

흐름 및 침강 장-흐름 분획법에 의한 자연수 및 토양 중 나노 크기로부터 마이크론 입자들의 크기별 분리에 관한 연구

음철현^{1, *} · 강동영 · 이태우 · 이승호

한남대학교 화학과, ¹한국지질자원연구원 지질특성분석센터
(2008. 10. 9. 접수, 2008. 12. 26. 승인)

Study on the size-based separation of nano to micron particles in natural water and soil using flow and sedimentation field-flow fractionation

Chul Hun Eum^{1, *}, Dong Young Kang, Tae Woo Lee and Seungho Lee

Department of Chemistry, Hannam University, Daejeon 305-811, Korea

¹Korea Institute of Geoscience and Mineral Resources, Daejeon 305-350, Korea

(Received October 9, 2008; Accepted December 26, 2008)

요약: 흐름 장-흐름 분획법을 개선한 방식의 흐름 장-흐름 분획장치를 이용하여 아주 적은 농도의 입자를 포함하는 지하수의 실험이 가능하였다. 또한 침강 장-흐름 분획법을 조합하여 상대적으로 크기가 큰 입자들을 분리함으로써 보다 넓은 영역의 입자들을 분리 및 분석할 수 있었다. 이렇게 장-흐름 분획법을 이용한 환경적인 측면의 연구의 가능성을 확인하였다. 각 시료의 크기 별 분포를 비교하고 크기별 분리를 확인하고자 광학 현미경을 사용하였다. 실험의 결과들은 입자크기분포를 결정하기 위한 가능성을 보여주었다. 다양한 분석 기술들의 조합으로 인해 그 효율성이 매우 증대할 수 있다는 것을 확인하였다. 또한, 본 연구를 통하여 입자 크기별 분리를 위한 장-흐름 분획법의 응용 가능성을 충분히 확인할 수 있었다. 앞으로 더욱 세밀한 실험과 시스템의 최적화에 노력을 기울인다면 흐름 장-흐름 분획법의 여러 부수 기술들을 조합하여 자연수 내의 입자들을 분리하고 분석할 수 있는 표준분석방법을 개발하고 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

Abstract: A flow and sedimentation field-flow fractionation method has been used to characterize colloidal particles in environmental samples. The opposed flow sample concentration (OFSC) method was employed. The OFSC procedure was optimized for the analysis of particles in ground water with respect to various experimental parameters including sample introduction time, flow rates, etc. The effectiveness in low concentration and characterization of the OFSC-FIFFF was demonstrated with GW-1 and GW-2 ground water samples. Ground water of upto 100 mL has been successfully loaded, concentrated, and characterized by OFSC-FIFFF. The OFSC technique allow the application of FIFFF possible for the separation and characterization of colloidal particles in very low concentrations. The results show FFF provides a simplified alternative to existing off-line concentration procedures, and shows a high potential for the applications to the analysis of dilute colloidal particles in the environmental samples.

Key words: FFF, size-based separation, colloidal particle

★ Corresponding author

Phone : +82-(0)42-868-3675 Fax : +82-(0)42-868-3393

E-mail : kdy0509@paran.com

1. 서 론

최근 세계적으로 환경에 대한 관심이 높아지면서, 과학적으로 환경계에 존재하는 여러 성분들을 연구할 수 있는 기술에 대한 정보의 중요성이 증가하고 있다. 그 중에서도 특히 환경입자에 대한 연구가 매우 활발히 진행되고 있으나 아직까지 이들을 충분히 파악하고 증명할 수 있는 기술이 부족하다. 환경입자의 연구에 관련한 장비들의 뒷받침이 부족한 현실이다. 특히 자연수 내에 포함되어진 입자 및 토양 시료들의 분리 및 분석은 환경적인 연구에 매우 중요한 부분을 제공한다. 그 중에서도 특히 지하수나 하천수 내의 입자들은 지질학적으로 뿐만 아니라 환경오염 면에서도 매우 다양한 역할을 하므로 그들의 분석은 매우 중요하다.^{1,2} 이들 입자들의 특징은 매우 복잡한 화학적 구조를 가지며, 모양이나 크기, 밀도, 질량, 표면의 화학적 성질 등에서 다양한 분포를 가진다는 점이다. 비록 이들이 자연수 중에 매우 낮은 농도로 존재하더라도 이들은 매우 높은 표면 대 질량비를 가지므로 환경오염 물질의 이동에 매우 큰 영향을 미친다.³

본 연구의 목적은 위에서 언급한 자연수 중에 입자들을 장-흐름 분획법(Field-Flow Fractionation, FFF)을 이용하여 입자의 크기별 분리와 그에 따른 환경연구에 대한 정보를 얻고자 하였다.

