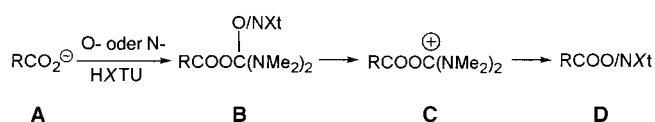


- [23] Zur auffälligen zeitabhängigen Zersetzung von N-HATU- bzw. von den bei N-HATU-Aktivierung gebildeten Zwischenprodukten siehe: H. Gausepohl, C. Behn, *Peptides 1996. Abstracts of the 24th Eur. Pept. Symp.*, Mayflower Scientific, Kingswinford, UK, **1998**, S. 409.
- [24] Die Natur der in einem besonderen Fall gebildeten Zwischenprodukte hängt vom Substrat, vom Lösungsmittel, vom Charakter und der Menge der Base und von der Gegenwart oder Abwesenheit von HOXt ab. So wird beispielsweise Z-Gly-Ala-OH in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> von N-TBTU in Gegenwart von 2 Äquiv. DIEA in weniger als 2 min in das Oxazolon umgewandelt, und der OBt-Ester bildet sich nur sehr langsam (>1 h). In Gegenwart von je 1 Äquiv. DIEA und HOBt erfolgt dagegen vollständige OBt-Esterbildung innerhalb von 30 s, und auch danach ändert sich das Oxazolon/OBt-Ester-Verhältnis kaum. Im Falle der Aktivierung von Fmoc-Aib-OH mit N-HATU ist sowohl die Bildung von Oxazolon (1690, 1829 cm<sup>-1</sup>) als auch von O- (1819 cm<sup>-1</sup>) und N-Acyl-Spezies (1722 cm<sup>-1</sup>) nachweisbar. Nach 5–6 min ist das Oxazolon umgesetzt, und das O-Acylderivat hat sich in das N-Acyl-Isomer umgewandelt, sodass die 3N-Form zur vorherrschenden Spezies wird. Der Verlust der stereochemischen Integrität bei Segmentkupplungen in Gegenwart einer Base wird mit dem Ausmaß der Oxazolonbildung in Beziehung gebracht. Es könnten aber auch andere Zwischenprodukte der Bildung der OXt-Ester vorgelagert sein. Ein mögliches Zwischenprodukt könnte das über das tetraedrische Intermediat **B** gebildete O-Acylluronium-Kation **C**



sein. Von mehreren sterisch gehinderten Säuren (Mesitylsäure, Pivalinsäure) konnten O-Acylluroniumsalze isoliert und identifiziert werden. Im Falle der Mesitylsäure-Derivate erwies sich diese Spezies als reaktiver als der entsprechende OAt-Ester. Kenntnisse zur möglichen Bildung von **C** und seiner Umwandlung in Aktivester oder seiner direkten Teilnahme am Reaktionsprozess könnten hilfreich sein, die Unterschiede in der Reaktivität von N-HATU und N-HAPyU oder zwischen N-HATU und N-HBTU zu erklären. Die Lebensdauer von Zwischenprodukten wie **C** in Gegenwart von Nucleophilen wie OXt<sup>(-)</sup> ist äußerst gering und eine direkte Einbeziehung in den Aktivierungsprozess bisher nicht nachgewiesen. Eine Reaktion unter Beteiligung von **C** wäre am wahrscheinlichsten, wenn keine oder eine sehr kurze Voraktivierung erfolgt, also unter Bedingungen, die sich im Allgemeinen vorteilhaft auf den schrittweisen Aufbau von Peptiden und auf die Erhaltung der stereochemischen Integrität bei Segmentkupplungen auswirken.

- [25] J. Klose, M. Bienert, C. Mollenkopf, D. Wehle, C. Zhang, L. A. Carpino, P. Henklein, *Chem. Commun.* **1999**, 1847.

## Kapillarelektrophoretische Analyse von DNA-Addukten als Biomarker der Kanzerogenese\*\*

Oliver Johannes Schmitz,\*

Christian Christoph Theophil Wörth, Dirk Stach und Manfred Wießler

Kovalente Modifikationen der DNA, DNA-Addukte, die durch reaktive Substanzen exogenen oder endogenen Ursprungs gebildet werden, zählen zu den frühesten Ereignissen in der Krebsentstehung. Die Bildung dieser DNA-Addukte stellt einen kritischen und detektierbaren Schritt in der Kanzerogenese dar. Aus diesem Grund können DNA-Addukte als frühe Biomarker genutzt werden.

