

역상 액체 크로마토그래피에서 이동상 조성의 함수로서 taxol의 분리도

정용안 · 정성택 · 노경호[†]

인하대학교 화학공학과
(1997년 4월 9일 접수, 1997년 7월 16일 채택)

Resolution of Taxol in Terms of Mobile Phase Compositions in RP-HPLC

Yong An Jung, Sung Taik Chung and Kyung Ho Row[†]

Dept. of Chem. Eng., Inha University, Incheon 402-751, Korea
(Received 9 April 1997; accepted 16 July 1997)

요 약

역상 액체크로마토그래피와 물, 아세토나이트릴, 메탄올의 3성분계 이동상을 사용하여 주목나무 추출물에 포함된 taxol을 체류거동이 비슷한 cephalomannine, 10-deacetyltaxol로부터 분리하였다. 물을 기본으로 유기용매인 아세토나이트릴과 메탄올의 이동상의 조성을 5%씩 변화시켜서 15번의 실험을 수행하여 cephalomannine과 taxol, taxol과 10-deacetyltaxol의 분리도를 측정하였다. 이 실험결과로부터 각기의 분리도를 이동상 조성의 함수로서 표시된 실험상관식을 구하였다. 실험값에 가장 잘 일치하는 상관식에는 각기 조성의 선형성과 상호관련항이 포함되었다. 이 실험상관식으로부터 이동상의 최적 범위를 분리도와 분리시간을 기준으로 정하였고 이 중에 포함된 56/39/5(물/아세토나이트릴/메탄올, vol.%)에서 주목나무로부터 얻어진 추출물을 분리한 결과 실험상관식으로부터 계산한 분리도와 잘 일치하였다.

Abstract—The separation of taxol from cephalomannine and 10-decetyltaxol, in extract from yew trees was studied by an isocratic reversed-phase high performance liquid chromatography(RP-HPLC) with the mobile phase consisted of water, acetonitrile, and methanol. The compositions in mobile phase were varied to an increment of 5% of acetonitrile and/or methanol and the resolutions of cephalomannine/taxol and taxol/10-deacetyltaxol were measured by fifteen experimental runs. Using the experimental results, each resolution was fitted to the correlation equation as a function of mobile phase composition. The best correlation equation contained the linear and interaction terms of mobile phase composition. The optimized range for the resolution of the three components was determined by the resolution and separation time. The extraction from yew tree was separated with the mobile phase composition of 56/39/5(water/acetonitrile/methanol, vol.%) in the optimized range. The calculated resolution from the correlation equation was in good agreement with the experimental one.

Key words: Taxol, Mobile Phase, Resolution, HPLC

1. 서 론

고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)는 최근 그 응용범위의 폭이 넓어짐에 따라 물질을 최적으로 분리하기 위한 공정들에 많은 관심이 집중되고 있으며 의약품의 분리에 있어서 폭 넓게 사용되어져 왔다[1]. 또한 분리하고자 하는 물질들이 복잡해 짐에 따라 최근 몇년 동안 이러한 HPLC 분리기술의 사용에 대한 필요성이 급증하고 있다. 장치 조작의 용이성, 정확성, 확실성 그리고 가장 중요한 특징인 물질에 대한 선택성의 장점 때문에 유전공학 분야에서 편리하게 사용되고 있다. 정성 및 정량과 관련한 분리에서 역상 고성능 액체 크로마토그래피(RP-HPLC)가 대표적으로 사용되며, 이는 최근 의학분야에서 관심의 대상이 되고 있는 taxol, phospholipids 등의 분리에 있어서도 매우 유용하게 사용되고 있다[2]. HPLC를 이용하여 최적의 분리도를 얻기 위해서는 우수한 분리기술뿐만 아니라 혼합물 중

에 있는 주요한 성분의 최적 분리도를 얻기 위해서 이용이 가능한 모든 변수들을 최적화해야만 한다[3].

