

## 흐름 장 흐름 분획법에 의한 지하수 중 입자들의 크기 분포 결정

음철현<sup>†</sup> · 강동영 · 이승호

<sup>†</sup>한국지질자원연구원 지질특성분석센터, 한남대학교 화학과

### Determination of Size Distribution of Particles in Ground Water Using Flow Field-Flow Fractionation

Chul Hun Eum<sup>†</sup>, Dong Young Kang, and Seungho Lee

<sup>†</sup>*Korea Institute of Geoscience and Mineral Resources, Daejeon, 305-350, Korea*  
*Department of Chemistry, Hannam University, Daejeon 306-791, Korea*

Flow field-flow fractionation(FFF) have been used to characterize particles in ground water. The opposed flow sample concentration (OFSC) method is employed, where particles are focused into a narrow band near the inlet of the flow FFF channel by two incoming flow-streams through the inlet and the outlet of the channel. There is no need for stopping the flow for the sample relaxation, which is usually required in conventional Flow FFF operations. The OFSC procedure is optimized for analysis of ground water particulates with respect to various experimental parameters including sample introduction, flow rates, etc. The effectiveness in concentration and characterization of the OFSC-flow FFF was demonstrated with various mixtures of polystyrene latex spheres. Ground water of upto 100mL has been successfully loaded, concentrated, and characterized by OFSC-flow FFF. The OFSC technique makes the application of flow FFF possible for separation and characterization of particles in very low-concentrations. The results show the potential of (OFSC)-Flow FFF. OFSC-flow FFF provides a simplified alternative to existing off-line concentration procedures, and shows high potential for application to analysis of dilute particles in environmental water.

**Key words** : field-flow fractionation, ground water, size distribution, opposed flow sample concentration(OFSC)

#### 1. 서 론

다양한 환경 중(지하수, 대기, 강물, 바다 침전물, 등)의 입자 물질들은 지질학적으로 뿐만 아니라 환경오염 면에서도 매우 다양한 역할을 하므로 그들의 분석은 매우 중요하다.<sup>1,2)</sup> 이들 입자들의 특징은 매우 복잡한 화학적 구조를 가지며, 모양이나 크기, 밀도, 질량 그리고 표면의 화학적 성질 등에서 다양한 분포를 가진다는 점이다. 또한 이들은 매우 높은 표면 대 질량비를 가지므로 비록 이들이 환경수 중에 매우 낮은 농도로 존재하더라도 환경오염 물질의 이동에 매우 큰 영향을 미친다.<sup>3)</sup>

본 연구의 목적은 위에서 언급한 다양한 환경 중 특히 자연수 내의 입자를 장 흐름 분획법(Field-Flow Fractionation, FFF)을 이용해서 효과적으로 분리하고 그에 따른 환경 입자의 정보를 얻고자 하는데 있다.

FFF는 1980년대 중반에 Giddings에 의해 분리 기술의 하나로 연구되었다.<sup>4)</sup> FFF는 크로마토그래피와 달리 내부에 충전된 정지상이 없고, 속이 비어 있어 단지 유체의 흐름만을 이용하여 입자 물질들과 거대분자 물질들을 입자의 크기에 의해서 분리가 이루어지므로 분석 과정 중에 발생 할 우려가 있는 분석 물질들의 흡착 또는 변형을 제거 할 수 있는 장점을 지니고 있다. 이러한 FFF는 고분자 및 단백질을 비롯하여 나노미터에

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.

E-mail: cheum@kigam.re.kr

서부터 마이크론 크기의 입자 시료들을 분리하는데 유용한 분리 방법이다. FFF의 특징 중 하나는 용리 시간으로부터 시료의 크기, 분자량 등과 같은 물리/화학적 파라미터를 직접 결정할 수 있다는 점이며 이러한 특징으로 인하여 현재 생화학,<sup>5)</sup> 의약학,<sup>6)</sup> 고분자<sup>7)</sup> 및 무기재료와 환경입자<sup>8)</sup> 시료들에 대한 FFF의 응용연구가 활발히 진행되고 있다.