FFF는 용리 방법으로 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)와 기기 면에서 매우 유사한 형태를 갖는다. FFF에서는 HPLC의 컬럼에 해당하는 채널(channel)이라는 빈 공간을 통해서 분리가 이루어진다. 이때 충전된 정지상이 없고 단지 유체의 흐름에 의해서 분리가 일어나기 때문에 단일상 크로마토그래피라고 부르기도 한다. 이렇게 크로마토그래피와 달리 내부에 충전된 정지상이 없고, 속이 비어 있어 단지 유체의 흐름만을 이용하여 입자들과 거대분자와 같은 시료들이 크기에 의해서 분리가 이루어지므로 분석 과정 중에 발생할 우려가 있는 시료들의 흡착 또는 변형을 제거할 수 있다는 장점을 지닌다.³ FFF는 고분자 및 단백질 등을 비롯하여 나노미터에서부터 마이크로 크기의 시료들을 분리하는데 유용한 분리방법이다. FFF의 특징 중 하나는 용리시간으로부터 시료의 크기, 분자량 등과 같은 물리적 혹은 화학적 파라미터를 직접 결정할 수 있다는 점이다. 이러한 특징으로 인하여 현재 생화학, 의·약학, 고분자 및 무기재료와 환경입자 시료들에 대한 FFF의 응용연구가 활발히 진행되고 있다.^{4,7} FFF에서 사용하는 채널은 두개의 편평한 아크릴 블록 사이에 리본 형태로 잘라낸 간격 띠우게(spacer)를 끼워 넣고 맞물렸을 때 형성되는 양끝이 삼각형이고 가운데는 긴 직사각형의 단면으로 된 얇은 판 형태를 취한다. 이때 두 면 사이에서 벽 쪽의 유속은 점성 끌

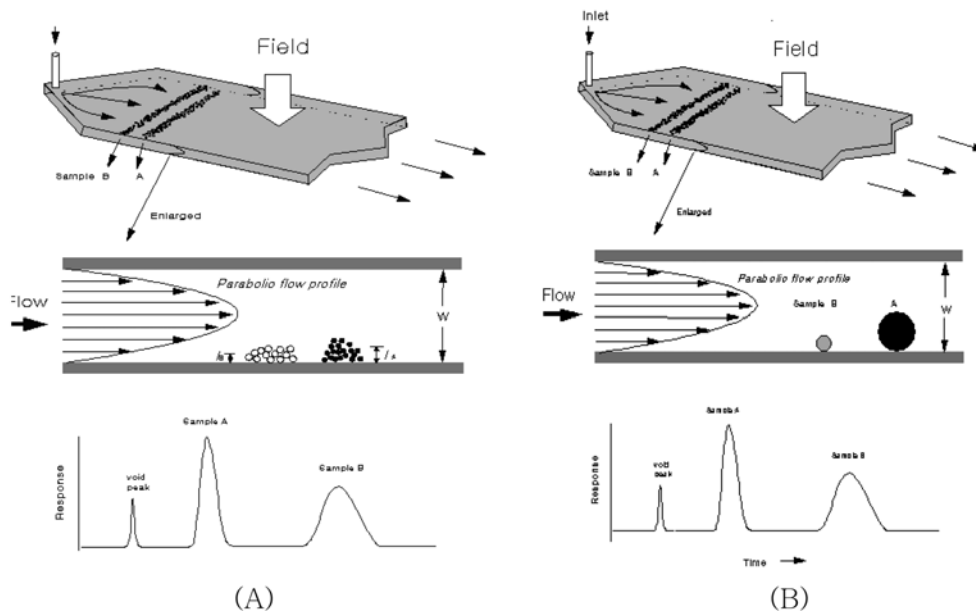


Fig. 1. An illustration for the principle of field-flow fractionation (FFF) method: Comparison between normal (A) and steric (B) mode.