크로마토그래피는 혼합된 시료성분이 분리관의 고정상과 이동상을 통하여 흐르면서 시료가 고정상과 이동상에 흡착작용, 분배작용, 이온교환작용, 분자크기 배제작용에 의하여 분리되고 정성 및 정량이 가능하게 된다[4]. 시료 중의 각 성분이 column에서 분리, 용출될 때 각 성분에 대한 분리된 정도를 나타내기 위해서 분리도(R)를 사용하는데 이는 capacity factor(k'), 분리인자(α), 이론단수(N)의 관계식으로 구할 수 있다.

$$R = \frac{1}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \times (\sqrt{N}) \times \left(\frac{k'}{1 + k'} \right) \quad (1)$$

selectivity efficiency capacity

여기서 α 는 column에서 용출되는 각 성분의 분리의 차이를 나타낸

다. α 는 분리의 선택성을 의미하며, 이동상으로서의 용매의 종류, 고정상의 종류에 따라 결정되는 부분이며, 용량인자 k_2 와 k_1 의 비이다[5]. Column의 효율은 이론단수로서 표시되며 주로 액체크로마토그래피에서는 10^3 정도의 이론단수를 갖는다. N 은 column 길이, 충전제의 입자모양 및 표면적, 이동상의 유속, 분리온도, 시료주입방법, 시료의 화학 및 물리적 특성 등에 의존하기 때문에 실제의 분리하는 경우 쉽게 변화시킬 수 없는 경우가 많다[6]. k' 는 시료가 column의 고정상에 체류하는 정도를 나타내는 retention volume과 관련된 항으로 두 인접한 peaks 1과 2의 용량인자 k_1 , k_2 의 평균값이며 일반적으로 선택된 이동상 용매의 조성비 또는 pH 등에 의하여 크게 변화될 수 있는 화학적인 항으로서 초기 조건의 개량에 가장 많이 사용된다. 가장 좋은 용량인자의 값은 1.5와 4사이의 값이다[7]. 위 식(1)의 selectivity, efficiency, capacity의 세 항들은 서로 독립적인 관계로서 각 항을 최적화할 수 있다[8].

최소한의 실험으로 특정 물질에 대한 최적 분리도를 이동상 조성의 함수로 표시된 실험상관식을 구하여 그 관계식으로부터 최적 이동상 조성을 찾는 것이 본 연구의 목적이다. 표준시료 물질로 taxol, cephalomannine, 10-deacetyltaxol을 사용하였다. Taxol은 백혈병의 치료제로서 탁월한 성능을 가지고 있을 뿐만 아니라 자궁암, 유방암, 후두암 및 불치성 말라리아 등에 대하여도 효과가 있으며[9-10], 최근들어 생활수준의 향상과 기호의 다양화로 각종 난치성 질병이 사회적인 문제로 대두됨에 따라 의학적인 측면에서 관심의 대상이 되고 있는 물질이다. Curosil-PFP reversed-phase column(250×4.6 mm, 5 μ m)과 이동상으로 물과 유기용매인 아세트나이트릴, 메탄올을 사용하고 이들 용매의 종류와 조성이 변화됨에 따라 위의 세 물질에 대한 분리도에 관한 실험을 하여 실험상관식을 구하였다. 이 관계식으로부터 curosil-PFP column에서 taxol 분리의 최적 이동상 조성 범위를 구하고 실제 주목나무 추출물에서 얻은 시료를 사용하여 실험하였다.

2. 실험

2-1. 시약

본 실험에 사용된 taxane의 표준시료(taxol, cephalomannine, 10-deacetyltaxol)는 NCI(National Cancer Institute, Bethesda, USA)에서 제공하였다. 이동상으로는 J. T. Baker사의 HPLC용 물, 메탄올, 아세트나이트릴을 감압 펌프(Division of Millipore, Waters)와 필터(FH-0.5 μ m, Waters)를 이용하여 감압 여과한 후에 사용하였다.

