

## 역상액체크로마토그래피에서 벤조산류의 머무름

이 재 석 · 최 범 석\*

경희대학교 기초과학연구소, 자연과학대학 화학과  
(1999. 12. 14 접수)

### Retention of Benzoic Acids in RPLC

Jae-Seok Lee and Beom-Suk Choi\*

Research Institute for Basic Sciences

Department of Chemistry, Kyung Hee University, Yongin, 449-701, Korea

(Received December 14, 1999)

**요 약:** 역상액체크로마토그래피에서 7종의 벤조산의 머무름에 대해서 연구하였다. 벤조산의 불감시간 측정은 무기염이 적당하였다. 로그 용량인자( $\log k'$ )와 Hildebrand의 용해인자( $\delta$ )는 직선관계를 가지며 머무름 메카니즘이 소용매성 효과에 영향을 받는다. 용질의 전이 엔탈피는 온도증가 그리고 이동상에서 유기변형제의 비와 반비례 관계를 가진다. 이동상에서 물의 부피분율과  $\log k'$ 의 관계로부터 얻은 기울기인 S값은 양의 값을 가진다. 자유에너지 변화는 유기변형제의 부피분율의 증가와 비례한다. 소수성지표  $\phi_0$ 은 컬럼의 온도와 반비례한다.

**Abstract:** Chromatographic retention mechanism of seven benzoic acids in RPLC were investigated. Inorganic salt is pertinent for the measurement of dead time in benzoic acid. Logarithms of capacity factor ( $\log k'$ ) and Hildebrand solubility parameter ( $\delta$ ) showed proportional relationship which imply the hydrophobic effect of the retention mechanism in RPLC. Enthalpies of solute transfer showed inverse proportion to temperature and organic modifier ratio of the mobile phase. It was found that the S value showed positive slope in plot of  $\log k'$  vs. volume fraction of water in mobile phase. Free energy change increases with increasing organic volume fraction. The hydrophobicity index,  $\phi_0$  (organic volume fraction) is inversely proportional to column temperature.

**Key words:** RPLC, retention of benzoic acids, hydrophobicity

### 1. 서 론

역상 액체 크로마토그래피에서 용질의 용리거동을 밝히고, 이에 대한 머무름을 예측하기 위한 연구는 다각적으로 이루어지고 있다. 머무름 메카니즘은 이동상의 종류와 조성에 따라 많은 영향을 받고, 매우 복잡해서 이를 정확히 규명하기가 어렵다. 지금까지 용질

의 머무름이 이동상과 용질사이의 소수성 상호작용(hydrophobic interaction)과 밀접하게 관련되어 있다는 소용매성 이론(solvophobic theory)이 머무름 메카니즘 연구에 도입한 이후, 정지상과 이동상 사이에서 용질의 머무름 메카니즘에 대한 많은 연구들이 발표되었다.

Horváth 등이 제시한 소용매성 이론에 의하면 역상 액체 크로마토그래피에서 용질의 머무름은 정지상과 특별한 관계가 없으며, 이동상에 대한 용질의 분배보다는 흡착과정을 통해 머무름이 이루어진다고 하였

\* Corresponding author  
Phone : +82-(0)331-201-2421 Fax : +82-(0)331-202-7337  
E-mail : bschoi@nms.kyunghee.ac.kr

다. 그리고 Tanford 등<sup>2,3</sup>은 용질의 용해도는 이동상과의 수소결합에 의해서 영향을 받으며, 그 결과 수소결합이 용질의 머무름에 영향을 미친다고 하였다. 소용매성 이론은 역상 액체 크로마토그래피에서 관찰되는 대부분의 머무름 거동을 설명하고 있는데, 용질의 용리거동에 영향을 미치는 인자들은 매우 다양하고 상호 복합적으로 작용하기 때문에 용질의 머무름 메카니즘을 정량적이고 체계적으로 설명하는데 부족한 점들을 가지고 있다.

그리고 Geng<sup>4</sup> 등이 제시한 역상 액체 크로마토그래피의 머무름 메카니즘은 화학 양론적 치환모델(stoichiometric displacement model)로서, 이 모델은 용해도 파라미터 개념<sup>5,6</sup>을 이용하여 이동상 조성에 대한 머무름의 의존성을 유도하고, 이동상의 모든 조성 범위에서 정확하게 머무름을 예측할 수 있다고 하였다.