림에 의해 느려지고 가운데 쪽으로 갈수록 유속이 빠른 포물선형 흐름이 형성된다. 그리고 외부에서 걸어주는 힘이 분리의 추진력(driving force)이며 이 분석물질의 특성에 따라 용리를 지연시키게 된다. 외부장이 가해지면 채널 내에서 분석물질들은 누적벽(accumulation wall) 쪽으로 이동하고 누적벽으로부터는 분석물질들의 브라운 확산에 의해 반대로 이동하여 정류상태(steady-state)를 이루게 된다. 크기가 작은 입자들은 큰 입자들보다 상대적으로 확산이 커서 채널 누적벽에서부터 높은 위치에 평형을 이루게 되면 빠른 흐름 층에 속하여 작은 입자들이 먼저 용리되고 큰 입자들이 나중에 용리되게 되는데, 이것이 FFF의 일반적인 작동모드인 정상모드라고 한다(Fig. 1(A)). 이와는 다르게 FFF에서 입자 하나의 크기가 매우 커서 채널 내에서 흐름속도 영역을 결정짓는 요인이 되고 이렇게 입자자체의 크기에 의해서 시료의 분리가 일어나는 형태를 입체모드라고 한다(Fig. 1(B)). 외부장(field)이 같더라도 입자크기가 증가하면, 확산계수(diffusion coefficient)를 무시할 수 있으므로 역시 입체모드의 영향을 받게 된다. 일반적으로 입자의 직경이 큰 경우(대략 직경 1 μm 이상의 입자)는 브라운 확산을 무시할 수 있을 만큼 작아지게 된다. 따라서, 적당한 외부장이 가해지면 시료는 누적벽에 위치하게 된다. 이 경우, 큰 입자의 중심은 유체의 흐름속도가 빠른 영역에 놓이게 되므로 먼저 용리된다. 반대로, 작은 입자의 경우 시료의 중심이 흐름속도가 낮은 영역에 놓이게 되므로 나중에 용리가 이루어진다. 이러한 FFF는 외부장 또는 추진력의 형태에 따라 여러 가지 부수기술(subtechnique)들로 구분할 수 있다. (1)원심력을 이용한 침강 장-흐름 분획법(sedimentation FFF, SdFFF), (2)교차흐름을 가하여 분리에 이용하는 흐름 장-흐름 분획법(flow FFF, FIFFF), (3)온도차이를 주어 열확산을 이용한 열 장-흐름 분획법(thermal FFF), (4)전기장을 이용한 전기 장-흐름 분획법(electrical FFF) 등이 있다.

FFF는 이론이 간단하여 분석물질의 머무름을 이론적으로 예측할 수 있으므로 용리 곡선을 통하여 분석물질의 물리적인 특성(즉, 분자량, Stokes 직경, 밀도, 전기적 성질, 열확산계수(thermal diffusion coefficient) 등)의 여러 가지 정보를 각각의 부수적인 기술의 사용으로 확보할 수 있다. 작동 면에서 부수적인 기술을 사용할 수 있는 다양성 외에도 장 흐름 분획법의 장점은 외부장의 세기를 조절함으로써 분석물질에 알맞은 실험조건을 결정하기 용이하다. 또한, 용리한 시료

들의 손상이 없기 때문에 이들을 다시 분리하여 2차 분석에 사용할 수 있다.

본 연구에서는 지하수 내의 입자들 연구에 있어서 사전 전처리와 낮은 농도의 문제점을 해결하기 위해서 정상모드에서 FIFFF의 새로운 방식인 OFSC (opposed flow sample concentration) 방식⁸과 입체모드에서 St/SdFFF를 이용하여 상대적으로 크기가 큰 토양시료를 분리 및 분석하고자 하였다. 실제 시료들을 채집 분리하여 크기별로 분리하고 시료의 크기분포를 확인하고 비교하여 환경연구에 필요한 정보들을 알아보하고자 하였다.

2. 실험

2.1. 시료 채취

본 연구에서 사용한 지하수 시료들은 광주광역시(Gwangju metropolitan city, Korea)에서 수집하였다. 실험에 알맞게 사용할 수 있도록 수집 즉시, 현장에서 hand suction pump와 1.2 μm 여과막 필터로 시료의 정삼모드영역과 입체모드영역을 두 개의 크기별로 구분하였다. 시료들은 시료간의 응집(aggregation)을 방지하고 계면활성제로 작용하여 membrane과 상호작용(interaction)을 최소화하기 위하여 지하수 시료 1 L당 1 g의 SDS (sodium dodecyl sulfate)을 첨가하고, 박테리아 생성의 억제를 위하여 0.2 g의 NaN_3 (sodium azide)를 첨가하였다. 이러한 지하수 시료들은 4 $^{\circ}\text{C}$ 의 온도로 냉장고에 보관하였다가 실험 시에 필요한 양만큼 취하여 고르게 섞어주었다. 그리고 1시간 이상 실온에 방치하였다가 30 분간 교반 후에 사용하였다.