Um die pathologische Signifikanz der DNA-Addukte bei Krankheiten wie Krebs zu ermitteln, ist es notwendig, Analysemethoden zu entwickeln, die einen hohen Probandendurchsatz sowie eine simultane Detektion verschiedener DNA-Adduktklassen gewährleisten. In der EPIC-Studie (European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition) wurden z. B. 470 000 Personen aus neun europäischen Ländern über ihre Ernährung und Lebensgewohnheiten befragt.<sup>[1]</sup> Für zukünftige Analysen von Biomarkern, z. B. DNA-Addukten,<sup>[2]</sup> wurden auch Blutproben entnommen. Die sehr empfindliche <sup>32</sup>P-Postlabelling-Methode<sup>[3]</sup> wird bei solchen Studien wegen ihrer verschiedenen Nachteile wie der fehlenden Automatisierungsmöglichkeit, dem notwendigen starken  $\beta$ -Strahler <sup>32</sup>P und der Tatsache, dass unterschiedliche DNA-Adduktklassen nicht simultan detektiert werden können, vermieden. Zur Bestimmung von DNA-Addukten mit LC-MS werden ungefähr 300  $\mu$ g DNA benötigt.<sup>[4]</sup> Obwohl diese Methode sehr hilfreich für die Charakterisierung unbekannter DNA-Addukte ist, kann sie in der Routineanalytik nicht eingesetzt werden. Die benötigten großen DNA-Mengen stehen meistens nicht zur Verfügung und verteuern darüber hinaus die DNA-Hydrolyse erheblich. Außerdem können nur ähnliche DNA-Addukte in einem Analysenlauf getrennt werden. Aus diesen Gründen wird eine neue analytische Methode mit einem hohen Probandendurchsatz benötigt, die bei nur 10  $\mu$ g DNA eine simultane Bestimmung unterschiedlicher Adduktklassen ermöglicht. Seit 1988 versuchen die Arbeitsgruppen von Sharma und Giese, die Fluoreszenzderivatisierung von Nucleotiden zu optimieren.<sup>[5]</sup> Allerdings führte bisher weder die beschriebene Konjugation

[\*] Dr. O. J. Schmitz,<sup>[+]</sup> Dr. C. C. T. Wörth, D. Stach, Prof. Dr. M. Wießler  
Deutsches Krebsforschungszentrum Heidelberg  
Abteilung Molekulare Toxikologie (Deutschland)  
E-mail: olivers@uni-wuppertal.de

[+] Aktuelle Adresse des Korrespondenzautors:  
Bergische Universität-Gesamthochschule Wuppertal  
FB 9/Analytische Chemie  
Gaußstr. 20, 42119 Wuppertal (Deutschland)  
Fax: (+49) 202-4393915

[\*\*] Wir bedanken uns bei H. Schmeiser, E. Frei und W. V. Turner für viele hilfreiche Diskussionen, bei E. Eder für Hex-dGMP, bei W. E. Hull für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen und bei der Deutschen Bundesstiftung Umwelt für die finanzielle Unterstützung.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://www.angewandte.de> zu finden oder können beim Autor angefordert werden.

von Ethylendiamin an die 5'-Phosphatgruppe der Nucleotide,<sup>[5a]</sup> gefolgt von der Derivatisierung mit Dansylchlorid oder Fluoresceinisothiocyanat,<sup>[5b]</sup> noch die Ein-Schritt-Fluoreszenzderivatisierung mit einer Histidin-Ankergruppe<sup>[5c,d]</sup> zu einer Analysenmethode, die einen hohen Probendurchsatz erlaubt.

