 세척기(Chosun Scientific, Korea)를 사용하였다. 원심 분리에는 위하여 Micro 17TR (Hanil science industrial, Korea)을 사용하였다.

완충액의 농도에 따른 미생물 거동 변화. 90 mM Tris, 90 mM boric acid, 2 mM EDTA(1.0XTBE)를 증류수에 녹인 뒤 pH를 8.4로 조정된 완충액을 증류수로 0.8 X, 0.5 X, 0.3 X, 0.1 X, 8:1 diluted 0.05 X TBE의 농도가 되도록 희석하여 준비한다.

실험에 사용된 미생물 시료는 1.0 mg/ml의 농도가 되도록 준비된 농도의 완충액을 가한 뒤 mixing vortex에서 적절히 분산시켰다. 준비된 미생물 시료들은 12,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하고 다시 완충액을 가하여 혼합기에서 2분간, 초음파 세척기에서 3분간 분산시켰다. 다른 농도의 미생물 시료는 분산이 완료된 후 물척 사용하였다. Fused silica capillary는 polymicro technology의 내경 75 μ m 모세관을 사용하였고 모세관의 총 길이는 50 cm이며, window는 inlet 으로부터 40 cm에 만들었다. 모세관은 미생물의 분리 이전에 3분간 0.1 N 염산, 3차 증류수로 2분간, 1.0 N 수산화나트륨으로 2분 30초간 세척한 뒤 3차 증류수로 2분간, 완충액으로 2분간 세척하였다. 미생물 시료를 2.5 cm에서 5초간 siphoning으로 주입한 뒤 15 kV에서 214 nm의 파장에서 검출하였다.

박테리아 농도에 따른 분리 효율의 변화. 8:1로 희석된 0.05XTBE 완충액은 pH 8.4로 조정된 뒤, 1.0 mg/ml의 농도가 되도록 *Micrococcus lysodeikticus*에 가한 뒤 12,000 rpm에서 10분간 원심분리 한 뒤 상등액을 제거

하였다. 이 미생물 시료는 다시 8:1로 희석된 0.05XTBE 완충액을 이용하여 0.25, 0.17, 0.125 mg/ml의 농도가 되도록 희석하여 준비하였다. 그 이외의 실험 조건은 완충액의 농도에 따른 미생물 거동 변화에 대한 실험과 동일하다.

미생물의 크기와 형태적 특성에 선택성이 있는 물에 녹는 고분자의 준비, 8:1로 희석된 0.05XTBE 완충액 (pH 8.4)에 0.5%의 농도가 되도록 poly(ethylene)-oxide(PEO, Mw = 600,000), dextran(Mw = 513,000), polyvinylpyrrolidone(PVP, Mw = 1,300,000)를 각각 가하여 12시간 동안 녹인다. 여기에 8:1 희석된 0.05XTBE 완충액을 가하여 0.025%(PEO, PVP)의 농도가 되도록 희석시킨 뒤 적절히 분산하였다.

각각의 고분자와 미생물간의 선택성을 확인하기 위하여, 8:1로 희석된 완충액을 박테리아 시료에 가하여 1.0mg/ml의 농도가 되도록 분산된 *Micrococcus lysodeikticus*를 사용하였다.

결과 및 고찰

완충액의 농도에 따른 박테리아의 거동 변화, 박테리아의 형태학적 분류에 있어서 gram-staining의 차이에 따라 gram-positive 박테리아와 gram-negative 박테리아로 나뉘어 진다. 이러한 차이는 박테리아를 구성하는 유사한 화학적 성분의 조합의 차이에 의한 결과로서 박테리아의 크기 및 형태와 같은 물리적 특성을 부여한다.¹¹

모세관 전기영동을 이용한 분리에서 gram-positive 박테리아와 gram-negative 박테리아는 완충액의 농도에 따라 다른 거동이 관찰되었다. 0.1XTBE 완충액에서 gram-positive 박테리아인 *Micrococcus lysodeikticus*와 gram-negative 박테리아인 *Escherichia coli*, *Aerobacter aerogenes*, *Pseudomonas fluorescens*의 경우 서로 다른 거동이 관찰된다. Fig. 1에서 gram-positive 박테리아인 *Micrococcus lysodeikticus*(Fig. 1a)의 경우에는 비교적 안정한 단일 peak이 관찰되는 반면, gram-negative 박테리아에서는 안정한 단일 peak(*Aerobacter aerogenes*: Fig. 1b) 이외에도 불안정한 peak(*Escherichia coli*: Fig. 1c, *Pseudomonas fluorescens*: Fig. 1d)들이 관찰되었다. Gram-negative 박테리아인 *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*의 결과에서 관찰되는 불안정한 peak들은 박테리아 표면에 존재하는 구성 물질인 peptidoglycan의 해리의 결과로 여겨진다.¹² Gram-positive 박테리아의 경

