

Capillary Zone Electrophoresis에서 Deoxyribonucleotides의 분리

노 경 호

인하대학교 화학공학과
(1994년 10월 1일 접수, 1994년 12월 12일 채택)

Separation of Deoxyribonucleotides by Capillary Zone Electrophoresis

Kyung Ho Row

Dept. of Chem. Eng., Inha University
(Received 1 October 1994; accepted 12 December 1994)

요 약

Capillary zone electrophoresis에서 organic modifier로서 isopropanol을 첨가하는 경우와 계면활성제로서 사용된 sodium dodecyl sulfate(SDS)의 농도에 따라서 4개의 deoxyribonucleotides(dAmp, dGmp, dTnp, dCmp)의 분리도에 미치는 영향을 고찰하였다. 실험기기는 60 μ m i.d. fused silica tubing(68.5 cm 길이), 고압 전원 공급기, UV 검지기(254 nm)로 구성되어 있다. 최적의 이동상을 구하기 위해서 서로 조성이 다른 8개의 이동상에 따라서 분리도에 미치는 영향을 살펴보았다. 실험결과에 의하면 0.05 M SDS, phosphate, Tris로 구성된 이동상이 가장 좋은 분리도를 보여 주었고 관의 효율(이론 단위)과 분리도는 분리전압에 의해서 영향을 받았다.

Abstract—The effects of the addition of isopropanol as a organic modifier and the effects of concentration of sodium dodecyl sulfate(SDS) in capillary zone electrophoresis are discussed in terms of resolution using the four deoxyribonucleotides of dAmp, dGmp, dTnp, and dCmp. The system is consisted of a 60 μ m i.d. fused silica tubing(68.5 cm column length), a high-voltage power supply, and an UV detector set at 254 nm. The effects of the eight different mobile phases on the column efficiency and resolution were compared to find the optimum mobile phase. The experimental results showed that the mobile phase of phosphate/Tris with 0.05 M SDS was most suitable for the separation of the components and the column efficiency(Number of theoretical plates) and resolution were affected by the separation voltage.

1. 서 론

최근에 첨단 유전공학의 발전과 함께 biopolymer-adducts에 대한 관심이 높아지고 있다. 이러한 물질들은 비교적 낮은 농도($1 \text{ adducts}/10^{10} \text{ base pairs}$)로 존재하기 때문에 분석을 위해서는 높은 감도가 있어야 하고 시료와의 선택성이 고려되어야 하기 때문에 정밀한 방법이 필요하다. Capillary zone electrophoresis(CZE)는 전하를 띤 입자 즉 biopolymer에 대해서 탁월한 분리

능력을 보여 주고 있기 때문에 현재 널리 사용되고 있는 대표적인 분석기기이다[1-3]. 기존의 전기영동장치에 비해서 내경이 매우 작은 관(10-300 μ m i.d.)을 사용하기 때문에 우수한 분리 효율을 얻을 수 있어서 기존 크로마토그래피에 비해서 분리능력이 탁월하다. 또한 보통 nl정도의 매우 작은 원료의 양으로도 충분히 분석이 가능하다는 장점을 갖고 있다.

이동상에 organic modifier를 사용하여 용출범위를 확장시켜서 전하를 띠지 않은 물질에 대해서 분리효율을

Table 1. Types of mobile phases used in this work

Mobile phase no.	Na ₂ HPO ₄	Na ₂ B ₄ O ₇ ·10H ₂ O	Tris	Organic modifier	SDS
#1	0.01	0.006			
#2	0.01	0.006			
#3	0.01	0.006		isopropanol, 1.0%*	
#4	0.005		0.02	acetonitrile, 5.0%*	
#5	0.005		0.02		0.05
#6	0.005	0.02		isopropanol, 0.5%*	0.05
#7	0.005		0.02	7 M urea	0.05
#8	0.01	0.006			0.05

*: by volume %
(unit = M)

높이는데 이용한 보고가 있다[4]. CZE에서는 주로 크기의 차이로 인한 중성 용질의 viscous drag의 차이로 분리를 한다. 그러나 이러한 차이는 크지 않기 때문에 중성물질을 분리하는데 효율적이지 못하고 계면활성제 등을 첨가하여 체류시간을 조절하여 분리효율을 증가시킨다. 이 계면활성제 중에서 관심을 모으는 것이 sodium dodecyl sulfate(SDS)이다. 이 물질을 이동상에 critical micelle concentration(CMC) 이상을 넣으면 micelle가 생성되고 이동상과 micelle의 소수성 내부 사이에 미분의 분배 차이로 인해서 물질이 분리된다[5, 6].