또한 Horváth<sup>7</sup> 등은 소용매성 이론을 열역학적으로 고찰하였는데 이동상에서 물의 부피비가 증가할수록 비극성 용질이 이동상에서 정지상으로 전이할 때 표준 전이엔탈피는 증가한다고 하였다. 그리고 Chen<sup>8</sup> 등은 머무름 실험식을 사용하고 머무름 실험식에서 S지표(hydrophobic index)에 대한 분자구조의 효과를 연구하여 머무름 메카니즘을 설명하였다.

지금까지 역상 액체 크로마토그래피의 머무름 메카니즘 규명을 위한 많은 연구가 진행되어 왔으나<sup>8,9,10</sup> 벤조산과 같은 약산에서 유도체의 대한 비교와 pH에 따른 연구는 많이 되어있지 않다. 본 연구에서는 용질의 머무름 거동 해석에서 일반적으로 적용되고 있는 소용매성 이론을 근거로 하여 완충용액에서 약산 용질의 머무름이 소용매성 효과에 의한 것인지를 확인하고, 완충용액에서 약산인 벤조산류의 머무름 메카니즘에 대해서 알아보고자 하였다. 이를 위해서 용질과 이동상간의 상호작용을 나타내는 소수성 지표인 S지표와  $\log k_w'$ , 부피분율( $\varphi_0$ )을 고찰하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 기기

본 연구에서는 Waters사(Massachusetts, USA)의 HPLC를 사용하였다. HPLC의 pump는 model 616, UV 검출기는 model 996 photodiode array detector이며, injector는 717 plus autosampler이다. 사용한 컬럼

은 Cosmosil 5C18 (4.6 × 150 mm)이고 전치컬럼은 Cosmosil 10C18 (4.6 × 150 mm)이다. 각 기기는 660S controller를 사용하여 작동하고, column의 온도는 410 differential refractometer를 이용해서 조절하였다.

### 2.2. 시약

실험에 사용된 시료(benzoic acids)는 Aldrich사의 A.C.S.급 시약으로서 P.T.A. (purified terephthalic acid) 합성시 사용되는 산이다. 실험에 사용된 7개 시약의 약자는 다음과 같이 본문중에 표기하였다. 4-Carboxybenzaldehyde (4-CBA), 3-Carboxybenzaldehyde (3-CBA), 4-(Hydroxymethyl)benzoic acid (4-HMBA), 3-(Hydroxymethyl)benzoic acid (3-HMBA), Benzoic acid (BA), 4-Toluic acid (4-Tol), 3-Toluic acid (3-Tol).

### 2.3. 온도에 변화에 대한 실험

컬럼의 온도는 25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C로 하였으며, 컬럼의 온도 변화 후에 안정을 위해 240분을 두고 실험을 진행하였다. 이동상의 조성은 pH 4.0의 acetic acid buffer solution과 methanol 그리고 pH 4.0의 acetic acid buffer solution과 acetonitrile의 부피비를 각각 75:25로 고정하여 용리하였다. 각 크로마토그램의 용리시간(elution time)은 60분으로 하였다.

### 2.4. 이동상 세기 변화에 대한 실험

컬럼의 온도를 30°C로 고정시키고 pH 4.0의 acetic acid buffer solution을 각각의 methanol과 acetonitrile에 대해서 20%에서 40%까지 5%씩 변화를 주면서 일정한 부피비로 용리하였다. 각 크로마토그램에서의 용리시간(elution time)은 40분이며, 이동상의 조성비 변화시 컬럼의 안정된 평형상태를 위하여 180분의 간격을 두고 실험을 진행하였다.

### 2.5. 이동상의 pH변화에 따른 실험

컬럼의 온도를 30°C로 고정시키고 이동상의 조성비는 acetic acid buffer solution에 대한 methanol과 acetonitrile의 부피비를 75:25로 하였다. Acetic acid buffer solution의 pH 변화는 3.6, 4.0, 4.4, 4.8, 5.0으로 하였다. 각 크로마토그램에서의 용리시간(elution time)은 40분으로 하였다. pH의 변화시 컬럼이 안정된 평형상태를 유지하도록 240분의 간격을 두고 실험하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. 완충용액에서 불감시간의 측정

역상 액체 크로마토그래피에서 용량인자 ( $k'$ , capacity factor)의 결정을 위해서는 불감시간 (dead time)을 측정하여야 한다. 일반적으로 물, 중수 (deuterium oxide), 유기용매, 극성 유기물질 (예: Uracil), 무기염 (inorganic salt) 등을 이용하여 불감시간을 측정한다. 이온화 화합물의 불감시간은 주로 이온화 정도에 영향을 받으며, 이밖에도 주입된 시료의 양, 시료용매의 전해질 (완충용액) 상태에 따라 영향을 받게 된다.