Hier stellen wir eine neue Methode zur DNA-Adduktbestimmung vor: Sie beinhaltet die Hydrolyse der DNA, die Fluoreszenzmarkierung von modifizierten und unmodifizierten Nucleotiden und die auf micellarer elektrokinetischer Chromatographie basierende Analyse mit anschließender Laser-induzierter Fluoreszenzdetektion (CE-LIF). Als Fluoreszenzmarker dient 4,4-Difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-*s*-indacen-3-propionylethylendiamin (BODIPY FL EDA). Die selektive Konjugation der Phosphatgruppe der 2'-Desoxynucleosid-3'-monophosphate (dNMPs) an die Aminobindungsgruppe des BODIPY FL EDA wurde durch Aktivierung des Phosphats mit dem wasserlöslichen Carbodiimid 1-Ethyl-3-(3'-*N,N'*-dimethylamino-propyl)-carbodiimid (EDC) erreicht.<sup>[6]</sup> Allerdings schließt dieses Derivatisierungsverfahren den Einsatz von Fluoreszenzmarkern oder Puffersystemen aus, die als funktionelle Gruppe eine Carboxyl-, eine primäre Amino- oder eine Phosphatgruppe tragen. Der einzige, für die Derivatisierung einsetzbare Puffer war *N*-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-*N'*-2-ethansulfonsäure (HEPES) bei pH 6.5. Um einen Reinigungsschritt zu vermeiden, wurde die vorherige enzymatische Hydrolyse ebenfalls in einem HEPES-Puffer, pH 6.0, durchgeführt. Mit dem <sup>32</sup>P-Postlabelling konnte gezeigt werden, dass die Hydrolyse von Kalbsthymus-DNA (CT-DNA) in HEPES-Puffer die gleichen Mengen an dNMPs lieferte wie die routinemäßig eingesetzte Hydrolyse in Natrium-Succinat.<sup>[7]</sup> Die Derivatisierung wurde durch die spektroskopische Charakterisierung (ESI-MS, <sup>1</sup>H-, <sup>13</sup>C-, <sup>11</sup>B- und <sup>19</sup>F-NMR-Spektroskopie) des 2'-Desoxyadenosin-3'-monophosphat-BODIPY-FL-EDA-Konjugats kontrolliert.

Bis jetzt wurde die CE-LIF-Methode zur Detektion von apurinischen Stellen (AP-Stelle) und zur Bestimmung verschiedener endogener und exogener DNA-Addukte (Tabelle 1) in synthetisierten Oligonucleotiden, CT-DNA oder humaner DNA eingesetzt. Sowohl die Derivatisierungsbedingungen als auch die Trennparameter waren für alle Proben identisch. Die CE-LIF-Analysen von Etheno-dAMP- (Abbildung 1 A) und 5-Me-dCMP-modifizierten (Abbildung 1 B) Oligonucleotiden belegen die gute Trennung der dAMP-

Tabelle 1. Korrigierte Migrationszeiten der modifizierten und unmodifizierten Nucleotide

Nucleotide	korr. MT (dAMP/Nucleotide)	
1, <i>N</i> <sup>2</sup> -Propano-2'-desoxyguanosin-3'-monophosphat (Hex-dGMP)	0.78; 0.75	( <i>n</i> = 2)
5-Methyl-2'-desoxycytidin-3'-monophosphat (5-Me-dCMP)	0.79 ± 0.01	( <i>n</i> = 32)
2'-Desoxycytidin-3'- monophosphat (dCMP)	0.81 ± 0.01	( <i>n</i> = 34)
8-Hydroxy-2'-desoxyguanosin-3'-monophosphat (8-HO-dGMP)	0.83 ± 0.01	( <i>n</i> = 6)
2'-Desoxythymidin-3'- monophosphat (dTMP)	0.938 ± 0.006	( <i>n</i> = 42)
2'-Desoxyguanosin-3'-monophosphat (dGMP)	0.962 ± 0.004	( <i>n</i> = 42)
2'-Desoxyadenosin-3'-monophosphat (dAMP)	1.000	
AP-Stelle	1.011 ± 0.002	( <i>n</i> = 6)
Addukte des Benzo[ <i>a</i> ]pyrendiolepoxids (B[ <i>a</i> ]P-dGMP, 2. Isomer)	1.17 ± 0.01	( <i>n</i> = 5)
Addukte der AAI (dA-AAI, dA-AAII, dG-AAI)	1.23; 1.19	( <i>n</i> = 2)
	1.20; 1.17	( <i>n</i> = 2)
	1.13; 1.11	( <i>n</i> = 2)
Addukte des Benzo[ <i>a</i> ]pyrendiolepoxids (B[ <i>a</i> ]P-dGMP, 1. Isomer)	1.29 ± 0.01	( <i>n</i> = 5)
1, <i>N</i> <sup>6</sup> -Etheno-2'-desoxyadenosin-3'-monophosphat (Etheno-dAMP)	1.38; 1.36	( <i>n</i> = 2)