핵산은 살아있는 세포의 증식에서 중심적인 역할을 한다. DNA(deoxyribonucleic acid)는 유전정보를 저장하고 보존하며 RNA(ribonucleic acid)는 단백질 합성에 중심적인 역할을 한다. 이러한 DNA와 RNA는 상응하는 nucleotide로 만들어진 중합체이다. 따라서 nucleotide는 DNA와 RNA를 구성하는 기본요소가 되며 정밀한 정성 및 정량분석은 유전공학에서 매우 중요하다. 4개의 deoxyribonucleotides를 분리하는데 최적의 이동상을 구하기 위해서 이동상의 조성을 변화시켰다. Isopropanol 또는 acetonitrile 등의 organic modifier와 sodium dodecyl sulfate(SDS)의 계면활성제를 추가하여 여러 이동상에 대해서 관의 효율(이론 단위)과 분리도를 조사하여 가장 적합한 이동상을 찾은 것이 본 연구의 목적이다.

2. 실험

2-1. 시약

실험에 사용한 deoxyribonucleotides는 Pharmacia Chemical Co.에서 구입한 2'-deoxyadenosine-5'-monophosphate(dAmp), 2'-deoxyguanosine-5'-monophosphate(dGmp), 2'-deoxycytidine-5'-monophosphate(dCmp), 2'-deoxythymidine-5'-monophosphate(dTnp)이다. 이

밖의 시약인 SDS, Tris, 완충용액인 sodium tetraborate and sodium phosphate는 Aldrich Chemical Co.에서 구입하였고 isopropanol과 acetonitrile은 Burdick & Jackson Lab. Inc.에서 구입한 것을 더 이상의 정제없이 사용하였다.

2-2. 실험장치 및 방법

관은 60 μ m i.d. fused silica tubing(SGE, Inc.)이고 유효길이는 68.5 cm이다. 고압전원기(Hipotronics Co.)는 40 kV까지 조절할 수 있다. 관의 양단을 각기 이동상이 포함되어 있는 저장조에 담그고 출구쪽의 일부 표면을 벗겨내서 254 nm에서 고정된 UV 검지기(JASCO UVIDEC-100-III)에 설치하였다[7].

실험에 사용된 관은 몇 시간 또는 밤새동안에 0.1 M HCl을 사용하여 세척하였고 이후에 한시간 동안 증류수와 해당 이동상을 흘려주었다. 관에 원료를 주입하는 방법은 electroinjection을 사용하였다[8, 9]. 원료를 관 내에 주입시의 실험조건은 전압이 5 kV, 주입시간은 5 sec로 일정하게 유지하였다. 관은 실험과 실험사이에 수시로 해당 이동상으로 세척하여 전류와 물질의 체류시간에 대한 재생성이 유지되도록 하였다. Table 1에서는 deoxyribonucleotide를 분리하기 위한 최적의 이동상을 구하기 위해서 본 실험에 사용된 이동상의 종류와 조성을 보여 주고 있다.

