

고성능 액체 크로마토그래피에 의한 지방족 화합물의 간접 분광광도 측정에 관한 연구

姜三祐[†]·姜專澤^{*}

한남대학교 이공대학 화학과

^{*}한국화학연구소

(1989. 2. 23 접수)

A Studies on Indirect Photometric Detection of Aliphatic Compounds by High-Performance Liquid Chromatography

Sam-Woo Kang[†] and Jeon-Tag Kang^{*}

Department of Chemistry, Han Nam University, Dae-Jeon 300-791, Korea

^{*}Korean Institute of Chemical Research, Dae-Jeon 302-343, Korea

(Received February 23, 1989)

요 약. 고성능 액체 크로마토그래피에 있어서 지방족 화합물인 알코올 케톤 및 에스테르의 간접 분광광도 측정에 관하여 조사하였다. 비발색단 또는 약한 발색단을 가지고 있는 이들 시료들은 검출시약으로 UV 흡수물질인 *p*-클로로페놀 또는 *p*-니트로페놀을 이동상에 첨가하므로 UV 검출기로서 간접적으로 검출할 수 있었고 검출한계로 Submicrogram 수준까지 얻을 수 있었다. 또한 최적조건하에서 몇가지 혼합 시료들을 좋은 분리도와 비교적 높은 감도로서 분리 및 정량할 수 있었다.

ABSTRACT. Indirect photometric detection of aliphatic compounds such as alcohols, ketones and esters was investigated in high-performance liquid chromatography. These samples possessing nonchromophore or weak chromophore could be indirectly detected by a UV detector with addition of UV absorbing, *p*-chlorophenol or *p*-nitrophenol in mobile phase as detection reagent, and submicrogram detection limits were achieved. Some mixtures of samples were also able to be separated and quantitated with good resolution and comparatively high sensitivity under optimum conditions.

서 론

고성능 액체 크로마토그래피에서 중요한 부분을 차지하고 있는 것은 분리관으로부터 용출되는 이동상을 연속적으로 모니터하기 위한 검출기인데 현재 가장 널리 사용하고 있는 검출기는 RI 검출기와 UV/VIS 검출기이다. RI 검출기는 모든 시료에 감응하나 온도영향에 민감하여 감도가 다른 검출기보다 비교적 낮다. 반면 UV/VIS 검출기는 감도는 높으나 비발색단의 시료에 대해서는 검출이 어려운 단점을 가지고 있다. 그러나 UV/VIS 검출기를 사용하여 발색단이 없는 시료들을 간접

적으로 검출할 수 있는 분광광도 측정법이 많이 연구되어 왔다. 이러한 간접 분광광도법은 1973년 G. Schill¹이 처음으로 소개하였는데 그는 이온성 시료들을 이온-쌍 크로마토그래피법으로 분리하기 위해 반대이온으로 UV 흡수물질을 이동상에 첨가하여 비흡수 시료들을 간접적으로 검출할 수 있었으며 흡수시료 일지라도 감도를 크게 향상시킬 수 있었다. 그 후 이러한 이온-쌍 크로마토그래피 방법을 사용하여 비흡수 유기 및 무기이온 화합물들을 검출하는 연구들이 활발히 진행되어 왔다²⁻¹². DiNunzio와 Freiser¹³는 지방족 유기산들을 분리하는데 양이온 염료인 brilliant green