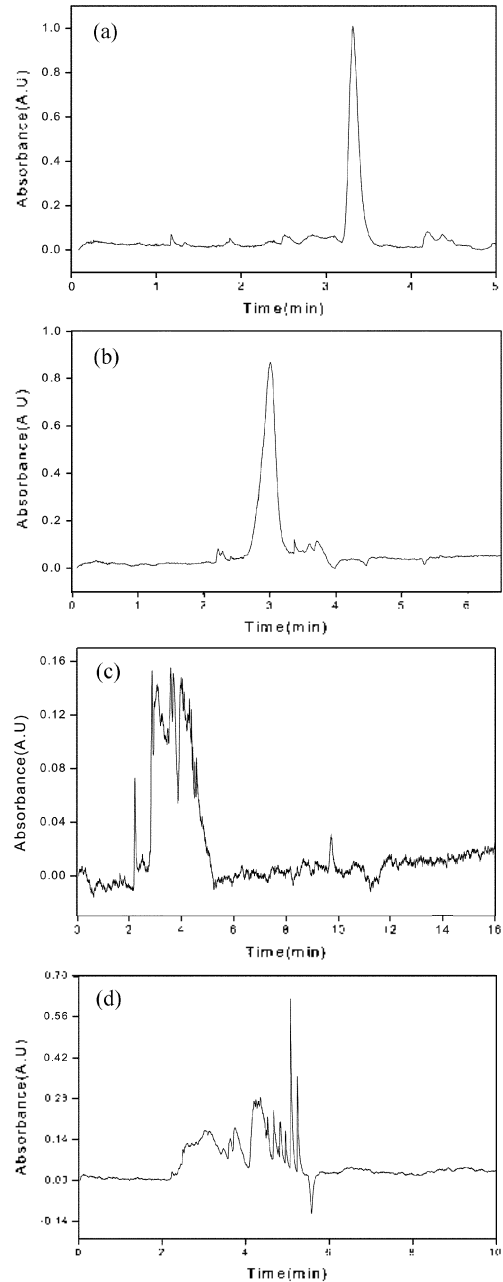


Fig. 1. Electropherograms of *Micrococcus lysodeikticus* (Fig. 1a), *Aerobacter aerogenes* (Fig. 1b), *Escherichia coli* (Fig. 1c) and *Pseudomonas fluorescens* (Fig. 1d). Bacteria samples were dissolved in 0.1XTBE buffer at the concentration of 1.0 mg/ml. The running buffer consisted of 9.0 mM Tris, 9.0 mM boric acid, and 0.2 mM EDTA (pH 8.4). Conditions: fused silica capillary, 75 μ m i.d. 50 cm total length, 40 cm effective length, +15 kV running voltage, room temperature, siphoning injection at 2.5 cm for 5 sec.

우 표면의 구성 성분 중 peptidoglycan의 비율이 약 90%를 차지하는 반면, gram-negative 박테리아는 약 10% 정도의 peptidoglycan이 존재한다. 완충액의 농도가 비교적 높을 경우 높은 전류의 발생으로 인한 주열(Joule heating)에 기인하며, 그 결과 모세관 내부에서 발생하는 열의 영향에 의한 박테리아의 표면에 손상이 발생하게 되고 gram-negative 박테리아의 경우 더욱 영향을 받게 되는 것으로 생각된다. 한편, Gram-negative 박테리아인 *Aerobacter aerogenes*의 경우 0.1XTBE 완충액에서 *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*와 달리 비교적 안정된 단일 peak이 관찰되었는데 이러한 현상은 세포벽에 존재하는 peptidoglycan의 비율이 *Aerobacter aerogenes*의 경우 비교적 높다는 것을 의미한다.