2-2. 기기 및 장치

HPLC는 Waters사의 600E 펌프(multisolvent delivery system), 486 UV-visible tunable wavelength absorbance, U6K 주입기(2 ml sample loop)를 사용하였다. 데이터 저장 시스템은 CHROMATE(v.3.0, Interface Eng.)를 사용하였다. 본 실험에서는 분석용 column인 curosil-PFP(250×4.60 mm, 5 μ m, Phenomenex Co.)을 사용하였다. 분석 후 얻어진 시료를 농축하기 위해 회전식 증발기(LABO-THERM SW 200, Resona Technics Co.)를 사용하였다.

2-3. 실험방법

시료(주목나무)의 추출은 임목육종연구소에서 제공한 주목나무 분말을 메탄올을 사용한 용액 추출법과 클로로포름을 사용한 용액 분배법을 통해 실험에 사용할 시료를 만들었다[11]. 시료는 주목나무의 추출액과 표준시료로서 NCI로부터 제공받은 3가지 성분(cephalomannine, 10-deacetyltaxol, taxol)의 혼합액을 사용하였다. 이들 혼합액은 taxol과 매우 유사한 화학구조를 갖기 때문에 taxol로부터 분리하기가 어려우며 이들 3가지 성분의 혼합액을 100 ppm 농도로 만들어 사용하였다.

시료 주입량은 10 μ l이고 유속은 1 ml/min으로 고정하고 일정용매법으로 실험을 하였다. UV wavelength는 228 nm에서 고정하였다. 이동상의 조성은 2성분계는 역상 크로마토그래피이기 때문에 물을 기본으로 하여 물/아세트나이트릴, 물/메탄올의 조성을 바꾸며 실험을 하였다. 3성분계에서는 2성분계와 동일한 방법으로 물/아세트나이트릴/메탄올에 대한 이동상의 조성을 변화시키면서 분리도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

특정 물질에 대한 분리조건을 구하기 위해서는 용량인자, column의 효율, 이론단수, column의 선택도 등을 고려해야 한다. 본 연구에서는 물을 기본으로 하는 역상 HPLC에 organic modifier로서 메탄올과 아세트나이트릴을 첨가하였다. 이 organic modifier에 따라서 cephalomannine과 taxol의 분리도(R_{CT}), taxol과 10-deacetyltaxol의 분리도(R_{TD})를 다음과 같은 식에 의해서 계산하였다.

$$R = \frac{t_2 - t_1}{(w_2 + w_1)/2} = \frac{2\Delta t}{w_2 + w_1} \quad (2)$$

Table 1. Resolution and elution time in terms of mobile phase composition

Run no.	Mobile phase compositions (v/v/v%)			Resolution		Elution time (min)		
	Water	ACN	MeOH	Cephalomannine/taxol	Taxol/10-deacetyltaxol	Cephalomannine	Taxol	10-Deacetyltaxol
1	40	60	0	1.13	0	6.2	6.68	6.68
2	45	55	0	1.59	0.48	7.98	8.85	8.55
3	50	50	0	2.92	1.33	11.02	12.75	11.95
4	55	45	0	4.1	2.29	17.08	20.75	18.78
5	60	40	0	6	3.6	30.27	39.03	33.87
6	25	0	75	0.3	0.42	8.08	8.08	8.77
7	30	0	70	0.91	1	12.08	12.95	14.13
8	35	0	65	1.65	1.3	21.07	23.47	25.62
9	40	0	60	4	1.7	44.23	51.65	55.75
10	45	0	55	4	0.74	105	129.42	134.67
11	50	35	15	4.75	1.29	22.85	27.95	26.58
12	50	40	10	3.56	1.05	17.3	20.75	19.72
13	50	45	5	3.2	1.05	13.62	16	15.13
14	55	35	10	6	2.12	31.72	40.33	36.95
15	55	40	5	5	2.11	22.7	28.13	25.72

t_1 , t_2 는 시료 1, 2의 체류시간이며, w_1 , w_2 는 시간단위로서의 peak 1, 2의 기준선에서의 폭이다. 위 식에서 보는 바와 같이 두 물질의 체류 시간의 차이가 크더라도 peak banding의 broadening이 작은 경우 분리도는 좋지 않게 된다[12].