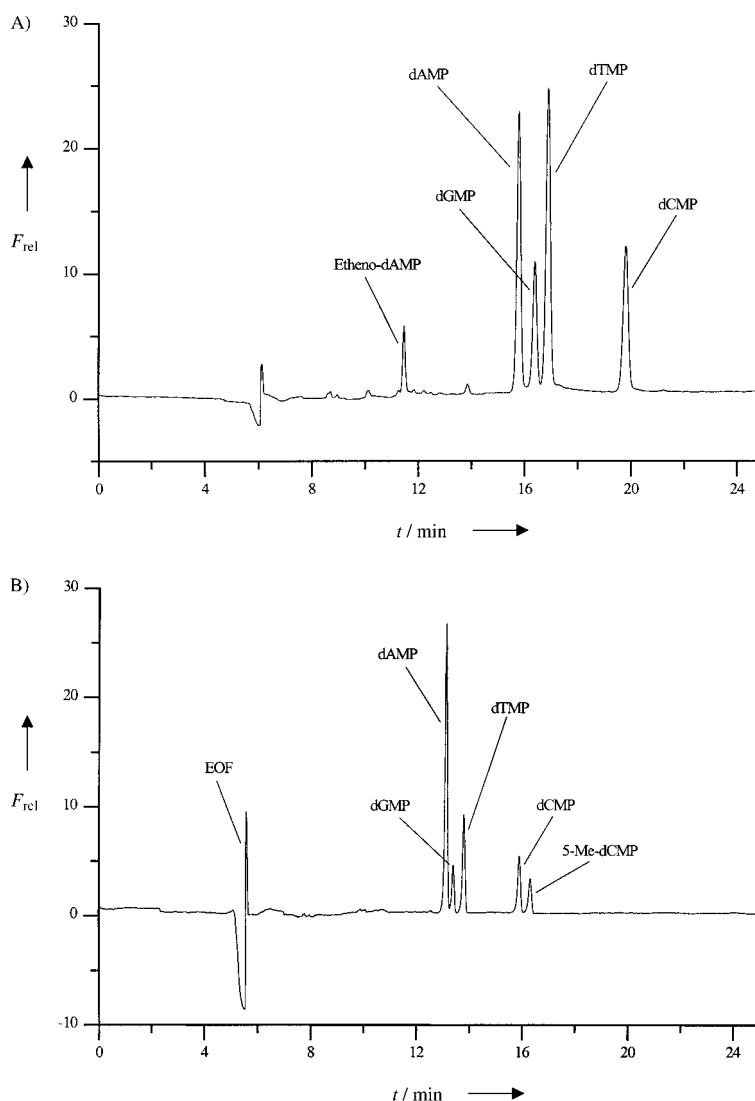


Abbildung 1. A) Analyse von Etheno-dAMP: 10 µg eines synthetisierten Oligonucleotids mit der Sequenz 5'-GAG.TCT.TCC.A\*GT.GTG.ATG.AT-3' (A\*: Etheno-dAMP) wurden hydrolysiert, derivatisiert und analysiert. Elektrolyt: 17 mM Natrium-Phosphatpuffer (pH 9.0), der 75 mM SDS und 15% (v/v) Methanol enthält; Fused-silica-Kapillare: Gesamtlänge: 50 cm; Länge zum Detektionsfenster: 45.4 cm; Innendurchmesser: 50 µm; Injektion: 20 psi; Temperatur: 25 °C; angelegte Spannung: 20 kV. Die Probe wurde 10000-fach mit Wasser verdünnt. B) Analyse von 5-Me-dCMP: 10 µg eines synthetisierten Oligonucleotids mit der Sequenz 5'-AGA.GC\*G.AGA.TTC.CAT.CA-3' (C\*: 5-Me-dCMP) wurden analysiert. Die Probe wurde 10000-fach mit Wasser verdünnt. Trennbedingungen wie unter A beschrieben.