0.1XTBE 완충액에서 안정된 gram-positive 박테리아인 *Micrococcus lysodeikticus*와 gram-negative 박테리아인 *Aerobacter aerogenes*의 경우 보다 높은 농도인 1.0XTBE 완충액에서 거동의 차이가 관찰되었다. 일반적으로 모세관 내부의 완충액의 농도가 증가하면 같은 전기장에서 발생하는 주열 열도 높아지는 것이 잘 알려져

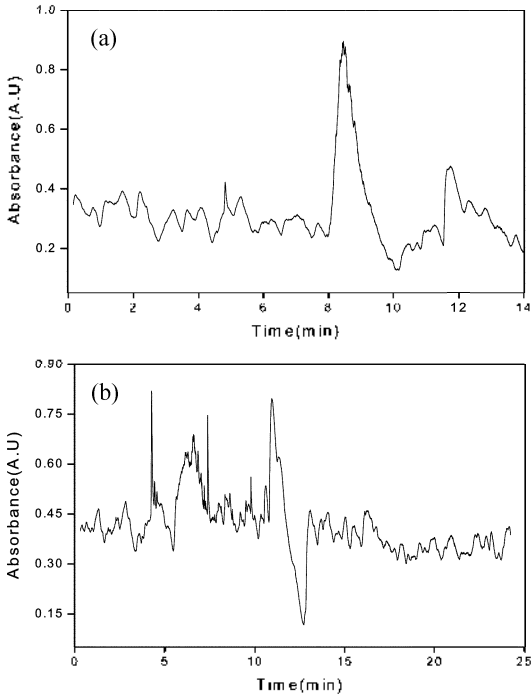


Fig. 2. The electropherogram of *Micrococcus lysodeikticus* (Fig. 2a) and *Aerobacter aerogenes* (Fig. 2b). Bacteria samples were dissolved in 1.0XTBE buffer. The running buffer consisted of 90 mM Tris, 90 mM boric acid, and 2.0 mM EDTA. Other conditions were the same as in Fig. 1.

져 있다. 1.0XTBE 완충액에서 gram-positive 박테리아인 *Micrococcus lysodeikticus*(Fig. 2a)는 비교적 안정한 단일 peak이 관찰되지만, 모세관 내부에서 발생하는 주열 열에 의한 박테리아의 손상과 연관된 peak의 불안정성의 견지에서 gram-negative 박테리아인 *Aerobacter aerogenes*(Fig. 2b)와 같이 심각해 보이지 않는다. *Aerobacter aerogenes*에서 관찰되는 불안정한 peak들은 박테리아 표면으로부터 해리된 구성 물질의 검출에 의한 결과이다. 이러한 현상은 gram-positive 박테리아와 gram-negative 박테리아의 열적 손상과 연관된 peptidoglycan의 비율의 차이에 의한 것으로 보여진다.

박테리아 농도와 분리 효율간의 관계. Fig. 3: *Micrococcus lysodeikticus* 농도에 따른 분리 효율의 차이를 보여 준다. 실험에서 사용한 여러 농도 중에서 1.0 mg/ml 일때 가장 높은 분리 효율(이론 단수, 4.3×10^4)을 보이는 반면 농도가 낮아짐에 따라 분리 효율의 감소가 관찰되었다.

박테리아들은 중성이나 약 알칼리성 완충액 하에서 콜로이드성 입자인 hairy particle로서 인식된다.^{13,14} 박테리아의 순 전하(net charge)는 이러한 완충액에서 음전하를 띠며 모세관 전기영동에서 박테리아의 시료 구역은 낮은 전도도를 가지게 된다. 이러한 시료 구역은 일시적으로 구역의 전, 후에 걸쳐 음극 면(cathode side)에는 양 전하(cation)가 양극 면(anode side)에서는 음전하(anion)가 집중되는 현상이 발생한다. 이러한 결과, 시료 구역의 집중이 발생하게 된다.¹⁴ 따라서, 박테리아의 농도가 높을수록 시료 구역의 집중(focusing)이 발생할 확률은 증가된다. 그와 더불어, 모세관 내부로 주입된 박테리아들의 방향성에 따라 이동도의 차이를 보이게 되는데, 이 결과 서로 다른 방향성을 갖는 박테리아들의 충돌의 결과로서 시료 구역의 집중이 발생하게 된