을 이온-쌍 시약으로 사용하여 가시영역인 630 nm에서 검출할 수 있었다. 이러한 간접 분광광도법은 이온교환 크로마토그래피에서도 적용할 수 있었다. Miller¹⁴ 등은 이온교환법으로 할로젠족 이온 등 무기이온들을 프탈산 및 벤조산 유도체들을 이동상으로 하여 분리 검출할 수 있었으며 Cochrane¹⁵ 등은 프탈산염을 사용하여 여러 무기이온들을 분리 및 검출하였으며 검출한계는 전기전도도 검출기를 사용했을 때 보다 간접 분광광도법이 훨씬 우수하다는 것을 알 수 있었다. 이온교환 크로마토그래피에서 간접 분광광도 검출의 특징은 모든 시료들의 크로마토그램이 negative peak로 나타나며 특히 전기전도 측정에서 요구되는 suppressor column이 필요없다. 최근에는 Parkin¹⁶⁻¹⁸과 Takeuchi¹⁹ 등은 역상계에서 비이온성 물질인 지방족 알코올과 에틸렌 글리코올들을 간접 검출하였다.

본 연구에서는 비흡수 물질인 지방족 알코올, 흡수가 아주 약한 케톤 및 에스테르 화합물들을 검출시약으로 몰흡광계수가 큰 *p*-클로로페놀과 *p*-니트로페놀을 사용하여 간접 분광광도법으로 검출하였다. 또한 용량인자에 영향을 주는 여러 인자들의 영향을 조사하였으며 최적조건하에서 몇가지 혼합시료들을 분리 및 정량하였으며 검출한계들도 조사하였다.

실 험

시 약

본 실험에서 사용한 시료들은 Fisher Scientific, E. Merk, Wako Chemicals, J. T. Baker 및 Aldrich Chemicals 등의 제품으로 특급 또는 일급 시약을 사용하였고 검출시약인 *p*-클로로페놀(*p*-CP)과 *p*-니트로페놀(*p*-NP)은 Tokyo Kasei 제품인 특급시약으로 정제하지 않고 그대로 사용하였다. 이동상으로 사용한 메탄올은 J. T. Baker 제품인 HPLC 용을 사용하였고 증류수는 Waters, Milli-Q Reagent Water System에 통과시킨 탈이온수를 사용하였다.

측정기기

본 실험에서 사용한 HPLC는 Waters Associates 제품으로 펌프는 510 Solvent Delivery

System, 시료 주입기는 U6K Universal Injector, 검출기는 441 UV/VIS Discrete Multi-wavelength Absorbance Detector, 기록기는 730 Data Module를 사용하였으며, 분리관은 Spectra Physics 제품인 Spherisorb C₁₈ Column(30 cm×3.6 mm, 10 μm)를 사용하였다. 분리관의 온도를 정밀하고 일정하게 유지시키기 위하여 Microprocessor로 조절되는 가열장치로서 Waters사 Temperature Control System과 Column Heater Chamber를 사용하였다.

실험방법

용리액 및 시료의 조제. 메탄올, 증류수 및 검출시약을 주어진 실험조건에 따라 일정한 농도로 이동상을 만든 다음 0.45 μm Millipore filter membrane으로 흡인여과한 후 Ultrasonic bath에서 용액속에 녹아 있는 공기를 제거하여 사용하였다. 시료는 실험조건에 따라 일정한 농도로 만들었으며 각 시료들의 용해도를 고려하여 용매 혼합비율(MeOH-H₂O, v/v%)을 다르게 사용하였다.

실험절차. 분리관에 시료를 주입하기 전에 이동상을 통과시켜 이동상과 정지상에 평형이 되도록 하였으며 평형이 이루어졌을 때 바탕선이 일정하게 안정되었으며 각 시료들의 머무름 시간도 일정하였다. 이동상의 유속은 1.0 ml/min으로 고정시켰으며 시료들은 0.01~0.1 M 사이의 농도를 만들어 25~50 μl를 주입하였다. 시료의 검출은 본 실험에서 사용한 검출기는 Variable multiwavelength가 아닌 Discrete 검출기이기 때문에 *p*-CP의 λ_{max}는 279.0 nm로 *p*-NP는 317.0 nm에서 313 nm로 각각 이동시켜 측정하였다. 모든 실험은 25°C±1 온도에서 실시하였다. 그리고 background를 유지하기 위하여 이동상에 첨가한 검출시약의 UV 흡수로 인하여 바탕선을 하향조절하여 흡광도를 영(zero)으로 조정하였다. 모든 시료의 머무름 정도는 용량인자(*k'*)로 계산하여 표시하였다.