이러한 FFF는 입자의 유체역학적 부피(hydrodynamic volume)에 의해 머무름 시간(retention time)이 결정되며 채널의 흐름과 직각방향으로 가하여 지는 외부장에 의해 분석물질들을 누적적으로 밀어준다. 각 분석물질들은 확산계수(diffusion coefficient)와 Stokes직경 등의 인자에 의해 크기별로 분리가 가능하며, 이 방법은 콜로이드 및 입자형태의 물질의 분리에 이용되며 특히 이동상의 적용범위가 넓고 수용액 상태로 실험을 하므로 자연수 내의 콜로이드 및 입자의 분리에 매우 유용하다.

하지만 자연수 내에 존재하는 콜로이드 및 입자의 농도는 매우 낮아서 반드시 원심분리나 여과 장치를 이용한 전처리 과정을 거치게 된다. 이러한 전처리 과정은 시료의 응집(aggregation)과 분해(shear degradation) 등의 역효과를 유발하게 되어 유체 속에서 존재하는 실제의 모습과는 다소 차이가 있는 정보를 얻을 수 있는 한계를 가지고 있다. 또한 시료의 크기분포를 확인하기 위해 흔히 사용하는 전자현미경(SEM, TEM)은 액체상태가 아닌 진공상태에서 사용하므로 정확한 크기 정보를 얻을 수 없다. 크기배제 크로마토그래피(size exclusion chromatography)의 경우 위에서 언급한 문제점(응집, 및 분해)로 인해 사용에 제한이 많다.<sup>9,10)</sup>

따라서, 본 연구에서는 사전 전처리와 낮은 농도의 문제점을 해결하기 위하여 opposed flow sample concentration (OFSC) 방식을 사용하여 FFF에 의하여 지하수 내에 존재하는 입자를 분리하고자 하였다.

## 2. 실험방법

Flow FFF 분획장치는 FFFractionation사(Salt Lake City, UT, U.S.A.)의 모델 F-1000 Universal Fractionator이다. 채널의 구조는 2개의 플렉시 유리(Plex glass) 사이에 알루미나(alumina)로 이루어진 다공성 판(frit)이 있어 이 두 다공성 판 사이를 관통하는 유체의 흐름이 균일하게 유지되도록 하였고, 이것을 통해서 Cross stream 역시 균일하게 공급할 수 있다.

두 개의 다공성 판 사이에 간격 띄우게(spacer)를 놓았으며 아래 판 쪽에는 분석물질이 다공성 판을 통해서 유실 되지 않도록 막(membrane)을 놓았다. 이 멤브레인을 놓을 때 충분히 양쪽에서 당겨주어 결합 후에 멤브레인이 들뜨지 않도록 유지시켜 주었다. 채널의 길이는 29.3 cm, 폭 2.0 cm, 간격 띄우게(spacer)의 두께는 0.0194 cm이었다.

실험에 사용한 멤브레인은 재생 셀룰로오스(regenerated cellulose)로 YM-10(Amicon Inc. MA)이었고, YM-10 멤브레인을 통과 할 수 있는 최대분자량(molecular weight cut-off)은 분자량 10,000이었다. 채널은 토크렌치(torque wrench)를 이용하여 55 lb/inch 로 균일하게 조여서 실험에 사용하였다.

펌프는 YOUNG-LIN M930(Seoul Korea), DMX-2003T(SMK Inc. Japan) Piston 펌프와 GILSON Model M312(Middleton, WI, USA) peristaltic 펌프를 사용하였다.

시료의 검출은 YOUNG-LIN Scientific사의 M720(Seoul Korea)을 사용하였다. 검출 결과는 FFF Data 분석 소프트웨어인 FFFEXE (FFFractionation Inc. Utah, USA)를 이용하여 받은 데이터를 처리하였다.

시료 주입 장치(Injector)로는 Rheodyne 7725 Injector를 이용하였다. 실험시 채널의 유속과 교차흐름의 유속은 교차흐름의 출구 방향에 needle valve로 조절한 후에 뷰렛(buret)을 이용하여 각각의 유체의 부피를 측정하여 유속을 측정하였다.