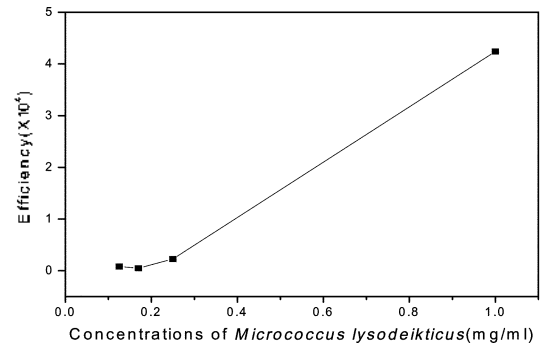


Fig. 3. The separation efficiency (the number of theoretical plate) as a function of concentration of *Micrococcus lysodeikticus*.

다.^{13,15} 이러한 시료 구역의 집중은 박테리아의 농도가 높을수록 더욱 영향을 받게 되며 순차적으로 높은 분리 효율로 이어진다.

박테리아의 형태적 특성에 선택성이 있는 고분자의 선택, 박테리아의 형태적 특성에 따른 분리물 위하여 sieving matrix로서 수용성 고분자를 포함하는 완충액을 이용하게 되는데, 고분자의 화학적 특성에 따른 분리 효율의 차이를 연구하였다.

Fig. 4는 수용성 고분자로서 선형 고분자(linear type polymer)인 poly(ethylene)oxide (PEO), polyvinylpyrrolidone (PVP)와 가지형 고분자(branch type polymer)인 dextran을 포함하는 완충액에서 *Micrococcus lysodeikticus*의 electropherogram을 보여주고 있다.

선형 고분자인 poly(ethylene)oxide(PEO)의 경우(Fig. 4a) 가장 높은 분리 효율이 관찰되었다. 이러한 현상은 고분자의 유연성과 관계하는 것으로 생각된다. Dextran과 같은 가지형 고분자인 경우(Fig. 4c) 선형 고분자에 비하여 유연성이 떨어진다.^{16,17} 낮은 유연성을 갖는 가지형 고분자인 dextran의 경우 박테리아 표면과 화학적 상호 작용(친수성, 소수성)의 가능성은 적다. 반면, 선형 고분자인 poly(ethylene)oxide(PEO)는 박테리아와의 높은 화학적 상호 작용(친수성, 소수성 반응)의 결과로 인하여 박테리아에 대하여 형태적 선택성을 가지게 된다. 그러나, 같은 선형 고분자인 polyvinylpyrrolidone(PVP)의 경우 낮은 분리 효율을 보이는데(Fig. 4b), 이러한 현상은 고분자의 유연성과 더불어 pyrrolidone 그룹의 입체 장애가 박테리아에 대한 형태적 선택성에 중요한 영향을 주는 것으로 생각된다. 뿐만 아니라, polyvinylpyrrolidone(PVP)는 박테리아를 검출하기 위해 사용되는 파장인 214 nm 근처에서 UV를 흡수하므로 박테리아의 검출에 있어서 검출 한계에 영향을 줄 수 있다.¹⁸ 본 실험에서는, 박테리아의 형태적 특성에 대하여 선택성이 있는 고분자로서 poly(ethylene)oxide (PEO)가 박테리아의 분리에 최적임을 알 수 있었다.

혼합 박테리아의 분리. Fig. 5은 두 가지 혼합 박테리아(*Micrococcus lysodeikticus*, *Aerobacter aerogenes*)의 분리를 보여준다. 박테리아의 효율적 분리를 위해 박테리아의 형태적 특성에 선택성이 있는 고분자인 poly(ethylene)oxide(PEO)는 8:1로 희석된 0.05 XTBE 완충액에 녹여 준비하였다.

Fig. 5은 구형의 gram-positive 박테리아인 *Micrococcus lysodeikticus*(약 7.8분)와 막대 모양의 gram-negative 박

