

단이론과 모멘트방법을 이용한 데옥시리보뉴클레오사이드의 평형상수의 계산 및 비교

이 주 원 · 노 경 호

인하대학교 화학공학과
(1997년 1월 8일 접수, 1997년 3월 18일 채택)

Comparison and Estimation of Equilibrium Constants for Deoxyribonucleosides by Plate Theory and Moment Method

Ju Weon Lee and Kyung Ho Row

Dept. of Chem. Eng., Inha Univ., Incheon 402-751, Korea
(Received January 8, 1997, Accepted March 18, 1997)

요 약 : 데옥시리보뉴클레오사이드의 평형상수를 단이론과 모멘트방법에 의해서 일정 용매 조성법 역상 고성능 액체크로마토그래피(Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 계산하였다. 이동상은 물을 기본으로 유기용매로서 acetonitrile과 methanol을 사용하였다. 단이론은 선형 흡착식으로부터 나온 모델로 일정한 유속으로 용매가 column의 단을 평형을 이루면서 지나간다는 가정 하에서 이루어졌다. 모멘트방법은 실험결과로부터 얻은 peak에서 첫 번째 절대 모멘트를 구하여 평형상수를 계산하는 방법이다. 이 두 가지 방법에 의한 다섯 가지의 데옥시리보뉴클레오사이드의 평형상수값은 서로 근사하였고, 용량인자를 이용하여 구한 평형상수의 값과도 비슷하였다. 평형상수는 이동상에서의 organic modifier의 양의 semi-log의 관계식으로 표시되었고 단이론에 의해 계산된 용출곡선은 실험값과 잘 일치하였다.

Abstract : The equilibrium constants of five deoxyribonucleosides (dCyd, dUrd, dGuo, dThd, dAdo) were estimated by the plate theory and the moment method under isocratic conditions of the Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC). The mobile phase in this system was composed of water and organic modifiers(acetonitrile and methanol). The plate theory of linear adsorption isotherm was treated on the basis of continuous flow of eluent through the plates of the column. The moment method was utilized to find the equilibrium constant from the first absolute moment of experimental data. The equilibrium constants of five deoxyribonucleosides in the two methods were very close, and also the equilibrium constants calculated by capacity factor were similar to those by both the plate theory and the moment method. The equilibrium constant was expressed as a semi-log function of the quantity of organic modifier. Excellent agreements between the calculated elution profile by the plate theory and the experimental data were observed.

1. 서 론

데옥시리보뉴클레오사이드는 DNA를 구성하는 중요한 성분이고 생존하는 모든 생물에 중요한 역할을 한다. 이들 물질은 강력한 생리학적 효과를 가지고 있다. 최근에는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)를 이용하여

DNA fragments를 정제하거나 분리하는 기술이 상당히 발전하였다[1].

크로마토그래피는 주입된 물질의 분리가 충전물이 채워진 관에서 이루어지며 분석 등의 소규모 기기에서부터 대규모 흡착탑에 이르기까지 사용범위가 광범위하다. 고정층 충전탑인 크로마토그래피를 설계하기 위해서는

주로 breakthrough curve를 이용하고 있다. 실험실 규모나 pilot plant scale의 실험을 가능한 줄이기 위해서는 수학적 모델 선정의 필요성이 생긴다. 고성능 액체 크로마토그래피에서 이동상의 변화에 따른 용질의 체류거동에 대한 정확한 메카니즘은 그 동안 많은 연구가 이루어졌다. 이러한 메카니즘을 이용함으로써 역상 액체 크로마토그래피에서 용질의 관내 체류 시간과 용질의 용출곡선을 단이론(plate theory)을 이용하여 예측할 수 있다[2]. 크로마토그래피용 column 내에서 데옥시리보뉴클레오사이드가 분리되는 것은 각 성분의 평형상수(equilibrium constant)가 서로 다르기 때문이다.