본 연구에서 사용한 지하수와 토양시료는 광주(Gwang-ju city, Korea)에서 수집되었고 실험에 알맞게 사용될 수 있도록 수집 즉시, 현장에서 hand suction 펌프를 사용하여 1.2 um 멤브레인 여과지로 두개의 크기 별로 시료를 구분하였다. 멤브레인 여과지를 통과한 여액은 Flow FFF를 이용하여 normal 영역에서 분리하였고, 시료들은 시료간의 응집(aggregation)을 방지하고 계면 활성제로 작용하여 멤브레인 여과지와 상호작용(interaction)을 최소화하기 위하여 지하수 시료 1 L당 1 g의 SDS(sodium dodecyl sulfate)를 첨가하고, 박테리아 생성의 억제를 위하여 0.2 g의 NaN<sub>3</sub>(sodium azide)를 첨가하였다. 이러한 지하수 시료들은 4°C의 온도로 냉장고에 보관하였다가 실험에 사용할 시에 필요한 양만큼 취하여 고르게 섞어주고 1시간 이상 실온에 방치하였다가 30분간 교반한 후에 실험에 사용하였다. 시료는 Milli-Q 초순수 제조장치에서 정수한 물에 0.05% SDS와 이동상 내의 박테리아 생성을 방지하기

위하여 0.02%  $\text{NaN}_3$ 를 포함한 이동상에 희석하였다. 이동상은 가능한 균일한 조성에서 사용하기 위해서 표면 활성제를 혼합시킨 후에 최소 5시간 이상의 교반(stirring)을 거친 후에 사용하였으며, 소결 유리 거르개(sintered glass filter)를 사용해서 여과 후에 사용하였다.

## 2.1. 실험법

stop-flow 방식의 FFF 실험은 우선 시료를 주입하기 전에 먼저 흐름 장 흐름 분획 장치의 펌프를 작동시켜서 실험에 필요한 일정한 유속에 도달 하게 되면 분리 조건에 맞는 시료 도입 지연 시간(injection delay time)과 이완 시간(relaxation time)을 결정하고 채널 흐름과 교차 흐름의 정확한 유속을 측정 한 후에 원하는 시료를 주입한다.

먼저 채널의 틈새부피(void volume)를 측정하기 위해서 교차 흐름(cross flow)이 없이 채널 흐름(channel flow)만을 주어 정확한 유속을 측정 한 후에 이동상 20  $\mu\text{L}$ 을 주입하여 피크를 확인하였다. 이때 채널 흐름 유속(channel flowrate)을 이용하여 채널의 두께(thickness)를 결정하면 0.0182 cm이고, 틈새 부피(void volume)는 1.067 mL이다.

틈새 부피를 결정한 후에는 크기에 의한 분리를 확인하기 위하여 28, 79, 138 nm 크기의 폴리스티렌 라텍스 표준물질 3종을 혼합한 시료를 이동상에 희석 시켜서 사용하였다. 이때의 실험 조건은 채널 흐름 유속과 교차 흐름 유속을 적절히 조절하여 약 30분 이내에 용리 되도록 실험 전에 조절 한 후 실험하였다.

stop-flow방식의 flow FFF에 의한 크기에 따른 분리를 이론적인 입자의 크기와 머무름 시간(retention time)에 따른 실험적인 입자의 크기를 확인한 후 OFSC-Flow FFF에서 분리하기 위해서 stop-flow방식의 기기장치에 3개의 3-way 밸브를 설치해서 흐름의 방향을 조절 할 수 있도록 하였고, 시료의 채널 내 원활한 주입을 위해서 특별히 peristaltic pump를 설치하였다. 실험에 사용한 시료는 stop-flow방식에서 사용한 28, 79, 138 nm 폴리스티렌 라텍스 혼합 시료를 이동상 50 mL와 100 mL에 희석 시켜서 실험에 사용하였다.