그림 1에 sodium nitrate ( $\text{NaNO}_3$ ), methanol, phenol, 3-nitrobenzoic acid의 pH 변화에 따른 불감시간을 비교하였다. 본 연구에서는 무기염 ( $\text{NaNO}_3$ )을 불감시간 측정에 사용하였다.

#### 3.2. 이동상의 조성 변화에 따른 머무름의 변화

이동상의 조성비에 따른 Hildebrand의 용해도 파라미터 (solubility parameter,  $\delta$ )와  $\log k'$ 값의 관계를 그림 2 (methanol)과 그림 3 (acetonitrile)에 나타내었다. 본 연구에서 사용한 Hildebrand의 용해도 파라미터는 methanol 14.50, acetonitrile 12.11, water 23.53이며 이 값과 물분율의 곱으로 부터 구하였다.

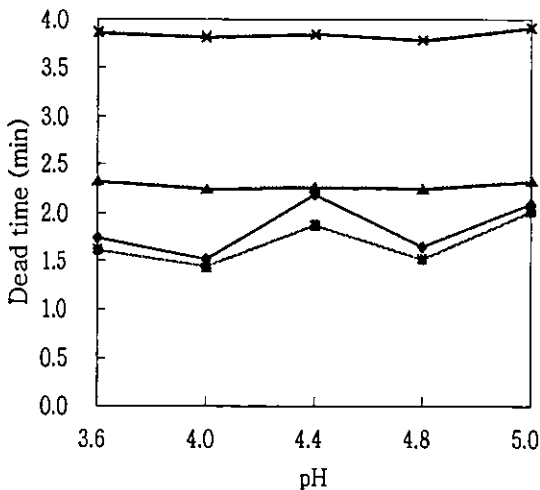


Fig. 1. Effect of pH of the mobile phase in 25% methanol on the dead time.

◆ 3-Nitrobenzoic Acid ■  $\text{NaNO}_3$  ▲ Methanol × Phenol

결과에서 보는 바와 같이 각각의 용질들은 용해도 파라미터 ( $\delta$ )와  $\log k'$ 의 관계는 비교적 좋은 직선성을 보여주고 있다. 이와 같이  $\delta$ 과  $\log k'$ 이 비례하는 것으로 보아 소용매성 효과가 이들 용질들의 머무름 메카니즘에 기여한다는 것을 알 수 있었다.

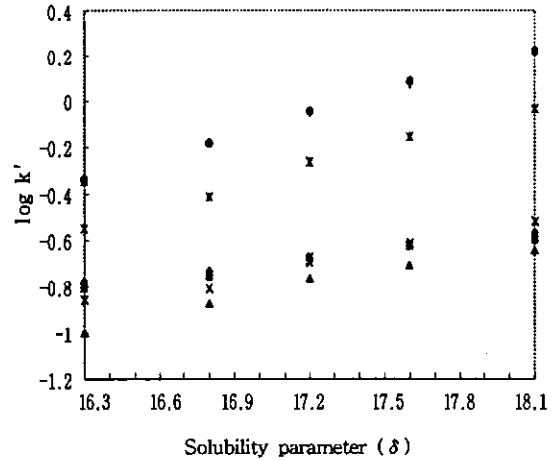


Fig. 2. Relationship between solubility parameter ( $\delta$ ) of the mobile phase (methanol/water) and  $\log k'$  of benzoic acids.

◆ 4-HMBA ■ 3-HMBA ▲ 4-CBA  
× 3-CBA \* BA ● 3-Tol + 4-Tol

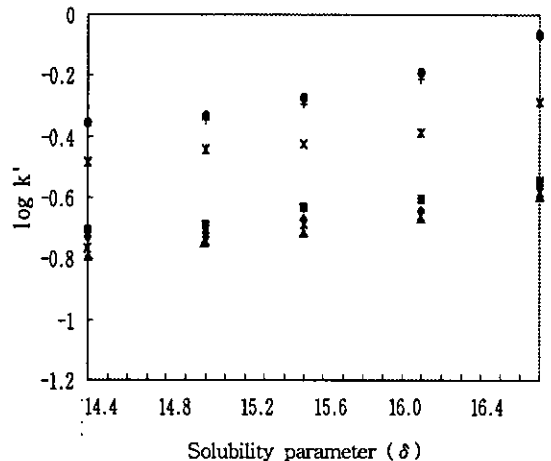


Fig. 3. Relationship between solubility parameter ( $\delta$ ) of the mobile phase (acetonitrile/water) and  $\log k'$  of benzoic acids.