결과 및 고찰

Fig. 1은 노르말 헤산올(*n*-HeOH)과 시크로 헤산올(*c*-HeOH)의 크로마토그램으로 이동상은

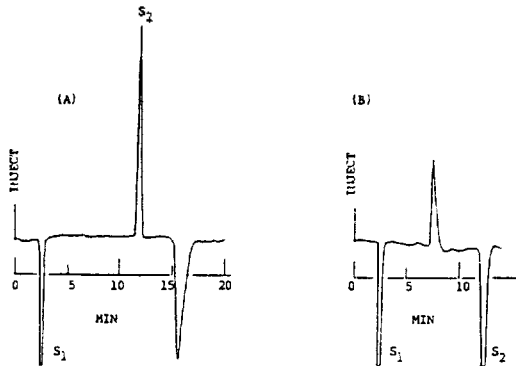


Fig. 1. Chromatograms of (A) *n*-HeOH (B) *c*-HeOH in 50% (v/v) MeOH-H₂O containing $5.0 \times 10^{-4} M$ *p*-CP. System peak: S₁; MeOH, S₂; *p*-CP.

검출시약으로 $5.0 \times 10^{-4} M$ *p*-CP를 포함하는 50% (v/v) MeOH-H₂O이다. Fig. 1에서 크로마토그램은 두개의 system peak(S₁, S₂)와 시료의 peak를 보여주고 있다. Fig. 1(A)에서는 *p*-CP의 system peak인 S₂는 positive이고 시료의 용매로 사용한 MeOH의 system peak인 S₁과 시료 peak는 negative로 나타나고 있다. Fig. 1(B)에서는 반대로 system peak, S₁과 S₂는 negative이고 시료의 peak는 positive임을 보여주고 있다. 이것은 시료의 극성, 시료와 검출시약의 상대적 머무름 시간 및 시료의 용매농도 등에 기인한다²⁰. 본 실험에서 시료의 용매로 MeOH-H₂O 혼합용매를 사용하였는데 시료의 용해도에 따라 MeOH의 함량을 다르게 하였다. Fig. 1(A)와 (B)에서 S₁은 모두 negative인데 용매의 MeOH 농도가 이동상의 MeOH 농도보다 적을 때 나타나고 있다. 이와 같은 사실은 검출시약인 *p*-CP가 이동상과 정지상 사이에서 평형을 이루고 있을 때 시료를 주입하면 시료의 용매 MeOH이 이동상의 MeOH보다 적음으로 평형은 깨어지고 이동상의 *p*-CP가 정지상으로 이동된다. 따라서 이동상의 *p*-CP의 농도가 감소됨으로 negative로 나타난다. 반대로 시료의 용매의 MeOH 농도가 이동상의 MeOH 농도보다 크면 평형은 정지상의 *p*-CP가 이동상으로 이동되어 *p*-CP 농도가 증가되므로 positive peak로 나타나게 된다. S₁ peak의 크기는 시료용매와 이동상의 MeOH 농도의 차가 크면 클수록 증가되었고