und dCMP-Addukte von den unmodifizierten Nucleotiden. Etheno-DNA-Addukte können endogen bei der Reaktion von DNA-Basen mit Produkten der Lipidperoxidation und exogen durch verschiedene Xenobiotika gebildet werden.<sup>[8]</sup> Ein wichtiger Einsatzbereich für diese Analysenmethode stellt die exakte Quantifizierung der 5-Me-dCMP-Konzentration in normalem und malignem Gewebe dar, da der DNA-Hypomethylierung eine Schlüsselrolle in der Kanzerogenese zukommt.<sup>[9, 10]</sup> Abbildung 2 zeigt die Analyse von 8-HO-dGMP, einem Biomarker des oxidativen Stresses,<sup>[11]</sup> in einem modifizierten Oligonucleotid. Die zeitabhängige Zersetzung von 8-HO-dGMP in AP-Stellen erschwert die Quantifizierung des 8-HO-dGMP und ist vermutlich einer der Gründe für die in der Literatur diskutierten variierenden Konzentrationsangaben von 8-HO-dGMP.<sup>[12]</sup>

Es wurde auch eine mit verschiedenen Metaboliten der Aristolochiasäure (AA-dNMP) zusammengesetzte CT-DNA analysiert. Diese Addukte gelten als Biomarker der Chinesischen-Heilkräuter-Nephropatie.<sup>[13]</sup> Die Abbildungen 3 A und B zeigen die Analyse einer unmodifizierten CT-DNA und einer mit Aristolochiasäure I unter Zinkaktivierung inkubierten CT-DNA (Abbildung 3 B). Eine parallel durchgeführte <sup>32</sup>P-Postlabelling-Analyse belegt die elektrophoretisch ermittelten Ergebnisse und zeigt, wie schon früher berichtet,<sup>[13]</sup> drei Spots für die Aristolochiasäure-spezifischen DNA-Addukte (Teil der Abbildung 3 B). Im Unterschied zum <sup>32</sup>P-Postlabelling ermöglicht die hier vor-