◆ 4-HMBA ■ 3-HMBA ▲ 4-CBA  
× 3-CBA \* BA ● 3-Tol + 4-Tol

3.3. 용량인자(k')와 이동상 조성의 관계

역상 액체 크로마토그래피의 정지상은 실리카 표면에 octadecyl기 등이 화학적으로 결합되어 있어 용질의 머무름은 소용매성 효과 (solvophobic effect)와 친실란올성 효과 (silanophilic effect)에 의해서 머무름이 이루어진다고 할 수 있다. 소용매성 효과에 의한 인자는 이성분 용매계에서 물의 부피 분율( $\phi_w$ )과 지수함수 관계가 있으며, 친실란올성 효과에 의한 인자는 이성분 용매계에서 극성이 큰 성분의 부피 분율로 나타낼 수 있다. 따라서 이성분 용매계에서는 다음과 같이 나타낼 수 있다.<sup>11</sup>

$$k' = a \exp(b \phi_w) + (c + d \phi_w)^{-1} \quad (\text{식 1})$$

여기에서 a, b, c, d는 실험으로 얻어지는 상수이다. 따라서, 소용매성 효과와 친실란올성 효과가 거의 비슷하게 영향을 미치면  $\log k'$ 과  $\phi_{H_2O}$  사이에는 직선관계가 성립하지 않게 된다. 반면에 친실란올성 효과를 무시한다면 식 2와 같이  $\log k'$ 과  $\phi_w$  사이에는 직선관계가 성립한다.<sup>12</sup>

$$\log k' = \log a + b \phi_w \quad (\text{식 2})$$

그림 4와 그림 5에 7종의 벤조산으로  $\log k'$ 과  $\phi_w$ 의 관계를 도시하였는데 직선성을 나타냈다. 따라서 이들 용질의 머무름 메카니즘이 소용매성 효과에 기

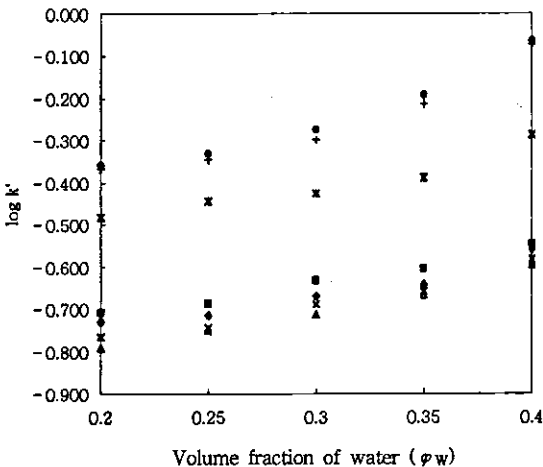
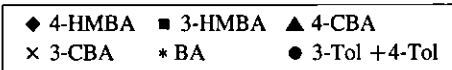


Fig. 4. Dependence of  $\log k'$  of benzoic acids on the volume fraction of water ( $\phi_{H_2O}$ ) in methanol/water mixture.



인한다는 것을 알 수 있다.

3.4. 온도와 이동상이 용질의 머무름에 미치는 영향

최근 액체 크로마토그래피에서 온도의 증가에 따라 이동상의 점도 변화가 컬럼 효율에 영향을 미친다는 것이 밝혀지면서 액체 크로마토그래피에서 온도에 대한 관심이 모아졌다. 용질이 정지상과 상호 작용에서 용질의 용량계수 ( $k'$ )은 열역학적 평형상수 (K)와의 관계 및 K와 Gibbs 자유 에너지의 관계를 이용하여 다음과 같은 열역학 함수를 얻을 수 있다.<sup>13</sup>

$$\ln k' = -\frac{\Delta H^0}{RT} + \frac{\Delta S^0}{R} + \ln \Phi \quad (\text{식 3})$$