하천수인 광주천시료는 수집 후에 지하수 시료와 동일하게 처리하고 실험에 사용하였다. 토양시료는 지하수시료를 수집한 장소에 10 m 정도 떨어진 곳의 시료를 수집하였고 지하수 시료와 동일한 방법으로 처리하여 실험에 사용하였다. 각각의 시료들은 FFF의 정상과 입체모드의 영역 구분을 위해 시료 수집 즉시 1.2 μm 여과막 필터로 입자와 용액의 시료를 걸러주었다. 걸러낸 용액은 위의 지하수 시료와 동일하게 처리하였다. 걸러낸 입자들은 이동상으로 회석시킨 후 3 분간 초음파를 조사하여 충분히 분산시키고 아세톤으로 세척한 후에 실험에 사용하였다.

2.2. FFF 이동상

표준물질과 지하수 시료는 초순수 증류수에 0.05% SDS와 이동상 내의 박테리아 생성을 방지하기 위하

여 0.02% NaN_3 를 포함한 이동상에 희석하였다. 이동상은 가능한 균일한 조성을 위해 계면활성제를 혼합시킨 후에 최소 5 시간 이상의 교반(stirring)을 거친 후에 $0.45 \mu\text{m}$ 여과막 필터로 여과 후 사용하였다.

2.3. 기기 및 장치

본 연구에서 사용한 FFF 기기의 구성은 용매용기, 펌프, 시료 주입기(injector), 채널(channel), 검출기(detector), 제어용 컴퓨터로 이루어져 있다.

FIFFF는 FFFractionation사(Salt Lake City, UT, USA)의 모델 F-1000 Universal Fractionator이고, SdFFF는 제작하여 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 FFF.EXE(FFFractionation Inc. Utah, USA)를 이용하여 받은 데이터를 처리하였다. 시료 주입 장치(Injector)로는 Rheodyne 7725 Injector를 이용하였다. 실험 시 채널의 유속과 교차흐름의 유속은 교차흐름의 출구 방향에 Needle Valve로 조절한 후에 뷰렛(buret, PYREX, USA)을 이용하여 각각의 유체의 부피를 측정하여 유속을 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. OFSC방식의 FIFFF를 이용한 실제 지하수 시료의 크기별 분리

GW-1 시료는 광주광역시 서구의 쓰레기 매립장 근처에서 GW-2 시료는 광주광역시 서구의 민방위 비상급수 시설에서 수집한 지하수시료이다. 각 시료의 명칭은 실험에 적절하게 임의로 정하였다. 2가지 시료의 시각적인 관찰 결과의 차이는 GW-1의 경우는 GW-2에 비해 투명한 시각적인 관찰을 할 수 있었다. OFSC방식 FIFFF로 실험하기 이전에 실험할 시료들은 우선 입체모드영역의 큰 입자를 제거하기 위하여 $1.0 \mu\text{m}$ 여과막 필터로 걸러서 2가지 지하수 시료 중에서 정상 모드영역의 시료만을 취하여 수집하였다.

우선, GW-2 시료의 결과와 실험 조건을 Fig. 2에 나타내었다. 시료 10 mL와 20 mL의 주입 부피로 2회에 걸친 실험을 통하여 그 결과에 대한 재현성과 정량적인 결과를 얻을 수 있음을 확인하였다. Fig. 2에

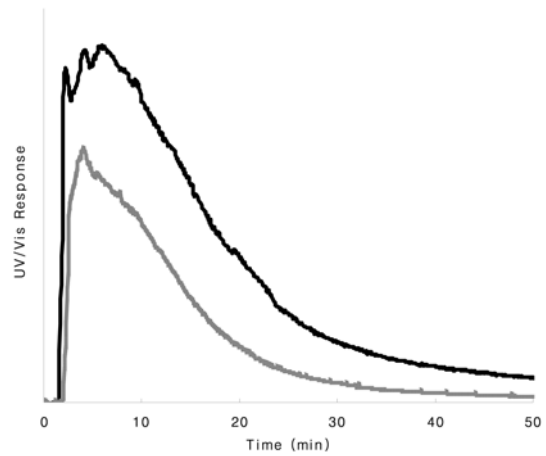


Fig. 2. Fractograms of ground water (GW-2) sample obtained by OFSC mode Flow FFF run. 10 mL (gray) and 20 mL (dark) injection volume sample was introduced into channel. The focusing flow rate is 1:15 with flow rates at the normal and opposed in flow inlets of 0.2 and 3.0 mL/min. The focusing time is 60 min. During the separation, $V_c=0.5 \text{ mL/min}$, $V_{out}=1.0 \text{ mL/min}$.