먼저 채널 내에 정상흐름과 반대흐름이 만나는 지점에서 시료들이 균일한 띠를 형성하게 되고 이 단계에서는 교차흐름 없이 단지 채널 내로 유입된 흐름이 바닥면에 위치한 frit을 통과하여 직각 흐름 출구로 나가도

록 하였다. 이것을 sample loading and focusing이라고 하며 이렇게 형성된 시료의 띠는 양쪽으로 유입되는 흐름을 막고 외부장(field)인 교차흐름(crossflow)을 가하는 안정화 단계(stabilization step)를 거치면서 입자의 확산(diffusion)과 외부장(field)인 교차흐름(crossflow)이 평형을 이루는 지점에 각각의 크기에 맞는 층(layer)을 형성하게 된다. 이렇게 형성된 층은 포물선 형태의 채널 흐름에 의해서 마지막 분리 과정에 크기에 따라 분리가 이루어지게 된다. OFSC-flow FFF의 실험에서 시료는 반대 방향 흐름(opposed flow)에 의하여 채널 내에 주입하였고 각각의 단계는 3-way 밸브를 이용해 flow의 방향을 조절함으로써 실험이 진행되었다.

OFSC-flow FFF의 실험에서는 stop-flow 방식에서 사용한 28, 79, 138 nm 폴리스티렌 라텍스 혼합시료를 20  $\mu\text{L}$ 을 취하여 이동상 50 mL, 100 mL에 희석하여 고르게 흔들여 준 후에 peristaltic 펌프를 이용하여 채널 내로 성공적으로 희석된 시료를 주입할 수 있었다. 이러한 peristaltic 펌프의 사용은 실험 결과 피스톤 펌프나 Q-펌프에 비해서 시료의 유실이 가장 적게 나타났음을 확인할 수 있었다.

OFSC방식에서 사용된 needle 밸브는 교차흐름의 출구 쪽에 설치하여 실험에 적당한 cross-flowrate을 조절하기 위한 목적으로 사용되었다.

실제 지하수 시료들은 실험에 충분한 부피만큼을 표준시료와 동일한 방법으로 처리하고 채널 내에 주입하여 실험하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. stop-flow방식에 의한 표준물질의 시료 분리

stop-flow방식의 흐름 장 흐름 분획장치를 사용하여 3가지 28, 79, 138 nm의 크기를 갖는 폴리스티렌 라텍스 혼합시료를 30분 안에 분리될 수 있는 조건에서 실험을 수행하였다. 이동상은 분석 물질간의 응집(aggregation)을 억제하고 채널과의 상호 작용(interaction)을 최소화 할 수 있는 조성으로 0.05% SDS를 3차 증류수에 넣어 사용하였다.

이 실험에서 적용한 조건과 분리는 Fig. 1에 나타나고 이를 바탕으로 계산되어진 각각의 크기분포는 Fig. 2에 나타내었다. 또한 폴리스티렌 라텍스의 명목상의 직경(nominal diameter)과 실제 실험을 통해 계산되어진 유체역학적 직경(hydrodynamic diameter)을 비교하고

**Table 1.** Nominal and measured diameters of polystyrene standards.

Nominal diameter (nm)	Diameter determined by Flow FFF (nm)			
	Peak max.	Error (%)	First moment	Error (%)
28	26.2	6	27.3	2
79	78.9	0.1	78.9	0.1
138	138.4	0.3	138.2	0.1

이론에 의해 계산되어진 크기와 실험적으로 결정된 시료의 크기에 대한 오차를 확인한 결과는 Table 1에 나타내었다.

Fig. 1, 2에 나타난 바와 같이 3가지 크기의 표준물질이 잘 분리 되어 졌고, 그에 따른 크기의 분포 또한 확인 할 수 있었다.

3가지 28, 79, 138 nm의 크기를 가지는 표준물질 시료 또한 주어진 크기와 실제 실험을 통하여 계산되어진 크기의 오차는 0.01%에서 6%정도로 나타나서 이론치와 실험치가 큰 차이를 갖지 않는다는 것을 실험을 통하여 확인할 수 있었고 또한 실험에 사용된 채널과 그 밖의 기기들이 정상적인 작동을 하였다는 것을 간접적으로 확인할 수 있었다.