Table 1에서는 물/아세토나이트릴, 물/메탄올의 2성분계와 물/아세토나이트릴/메탄올의 3성분계 조성에 따라 cephalomannine과 taxol, taxol과 10-deacetyltaxol의 각각의 분리도와 용출시간을 보여주고 있다. 2성분계에서 아세토나이트릴은 40-60 vol.%, 메탄올은 55-75 vol. %로 각기 5%씩 변화시키면서 물과 함께 이동상 조성으로 사용하였으며 3성분계에서는 아세토나이트릴과 메탄올의 함량을 5%씩 변화시켰다. 유기 용매인 아세토나이트릴과 메탄올의 양이 증가함에 따라 각각 물질의 용출 시간이 빨라져서 전체 분리시간이 줄었고 이에 따라서 분리도가 감소하고 있다. 아세토나이트릴과 메탄올이 동일한 양(60-55 vol.%)에서 비교해 보면 아세토나이트릴은 메탄올에 비해 전체 분리시간은 짧고 분리도는 낮았으며 메탄올은 분리도는 좋았지만 전체 분리시간이 길어졌다. 따라서 아세토나이트릴은 전체 분리시간에, 메탄올은 분리도에 각기 영향이 있었다. 또한 분리도를 이동상 조성에 대한 실험상관식으로 나타내기 위해서 Table 1에 있는 각 이동상 조성에서의 분리도를 cephalomannine/taxol, taxol/10-deacetyltaxol에 대하여 다음과 같은 네 가지 equation에 대해서 고려하였다(Table 2 참조). 두 개의 organic modifier의 조성과 이들 조성의 interaction항으로 이루어진 선형식, 두 개의 organic modifier에 대한 2차 다항식, 이전 식에 interaction 항을 고려한 식, 물과 두 개의 organic modifier에 대한 조성의 선형식과 각기의 interaction 항을 포함한 식이다. 각 equation에 대한 regression coefficient(r^2)를 비교한 결과 매개변수의 수가 가장 많은 식 (6)이 가장 1에 근접하였다. 물, 아세토나이트릴, 메탄올의 모든 조성에 대해서 실험적으로 분리도를 정해진 기준의 작은 범위까지 확인하기 위해서는 많은 시간이 소요된다. 최적의 분리도와 분리시간은 물질에 따라 다르게 정의되며 모든 조건을 실험적으로 확인하여 최적조건의 이동상의 조성을 정하기가 어렵다. Cephalomannine/taxol과 taxol/10-deacetyltaxol의 이동상 조성의 변화에 따른 분리도를 최소한의 실험을 하고 실험상관식으로 예측하여 taxol을 분리하기 위한 최적의 이동상 조성을 실험상관식으로부터 구하였다. 본 실험에서는 각 성분(물, 아세토나이트릴, 메탄올)의 5%씩을 변화시키면서 실험을 하였다. Fig. 1에서 Table 2에 있는 식 (6)으로부터 계산한 분리도(R_{cal})와 실험을 통해서 계산된 분리도(R_{exp})를 cephalomannine/taxol, taxol/10-deacetyltaxol에 대해서 비교하였다. Fig. 2는 3성분계에서 cephalomannine과 taxol에 대한 분리도(R)를 $R < 1.5$, $1.5 < R < 6$, $R > 6$ 의 세 부분으로 나누어서 표시하였다. 실험에서 사용한 각 이동상의 범위는 물 30-100, 아세토나이트릴 0-70, 메탄올 0-70(vol.%)이었다. 유기용매인 아세토나이트릴과 메탄올의 양이 많아지면 분리하고자 하는 세 물질(cephalomannine, taxol, 10-deacetyltaxol)의 분리가 이루어지지 않기 때문이다.