성분 i에 대한 이론 단위(Number of Theoretical Plates, N)는 기준선에서의 peak width(W_i , in sec)와 체류시간(T_{ri} , in sec)을 사용하여 다음식에 의해서 구하였고 이는 관의 효율을 나타낸다. 이론 단수가 많은 peak는 관의 효율이 높아서 peak width가 좁아지게 된다.

$$N = 16(T_{ri}/W_i)^2 \quad (1)$$

두개의 peak(성분 i와 j)사이의 분리도(resolution)는

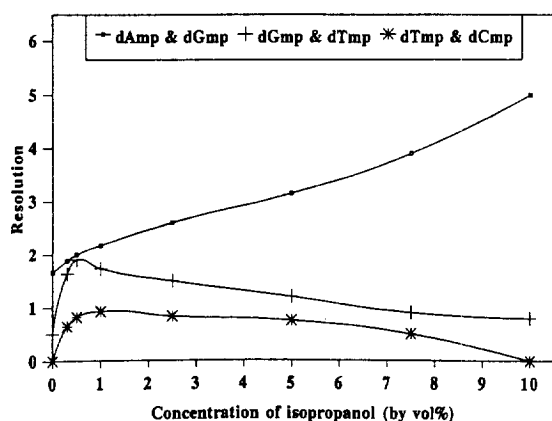


Fig. 1. Effect of concentration of isopropanol on resolution.

(0.01 M Na_2HPO_4 /0.006 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ buffer, 38 kV separation voltage)

다음 관계식에 의해서 구하였다. 두 peak의 체류시간의 차이가 크고 각기의 peak width가 작으면 분리도가 좋게 된다.

$$R_{ij} = 2(T_n - T_r) / (W_j + W_i) \quad (2)$$

3. 결과 및 고찰

본 실험에 사용된 모든 이동상에 대해서 상대적인 용출 순서는 변하지 않았으며 체류시간이 빠른 순서는 $dAmp < dGmp < dTnp < dCmp$. Purine이전의 pyrimidine의 용출 순서는 nucleic bases와 nucleosides에서도 관찰되었다[7]. 이는 또한 역상 액체 크로마토그래피에서의 용출순서와도 일치한다[10]. Purines의 체류시간이 pyrimidines 보다 긴 것은 이동상에서 용해도가 크기 때문이다. 따라서 dAmp와 dGmp는 dTnp와 dCmp 보다 빨리 용출된다. 이는 purine groups(two aromatic rings)과 pyrimidine groups(one aromatic ring)의 구조적 특성에 의한 차이이다. Deoxyribonucleotide에 있는 acidic phosphate group은 이동상 내에서 이온화되어 음전하를 띠게 된다.

3-1. Isopropanol의 영향

적절한 organic modifier를 선정함으로써 체류시간과 관의 효율을 조절하여 원하는 물질에 대한 분리를 할 수 있게 된다[11]. Fig. 1에서는 분리전압이 38 kV에서 organic modifier를 isopropanol을 사용한 경우 첨가된 양에 따라서 분리도에 미치는 영향을 보여 주고 있다. Borate/phosphate buffer에 isopropanol이 첨가되지 않

Table 2. Effects of mobile phases on Number of Theoretical Plates(N)

Mobile phase no.	Separation voltage (kV)	Number of Theoretical Plates(N)			
		dAmp	dGmp	dTnp	dCmp
#1	15	36900	*	*	*
#2		99200	104600	*	*
#3		86300	76100	*	*
#4		59600	54300	37100	50600
#5		59500	31900	22600	25100
#6		60600	37500	*	*
#7		37500	26000	*	*
#8		116700	*	*	*
#1	30	26200	29800	*	*
#2		91300	69400	97000	33000
#3		53500	46300	11700	31000
#4		41900	44500	8000	36100
#5		32900	31000	29900	45400
#6		57600	28100	36700	55100
#7		25500	22500	23500	33700
#8		90000	52300	*	*
#1	38	23800	25900	*	*
#2		34700	27500	76200	15800
#3		48100	35300	67200	33600
#4		30700	12400	6400	27500
#5		26700	30800	21900	43700
#6		35100	25600	30900	42500
#7		20200	10000	9200	31000
#8		15100	9800	29600	31000