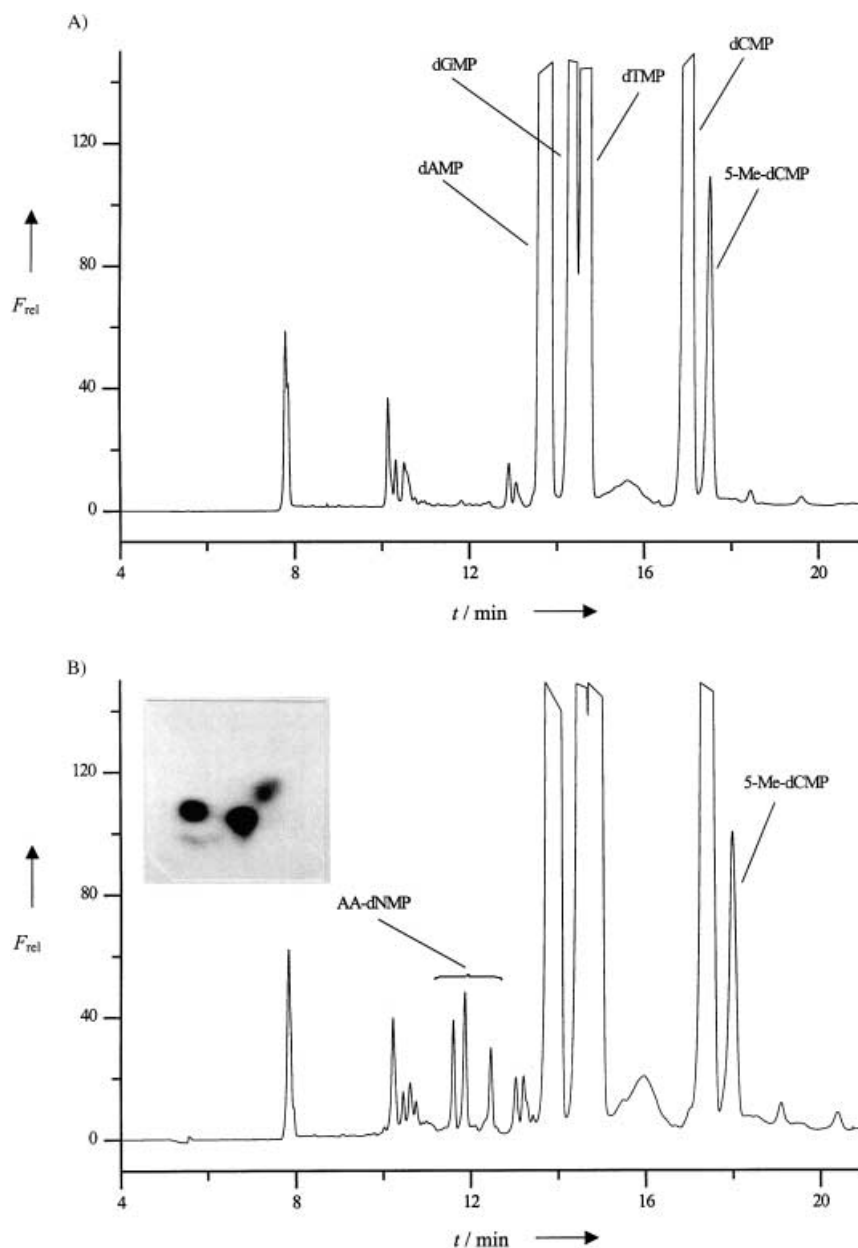


Abbildung 3. CE-LIF- und <sup>32</sup>P-Postlabelling-Analyse einer mit Aristolochiasäure I (AAI) unter Zinkaktivierung inkubierten CT-DNA. 10 µg einer unmodifizierten CT-DNA (A) und 10 µg einer mit AAI inkubierten CT-DNA (B) wurden analysiert und die Elektropherogramme mit den Ergebnissen der <sup>32</sup>P-Postlabelling-Methode verglichen. Die Probe wurde 100-fach mit Wasser verdünnt. Trennbedingungen wie in Abbildung 1 beschrieben.

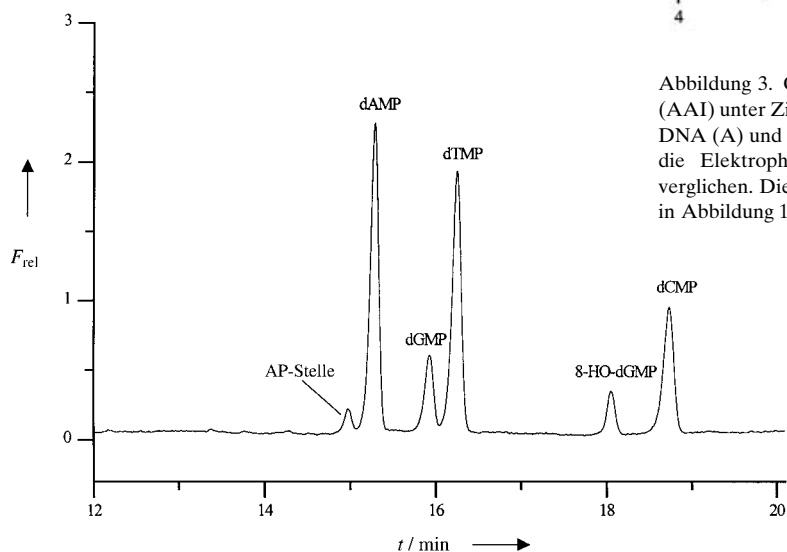


Abbildung 2. Analyse von 8-HO-dGMP und AP-Stellen. 10 µg eines synthetisierten Oligonucleotids mit der Sequenz 5'-GAG.TCT.TCC.AGT.G\*TG\*.ATG.AT-3' (G\*: 8-HO-dGMP) wurden analysiert. Die Probe wurde 10000-fach mit Wasser verdünnt. Trennbedingungen wie in Abbildung 1 beschrieben.

gestellte Methode nicht nur die Bestimmung der drei Addukte der Aristolochiasäure I, AAI-dGMP, AAI-dAMP und AAI-dCMP, sondern parallel dazu auch die Analyse der unmodifizierten Nucleotide und 5-Me-dCMP. Wegen der vermuteten Demethylierung der CpG-Inseln während der Kanzerogenese ist eine simultane Bestimmung von 5-Me-dCMP neben DNA-Addukten von großem Interesse.