여기에서, R은 기체상수, T는 절대온도,  $\Delta H^0$ 는 용질이 이동상에서 정지상으로 전이 엔탈피 변화량,  $\Delta S^0$ 는 표준 전이엔트로피 변화량이다. 그리고,  $\Phi$ 는 고정상과 이동상과의 부피비인 상비율 (phase ratio)이다. 식 3에서와 같이 컬럼내에서 용질의 머무름은 엔탈피와 엔트로피의 영향을 받는다. 용질이 이동상에서 정지상으로 전이될 때  $\Delta H^0$ 가 작을 수록,  $\Delta S^0$ 는 양의 값이 클수록,  $k'$ 값은 증가하게 된다. 이는 용질이 이동상과의 상호작용이 약해지고 이동상에서 정지상으로의 전이가 쉬워진다는 것을 의미한다.

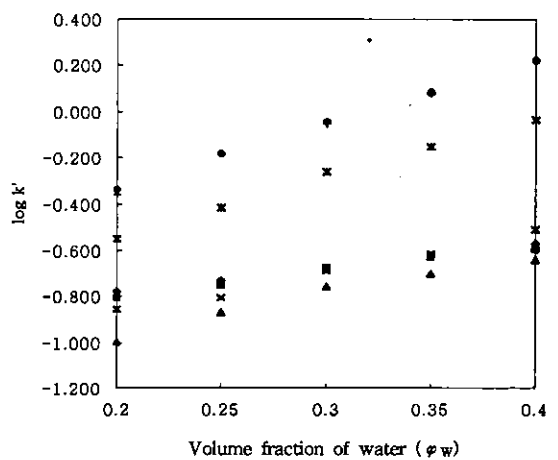
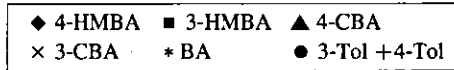


Fig. 5. Dependence of  $\log k'$  of benzoic acids on the volume fraction of water ( $\phi_{H_2O}$ ) in acetonitrile/water mixture.



van't Hoff plot에서 기울기(-ΔH<sup>0</sup>/R)로부터 용질이 이동상에서 정지상으로 전이 될 때 표준엔탈피를 구하고, 절편(-ΔS<sup>0</sup>/R+lnΦ)으로 부터 표준 전이엔트로

피를 구하였다. 본 연구에서는 Φ값을 μ-Bondapak C<sub>18</sub>의 컬럼에서 상비율 값(Φ=1/2.6)<sup>14</sup>을 사용하여 ΔH<sup>0</sup>와 ΔS<sup>0</sup>을 구하고 결과를 표 1과 표 2에 나타내었다. 그리고 표 1과 표 2에서 얻은 ΔH<sup>0</sup>와 ΔS<sup>0</sup>를 이용하여 표준온도에서 구한 ΔG<sup>0</sup>값과 유기용매 부피분율의 관계를 그림 6과 그림 7에 나타내었다. 그림에서와 같이 유기용매의 부피 분율이 증가함에 따라 용질이 이동상에서 정지상으로 전이할 때의 ΔG<sup>0</sup>값이 일관적으로 증가하는 것을 알 수 있다. 즉, 유기용매 부피 분율이 증가하면 이동상과 용질의 친화력이 증가하여 용질이 이동상에서 정지상으로 이동할 때 더 큰 에너지가 필요하게 된다. 따라서 정지상으로의 분배가 적어 머무름 시간이 짧아질 것이라는 예상과 일치하였다. 이는 이동상에 대해 용질의 소용매성 효과가 머무름 메카니즘에 큰 영향을 주고 있음을 알 수 있다.

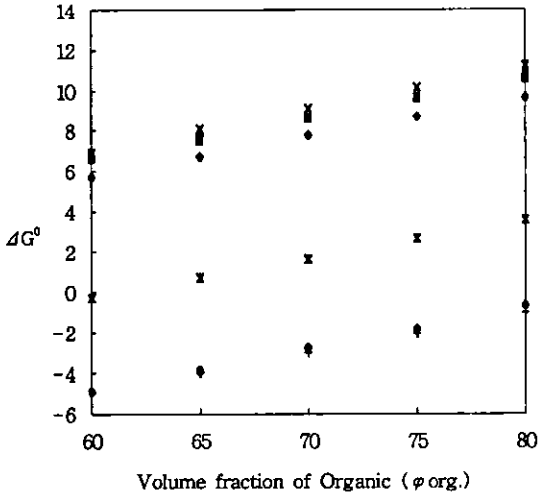


Fig. 6. Dependence of organic modifier volume fraction of free-energy change in methanol.