크로마토그래피의 이론은 Martin과 Synge가 1941년에 소개한 증류와 향류식 추출의 메카니즘과 유사성에 기초를 둔 단이론에서부터 시작하였다[3]. 단증류탑에서는 액체상과 기체상이 공존하는 실제적인 단이 존재한다. 단내의 정교한 혼합에 의해서 두 상간의 평형을 가정할 수 있다. 이러한 단이론은 충전증류탑에서도 이에 대등한 이론단이 존재하여 평형을 이루면서 분리된다고 볼 수 있다. 이러한 이론단을 크로마토그래피용 column으로 확장시켜, 이동상과 고정상 사이에서 물질의 이동이 평형을 이루면서 분배된다고 가정한다[4, 5]. 한편 모멘트방법은 용질에 대한 용출 곡선의 Laplace 변환에 의한 결과식이 용출곡선의 모멘트와 관계가 있다는 것으로부터 발전되었다.

두 개의 서로 다른 상 사이에서의 용질의 분배에 대한 연구는 매우 오래 전부터 이루어져 왔는데 이에 관한 최초의 체계적인 연구는 1872년 Berthelot와 Jungfleisch에 의해 이루어진 것으로 보고되고 있다[6]. 생물공업과 관련하여서는 천연물로부터의 알칼로이드 및 스테로이드류의 분리, 발효 배양액으로부터의 항생물질 회수 등의약품 분야와 식용유 정제 등의 식품분야에 널리 사용되고 있다. 분배계수를 예측하는 방법으로 Hansch의 hydrophobic substituent constant 방법, Rekker의 hydrophobic fragmental constant 방법, Linear Free Energy Relationship(LFER)의 이용으로 다음 세 가지 방법이 있다. Hansch의 방법은 분배계수가 additive-constitutive 특징을 가지고 있음을 알아내고 hydrophobic substituent constant의 개념을 도입하여 분배계수의 예측을 가능하게 하였으나 inductive effect, resonance effect, steric effect, branching, conformational effect 등에 의해 많은 보정을 필요로 한다. 이에 비해 Rekker의 방법은 hydrophobic fragmental constant의 개념을 도입하여 Hansch의 방법의 단점을 보완하였다. LFER을 이용한 방법은 분배계수가 일종의 평형상수인 데서 기인하는 것

으로 1951년 R. Collander에 의해 처음으로 시도되었다 [7-9].

데옥시리보뉴클레오사이드는 수용성 물질로 역상 액체 크로마토그래피를 사용하고 이에 쓰이는 대표적인 유기용매인 methanol과 acetonitrile을 물에 첨가하였다. 크로마토그래피 분리에서 가장 중요한 평형상수를 데옥시리보뉴클레오사이드에 대해서 단이론과 모멘트방법에 의해서 구하고 단이론에 의하여 계산된 용출곡선과 실험값을 비교하여 단이론의 유용성에 대하여 논하는 것이 연구의 목적이다.

2. 이 론

2.1. 단이론

단이론에 의해서 크로마토그래피용 column은 수학적으로 N 개의 부분으로 나뉘어진 평형 단으로 구성된다고 가정한다. Column의 이론 단수 N 은 다음의 식으로 계산할 수 있다.

$$N = 16 \left(\frac{t_i}{w_i} \right)^2 \quad (1)$$

여기서 t_i 는 i 물질의 체류 시간, w_i 은 peak의 넓이이다. 각 단은 이동상의 부피(v_m)와 고정상의 부피(v_s)를 포함하고 있다. v_m 과 v_s 는 각기 다음 식에 의해서 구할 수 있다.

$$V_m = \frac{V \cdot \epsilon_{tot}}{N}, \quad V_s = \frac{V \cdot (1 - \epsilon_{tot})}{N} \quad (2)$$

V 는 column 내의 부피로 $V = 3.58 \text{ ml}$ 이고 ϵ_{tot} 는 column내의 전체부피에 대한 이동상의 부피의 비로 $\epsilon_{tot} = 0.75$ 로 가정하였다. 이동상이 각 단과 단 사이를 연속적으로 통과하고 있을 때 이동상과 고정상 사이에 용질은 평형을 이루면서 흡착한다. 이동상은 비압축성용매로 가정을 한다.