Durch den Einfluss des elektroosmotischen Flusses in Fused-silica-Kapillaren können bei kapillarelektrophoretischen Trennungen die Migrationszeiten (MT) oft schlecht reproduziert werden. Damit auch

in unbekannten Proben DNA-Addukte qualitativ bestimmt werden können, wurden die MTs von allen unmodifizierten und modifizierten Nucleotiden mit der MT von dAMP standardisiert, wobei eine sehr gute Reproduzierbarkeit (Standardabweichung unter 3 % bei Einsatz unterschiedlicher Kapillar- und Pufferchargen) erreicht wurde. In Tabelle 1 sind die korrigierten MTs von allen analysierten Nucleotiden als Mittelwert mit Standardabweichung dargestellt. Um eine Basislinientrennung zu erreichen, müssen die korrigierten MTs beider Nucleotide eine Differenz von 0.02 aufweisen.

Die Reproduzierbarkeit der Hydrolyse, Derivatisierung und Trennung wurde durch die Analyse aliquotierter CT-DNA bestimmt. Durch den Einsatz von Fluorescein als interner Standard konnten die Peakflächen korrigiert werden. Die auf diese Weise ermittelten Standardabweichungen für die Peakflächen der Nucleotide lagen zwischen 5.6 und 8.4 % ( $n = 29$ ).

Für eine exakte Quantifizierung muss die relative Fluoreszenzquantenausbeute (QY) für jedes fluoreszenzderivatisierte Nucleotid bestimmt werden. Die Quantenausbeuten der Nucleotide wurden ermittelt und mit der QY des dAMPs standardisiert, wodurch sich Quantenfaktoren von 1.00, 0.55, 0.97 und 0.98 für dAMP, dGMP, dTMP und dCMP ergaben. Der deutlich geringere Quantenfaktor für dGMP ist auf einen basenabhängigen Quenching-Effekt zurückzuführen.<sup>[14, 15]</sup> Unter Berücksichtigung dieser Faktoren ergab die Analyse einer CT-DNA, dass  $6.43 \pm 0.13$  % (RSD = 2.1 %;  $n = 6$ ) aller Cytosine methyliert vorliegen. Leider liegt zur Zeit noch kein Standard von 5-Me-dCMP vor, weshalb näherungsweise die QY von dCMP für das unmodifizierte und modifizierte Cytosin eingesetzt wurde.

Die Stärke der <sup>32</sup>P-Postlabelling-Methode ist die hohe Sensitivität, die durch eine Anreicherung der modifizierten Nucleotide entweder durch Butanolextraktion oder Hydrolyse mit Nuclease P1 erzielt wird. Dagegen liegt die Stärke der beschriebenen CE-LIF-Methode in der hervorragenden Selektivität. Aufgrund der hohen Salzkonzentration und des großen Überschusses an unmodifizierten Nucleotiden muß die Probe vor der CE-LIF-Analyse allerdings 100-fach verdünnt werden. Dies führt zu einer relativ hohen Nachweisgrenze von 850 pM (für dAMP bestimmt), welches einer relativen Adduktmarkierung („relative addukt labelling“, RAL) von zwei DNA-Addukten in 10<sup>6</sup> unmodifizierten Nucleotiden entspricht. Unter Verwendung eines Fokussierungsschrittes in der Kapillare, dem „electrostacking with reversed field“<sup>[16]</sup> konnte die Sensitivität auf 50 pM oder 1,4 DNA-Addukte in 10<sup>7</sup> unmodifizierten Nucleotiden verbessert werden.

Diese geringere Sensitivität reicht für die Detektion vieler endogener DNA-Addukte und der exakten Quantifizierung der DNA-Methylierung (5-Me-dCMP) aus. Momentan versuchen wir die Sensitivität durch einen Anreicherungsschritt weiter zu verbessern, um auch exogene DNA-Addukte in vivo nachweisen zu können.