*: coeluting peaks

는 경우에는 dAmp와 dGmp만이 분리되었다. Isopropanol 농도를 1%까지 증가함에 따라서 분리도가 증가되고 심지어 1% 이상에서도 dAmp와 dGmp사이의 분리는 더 잘 되고 있다. 이는 viscous drag에 의해서 purine이 포함된 물질의 electrophoretic mobility가 낮아지는데 기인한다. Isopropanol의 농도가 증가함에 따라서 다른 두 분리도가 감소하는 것은 상대적으로 높은 isopropanol의 농도로 인해서 pyrimidine 또는 pyrimidine이 포함된 물질에서는 이동상 중에서 적절하게 분배되지 못하고 electro-diffusion에 의해서 peak band가 커져서 분리도가 낮아지게 된다. 38 kV의 분리전압에서 borate/phosphate buffer를 사용하는 경우 dAmp의 이론단수는 23800이지만 1% isopropanol을 첨가하여 이론 단수를 34700까지 증가시켰다(참조 Table 2). 1% 이하의 isopropanol을 첨가하면 체류시간은 거의 변하지 않는다. 이러한 작은 양의 isopropanol을 첨가하면 peak의 폭이 작아지기 때문에 보다 개선된 분리도를 얻게 된다. 1% 이상에서는 전류가 증가하고 체류시간이 감소한다.

Table 3. Effects of SDS concentration on Number of Theoretical Plates(N)

Components	SDS concentrations			
	0.008 M	0.05 M	0.075 M	0.10 M
dAmp	190400	80700	100700	43500
dGmp	*	*	87900	35200
dTmp	103700*	26000*	117000	48300
dCmp	*	*	159000	62700

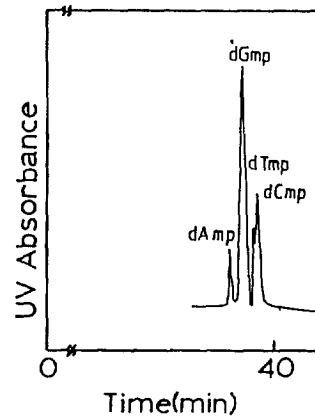
*: coeluting peaks(dGmp+dTmp+dCmp)

(Separation voltage=10 kV)

Isopropanol의 양이 증가함에 따라서 물질들을 결합해서 국지적인 점도를 증가시키고 따라서 물질전달 속도를 감소시키기 때문이다.

3-2. SDS의 농도에 따른 영향

Deoxyribonucleotide는 이동상 내에서 음전하를 띠기 때문에 electrophoretic mobility의 차이로 인한 분리가 가능하게 된다. Cohen 등은 이동상에 금속이온을 첨가하여 6개의 oligonucleotide와 8개의 base를 분리하였다 [12]. 사용이 가능한 계면활성제는 SDS 뿐만 아니라 sodium decylsulfate(STS), dodecyltrimethyl ammonium chloride(DATC), cetyltrimethylammonium chloride(CATC) 등이 사용되었지만 이 중에서 SDS가 nucleic acid를 분리하는데 가장 좋은 결과를 얻었다[13]. 이동상에 SDS를 첨가하는 경우에 가장 용출범위를 제한하기 때문이다. 이러한 특징을 이용하기 위해서는 SDS 농도에 대해서 최적화할 필요가 있다. 본 실험에서는 0.01 M Na_2HPO_4 와 0.006 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 의 완충용액에 첨가한 SDS 농도의 범위는 0.008-0.1 M이다. SDS의 CMC는 0.008 M이다[14]. Table 3은 SDS 농도에 따른 각 물질에 대한 이론 단수를 보여 주고 있다. SDS 농도가 0.008 M과 0.05 M에서는 dAmp만이 분리되었기 때문에 dGmp, dTmp, dCmp는 분리되지 않은 중첩된 한개의 peak에 대해서 이론단수를 계산하였다. 그러나 0.008 M에서 dAmp의 이론단수가 제일 큰 것은 흥미 있는 현상이다. dAmp는 나머지 세 물질과는 달리 낮은 0.008 M SDS농도에서 생성되는 micelle로의 물질전달의 영향을 거의 받지 않고 용출되었기 때문이다. 낮은 SDS 농도에서는 나머지 세 물질을 분리시키지 못했으나 SDS 농도를 0.075, 0.1 M로 증가시키기에 따라서 나머지 세 물질을 분리할 수 있게 되었다. 0.075 M SDS농도에서는 낮은 농도에 비해서 단위 부피당 micelle이 많아 micelle 입자간의 거리를 실제적으로 감소시켜서 이동상에서 물질전달의 저항으로 band가 좁아지게 된다. 이는 액체 크로마토그래피에서 입자의 크기가 작은