농도차가 없으면 S₁ peak는 나타나지 않았다. Fig. 1(A)에서 보는 바와 같이 검출시약인 *p*-CP peak인 S₂는 positive이고 시료인 *n*-HeOH peak는 negative로서 이 현상은 일반적으로 시료가 검출시약보다 머무름 시간이 클 때 나타나고 있다. 즉 정지상의 *p*-CP가 더 소수성인 시료 *n*-HeOH와 치환되어 용리됨으로 *p*-CP의 system peak, S₂는 positive로 나타나고 이어서 *n*-HeOH가 용리될 때 *n*-HeOH에 치환되었던 자리에 deficiency가 생겨 다시 평형을 유지하기 위하여 이동상의 *p*-CP가 정지상으로 이동되어 이동상의 *p*-CP 농도가 감소됨으로 negative로 나타난다. 이와는 달리 Fig. 1(B)에서는 시료가 검출시약보다 머무름 시간이 작을 때 반대현상이 나타난다. 즉 시료인 *c*-HeOH가 먼저 용리될 때 정지상의 *p*-CP와 coelution 되므로 시료의 peak는 positive이고 그 결과 정지상의 *p*-CP의 농도가 감소되어 다시 평형을 유지하기 위하여 이동상의 *p*-CP가 정지상으로 이동되어 지므로 시료 peak에 이어서 나오는 S₂ peak는 negative로 나타나게 된다.

검출시약의 농도. 이동상에 첨가한 검출시약인 *p*-CP와 *p*-NP의 농도변화에 시료의 용량인자와 검출기에 대한 감도가 영향을 받을 것으로 생각된다. 이러한 영향을 알아보기 위하여 10% MeOH의 이동상하에서 두 검출시약의 농도에 따라 몇개의 시료들의 용량인자와 area response를 측정하여 Table 1에 나타내었다. Table 1에서 보는 바와 같이 *p*-CP와 *p*-NP의 농도가 증가함에 따라 시료들의 peak 면적은 증가하였다. 따라서 시료들의 검출은 검출시약의 농도가 증가함에 따라 그 감도가 좋아짐을 의미한다. 그러나 검출시약의 농도가 증가함에 따라 상대적으로 바탕선의 신호잡음이 커지는 현상을 보여주었다. Background 흡광도에 대한 검출기와 기록기를 정기적으로 조절할 수 있는 능력이 제한을 받는다. *p*-NP와 *p*-CP의 농도를 달리한 이유는 *p*-NP가 *p*-CP보다 몰흡광계수가 훨씬 크므로 *p*-NP 농도를 *p*-CP보다 묽게 하였다. 한편 시료들의 용량인자들은 거의 변화를 찾아 볼 수 없다. 이것은 사용된 검출시약의 농도가 아주 묽기 때문에 이 농도범위 내에

Table 1. Capacity factor and area response of aliphatic alcohols as a function of the concentration of *p*-nitrophenol and *p*-chlorophenol in 10% (v/v) MeOH-H₂O

Alcohols	Conc. of <i>p</i> -NP (M)			Conc. of <i>p</i> -CP (M)	
	5.0 × 10 ⁻⁵	7.5 × 10 ⁻⁵	1.0 × 10 ⁻⁴	5.0 × 10 ⁻⁵	7.5 × 10 ⁻⁴
2-Propen-1-ol	1.16 ^a	1.15	1.16	1.17	1.10
	0.98 ^b	1.38	1.51	1.29	1.63
<i>iso</i> -Propanol	1.66 ^a 4.06 ^b	1.66	1.60	1.64	1.57
	1.83 ^b	1.97	2.39	1.91	3.18
<i>ter</i> -Butanol	4.01 ^a	4.03	4.00	3.91	3.72
	7.35 ^b	5.78	6.76	4.42	5.78
<i>sec</i> -Butanol	5.21 ^a	5.23	5.20	5.16	4.89
	5.10 ^b	7.26	8.50	5.31	6.55
<i>iso</i> -Butanol	6.34 ^a	6.31	6.30	6.34	5.97
	7.35 ^b	10.23	12.44	7.94	9.31

^aCapacity Factor; ^bArea Response, arb. unit (× 10³).