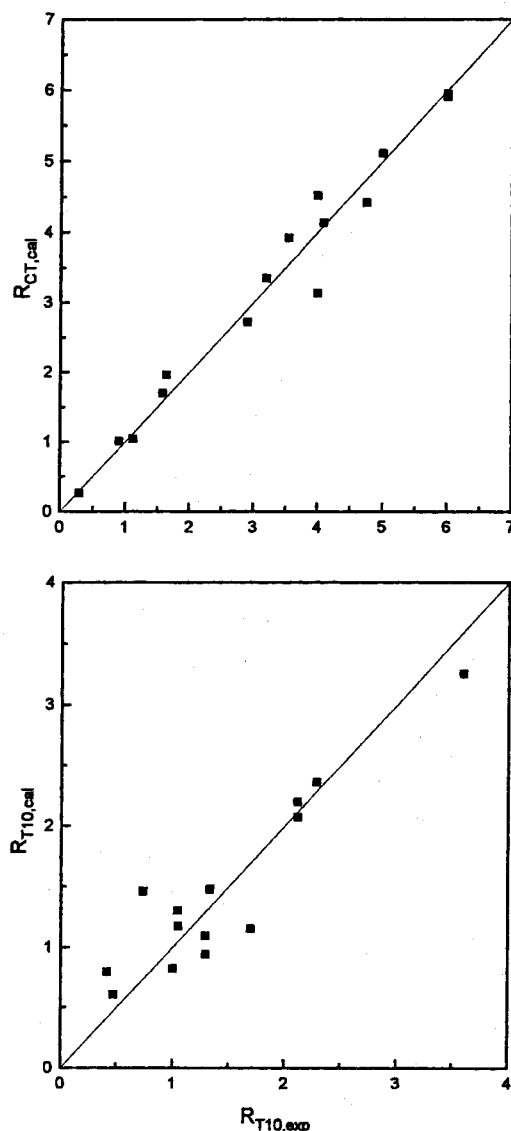


Fig. 1. Comparison of experimental and calculated resolution by Eq. (6).

작은 양(주로 $10^2 \mu\text{g}$ 이하)의 두 물질을 분리하는데 있어서 분리도가 1.5가 되면 기준선에서 완전한 분리가 이루어진다[13]. 분리도가 1.5 이하인 경우는 □로 표시하였다. $R > 6$ 이상인 경우에는 물이 많이 사용되어서 분리시간이 1시간 이상이 소요된다. 따라서 $1.5 < R < 6$ 인 조건에서의 분리도와 분리시간이 최적조건이라 정하였다. 물질을 분리하는 것은 분리도와 분리시간을 동시에 만족하도록 고려해야 한

Table 2. Correlation equations used in this work

Equation no.	Equations	Regression coefficient
3	$R_{CT} = 16.458 - 0.266X_1 - 0.22X_2 + 0.0016X_1X_2$ $R_{T10} = 8.464 - 0.139X_1 - 0.113X_2 - 0.0012X_1X_2$	0.9727 0.8473
4	$R_{CT} = 14.613 - 0.187X_1 - 0.00082X_1^2 - 0.16X_2 - 0.00048X_2^2$ $R_{T10} = 9.531 - 0.132X_1 - 0.0055X_1^2 - 0.229X_2 + 0.0015X_2^2$	0.9716 0.9321
5	$R_{CT} = 37.892 - 1.151X_1 + 0.0089X_1^2 - 0.892X_2 + 0.0157X_1X_2 + 0.0052X_2^2$ $R_{T10} = 12.737 - 0.265X_1 + 0.0008X_1^2 - 0.33X_2 + 0.0022X_1X_2 + 0.0023X_2^2$	0.9844 0.9330
6	$R_{CT} = 0.0042 + 0.088X_1 - 0.013X_1X_2 - 0.0043X_2 + 0.331X_3 - 0.0073X_1X_3 - 0.0041X_2X_3 + 0.00029X_1X_2X_3$ $R_{T10} = 0.00054 - 0.073X_1 - 0.0073X_1X_2 + 0.02X_2 + 0.106X_3 - 0.000071X_1X_3 - 0.0018X_2X_3 + 0.00013X_1X_2X_3$	0.9868 0.9349

X_1 : acetonitrile, X_2 : methanol, X_3 : water.