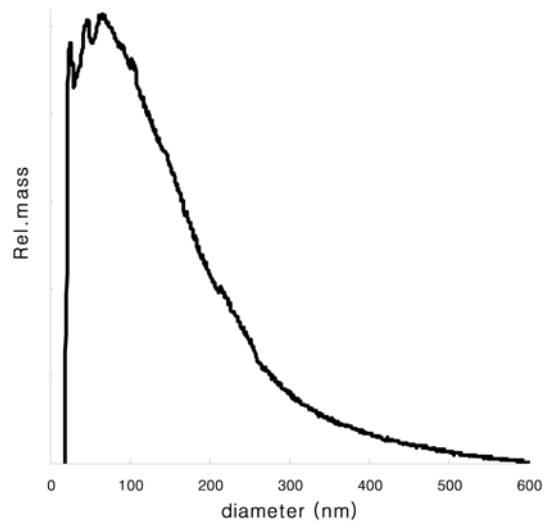


Fig. 3. Size distribution of ground water (GW-2) sample.

서는 채널 내로 주입하는 GW-2 시료의 각 부피에 따라 검출기에 충분한 신호를 주어 크기 분포를 얻을 수 있었다. 머무름 시간에 의해서 시료의 크기 분포(size distribution)를 확인해 본 결과 대부분의 입자들은 20 nm에서 500 nm의 크기에 분포하고 있다는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

GW-2의 경우, 우선 앞서 실험했던 GW-2과 동일한 주입 부피인 10 mL를 주입한 결과는 Fig. 4에 나타내

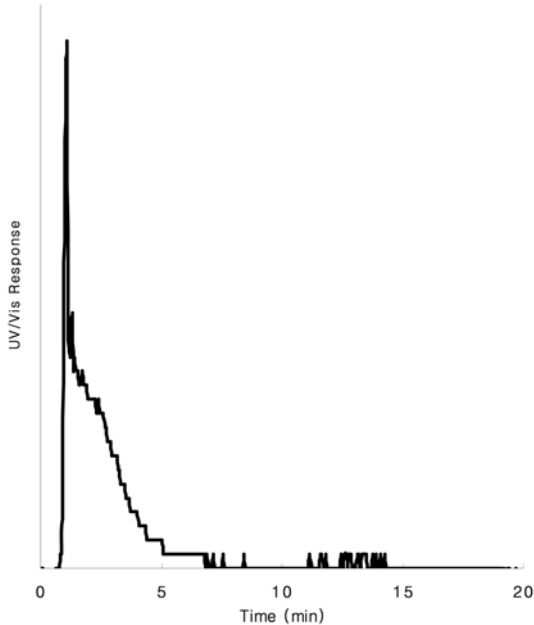


Fig. 4. Fractogram of groundwater (GW-1) sample obtained by OFSC mode Flow FFF run. 10 mL injection volume sample was introduced into channel. The focusing flow rate is 1:15 with flow rates at the normal and opposed inflow inlets of 0.2 and 3.0 mL/min. The focusing time is 60 min. During the separation, $V_c=0.5$ mL/min, $V_{out}=0.8$ mL/min.

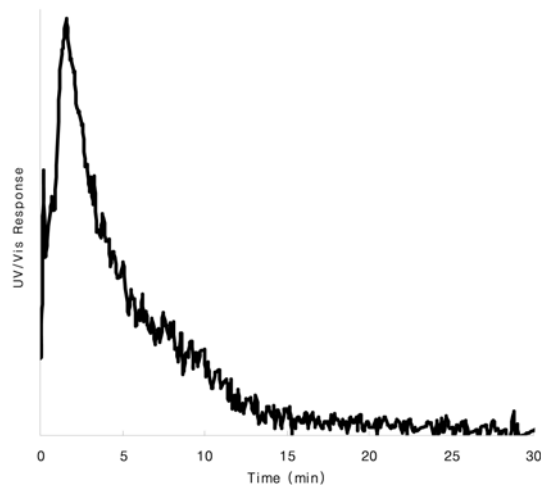


Fig. 5. Fractogram of groundwater (GW-1) sample obtained by OFSC mode Flow FFF run. 100 mL Injection volume sample was introduced into channel. The focusing flow rate is 1:15 with flow rates at the normal and opposed in flow inlets of 0.2 and 3.0 mL/min. The focusing time is 180 min. During the separation, $V_c=0.5$ mL/min, $V_{out}=0.8$ mL/min.