Table 2. Capacity factors of aliphatic compounds as a function of the concentration of methanol containing 5.0 × 10⁻⁴M *p*-chlorophenol

Compounds	Methanol (%)					
	10	20	30	40	50	60
Ethanol	0.63	0.46	0.37	0.33	—	—
<i>iso</i> -Propanol	1.64	1.07	0.77	0.58	0.44	0.34
<i>n</i> -Propanol	2.00	1.35	0.95	0.68	0.52	0.46
<i>n</i> -Butanol	7.00	4.29	2.72	1.70	1.12	0.73
<i>iso</i> -Butanol	6.34	3.85	2.52	1.62	1.08	0.69
<i>sec</i> -Butanol	5.16	3.12	2.03	1.32	0.92	0.68
<i>ter</i> -Butanol	3.91	2.39	1.58	1.07	0.77	0.55
Cyclopentanol	7.03	4.33	2.74	1.73	1.16	0.75
<i>n</i> -Pentanol	25.50	13.94	8.06	4.45	2.54	1.37
<i>iso</i> -Pentanol	20.67	11.48	6.85	3.84	2.25	1.25
<i>ter</i> -Pentanol	11.28	6.34	4.06	2.46	1.58	0.97
Cyclohexanol	20.31	11.12	6.49	3.66	2.12	1.22
<i>n</i> -Hexanol	—	—	21.75	11.96	5.61	2.62
2-Hexyl alcohol	—	—	16.59	9.50	4.58	2.22
2-Propen-1-ol	1.17	0.83	0.61	0.45	0.37	0.30
Acetone	—	—	0.60	0.41	0.31	0.29
2-Butanone	—	—	1.50	0.97	0.65	0.49
Cyclopentanone	—	—	1.82	1.15	0.76	0.59
Cyclohexanone	—	—	4.30	2.30	1.45	0.96
2-Hexanone	—	—	17.37	5.44	2.93	1.71
2-Heptanone	—	—	18.41	13.60	6.95	3.28
2-Octanone	—	—	—	—	15.44	6.21
Methyl acetoacetate	—	—	0.78	0.47	0.32	0.25
Ethyl acetoacetate	—	—	1.91	1.08	0.65	0.43
Butyl acetoacetate	—	—	11.42	5.15	2.63	1.25

서의 시료의 용량인자는 별 영향을 받지 않는 것으로 생각된다. 따라서 이동상의 검출시약의 농도증가는 시료의 용량인자보다는 시료의 검출감도 증가에 기여하는 것으로 나타났다.

용량인자에 대한 메탄올의 영향. 역상계에서 시료들의 용량인자는 이동상의 organic modifier에 크게 영향을 받는다. 본 실험에서 organic modifier로서 MeOH을 사용하였다. 5.0 × 10⁻⁴ M *p*-CP를 포함하는 이동상의 MeOH 농도를 여러가지로 변화시켜 시료들의 용량인자를 측정하였다. Table 2에서 볼 수 있는 바와 같이 MeOH 농도증가로 모든 용량인자는 감소되었다. 그 이유는 역상계에서 MeOH의 농도가 증가할수록 용매 강도가 증가하여 시료들의 머무름 시간이 감소하기 때문이다. 그리고 알킬사슬의 변화에 따라 용량인자가 *n*-HeOH > *n*-PeOH > *n*-BuOH > *n*-PrOH > EtOH 및 2-octanone > 2-heptanone > 2-hexanone > 2-butanone > acetone 순으로 감소하는 현상을 보여주었는데 이는 시료의 분자량 또는 소수성이 감소하기 때문이다. 또한 이성질체들의 용량인자는 소수성에 따라 normal > iso > secondary > tertiary > cyclo 순으로 감소하는 경향을 나타내었으며 특히 *c*-HeOH는 *i*-PeOH보다 분자량이 크지만 용량인자는 작은 것으로 나타났다.