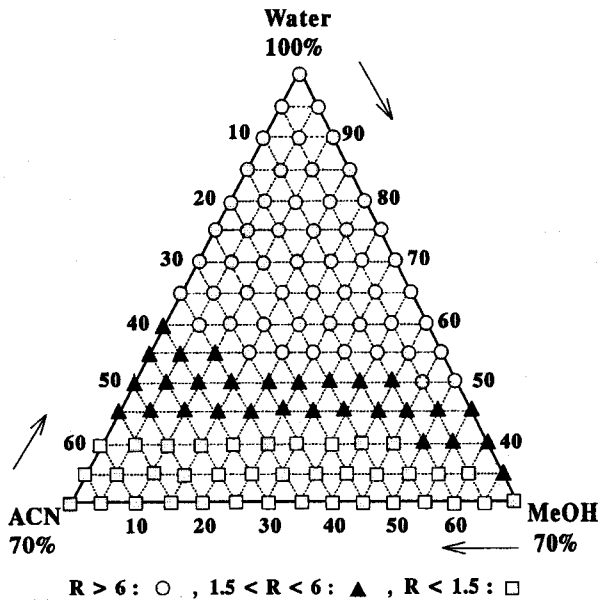


Fig. 2. Triangle plot of resolution of cephalomannine/taxol with mobile phase composition.

다. 서로 화학적 구조가 유사한 cephalomannine과 taxol이 분리도 $R > 1.5$ 의 범위에 있더라도 10-deacetyltaxol의 peak width가 크기 때문에 taxol과 10-deacetyltaxol은 분리가 되지 않았다. 세 물질을 동시에 분리하기 위해서는 Fig. 2와 3의 optimized region이 고려되어야 한다. 분리도와 분리시간은 독립적으로 변하는 것이 아니며 상호 의존적이며 최적조건에서 분리도와 분리시간의 절대적인 값이 있는 것은 아니다. 세 물질의 분리가 이루어지는 분리도의 범위를 $1.5 < R < 6$ 으로 정하고 그림에서는 ▲으로 표시된 부분이 만족할 만한 이동상의 조성(optimized zone)이 된다. 이 조건에서는 물과 메탄올의 양의 합이 50% 정도가 되어야 하는 것을 알 수 있다. Fig. 3에서도 Fig. 2와 동일한 방법으로 taxol/10-deacetyltaxol에 대해서 3가지 조건으로 분리도를 구분하여 삼각도표에 나타내었다. 이동상의 조성은 물의 함량이 55-75%로써 이 전 분리도(R_{CT})보다 물의 양이 많이

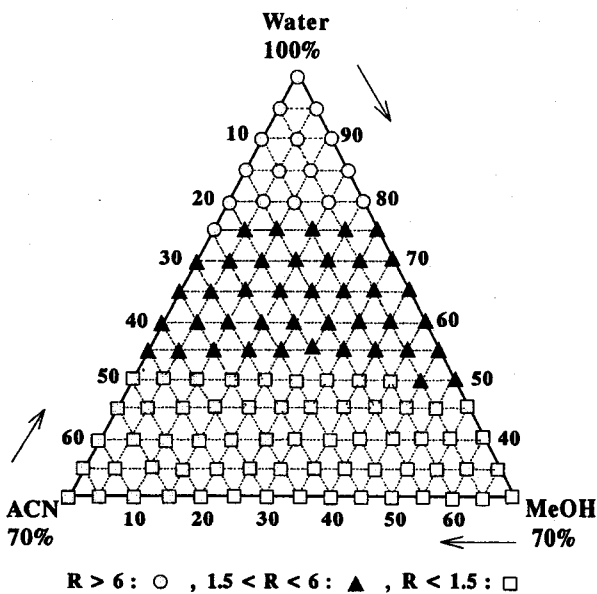


Fig. 3. Triangle plot resolution of taxol/10-deacetyltaxol with mobile phase composition.