었다. Fig. 4는 너무 입자들의 농도가 적어서 검출기에 충분히 분석할 만큼의 신호를 주지 못한 것을 확인할 수 있었고 검출기의 신호로써 충분히 분석할 정도의 입자 양을 전처리없이 채널 내로 주입하기 위해서 시료 주입시간(sample loading time)을 충분히 늘려 주어 100 mL의 시료가 주입한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5은 10 mL의 시료를 주입한 것에 비해서 충분히 많은 양의 입자들이 포함되어져서 시간에 따른 분리가 가능하였고 입자의 크기 분포는 Fig. 6에 나타내었다. 이렇게 입자의 크기 분포를 확인해 본 결과 GW-1 시료는 GW-2과 달리 대부분의 입자가 10 nm에서 100 nm 미만의 크기 분포인 것을 확인하였다. 이것은 GW-1, GW-2 시료를 시각적으로 확인했을 때와 같이, 혼탁도가 높은 GW-2 시료는 상대적으로 GW-1 시료에 비해 큰 입자들이 많이 포함되어 있으며 이러한 두 시료의 입자의 양을 Table 1에서 나타내었다. 실제 자연수 내에서 입자들이 미량원소나 오염물질의 운반체(carrier)로서 그 역할을 수행한다. 따라서 실제 자연수 내에 존재하는 입자의 양(suspended solid, SS)을 결정한다면 오염의 정도를 간접적으로 확

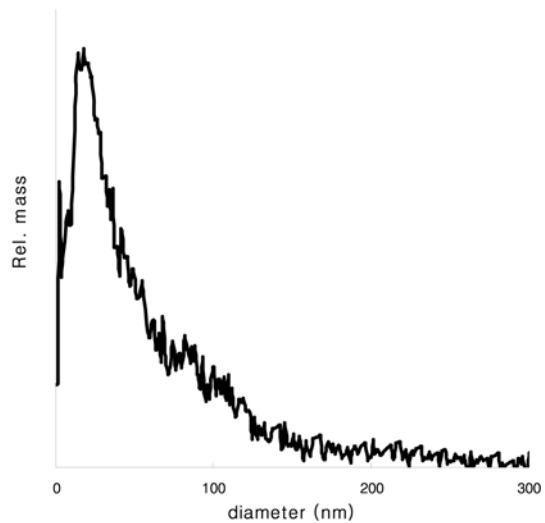


Fig. 6. Size distribution of groundwater (GW-1) sample.

Table 1. Amount of suspended solid (SS)

Sample	$0.45 \mu\text{m} \leq S < 1.2 \mu\text{m}$	$1.2 \mu\text{m} \leq S < S$
W-22	0.0004 g/L	0.01234 g/L
W-2-1	0.0007 g/L	0.2480 g/L

인하는 좋은 정보라고 할 수 있다. 본 연구에 사용한 GW-1, GW-2 시료의 일정 부피에 대한 입자의 양을

결정함으로써 간접적인 오염정도를 파악하는 자료로 사용하였다. 이러한 시료의 혼탁도는 입자의 농도와 관계있음을 간접적으로 확인할 결과라 할 수 있다. 이렇게 지하수 내에는 아주 적은 농도의 입자들도 OFSC방식의 FIFFF 이용으로 농축 과정을 거치지 않고도 분리하였다. 따라서 입자의 농도가 적은 지하수나 하천수시료 또는 여러 가지 환경 시료에 이러한 기법의 적용 가능성을 위의 실험을 통하여 확인할 수 있었다.

3.2. SdFFF에 의한 1.2 μm 이상 크기 입자의 분리

GW-1와 GW-2 시료의 경우 1.2 μm 보다 큰 입자의 양이 상대적으로 매우 낮아 FFF를 이용하여 분리하기에 충분치 않은 점이 있다. 따라서 1.2 μm 이상의 크기를 가지는 실제 시료에 대한 분리를 위하여 큰 입자의 양이 충분한 지하수시료 GW-3와 GW-3으로부터 30 m 떨어진 거리로부터 토양시료 S-1, GW-3과 500 m 떨어진 하천수시료(natural water)인 NW 시료를 조사대상으로 하였다. 그리고 SdFFF에 의해서 1.2 μm 필터로 걸러낸 S-1, NW의 크기별 분리를 입체모드에서 수행하였다(St/SdFFF).