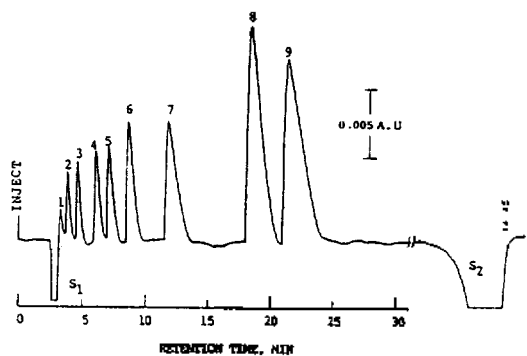


Fig. 2. Separation of a mixture of some alcohols in 30% (v/v) MeOH-H₂O containing $5.0 \times 10^{-4} M$ *p*-CP. 1: EtOH(50.70 μ g), 2: *n*-BuOH(51.38 μ g), 3: *n*-PrOH(51.01 μ g), 4: *t*-BuOH(50.53 μ g), 5: *s*-BuOH(50.73 μ g), 6: *n*-BuOH(51.20 μ g), 7: *t*-PeOH(50.53 μ g), 8: *i*-PeOH(50.20 μ g), 9: *n*-PeOH(50.88 μ g), System peak: S₁; MeOH, S₂; *p*-CP.

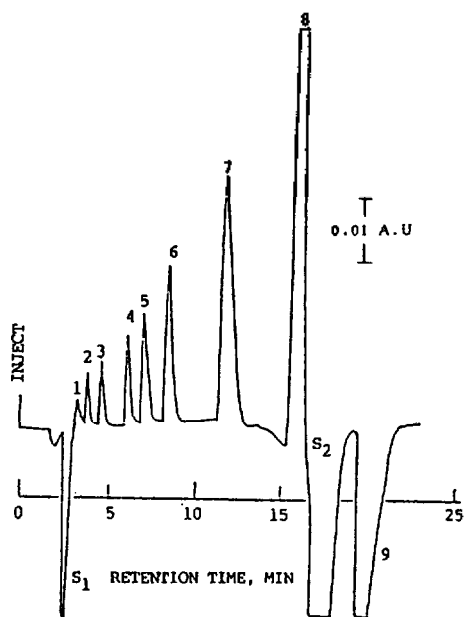


Fig. 3. Separation of a mixture of some alcohols in 30% (v/v) MeOH-H₂O containing $1.0 \times 10^{-4} M$ *p*-NP. Sample: Same as in Fig. 2.

혼합시료의 분리. 지금까지 실험결과를 토대로 최적조건하에서 몇가지 혼합시료들을 분리하였다. 이들의 크로마토그램은 Fig. 2~5에 나타나 있다. Fig. 2는 $5.0 \times 10^{-4} M$ *p*-CP를 포함하는 30% (v/v) MeOH-H₂O 이동상에서 알코올 시료들의

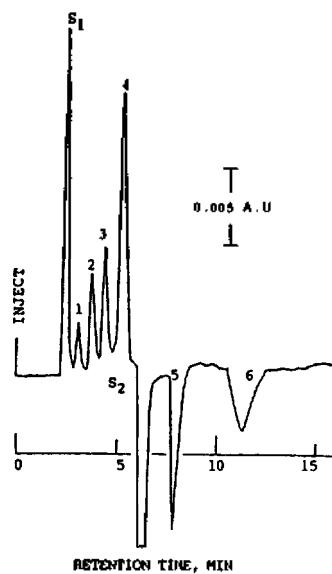


Fig. 4. Separation of mixture of some alcohols in 60% (v/v) MeOH-H₂O containing $5.0 \times 10^{-4} M$ *p*-CP. 1: *n*-PrOH(32.46 μ g), 2: *i*-BuOH(30.56 μ g), 3: *t*-PeOH(30.17 μ g), 4: *n*-PeOH(30.64 μ g), 5: *n*-HeOH(30.99 μ g), 6: *i*-HpOH(31.34 μ g), System peak: S₁; MeOH, S₂; *p*-CP.