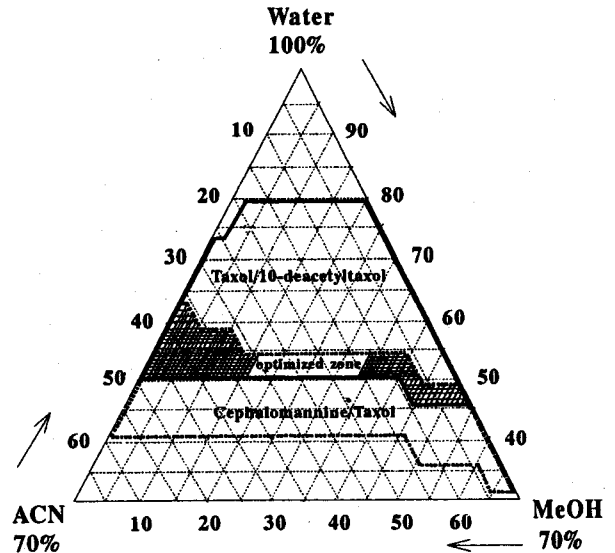


Fig. 4. Optimized zone for resolution of cephalomannine, taxol and 10-deacetyltaxol.

필요하게 되었다. Taxol/10-deacetyltaxol은 cephalomannine/taxol 분리보다 물의 양을 많이 사용하고 유기용매의 양을 적게 사용하여 분리도를 증가시켰다. 세 물질이 동시에 주입되는 것에 대한 이동상의 최적조건은 Fig. 2와 3의 중복되는 부분으로 Fig. 4에서 굵은 점선 부분이 Fig. 2에서 cephalomannine/taxol의 분리도를 나타낸 부분이고 굵은 실선 부분이 Fig. 3의 taxol/10-deacetyltaxol의 분리도를 나타낸 부분이며 가운데 존재하는 부분(optimized zone)이 분리시간이 1시간내로 세 물질의 분리도가 $1.5 < R < 6$ 에 존재하는 부분에 대한 물, 아세토나이트릴, 메탄올의 조성을 나타내고 있다. 이 optimized zone 부분에 해당하는 이동상 최적조건에 포함된 56/39/5(물/아세토나이트릴/메탄올, vol.%)을 선정하여 2-3의 실험방법으로 주목나무로부

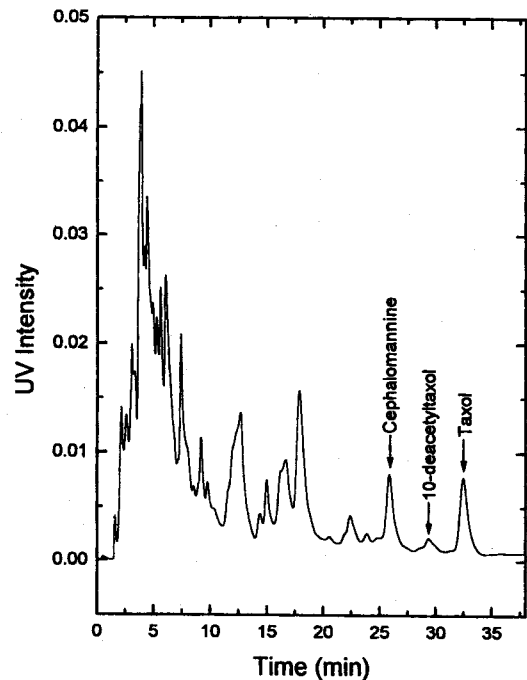


Fig. 5. Isocratic reversed-phase separation of yew extract.

(Water : Acetonitrile : MeOH=56 : 39 : 5 vol%, inj. vol=10 μ l, flow rate=1 ml/min, conc.=100 ppm).

터 추출한 시료를 사용하고 주입량 1 μ l, 이동상의 유속 1 ml/min로 세 물질에 대한 분리 실험을 한 결과가 Fig. 5에 나타나 있다. 이 그림에서 나타난 cephalomannine/taxol의 분리도는 5.6, taxol/10-deacetyl-taxol의 분리도는 3.13이었고 실험상관식으로부터 얻은 cephalomannine/taxol의 분리도는 5.49이고, taxol/10-deacetyl-taxol의 분리도는 2.38로서 매우 잘 일치하였다. 실험의 분리시간도 32분으로 빨리 용출되었다. 모든 이동상 조성에 대해서 실험을 통하여 이 세 물질의 분리가 가장 잘 이루어지는 이동상 조성을 찾는 데는 많은 시간과 노력이 필요하지만 위와 같이 체계적이고 최소한의 실험을 하여 얻어진 결과로부터 계산된 실험상관식을 사용함으로써 실험하지 않은 조성까지 고려할 수 있고 최소한의 실험으로 원하는 최적 조건의 이동상 조성을 찾을 수 있는 장점이 있다.