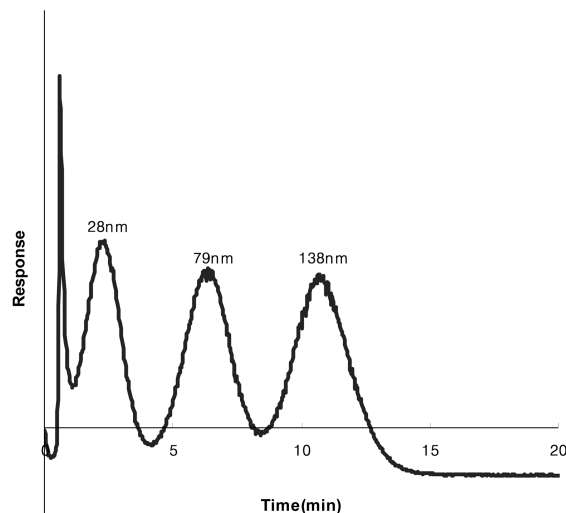
이렇게 본 연구에서 stop-flow방식의 flow FFF를 우선적으로 실험하고 이론적으로 계산되어지는 입자의 크기와 실험적으로 얻어진 결과를 확인 하였고, 확인 한

결과 실험을 통하여 입자의 크기를 결정하는 방법이 이론과 잘 일치하는지를 살펴보았다. 따라서 OFSC-flow FFF를 이용하여 이 결과와 비교함으로써 실제 시료에 적용(application) 가능성을 살펴보았다.

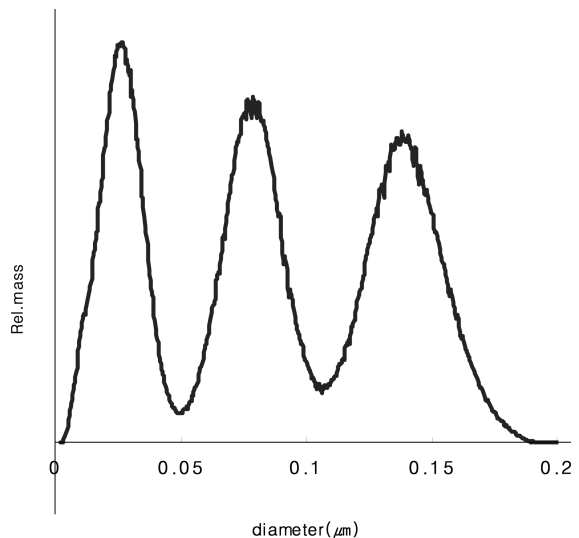
### 3.2. OFSC-Flow FFF에 의한 희석된 표준물질 분리

stop-flow 방식의 Flow FFF의 분리에 사용 되었던 동일한 3가지 28, 79, 138 nm 크기의 폴리스티렌 라텍스 표준물질의 혼합시료 20  $\mu$ L를 먼저 이동상 50 mL에 희석 시켜서 채널 내로 주입 했을 경우 시료의 유실 없이 stop-flow방식의 흐름 장 흐름 분획과 동일한 좋은 분리를 확인하고 서로 머무름 시간이 잘 일치 되는 것을 결과로 확인하고 그에 따라 크기 분포를 확인 하고자 각 크기의 시료의 피크를 얻는 것을 살펴보았다.

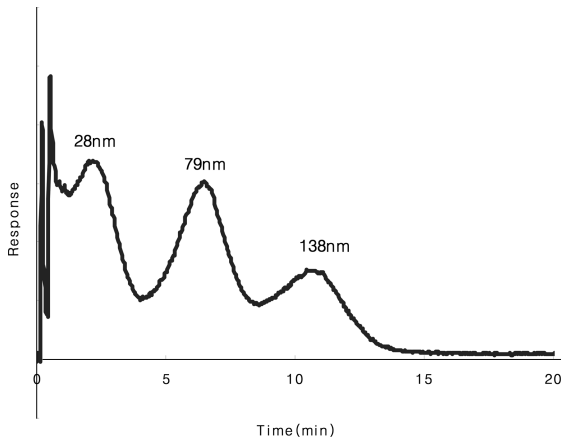
그 결과와 실험 조건은 Fig. 3에 나타내었다. 3가지 28, 79, 138 nm 크기의 표준물질 혼합시료의 경우 50 mL의 이동상에 희석 시킨 후에 실험을 한 결과, 특히 머무름 시간이 stop-flow방식의 결과와 좋은 일치를 보이는 것을 확인할 수 있었다. 머무름 시간이 일치를 보인다는 것은 이론에 따라서 계산하였던 stop-flow방식의 흐름 장 흐름 분획법의 결과와 일치되게 OFSC방식에 의해 실험에 의하여 결정된 입자의 크기가 잘 일치 한다는 것을 보여주는 결과이다.