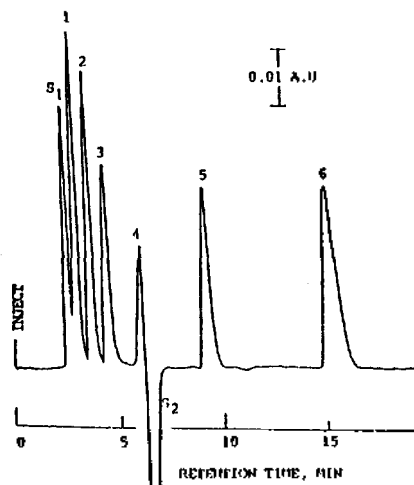


Fig. 5. Separation of mixture of some ketones in 60% (v/v) MeOH-H₂O containing $5.0 \times 10^{-4} M$ *p*-CP. 1: Acetone (11.25 μ g), 2: Cyclopentanone (11.24 μ g), 3: Cyclohexanone (12.28 μ g), 4: 2-Hexanone (10.72 μ g), 5: 2-Heptanone (11.15 μ g), 6: 2-Octanone (20.59 μ g), System peak: S₁; MeOH, S₂; *p*-CP.

크로마토그램이고 Fig. 3은 같은 시료들을 $1.0 \times 10^{-4} M$ *p*-NP를 포함하는 30% (v/v)

Table 3. Calibration curves and detection limits of aliphatic alcohols and ketones

Compounds	Linear regression parameters				Detection limits (μg)
	Intercept	Slope	Correl. coef.	Range of conc. μg	
Ethanol	1.873	2.639	0.9998	30-300	7.4
2-Propen-1-ol	3.685	1.782	0.9970	15-150	3.9
<i>n</i> -Propanol	-2.013	2.561	0.9984	13-130	3.3
<i>ter</i> -Butanol	3.111	1.126	0.9997	12-120	3.0
<i>sec</i> -Butanol	-4.636	2.081	0.9973	12-120	2.8
<i>n</i> -Butanol	-1.952	1.273	0.9993	10-100	2.3
<i>ter</i> -Pentanol	-1.582	0.760	0.9971	10-100	2.3
<i>iso</i> -Pentanol	-1.164	0.468	0.9965	7-70	1.3
<i>n</i> -Pentanol	1.772	0.375	0.9997	7-70	1.2
Acetone	-1.402	1.115	0.9998	10-100	2.2
Cyclopentanone	-0.443	1.089	0.9995	10-100	2.3
Cyclohexanone	-2.515	1.653	0.9979	10-100	2.5
2-Heptanone	-0.997	1.252	0.9992	10-100	2.5
2-Octanone	-1.386	0.789	0.9995	20-200	4.5

Alcohol: Experimental conditions are same as in Fig. 2. Ketone: Experimental conditions are same as in Fig. 5.

MeOH-H₂O 이동상으로 분리한 크로마토그램이다. 앞에서 언급한 바와 같이 system peak, S₁은 시료용매의 MeOH 농도가 이동상의 MeOH 보다 높기 때문에 negative로 나타나고 Fig. 2의 모든 시료들은 *p*-CP의 용량인자보다 작기 때문에 모두 positive로 나타났고 *p*-CP의 system peak, S₂는 negative로 나타났다. Fig. 3에서도 마찬가지로 *p*-NP의 용량인자보다 작은 용량인자를 가진 시료들의 peak들은 positive이고 *p*-NP의 peak, S₂는 negative이며 또한 *p*-NP보다 용량인자가 큰 *n*-PeOH peak도 negative로 나타남을 알 수 있다. 또한 각 시료들의 peak height는 약 50 μg 의 같은 양의 시료를 주입하였으나 검출 시약의 system peak에 가까울수록 증가함을 보여주고 있다. Fig. 4는 5.0 \times 10⁻⁴M *p*-CP를 포함하는 60% (v/v) MeOH-H₂O 이동상을 사용하여 분자량이 보다 큰 알코올 혼합물을 분리한 크로마토그램이다. 여기에서도 앞의 그림과 같은 현상으로 S₂보다 앞에 나오는 시료들은 positive이고 늦게 나오는 시료의 peak는 negative이다. Fig. 5는 5.0 \times 10⁻⁴M *p*-CP를 포함하는 60% (v/v) MeOH-H₂O 이동상으로 케톤 혼합시료를 분리한 크로마토그램이다. 여기서도 S₂보다 먼저 나오는 시료는 positive이고 S₂보다 늦게 나오는 peak는 알코올 시료와 달리 positive이다. 이러