4. 결 론

이동상의 조건은 물질을 분리하는데 분리도에 가장 큰 영향을 미친다. 물질 분리를 위한 최적 이동상 조성을 구하기 위해서 모든 이동상 조성에 대해서 작은 범위까지 실험적으로 확인하기 위해서는 많은 시간이 소요된다. 물질을 최적조건으로 분리시킨다는 것은 충분한 분리도와 분리시간이 짧아야 한다. 분리도와 분리시간의 절대적인 값이 정해져 있지 않기 때문에 이를 실험적으로 모든 조건들을 확인하여 최적조건이 되는 정확한 지점을 정하기는 어렵다. 따라서 항암제인 taxol 부근에 존재하는 cephalomannine, 10-deacetyl-taxol을 15번의 실험을 통하여 최적 이동상의 조건을 실험상관식으로 구하고 두 조건을 만족하는 분리도를 구하였다. Curosil-PFP column을 역상 액체크로마토그래피에서 주목나무로부터 얻어진 추출물을 시료 물질로 하여 이 조건에 부합되는 이동상 조성을 56/39/5(물/아세트나이트릴/메탄올, vol.%)으로 확인한 결과 이 세 물질의 분리가 잘 이루어졌으며 전체 분리시간은 32분이었다.

감 사

본 연구는 교육부 생물화학공학 분야 연구과제로 수행 중인 pro-

ject(과제번호: C-6)입니다. 연구가 원활하게 진행될 수 있게 표준시료를 제공해 주신 NCI와 주목나무 분말을 제공해 주신 임목육종연구소에 감사를 표합니다.

참고문헌

1. Berridge, J. C.: "Techniques for the Automated Optimization of HPLC Separation", Wiley-Interscience, New York(1985).
2. Ravanat, J. L., Douki, T., Incardona, M. F. and Cadet, J.: *J. Liq. Chromatogr.*, **16**, 3185(1993).
3. Chye, P. O., Chow, K. K., Choon, L. N. and Fei, M. O.: *J. Chromatogr. A*, **692**, 207(1995).
4. Hamilton, R. J. and Sewell, P. A.: "Introduction to High Performance Liquid Chromatography", 2nd Ed., 13(1982).
5. Hancock, W. S., Rosanne, C. C., Kirkland, J. J. and Snyder, L. R.: *J. Chromatogr. A*, **686**, 31(1994).
6. Guillaume, Y. and Guinchard, C.: *J. Liq. Chromatogr.*, **17**, 1443(1994).
7. Clajch, J. L., Kirkland, J. J. and Snyder, L. R.: *J. Chromatogr.*, **238**, 269(1982).
8. Shen, H.-X., Yang, G.-S., Gao, R.-Y. and Wang, Q.-S.: *Chromatographia*, **40**, 303(1995).
9. Wolff, M. E.: "Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery", 5th Ed., John Wiley & Sons, NY, U.S.A., 996(1995).
10. Witherup, K. M., Look, S. A., Stasko, H. W., Mccloud, T. G. and Muschik, H. J.: *J. Liq. Chromatogr.*, **12**, 2117(1989).
11. Kappakva, V., Rao, R., Bhakuni, J. J. and Richard, M. D.: *J. Liq. Chrom. & REL. Technol.*, **19**(3), 427(1996).
12. Valiente, B. A. and Duprat, F.: *J. Liq. Chromatogr.*, **17**, 1709(1994).
13. Nina, H., Fred, B., Fred, M. and Miner, M.: "Basic Liquid Chromatography", Varian Aerograph(1971).