◆ 4-HMBA    ■ 3-HMBA    ▲ 4-CBA  
 × 3-CBA    \* BA    ● 3-Tol + 4-Tol

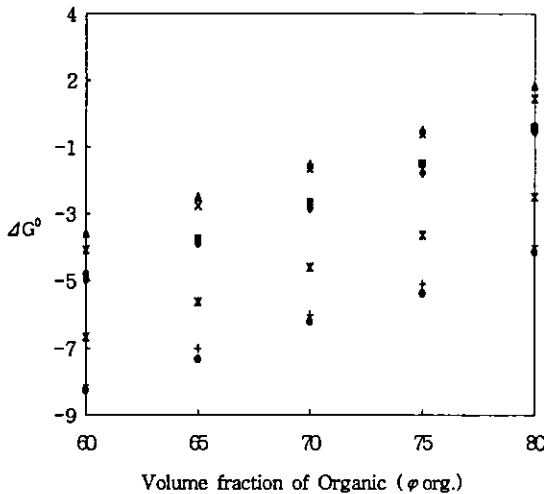


Fig. 7 Dependence of organic modifier volume fraction of free-energy change in acetonitrile.

◆ 4-HMBA    ■ 3-HMBA    ▲ 4-CBA  
 × 3-CBA    \* BA    ● 3-Tol + 4-Tol

3.5. 온도와 용매에 따른 소수성 상호작용의 변화

역상 액체 크로마토그래피에서 머무름 메카니즘을 결정하는 가장 큰 요인으로 작용하는 소수성 상호작용에서 유기용매에 대해서 용질의 머무름 값과 같이 나타낼 수 있다.<sup>13</sup>

$$\log k' = \log k_w' - S\phi \quad (\text{식 4})$$

여기서 k'은 용량인자, φ는 이동상에서의 유기용매의 부피분율, log k<sub>w</sub>'는 이동상이 오직 순수한 물일 때의 용질의 용량인자이다. S는 용질의 소수성을 나타내는 값이고 분자구조의 특성을 나타내는 값으로 분자의 크기나 수소결합 능력에 따라 그 크기가 달라진다. 따라서 구조가 유사한 화합물들 사이에서는 S지표와 log k<sub>w</sub>' 사이에는 상관성이 있어야 한다. Methanol과 acetonitrile의 이동상에서 식 4의 기울기와 절편으로부터 구한 S지표와 log k<sub>w</sub>'값을 표 3에 수록하였다. 본 실험에서 두 이동상 모두 용질의 para, meta구조에 따른 S지표 값은 거의 동일한 값을 가지고 있어 분자내 수소결합이 머무름에 크게 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다. Yoo<sup>15</sup>가 벤조산 에스테르류에서 ortho형이 meta와 para형보다 S값이 크며 meta와 para형의 경우는 큰 차이가 없던 결과와 일치한다. 한편, 이론적으로 log k<sub>w</sub>'은 이동상으로 사용하는 유기용매의 종류와는 상관없이 일정하게 나타나야 한다. 그러나 각각의 benzoic acid에서 두 유기용매에서 구한 log k<sub>w</sub>'은 차이가 있다. 이는 log k<sub>w</sub>'이 용질과 순수한 물과의 상호

Table 1.  $\ln k'$ , enthalpy ( $\Delta H^0$ ) and entropy ( $\Delta S^0$ ) values of the benzoic acids at 25% methanol

Solute	$\ln k'$ at temperature (K)					$-\Delta H^0$ (kcal/mol)	$\Delta S^0$ (cal/mol K)	$R^2$
	298	303	308	313	318			
4-HMBA	-0.531	-0.790	-0.909	-1.248	-1.620	10.248	0.84	0.971
3-HMBA	-0.395	-0.751	-0.892	-1.201	-1.483	10.246	1.11	0.988
4-CBA	-0.844	-0.992	-1.085	-1.350	-1.674	7.817	0.22	0.929
3-CBA	-0.800	-0.940	-1.005	-1.337	-1.663	8.137	0.31	0.947
BA	0.684	0.123	-0.128	-0.384	-0.594	12.031	3.26	0.956
3-Tol	1.850	1.666	1.591	1.428	1.269	13.326	7.00	0.986
4-Tol	1.799	1.652	1.570	1.426	1.270	13.978	6.92	0.991