임의의 한 단 n 에 대한 물질수지식은 다음과 같다.

$$c_{n-1}dv - c_n dv = d[(v_m + Kv_s)c_n] \quad (3)$$

v 는 n 단의 시작점에서의 이동상의 부피이고 c_n 은 n 단에서의 용질의 농도이다. 그리고 K 는 평형 상수로서 다음과 같이 정의된다.

$$K = \frac{\text{Concentration of Solute in Stationary Phase}}{\text{Concentration of Solute in Mobile Phase}} \quad (4)$$

작은 농도범위에서 평형 상수는 농도와는 무관하지만 온도에 대해서는 지수함수 관계식을 가지고 있다. β 를 고정상의 부피에 대한 이동상의 부피의 비로 나타내면 용량인자(capacity factor, k)와 평형 상수는 다음과 같은 관계가 있다.

$$k = K\beta \quad (5)$$

위의 식 (3)은 1계 선형 미분방정식으로 다음과 같은 해를 얻을 수 있다.

$$c_N = c_0 \sum_{i=N-r}^{N-1} \frac{(av)^r}{i!} e^{-av} \quad (6)$$

a 는 상수로서 다음과 같이 정의하였다.

$$a = \frac{1}{v_m + Kv_s} \quad (7)$$

r 은 용질이 처음 주입되었을 때 채워지는 이론단의 단수를 의미한다. r 은 주입 부피를 한 단의 이동상의 부피(v_m)로 나눈 값을 올림 하여 양의 정수로 하였다[3].

실험에 의한 분배계수와 계산값을 비교하기 위해 크로마토그램상에서 용량인자를 구한 다음에 용량인자와 평형상수와의 관계식을 이용하여 비교하였다. 용량 인자를 구하는 식은 다음과 같다.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (8)$$

t_R 은 용질의 체류시간이고 t_0 는 고정상과 상호작용이 없는 물질의 체류 시간(dead time)이다.

2.2. 모멘트 방법

크로마토그래피에서의 용질에 대한 용출 곡선의 n 번째 모멘트는 다음과 같이 나타낸다..

$$m_n = \int_0^{\infty} C(t) \cdot t^n dt \quad (9)$$

$C(t)$ 는 column의 출구에서의 시간에 따른 용질의 농도의 함수로서 용출 곡선을 나타낸다. 첫번째 절대 모멘트(first absolute moment)는 다음과 같이 나타낸다.

$$\mu_1 = \frac{m_1}{m_0} = \frac{\int_0^{\infty} C(t) \cdot t dt}{\int_0^{\infty} C(t) dt} \quad (10)$$

첫 번째 절대 모멘트(μ_1)는 매개변수 추산에서 가장 중

요하게 사용되는 모멘트이다. 이보다 더 높은 모멘트는 실험적인 용출곡선을 계산하였을 때 tailing으로 인한 큰 오차가 나타나게 된다.

모멘트 방법을 적용하기 위한 수학적 모델식에서는 solid particle 외부의 이동상에서의 축방향 확산(axial dispersion)과 이동상과 solid particle간의 물질전달, solid particle내부에서의 확산, 그리고 solid particle 외부에서의 1차 가역흡착이라는 가정 하에 선형 흡착식을 포함하고 있다. 평형 상수와 모멘트의 관계식은 다음과 같이 표시된다[10].

$$\mu_1 = (z/u)[1 + \delta_0] + (\mu_1)_{pulse} \quad (11)$$

식(11)의 δ_0 는 다음과 같다.

$$\delta_0 = [(1 - \epsilon)/\epsilon](\epsilon_p + \rho_p K) \quad (12)$$

z 는 column의 길이이고, u 는 이동상의 선 속도를 나타낸다. ϵ 은 고정상의 solid particle을 구형이라는 가정 하에서 입자사이의 전체 관에 대한 이동상의 부피의 비를 나타내고, ϵ_p 는 solid particle 내의 이동상 부피 비를 나타낸다. β 는 ϵ 와 ϵ_p 의 합으로 나타낸다. ρ_p 는 solid particle의 밀도이다.