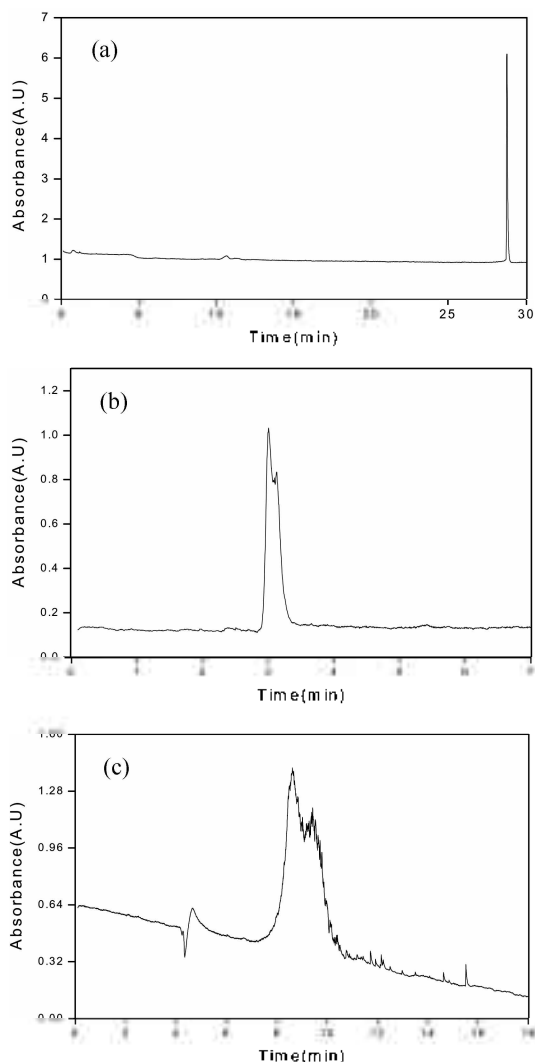


Fig. 4. The electropherograms of *Micrococcus lysodeikticus* in 8:1 diluted 0.05XTBE with 0.02 5% PEO (Fig. 4a), 0.025% PVP (Fig. 4b), 0.5% dextran (Fig. 4c). Running buffer was diluted 8:1 from 0.05XTBE buffer (4.5 mM TRIS, 4.5 mM boric acid, 0.1mM EDTA), 1.0 μ m i.d. fused silica capillary was used for the separation. Other conditions were the same as in Fig. 1.

테리아인 *Aerobacter aerogenes*(약 9.7분)가 poly(ethylene)oxide(PEO)가 포함된 완충액에서 성공적으로 분리가 되고 있음을 보여 준다. 이러한 결과는 모세관 전기영동이 미생물의 분석에 효과적인 방법이 될 수 있음을 보여주는 것이다.

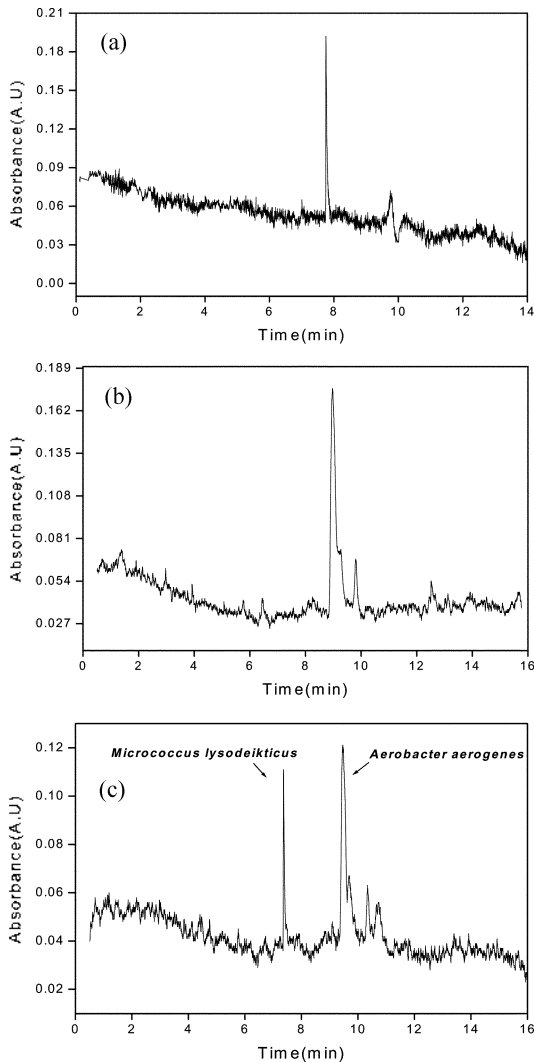


Fig. 5. Electropherograms of *Micrococcus lysodeikticus* (Fig. 5a), *Aerobacter aerogenes* (Fig. 5b), and the mixed sample (Fig. 5c) of *Micrococcus lysodeikticus* and *Aerobacter aerogenes*. The concentration of each bacterium was 0.5 mg/ml. Other conditions were the same as in Fig. 4.