**Fig. 1.** Fractogram of polystyrene latex standards. Flow conditions are  $V_c=0.8$  mL/min and  $V_{out}=2.0$  mL/min. Carrier solution is contained 0.05% SDS with 0.02%  $\text{NaN}_3$ .



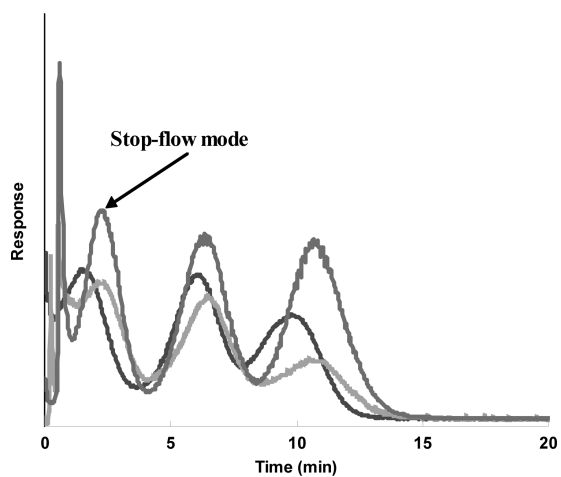
**Fig. 2.** Size distribution of polystyrene latex standards. Flow conditions are  $V_c=0.8$  mL/min and  $V_{out}=2.0$  mL/min. Carrier solution is contained 0.05% SDS with 0.02%  $\text{NaN}_3$ .



**Fig. 3.** Fractogram of polystyrene latex standards obtained by OFSC-Flow FFF run. 50 mL containing 20  $\mu$ L diluted sample was introduced into channel. The focusing flow rate is 1:15 with flow rates at the normal and opposed inflow inlets of 0.2 and 3.0 mL/min. The focusing time is 60 min. During the separation,  $V_c=0.8$  mL/min,  $V_{out}=2.0$  mL/min

Fig. 3을 통하여 OFSC방식의 가능성을 확인한 후 stop-flow의 결과와 OFSC방식의 결과가 일치하는지를 확인하기 위하여 두 결과를 비교한 결과는 Fig. 4에 나타내었다. stop-flow 방식에 비하여 다소 긴 focusing 시간에 따라 시료가 유실되는 경향은 보였지만 시료의 머무름 시간은 크게 달라지지 않음을 Fig. 4를 통하여 확인할 수 있었다.