한 서로 다른 원인을 규명하지 못하였다.

검출한계 및 정량. 간접 분광광도 검출의 감도를 조사하기 위하여 Fig. 2 및 5와 같은 실험조건에서 혼합 알코올과 케톤 시료들의 크로마토그램으로부터 계산하였다. 시료의 양을 감소하면서 검출기의 noise level에 2.5배 되는 peak height로부터 구하였다. 그 결과 Table 3에 표시하였으며 검출한계는 대략 submicrogram 수준에 이르렀다. 또한 정량을 위하여 시료의 주입한 양에 대한 peak area를 plot하여 검량선을 구했으며 Table 3에 그 검량선에 대한 linear regression parameters를 표시하였다. 정량범위는 알코올 및 케톤 시료 모두 대략 10~100 μg 범위내에서 좋은 linearity (r : 0.9965~0.9998)를 나타내었다.

본 연구는 한국과학재단의 연구비에 의하여 수행되었습니다. 재단에 심심한 감사로 드립니다.

인용문헌

1. S. Eksborg, P. O. Lagerstom, R. Modium, and G. Schill, *J. Chromatogr.*, **83**, 99 (1973).
2. L. Hackzell, T. Rydberg, and G. Schill, *J. Chromatogr.*, **282**, 179 (1983).
3. A. Herrmann, E. Damawandi, and M. Wagnann,

- J. Chromatogr.*, **280**, 85 (1983).
4. B. Sackok, S. N. Diming, and B. A. Bidlingmeyer, *J. Liquid Chromatogr.*, **5**, 389 (1982).
 5. P. Helboe, *J. Chromatogr.*, **261**, 117 (1983).
 6. M. Denkert, L. Hackzell, G. Schill, and E. Siogren, *J. Chromatogr.*, **218**, 31 (1981).
 7. W. E. Barber and P. W. Carr, *J. Chromatogr.*, **260**, 89 (1983).
 8. C. Pettersson and K. No, *J. Chromatogr.*, **282**, 671 (1983).
 9. J. Cronnen, *J. Chromatogr.*, **193**, 225 (1980).
 10. R. S. Deelder and H. A. J. Linssen, *J. Chromatogr.*, **185**, 241 (1979).
 11. A. Tilly Melin, M. Ljungcrantz, and G. Schill, *J. Chromatogr.*, **185**, 225 (1979).
 12. L. Hackzell and G. Schill, *Chromatographia*, **15**, 437 (1982).
 13. J. DiNunzio and H. Freizer, *Talanta*, **26**, 587 (1979).
 14. H. Small and T. E. Miller, *Anal. Chem.*, **54**, 462 (1982).
 15. R. A. Cochrane and D. E. Hillman, *J. Chromatogr.*, **241**, 392 (1982).
 16. J. E. Parkin, *J. Chromatogr.*, **287**, 457 (1984).
 17. J. E. Parkin and H. T. Lau, *J. Chromatogr.*, **314**, 488 (1984).
 18. J. E. Parkin, *J. Chromatogr.*, **351**, 532 (1986).
 19. Toyohide Takeuchi and Daido Isnii, *J. Chromatogr.*, **403**, 324 (1987).
 20. P. K. Gupta and J. G. Nikally, *J. High Resolution Chromatography and Chromatography Communications*, **9**, 573 (1986).