식 (12)에서의 K 는 단 이론에서의 평형 상수에 해당한다. 이 식에서 보는 바와 같이 첫번째 절대 모멘트(μ_1)는 평형 상수에 의해서만 영향을 받고, 선형적인 함수 관계를 가지고 있다. 각 물질의 평형 상수는 첫번째 절대 모멘트에 의해서 구할 수 있다.

$(\mu_1)_{pulse}$ 는 시료 주입 시간에 따른 함수로 $(\mu_1)_{pulse}$ 는 $\tau/2$ 로 나타낼 수 있다. τ 는 시료 주입 시간이다. 시료 주입 시간이 0에 접근할수록 같이 0에 접근하므로 0으로 가정할 수 있다. 본 연구에서는 Mathematica(V. 2.2, Wolfram Research, Inc.)를 사용하여 계산하였다.

3. 실험

본 실험에서 사용되는 5가지의 시료는 thymidine ($C_{10}H_{14}N_2O_5$, dThd), 2'-deoxyuridine ($C_9H_{12}N_2O_5$, dUrd), 2'-deoxyadenosine ($C_{10}H_{13}N_5O_3$, dAdo), 2'-deoxycytidine ($C_9H_{13}N_3O_4$, dCyd), 2'-deoxyguanosine ($C_{10}H_{13}N_5O_4$, dGuo)이고 모든 시료는 Sigma (St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였으며, HPLC-grade의 물을 사용하여 1000 ppm의 저장 용액을 만들고 50 ppm으로 희석시켜 사용하였다. 이동상으로 쓰이는 HPLC-grade의 water, methanol, acetonitrile은 Baker (Phillipsburg NJ, U.S.A.)에서 구입

하였다.

HPLC는 Waters사의 600E pump (multisolvent delivery system), 486 detector (UV-visible tunable wavelength absorbance), U6K injector (2 ml sample loop)를 사용하였고 data acquisition system은 CHROMATE (V. 2.1, Interface Eng.)를 PC에 설치하여 사용하였다. 본 실험에서 column은 Waters사의 μ -Bondapak C₁₈ (10 μ m particle size)을 사용하였다.

실험에 사용된 유기용매는 methanol과 acetonitrile이고 각각 0~30% (v/v), 0~12% (v/v)이다. 이동상의 모든 용매는 감압 펌프 (Division of Millipore, Waters)와 filter (HA-0.45 μ m, FH-0.5 μ m)를 이용하여 감압 여과를 한 후에 사용하였다. 이동상 내에 잔존하는 공기를 제거하기 위해 헬륨을 100 ml/min의 유속으로 이동상의 저장 용기에서 탈기하였다. 주입 부피는 5 μ l이고 이동상의 유량은 1 ml/min이다. UV detector의 wavelength는 254 nm로 고정하였다. 모든 실험은 상온에서 행하였다. Dead time은 column내에 이동상이 차지하는 부피를 유속으로 나누어 구하였으며 그 값은 2.6 min이었다.

4. 결과 및 고찰

이론단수(Number of theoretical plates, N)는 column efficiency를 알 수 있는 척도로서 Fig. 1에서는 각 물질에 대한 이론단수 값을 보여주고 있다. 이론단수는 물질과 실험한 이동상의 조성의 영향이 크지 않아서 약 4000 정도의 값을 가지고 있다. 유기용매로서 acetonitrile에 대한 이론단수의 값도 같은 경향을 보였다. 그러므로 단 이론을 이용하여 각 물질의 용출곡선을 예측할 때에 이론단수를 비교적 일정한 범위에서 정할 수 있게 된다.