**Fig. 2. Electrophoretic separations of deoxyribonucleotides.**

(0.075 M SDS in 0.01 M Na_2HPO_4 /0.006 M $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ buffer, 10 kV separation voltage)

것이 효율이 좋은 것과 같다. 그러나 0.1 M SDS농도로 증가함에 따라서 체류시간의 감소로 인해서 이론단수가 감소하게 된다[7]. 이 농도에서 체류시간이 감소하는 것은 전하를 띤 물질의 농도가 증가하여 생기게 되는 Joule heating으로 관의 온도가 증가하고 모세관으로서 열을 효율적으로 발산시키지 못하기 때문이다. 특히 체류시간이 긴 mononucleotides에 대해서는 base 또는 nucleoside에 비해서 이러한 현상이 두드러지게 된다. 관에 체류하는 동안 온도의 증가로 인해서 이동상의 점도가 감소하여 빨리 용출된다. 또한 관의 내부에 온도 구배 곡선을 만들어서 이론단수를 감소시킨다. 관의 온도증가는 SDS의 CMC를 증가시키며 이는 SDS 농도를 증가시키는 효과를 상쇄시킨다. SDS 농도가 0.1 M 이상이 되면 모세관 내의 전류가 일정하지 않으며 동일 실험에서 재생성이 상당히 좋지 않았다. 따라서 SDS의 최적 농도는 0.075 M이며, 이 실험조건에서 4개의 mononucleotide에 대한 chromatogram이 Fig. 2에 나타나 있다. 두개의 peaks(dTmp, dCmp)는 부분적으로 분리가 되었다. SDS 농도만을 변화시켜서 4개의 mononucleotide를 분리시키는 한계가 있었다. 이 두 물질의 분리를 개선하기 위해서 organic modifier를 첨가하거나 이동상의 조성을 변화시켰다.

3-3. 이동상의 조성분과 분리전압의 영향

Table 1에서 보는 바와 같이 실험에 사용된 8개 이동상의 조성이 나타나 있다. 완충용액으로 sodium phosphate와 sodium borate 또는 Tris(trishydroxymethylaminomethane)을 혼합하였다. Isopropanol, acetonitri-

Table 4. Effects of mobile phases on resolution(R)

Mobile phase no.	Separation voltage(kV)	R ₁	R ₂	R ₃
#1	15	*	*	*
#2		3.64	*	*
#3		2.71	*	*
#4		1.40	11.18	0.64
#5		4.80	13.50	2.00
#6		2.57	*	*
#7		1.68	*	*
#8		*	*	*
#1	30	1.27	*	*
#2		3.18	1.71	0.67
#3		3.17	2.27	0.37
#4		1.63	7.76	0.91
#5		2.69	6.29	1.11
#6		1.63	4.00	0.80
#7		1.60	3.57	0.62
#8		0.47	*	*
#1	38	1.67	*	*
#2		2.17	1.67	0.92
#3		1.36	1.90	0.91
#4		1.88	8.00	1.10
#5		2.30	1.76	1.54
#6		1.20	1.50	1.00
#7		1.60	2.07	0.95
#8		1.33	0.74	0.50

R₁=resolution between dAmp and dGmpR₂=resolution between dGmp and dTmpR₃=resolution between dTmp and dCmp

*: coeluting peaks

Table 5. Effects of separation voltage on resolution(R)