Fig. 7은 field-programming을 이용하여 구한 NW 시료의 Fractogram이다. SdFFF를 이용하여 보다 효율적인 분리를 수행하기 위하여 본 연구에서는 field-programming을 적용하였는데, 이러한 field-program-

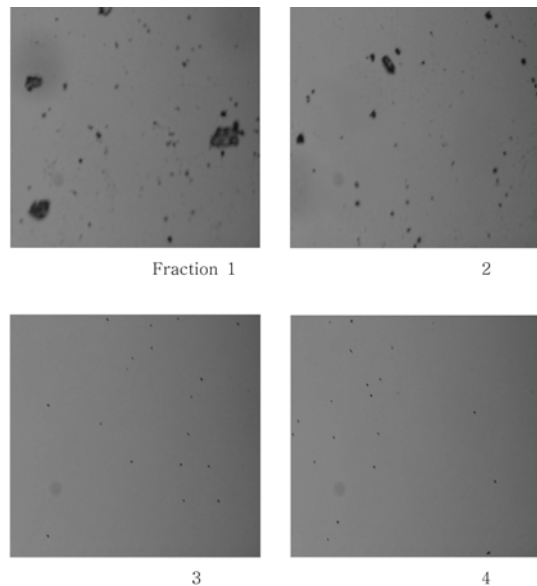


Fig. 8. Optical micrographs ($\times 300$) of four Sd/StFFF fractions in NW sample.

ming은 시료를 주입하고 용리되는 과정 중에 가하여지는 외부장을 서서히 감소시킴으로써 시료의 용리시간을 단축시켜서 보다 나은 분리 효율을 기대할 수 있다. 이런 실험 방법을 통한 결과를 입체모드의 이론에 맞게 분리가 잘 이루어지는지 확인하기 위하여 fraction을 1분 간격으로 4개를 취하여 광학현미경으로 관찰하였다. 그 결과(Fig. 8), 입체모드에서 큰 입자들

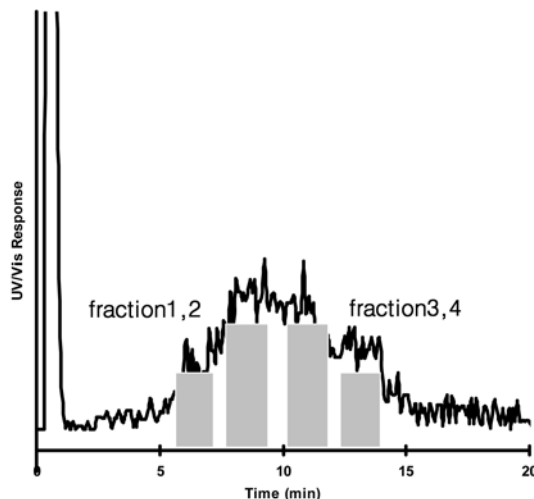


Fig. 7. Fractogram of NW sample obtained by Sd/StFFF run. Flow rate=7.0 mL/min, Field strength=300 rpm, stop-flow 30 sec.

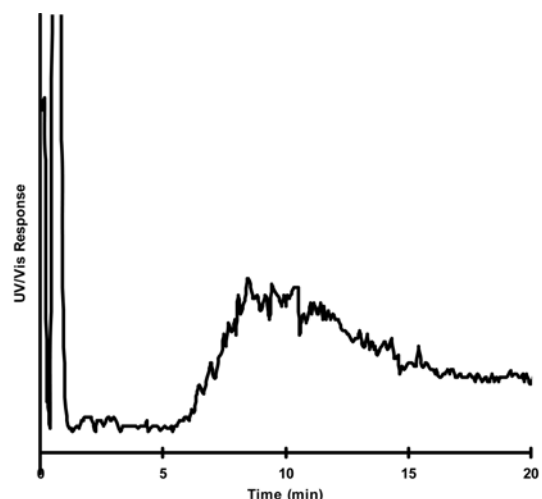


Fig. 9. Fractogram of groundwater (GW-3) sample obtained by St/SdFFF run. Flow rate=7.0 mL/min, Field strength=300 rpm, stop-flow 30 sec.

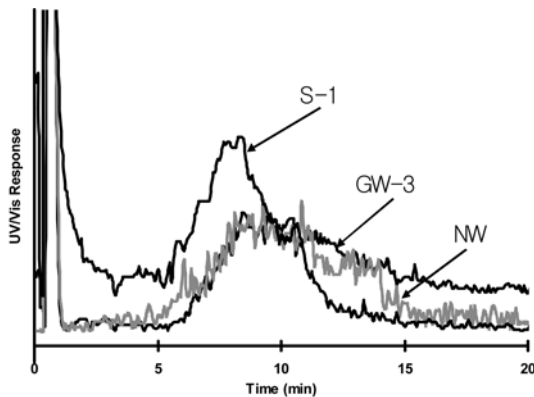


Fig. 10. Fractograms of groundwater (GW-3), natural water (NW), Soil (S-1) samples obtained by Sd/StFFF run. Flow rate=7.0 mL/min, Field strength=300 rpm, stop-flow 30 sec.