3가지 표준물질의 혼합시료 20  $\mu$ L을 이동상 100 mL에 희석 시킨 후에 채널 내로 주입하여 실험한 결

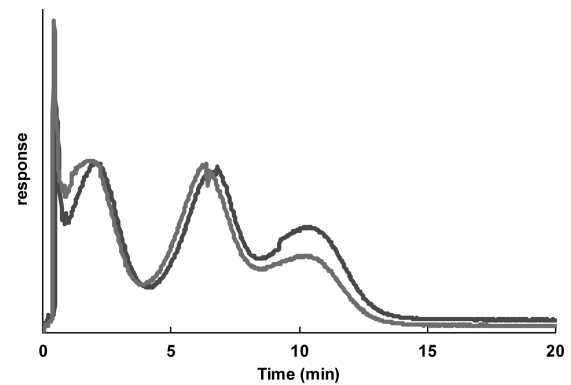


**Fig. 4.** Overlaid fractograms of polystyrene latex standards obtained by Stop-flow mode and OFSC mode Flow FFF runs.

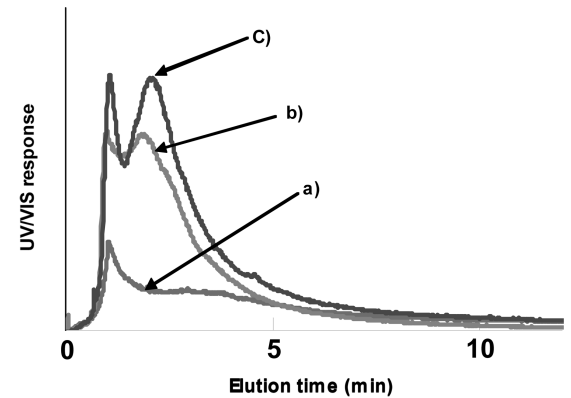
과와 실험 조건은 Fig. 5에 나타내었다. 실험 결과의 재현성을 확인하기 위하여 2번의 실험 결과가 잘 일치하는 것을 더불어 확인할 수 있었고 OFSC-flow FFF가 실제 지하수 시료와 같은 입자의 농도가 아주 적은 시료에 적용 가능성을 확인하였다.

**3.3. 실제 지하수 및 주변 토양 시료에 대한 OFSC 방식-흐름 장 흐름 분획법의 적용**

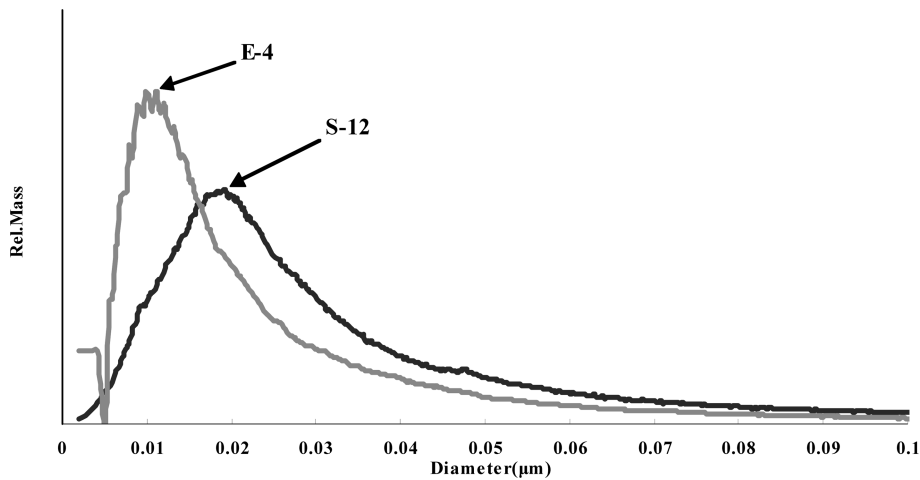
본 실험에 사용된 지하수 시료는 두 곳의 각기 다른 지역에서 수집된 지하수 시료인 E-4와 S-12 2가지 시



**Fig. 5.** Fractograms of polystyrene latex standards obtained by OFSC-Flow FFF run. 100 mL containing 20  $\mu$ L diluted sample was introduced into channel. The focusing flow rate is 1:15 with flow rates at the normal and opposed inflow inlets of 0.2 and 3.0 mL/min. The focusing time is 60 min. During the separation,  $V_c=0.8$  mL/min,  $V_{out}=2.0$  mL/min.



**Fig. 6.** Fractograms of ground water named S-12 sample obtained by OFSC-Flow FFF run. The focusing flow rate is 1:15 with flow rates at the normal and opposed inflow inlets of 0.2 and 3.0 mL/min. The focusing times are a) 30, b) 100, c) 150 min. Injection volumes are a) 10, b) 50, c) 100 mL. During the separation,  $V_c=0.5$  mL/min,  $V_{out}=1.0$  mL/min.



**Fig. 7.** Overlaid of size distributions of ground water named E-4 and S-12 sample obtained by OFSC-Flow FFF run. The focusing flow rate is 1:15 with flow rates at the normal and opposed inflow inlets of 0.2 and 3.0 mL/min. The focusing times is 100 min. Injection volumes is 50 mL. During the separation,  $V_c=0.5$  mL/min,  $V_{out}=1.0$  mL/min.

료가 연구에 이용되었다.