실험결과와 단이론에 의한 peak를 일치시키기 위하여 평형상수의 변화에 따라 dCyd의 용출곡선이 어떻게 변하는가를 Fig. 2에서 보여주고 있다. 평형상수(K)값이 증가하면 용질의 체류시간은 길어지고 감소하면 용질의 체류시간은 짧아진다. 실험적인 peak를 기준으로 계산한 평형상수를 다섯 가지 테옥시리보뉴클레오사이드에 대하여 구하여 실험결과와 비교한 것이 Fig. 3에 나타나 있다. 실험값과 단이론에 의해 구한 용출곡선이 잘 일치하고 있다.

크로마토그래피를 이용한 분리의 원리는 각 물질이 이동상과 고정상에서의 체류부피(일정한 유량에서는 체류시간)가 다르기 때문이다. 이 체류부피는 시스템에서의 dead volume을 고려하여 통상적으로 식 (8)과 같이 무차원식으로 표시한다. 용량인자와 organic modifier의

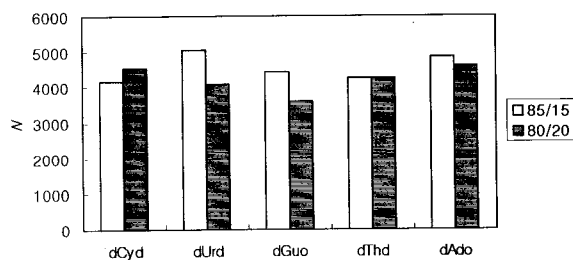


Fig. 1. Number of theoretical plates for five deoxyribonucleosides (Injection volume: μ l, Flow rate: ml/min, Mobile phase: water/methanol, vol. %).

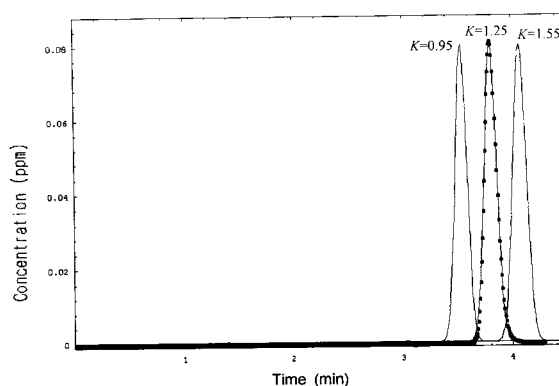


Fig. 2. Shifts of calculated elution profile with different values of the equilibrium constant (dots: experimental data of dCyd, Water/MeOH = 80/20 v/v).

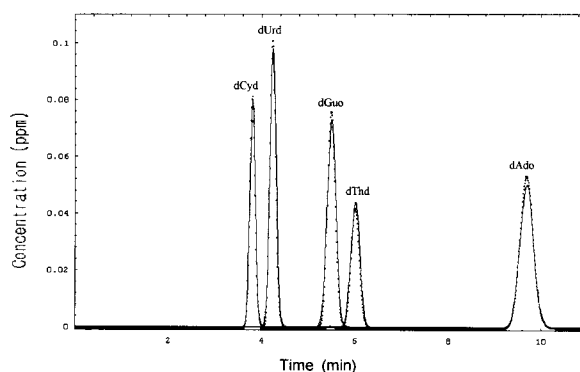


Fig. 3. Comparison of the calculated values with the experimental data (Water/MeOH = 80/20 v/v, Injection volume: 5 μ l, Flow rate: 1 ml/min).