## Experimentelles

DNA-Hydrolyse: 10 µg DNA werden in 5.2 µL Wasser gelöst, mit 4.0 µL einer Enzymmischung (Mikrokokken-Nuclease, 150 mU µL<sup>-1</sup> und Milz-

Phosphodiesterase, 2.5 mU µL<sup>-1</sup>) und 0.8 µL Puffer (250 mM HEPES, 100 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 6.0) versetzt und die Mischung 3 h bei 37 °C inkubiert.

Fluoreszenzderivatisierung: 30 µL 1.8 M EDC (in 800 mM HEPES-Puffer, pH 6.5), 30 µL 25 mM BODIPY FL EDA (in 800 mM HEPES-Puffer, pH 6.5) und 20 µL 800 mM HEPES-Puffer, pH 6.5, werden mit dem Hydrolysat versetzt und 25 h bei 25 °C im Dunkeln geschüttelt.

Eingegangen am 2. Juli 2001 [Z17407]

- [1] F. P. Perera, *J. Natl. Cancer Inst.* **1996**, *88*, 496–509.
- [2] E. Riboli, R. Kaaks, *Am. J. Epidemiol.* **2000**, *151*, 371–376.
- [3] K. Randerath, M. V. Reddy, R. C. Gupta, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**, *78*, 6126–6129; R. C. Gupta, M. V. Reddy, K. Randerath, *Carcinogenesis* **1982**, *3*, 1081–1092; M. V. Reddy, R. C. Gupta, E. Randerath, K. Randerath, *Carcinogenesis* **1984**, *5*, 231–243.
- [4] J. R. Soglia, R. J. Turesky, A. Paehler, P. Vouros, *Anal. Chem.* **2001**, *73*, 2819–2827.
- [5] a) D. J. Kelman, K. T. Lilga, M. Sharma, *Chem. Biol. Interact.* **1988**, *66*, 85–100; b) A. N. Al-Deen, D. C. Cecchini, S. Abdel-Baky, N. M. A. Moneam, R. W. Giese, *J. Chromatogr.* **1990**, *512*, 409–414; c) P. Wang, R. W. Giese, *J. Chromatogr. A* **1998**, *809*, 211–218; d) R. W. Giese, P. Wang, *Anal. Chem.* **1993**, *65*, 3518–3520.
- [6] M. G. Ivanovskaya, M. B. Gottikh, Z. A. Shabarova, *Nucleosides Nucleotides* **1987**, *6*, 913–934.
- [7] D. H. Phillips, M. Castegnaro, *Mutagenesis* **1999**, *14*, 301–315.
- [8] H. Bartsch, *Mutat. Res.* **2000**, *462*, 255–279.
- [9] S. B. Baylin, J. G. Herman, *Trends Genet.* **2000**, *16*, 168–174.
- [10] B. H. Ramsahoye, D. Biniszkiwicz, F. Lyko, V. Clark, A. P. Bird, R. Jaenisch, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 5237–5242.
- [11] H. Bartsch, J. Nair, I. Velic, *Eur. J. Cancer Prev.* **1997**, *6*, 529–534.
- [12] M. Zeisig, T. Hofer, J. Cadet, L. Möller, *Carcinogenesis* **1999**, *20*, 1241–1245.
- [13] J. L. Nortier, M.-C. Muniz Martinez, H. H. Schmeiser, V. M. Arlt, C. A. Bieler, M. Petein, M. F. Depierreux, L. de Pauw, D. Abramowicz, P. Vereerstraeten, J.-L. Vanherweghem, *N. Engl. J. Med.* **2000**, *342*, 1686–1692.
- [14] U. Lieberwirth, J. Arden-Jakob, K.-H. Drexhage, D. P. Herten, R. Müller, M. Neumann, A. Schulz, S. Siebert, G. Sagner, S. Klingel, M. Sauer, J. Wolfrum, *Anal. Chem.* **1998**, *70*, 4771–4779.
- [15] M. Torimura, S. Kurata, K. Yamada, T. Yokomaku, Y. Kamagata, T. Kanagawa, R. Kurane, *Anal. Sci.* **2001**, *17*, 155–160.
- [16] R. L. Chien, D. S. Burgi, *Anal. Chem.* **1992**, *64*, 1046–1050.