\*  $R^2$ : Linearity valueTable 2.  $\ln k'$ , enthalpy ( $\Delta H^0$ ) and entropy ( $\Delta S^0$ ) values of the benzoic acids at 25% acetonitrile

Solute	$\ln k'$ at temperature (K)					$-\Delta H^0$ (kcal/mol)	$\Delta S^0$ (cal/mol K)	$R^2$
	298	303	308	313	318			
4-HMBA	0.372	0.160	0.027	-0.191	-0.224	5.617	2.64	0.947
3-HMBA	0.415	0.213	0.061	-0.046	-0.158	5.391	2.72	0.986
4-CBA	0.061	-0.009	-0.130	-0.302	-0.344	3.810	2.02	0.970
3-CBA	0.181	0.072	-0.076	-0.262	-0.290	4.434	2.26	0.985
BA	1.322	0.969	0.741	0.623	0.530	7.459	4.53	0.994
3-Tol	2.463	2.160	1.917	1.615	1.501	9.056	6.79	0.983
4-Tol	2.429	2.093	1.861	1.600	1.487	8.867	6.73	0.974

\*  $R^2$ : Linearity value

작용에 기인하는 값으로 사용하기에 적당하지 않으며, 이동상의 유기용매 부피분율의 범위를 어떻게 하였는가에 따라  $\log k_w'$  값이 변함으로서 소수성 지표로 사용하기에는 적당하지 않음을 알 수 있었다. 이결과는 Yoo의 결과와 일치한다.<sup>15</sup>

또한, 식 4에서  $\log k'$ 이 0일 때 유기용매 부피 분율 ( $\varphi_0$ )은 실험을 통해 측정된 S 지표와  $\log k_w'$ 과의 비율로서 식 5와 같다.<sup>16</sup>

$$\varphi_0 = \log k_w' / S \quad (\text{식 } 5)$$

온도에 따른 머무름의 영향을 알아보기 위해서 온도에 따른  $\varphi_0$  값의 변화를 그림 8과 그림 9에 나타내었다. 그 결과 methanol과 acetonitrile의 두 이동상에서 온도가 증가할수록  $\varphi_0$  값이 감소하는 것을 알 수 있었다. 또한, methanol의 경우가 acetonitrile 보다  $\varphi_0$  값이 작는데 이는 acetonitrile에서는 용질과 이동상의 수소결합이 더 커지므로 분자내 수소결합의 영향이

Table 3.  $\log k_w'$  and S index value of the benzoic acids at 25°C

Solute	Methanol		Acetonitrile	
	S index	$\log k_w'$	S index	$\log k_w'$
4-HMBA	0.052	-0.831	0.041	-0.786
3-HMBA	0.055	-0.856	0.040	-0.757
4-CBA	0.087	-1.055	0.048	-0.845
3-CBA	0.088	-0.959	0.044	-0.822
BA	0.128	-0.667	0.045	-0.540
3-Tol	0.139	-0.469	0.073	-0.461
4-Tol	0.142	-0.485	0.072	-0.475

크다는 결과로 생각된다. 그리고 직선성의 관계로부터 소수성은 온도와 일차함수 관계를 가지고 있으며, 머무름 메커니즘에서 자유에너지 변화가 소수성에 크게 기여함을 알 수 있었다.

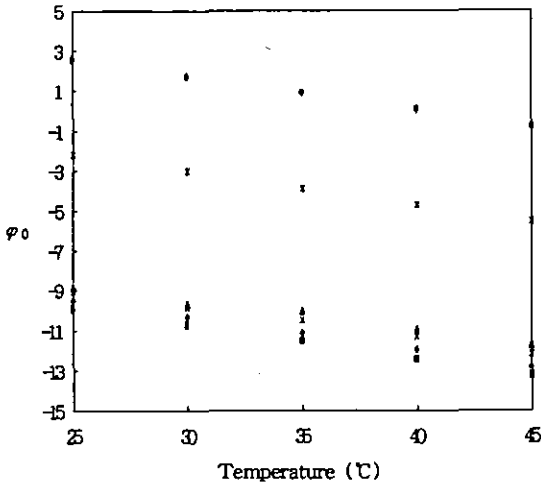


Fig. 8. The plot of  $\phi_0$  vs. temperature in methanol.