양과의 관계는 Snyder에 의해 semi-log 좌표에서 선형성을 가지고 있다[11]. 평형상수와 용량인자는 식 (5)에 의해 β 를 매개변수로 하고 있다. 용량인자 대신에 평형상수를 사용하여 이동상에서의 methanol과 acetonitrile

의 조성에 따라 나타낸 것이 각기 Fig. 4와 Fig. 5이다. 이동상에서 유기용매의 양이 늘어날수록 평형상수는 감소하는데 유기용매와 용질의 경쟁 흡착에 의해 일정한 표면적을 갖는 고정상에서 용질의 흡착면적이 줄어서 체류시간이 빨라지기 때문이다. 유기용매의 선택에 있어서 가장 중요한 인자는 유기용매의 극성(polarity)이다. 이동상의 극성에 의해서 평형상수의 값이 달라지게 되는데 역상의 경우 고정상이 비극성이므로 이동상의 극성이 낮을 수록 물질의 체류시간은 짧아진다. 이동상에서 같은 양의 methanol과 acetonitrile에 대한 평형상수의 값을 비교했을 때 acetonitrile에 대한 평형상수 값이 작은 이유는 methanol보다 acetonitrile의 극성이 더 작기 때문에 물질의 체류시간이 더 짧아져서 평형상수 값이 작게 된다. 이러한 특성을 이용하여 이동상의 조성을 변화시켜 특정 column내에의 dead time으로 부터 용량인자를 구할 수가 있다. ϵ_{tot} 가 0.75인 경우 β 는 3이고 이를 사용하여 K 값을 알 수 있게 된다. 그러므로 물과 methanol 또는 물과 acetonitrile로 이루어진 이성분계 이동상의 조성에서 평형상수를 구할 수 있으므로 단이론을 이용하여 용질의 용출곡선을 예측할 수 있다.

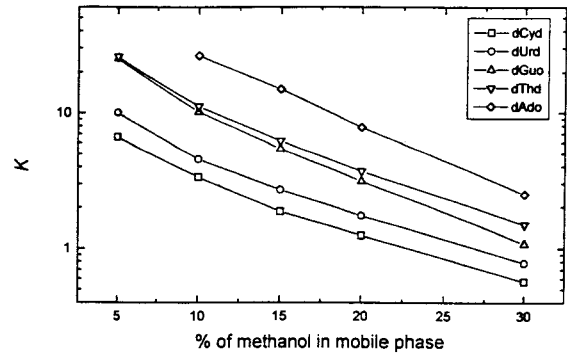


Fig. 4. Variation of equilibrium constant with methanol contents.

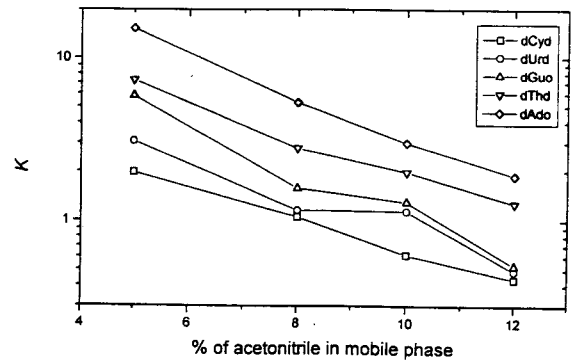


Fig. 5. Variation of equilibrium constant with acetonitrile contents.

Table 1에서는 다섯 가지의 데옥시리보뉴클레오사이드와 두 가지의 이동상의 조성에 따른 각 물질의 체류시간, 용량인자와 모멘트방법에 의해서 계산한 평형상수를 나타낸 것이다. K 는 체류시간 t_R 를 이용하여 식 (5), (8)에 의해 구한 것이고 식 (11)과 식 (12)에 의해서 평형상수는 첫 번째 절대 모멘트에 의해 결정되는 값이므로 용출곡선을 이용하여 구한 평형상수 값이 K_M 이다. 한 물질에 대한 실험 데이터에서 첫 번째 절대 모멘트를 식 (11)에 의해서 구한 후 선속도(u), column의 길이 (L), 고정상의 solid particle 외부의 void fraction(ϵ), solid particle 내부의 void fraction (ϵ_p), solid particle의 밀도(ρ_p), K 를 포함한 식 (12)을 이용하여 크로마토그래피 column에서 각 물질에 대한 K_M 값을 결정할 수 있다 (참조 Table 2).