먼저 용리되고 작은 입자들의 순서로 분리가 잘 이루어짐을 확인할 수 있었다. GW-3과 S-1 역시 동일한 실험과정을 통하여 각기 시료의 크기별로 분리하였다 (Fig. 9).

Fig. 10는 GW-3와 NW, S-1의 Peak를 각각 겹쳐서 제시하였다. Fig. 10를 통하여 GW-3 시료의 경우 주변의 토양시료인 S-1와 유사한 크기분포를 가진다는 것을 확인할 수 있다. 이러한 결과로부터 GW-3 시료는 주변 토양의 유입 가능성을 예측할 수 있다.

이렇게 St/SdFFF를 응용하여 1.2 μm 이상의 크기를 가지는 입자를 대상으로 정상, 입체모드 두 영역에 대한 실험결과를 확보하였다. 따라서 FIFFF과 SdFFF를 통하여 실제 지하수 및 토양과 같은 시료에 대하여 분리를 수행하고, 그 결과 실제 시료에 대한 분리 가능성을 확인하였다. 또한 이러한 기술을 실제 환경 연구에 적용하는 것이다.

4. 결 론

본 연구에서는 FIFFF를 이용하여 지하수 시료와 같이 입자의 농도가 적은 시료의 전처리 과정을 생략하고 보다 정확한 시료의 정보를 얻고자 OFSC방식의 FIFFF를 도입하여 실험하고 고찰해 보았다. 본 연구는 실제 지하수 시료를 머무름시간에 따라 분리하고 그

에 따른 환경적인 연구에 대한 정보와 연구를 수행하는데 그 목적을 두었다. 이러한 연구를 통하여 실제 다음과 같은 몇 가지 결론을 도출할 수 있었다.

실제 지하수 시료들을 전처리 과정 없이 시스템에 도입하여 각 크기 분포를 실측하였다. 이를 통해, 지하수 내에 존재하는 입자들의 전체적인 크기의 분포를 확인하고 각 시료가 가진 독특한 크기분포가 환경 연구에 좋은 자료로 활용가능하다는 것을 확인하였다.

또한, 새로운 방식의 OFSC-FIFFF 시스템을 도입하여 기존의 입자 물질이나 콜로이드 물질의 연구에 있어서 수반되었던 시료의 전처리 과정 없이 시료 그 자체를 실험에 도입하고 분리 및 분석을 수행함으로써 보다 정확한 시료에 대한 정보와 분석을 가능케 하였다. 또한 St/SdFFF를 조합하여 두 가지 영역(정상, 입체모드)에 대한 분리 및 그 응용 가능성을 확인하였다. 따라서 FFF의 다양한 방식을 조합한다면 지하수에 대한 표준 분석방법을 제시할 수 있다는 가능성을 확인하였다.

이상의 결론을 통해서 FFF는 향후 더욱 더 다양한 환경 관련 연구에 필요성이 증가할 것으로 예상할 수 있다. 이와 더불어 다른 분석기기를 함께 이용한다면 더욱 다양한 응용이 가능할 것이다.

참고문헌

1. A Rudin and H. K. Johnston, *Polym. Lett.*, **9**, 55(1970).
2. J. C. Giddings, *J. Chem. Educ.*, **50**, 667-669(1973).
3. R. Bekett, "Influence of Aquatic Humic Substances on Fate and Treatment of Pollutants", Chapter5, Washington, U.S.A (1988).
4. S. G. Stevenson, T. Ueno, and K. R. Preston, *Anal. Chem.*, **71**, 8-14(1999).
5. W. Fraunhofer, G. Winter and C. Coester, *Anal. Chem.*, **76**, 1909-1920(2004).
6. C. Arfvidsson, K.-G. Wahlund, *J.Chromatogr. A*, **1011**, 99-109(2003).
7. M. Nilsson, S. Brinbaum and K.-G. Wahlund, *J. Biochem. Biophys. Methods*, **33**, 9-23(1996).
8. C. H. Eum, D. Y. Kang, S. Y. Kim and S. H. Lee, *Journal of Chromatographic Science*, **45**, May/June (2007).