결 론

높은 전기장 하에서 완충액의 농도가 증가함에 따라 증가되는: 주울 열(Joule heating)로 인하여 gram-positive 박테리아와 gram-negative 박테리아는 서로 다른 거동을 보이는 것을 확인하였다. 또한, 같은 gram-negative 박테리아라 할지라도 완충액의 농도의 변화에 따라 서로 다른 거동이 관찰되었다. 이러한 결과는 박테리아의

안정성과 연관된 박테리아의 표면 구성 성분 중 하나인 peptidoglycan의 비율의 차이에 의한 것으로 추정된다.

모세관 전기 영동을 이용한 박테리아의 분리에서 모세관 내부로 주입되는 박테리아의 농도가 높을수록 좋은 효율을 보였다. 이러한 현상은 중성에 가까운 완충액 하에서 박테리아들은 hairy particle로서의 집중 뿐만 아니라, 주입된 박테리아의 방향성의 차이에 의한 시료 구역의 집중에 기인한다.

박테리아의 크기와 형태에 대한 선택성이 있는 고분자로서 선형 고분자인 poly(ethylene)oxide(PEO)가 가장 좋은 분리 효율을 나타내었다. 이러한 현상은 PEO의 높은 유연성과 적은 입체 장애로 인한 박테리아와 PEO간의 화학적 상호작용(친수성, 소수성 반응)의 결과이다.

이번 연구는 모세관 전기 영동이 박테리아의 분석에 효율적인 방법임을 보여주고 있으며 이러한 기술을 응용한 박테리아의 환경 모니터링, 병원성 미생물의 조기 진단 등의 연구가 진행 중에 있다.

본 연구는: "한국과학재단 목적기초연구(R05-2001-000-00238-0(2002))" 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

인 용 문 헌

1. Meyer, L. S.; *J. Bacteriol.* **1936**, *32*, 433.
2. Sonohara, R.; Muramatsu, N.; Oshima, H.; Kondo, T. *Biophys. Chem.* **1995**, *55*, 273.
3. Armstrong, D. W.; Schulte, G.; Schneiderheinze, J. M.; Westenberg, D. J. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5465.
4. Henny, C.; Mei, V. D.; Busscher, H. J. *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 491.
5. Armstrong, D. W.; Schneiderheinze, J. M. *Anal. Chem.* **2000**, *72*, 4474.
6. Armstrong, E. W.; Schneiderheinze, J. M.; Kullman, J. P.; He, L. *FEMS. Microbiol. letters.* **2001**, *194*, 33.
7. Moon, B. G.; Kim, Y. Submitted to *Bull. Korean Chem. Soc.* **2003**.
8. Armstrong, D. W.; Schulte, G.; Schneiderheinze, J. M.; Westenberg, D. J. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 5465.
9. Armstrong, D. W.; He, L. *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 4551.
10. Moon, B. G.; Lee, Y.; Kang, S. H.; Kim, Y. *Bull. Korean Chem. Soc.* **2003**, *24*, 81.
11. Brock, T. D.; Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J. *Prentice-Hall International, Inc.* **1994**, 58.
12. Pfätsch, A.; Wölsch, T.; Fresenius, J. *Anal. Chem.* **1997**.

- 359, 198.
13. Glynn, J. R.; Belongia, B. M.; Arnold, R. G.; Ogden, K. L.; Baygents, J. C. *Appl. Environ. Microbiol.* **1998**, *64*, 2572.
14. Armstrong, D. W.; Marco, G.; He, L.; Michael, A. R.; Wei, W.; Jinjian, Z.; Yeung, F. S. *Anal. Chem.* **2002**, *74*, 5523.
15. Grossman, P. D.; Soane, D. S. *Anal. Chem.* **1990**, *62*, 1592.
16. Guttman, A.; Horvath, J.; Cooke, N. *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 199.
17. Kim, Y.; Yeung, E. S. *J. Chromatogr. A.* **1997**, *781*, 315.
18. Ganzler, K.; Greve, K. S.; Cohen, A. S.; Kuger, B. L.; Guttman, A.; Cooke, N. C. *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 2665.
-