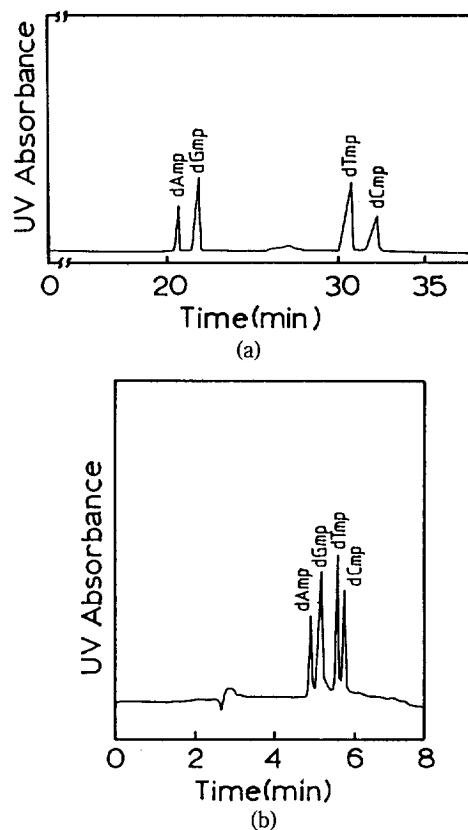
Pairs	R _{ij}			
	Separation voltage(kV)			
	5	10	25	30
dAmp/dGmp	1.20	1.94	3.82	4.02
dGmp/dTmp	1.19	1.38	*	*
dTtmp/dCmp	0.67	0.77	**	**

*: partially coeluting peaks

**: coeluting peaks

(SDS concentration: 0.075 M)

le, urea 중의 하나를 organic modifier로 사용하였으며 SDS를 계면활성제로 사용하였다. 관을 통과하는 이동상의 선속도는 electric field strength에 의해서 결정되기 때문에 분리전압이 높으면 체류시간이 감소하게 된다. 실험결과에 의하면 phosphate/borate만으로 구성된 이동상 #1이 전체 이동상 중에서 가장 빠른 체류시간을

**Fig. 3. Electrophoretic separations of deoxyribonucleotides.**

Mobile phase #5, separation voltage: (a) 15 kV,

(b) 38 kV

갖고 있으며 organic modifier 또는 계면활성제를 첨가함에 따라서 체류시간이 2배까지 길어졌다.

이론 단수에 의해서 표시된 관의 효율은 사용된 이동상에 의해서 크게 의존한다. Table 2에서는 이러한 의존도를 보여 주고 있다. 이동상 #4, 5에서만 세개의 분리전압에서 네개의 분리된 성분에 대한 이론단수를 계산할 수 있었다. 일부 물질에 따라서는 118700 이론단수까지 얻었는데 이는 m당 170000에 해당된다. 일반적으로 임의의 이동상에서 분리전압이 증가함에 따라서 짧은 체류시간으로 인한 관의 효율이 감소하였다.

Table 4에서는 이동상에 따라 각기 인근 물질에 대한 분리도를 계산한 결과이다. Tris를 포함하는 이동상 #4, #5와 포함하지 않는 #7에 대해서 실험에 사용한 분리전압이 15, 30, 38 kV에서 4성분이 서로 분리가 되었다. Tris는 오랫동안 주요 생화학 완충물질로 사용되었는데 가격이 싸고 고순도의 물질을 쉽게 얻을 수 있기 때문이다. Tris대신에 urea를 첨가하여 물질간의 결합을

분쇄하여 분리가 증대하도록 사용되기도 한다. 그러나 이 실험에서는 이동상 #7과 #4/#5를 비교하면 urea는 더 이상 분리가 잘 되도록 하는데 기여하지 못한다. Urea가 첨가되면 이동상 #4에서는 mononucleotide가 urea와 결합하고 이동상 #5에서는 micelle과 phosphate/Tris 수용액에서 효율적인 분배 평형이 이루어지지 않기 때문이다. 이 Table에 나타난 분리도를 기준으로 할 때 이동상 #5가 가장 바람직한 이동상의 조성이다. SDS와 phosphate/borate buffer로 구성된 이동상 #8에서는 15 kV의 낮은 전압에서도 분리가 잘 되지 않아서 dAmp만이 나머지 세 성분으로부터 분리가 되었을 뿐이다.