실제 지하수시료인 E-4와 S-12의 OFSC-Flow FFF의 분리는 Fig. 6에 나타내었다. OFSC 방식의 flow FFF를 사용하여 많은 양의 시료들을 채널 내로 주입하여 각 시료들의 특성에 따라 각기 다른 모양의 fractogram을 확인 할 수 있었고, 머무름 시간에 따라 E-4와 S-12 시료의 크기분포를 확인한 결과는 Fig. 7에 나타내었다. Fig. 7을 통하여 각 시료마다 다른 입자의 크기 분포를 갖는 것을 확인 할 수 있었으며 이를 통하여 두 가지 시료의 입자의 크기 분포가 다른 것을 확인함으로써 지하수 시료인 E-4와 S-12는 직접적인 연관성을 찾아보기 힘들다는 것을 예상할 수 있었다. 이렇게 각각의 지하수 시료들을 비교하고 분석함으로써 본 연구에서 OFSC-Flow FFF의 도입으로 지하수에 대한 분석에 적용할 수 있음을 보여 주었다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 flow FFF를 이용하여 지하수 시료와 같이 입자의 농도가 적은 시료의 전처리 과정을 생략하고 보다 정확한 시료의 정보를 얻고자 OFSC-Flow FFF를 이용하여 실험하고 고찰해 보았다. 본 연구에서 관심을 가지고 관찰한 실험은 실제 지하수 시료를 머무름 시간에 따라 분리하고 그에 따른 환경적인 연구에 대한 정보와 연구를 수행하는데 그 목적이 있었다. 따라서 이를 통하여 다음과 같은 몇 가지 결론에 도달할 수 있었다.

먼저, 28, 79, 138 nm의 크기를 가지는 폴리스티렌 라텍스 표준물질을 사용하여 본 연구에 사용된 OFSC-Flow FFF를 테스트 해 본 결과 분리가 잘 이루어짐을 확인하였다.

실제 지하수 시료들을 전처리 과정 없이 FFF 시스템에 도입하여 실험하여 각 크기 분포를 확인하여 자연수 내에 존재하는 입자들의 전체적인 크기의 분포를 확인하고 각 시료가 가진 독특한 크기 분포도 좋은 환경 연구에 자료가 될 수 있음을 볼 수 있었다.

또한, OFSC-Flow FFF를 도입하여 기존의 입자의 연구에 있어서 수반되었던 시료의 전처리 과정 없이 시료 그 자체를 실험에 도입하고 분리 및 분석을 수행함으로써 보다 정확한 시료에 대한 정보와 분석이 가능케 하였다. 따라서 FFF의 다양한 방식을 조합한다면 지하수에 대한 보다 정확한 분리 방법을 제시할 수 있다는 가능성을 보여 주었다.

#### 감사의 글

본 연구는 한국지질자원연구원 기본사업인 07-3412-11 과제의 일환으로 수행되었습니다.

#### 참고문헌

1. Rudin, A and Johnston, H.K. *Polym. Lett.*, **1970**, 9, 55.
2. Giddings, J. C, *J. Chem. Educ.*, **1973**, 50, 667-669.
3. Bekett, R, Bigelow, J.C, Zhang, J and Giddings, J. C,

- Influence of Aquatic Humic Substances on Fate and Treatment of Pollutants*; MacCarthy, P, Suffet, I.H., Eds.; *Advances in Chemistry Series 219:American Chemical Society*, Washington, DC, **1988** Chapter 5.
4. Yang, F.J.F, Myers, M.N and Giddings, J. C, *Anal. Chem.*, **1974**, 46, 1924-193.
  5. Mikael Nilsson, Staffan Brinbaum and Karl-Gustav Wahlund, *J. Biochem. Biophys.* **1996**, 33: 9-23.
  6. Wolfgang Fraunhofer, Gerhard Winter, and Conrad Coester, *Anal. Chem.*, **2004**, 76: 1909-1920.
  7. Cecilia Arfvidsson and Karl-Gustav Wahlund, *J. Chromatogr. A*, **2003**, 1011: 99-109.
  8. M. P. Petteys and M. E. Schimpf, *J. Chromatogr. A*, **1998**, 816:145-158.
  9. B. Lyven, M. Hasselov, C. Haraldsson and D.R. Turner, *Analytica Chimica Acta.* **1997**, 357, 187-196.
  10. Hookeun Lee, S. Kim Ratanathanawongs Williams, and J. C. Giddings, *Anal. Chem.*, **1998**, 70, 2495-2503.