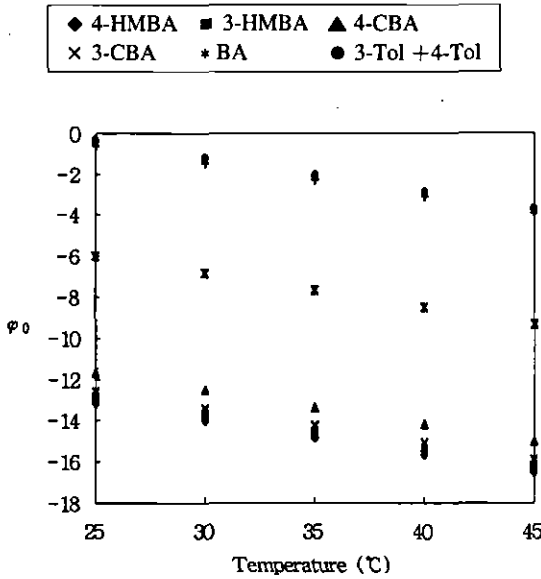


Fig. 9. The plot of  $\phi_0$  vs. temperature in acetonitrile.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 역상 액체 크로마토그래피에서 벤조산류의 약산 용질이 완충용액인 이동상 사이에서의 머무름을 고찰한 결과는 다음과 같다.

1. 용리액의 조성비에 따른 각 용질의 log k'값은 용

매의 용해도 상수, 그리고 이동상중 acetic acid buffer solution의 부피 분율과 직선적 상관관계를 가지며 따라서 벤조산류의 머무름 메카니즘은 소용매성 효과에 의해서 영향을 받고 있다.

2. 유기용매의 조성이 증가함에 따라 ln k'값이 감소한다. 유기용매의 조성비에 따른 용량인자와 컬럼의 온도와의 관계에서 모든 시료들의 엔탈피 변화는 음의 값을 나타내므로 유기용매의 분율이 증가할수록 정지상으로 전이가 쉬워진다. 그리고 엔트로피 변화값은 엔탈피 변화값에 비하여 매우 적기 때문에 머무름에 미치는 영향은 무시할 수 있다.

3. log k'값이 영일 때의 유기용매 부피 분율은 온도 증가에 따라 감소하며, 자유 에너지변화 값과 높은 상관성을 보였다.

#### 감사의 글

본 논문은 1998년 한국학술진흥재단의 학술연구비에 의하여 지원되었음(015-D00171).

#### 참고문헌

1. Horváth Cs and W. R. Malender, *J. Chromatogr. Sci.*, **15**, 393 (1977).
2. C. Tanford, "The Hydrophobic Effect, Formation of Micelles and Biological Membranes", 2nd Ed., 118, John Wiley & Son., Inc., New York, 1980.
3. F. Dondi and Y. D. Kahie, *J. Chromatogr.*, **461**, 281 (1989).
4. X. Geng and F. E. Regnier, *J. Chromatogr.*, **296**, 15 (1984).
5. P. J. Schoenmakers and R. Tihssen, *J. Chromatogr. A*, **71**, 135 (1973).
6. P. J. Schoenmakers, H. A. H. Billiet and L. de Galan, *J. Chromatogr.*, **282**, 107 (1983).
7. W. R. Melander, C. A. Mannan and SC. Horváth, *J. Chromatogr.*, **318**, 1 (1985).
8. N. Chen, Y. Zhang and P. Lu, *J. Chromatogr.*, **633**, 31 (1993).
9. L. A. Cole, J. G. Dorsey and K. A. Dill, *Anal. Chem.*, **64**, 1324 (1992).
10. Y. J. Moon and S. W. Kang, *Anal. Sci & Tech.*, **11**, 179 (1998).
11. L. R. Snyder, *J. Chromatogr.*, **179**, 167 (1979).

12. P. Jandera, H. Colin and G. Guiochon, *Anal. Chem.*, **54**, 435 (1982).
13. W. R. Malender, B. K. Chen and Cs. Horvath, *J. Chromatogr.*, **318**, 1 (1985).
14. N. Chen, Y. Chang and P. J. Lu, *J. Chromatogr.*, **606**, 1 (1992).
15. E. A. Yoo and S. Y. Jung, *J. Kor. Chem. Soc.* **41**, 1, 18 (1997).
16. K. Valko and P. Stegel, *J. Chromatogr.*, **631**, 49 (1993).