Table 5에서는 분리전압의 증가에 따른 분리도의 변화를 보여주고 있다. 사용된 이동상은 SDS농도가 0.075 M이다. CZE에서 관 내의 이동상의 속도는 분리전압에 의해서 조절되며 각기 일정한 이동상이 결정되면 이에 상응하는 최적 분리전압이 존재하는 것을 보여 주고 있다. Fig. 3에서는 본 실험에서 사용된 이동상 중 가장 좋은 이동상 #5에 대해서 분리전압이 각기 15 kV(a), 38 kV(b)에서 4개 물질의 분리되는 정도와 체류시간의 변화를 보여주고 있다. 분리전압을 38 kV로 증가하면 8분 이내에 4물질이 완전히 분리된 상태에서 용출되었다.

4. 결 론

유전공학 및 생명공학에서 관심이 되고 있는 biopolymer의 단위로서 존재하는 4개의 deoxyribonucleotides를 분리하기 위한 최적의 이동상을 구하기 위해서 capillary zone electrophoresis를 사용하였다. 이동상에는 organic modifier로서 isopropanol 또는 acetonitrile, 계면활성제로서 sodium dodecyl sulfate를 사용하여 각 물질의 이론단수와 각 물질간의 분리도를 기준으로 선정하였다. Isopropanol의 농도는 분리도에 영향을 끼쳤으나 물질의 구조적인 차이와 이동상의 분배에 의해서 높은 농도에서 증가하게 되면 dAmp와 dGmp의 분리도는 증가하였고 다른 두 분리도는 감소하였다. SDS의 농도는 0.075 M에서 가장 좋은 분리 조건을 얻었지만 좋은 분리도는 얻지를 못했다. 이동상의 종류와 조성에 관한 실험결과에 의하면 0.05 M SDS, phosphate, Tris로 구성된 이동상이 가장 좋은 분리도를 보여 주었다. 이론

단수에 의해서 표시된 관의 효율과 분리도는 분리전압에 의해서 영향을 받았다.

감 사

본 연구는 1994년도 인하대학교 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Jogerson, J. W. and Phillips, M.: "New Directions in Electrophoretic Methods", ACS Symposium Series 335, ACS(1987).
2. Lauer, H. H. and McManigill, D.: *Trend Anal. Chem.*, **5**, 11(1986).
3. Jorgenson, J. W. and Lukacs, K. D.: *Anal. Chem.*, **53**, 1298(1981).
4. Balchunas, A. T. and Sepaniak, M. J.: *Anal. Chem.*, **59**, 1466(1987).
5. Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A. and Ando, T.: *Anal. Chem.*, **56**, 111(1984).
6. Armstrong, D. W.: *Sep. Purif. Methods*, **14**, 213(1985).
7. Row, K. H., Griest, W. H. and Maskarinec, M. P.: *J. Chromatogr.*, **409**, 193(1987).
8. Burton, D. E., Sepaniak, M. J. and Maskarinec, M. P.: *Chromatographia*, **21**, 583(1986).
9. Burton, D. E., Sepaniak, M. J. and Maskarinec, M. P.: *J. Chromatogr. Sci.*, **24**, 347(1986).
10. Gehrke, C. W., McCune, R. A., Gama-Sosa, M. A., Ehrlich, M. and Kuo, K. C.: *J. Chromatogr.*, **301**, 199(1984).
11. Perrin, D. D. and Dempsey, B.: "Buffers for pH and Metal Ion Control", John Wiley & Sons, Inc., New York(1974).
12. Cohen, A. S., Terabe, S., Smith, J. A. and Karger, B. L.: *Anal. Chem.*, **59**, 1021(1987).
13. Maskarinec, M. P., Burton, D. E. and M. J. Sepaniak: "Selectivity of Micelles for Electrokinetic Chromatography", ORNL Internal Report(1987).
14. Armstrong, D. W.: *Separation and Purification Methods*, **14**, 213(1985).