모멘트 방법으로 구한 평형상수와 단이론을 이용하여 구한 평형상수의 값을 methanol과 acetonitrile의 실험값에 대해서 비교한 것이 Fig. 6과 Fig. 7로서 서로 잘 일치함을 알 수 있다.

두 개의 이성분계(물-methanol, 물-acetonitrile)를 사용하여 다섯 가지 데옥시리보뉴클레오사이드에 대한 평형상수를 각각 모멘트방법, 단이론에 의한 방법, 용량인자를 이용한 방법으로 구하고 이 값을 서로 비교한 것이 Fig. 8이고, 세 방법으로 구한 평형상수가 비교적 잘 일치하고 있다.

Table 1. Equilibrium Constants from Capacity Factor and Moment Method

parameters material	mobile phase (v/v)		t_R	K	K_M^*
	water	methanol			
dCyd	85	15	4.35	1.86	1.67
	80	20	3.80	1.25	1.38
dUrd	85	15	5.11	2.71	2.29
	80	20	4.24	1.74	1.66
dGuo	85	15	7.54	5.43	4.50
	80	20	5.50	3.14	2.91
dThd	85	15	8.23	6.20	5.41
	80	20	6.01	3.71	3.94
dAdo	85	15	16.12	15.01	13.15
	80	20	9.68	7.82	7.12

* : K_M = equilibrium constant from the first absolute moment

Table 2. Values of Parameters Used in the Calculations

parameters	values
ϵ	0.4
ϵ_p	0.35
ρ_p	1.2 g/cm ³
z	30 cm
u	1.0 ml/min

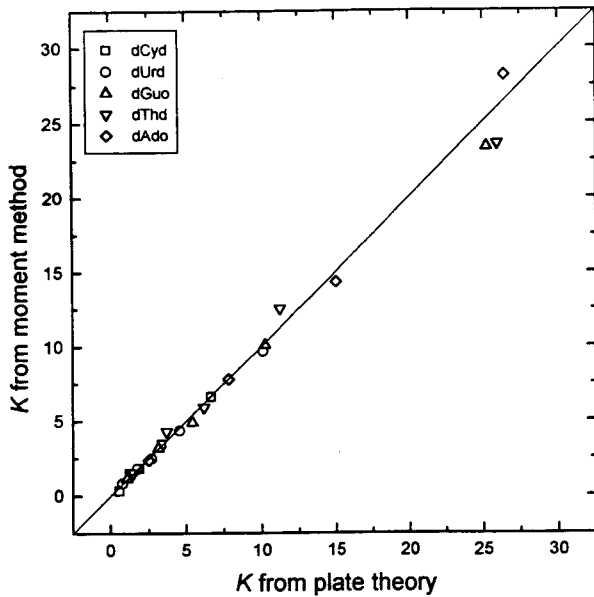


Fig. 6. Comparison of equilibrium constants by the plate theory and the moment method (organic modifier : methanol).

5. 결 론

크로마토그래피를 이용한 물질의 분리에서 물질을 분리하는데 영향을 끼치는 가장 중요한 인자는 각 물질의 평형상수이다. 각 물질의 평형상수가 다르면, 이 평형상수의 차에 의해서 물질의 체류시간이 달라지기 때문에 물질이 분리되는 것이다. 평형상수는 이동상의 조성에 의한 극성으로 인해서 변한다. 이동상의 조성을 변화시켜 최적의 분리조건을 찾는 것이 크로마토그래피를 이용한 물질의 분리공정에서의 가장 중요한 과정이 된다. 수학적 모델은 이러한 과정을 최소한으로 줄일 수 있으며 본 연구에서 사용한 단이론은 단순하면서 물질의 용출곡선을 비교적 정확하게 예측하였다. 또한 단이론의 장점은 몇 번의 실험으로 평형상수를 구하고 특정 column에 대한 매개변수를 알 수 있다. 중요한 점은 구배

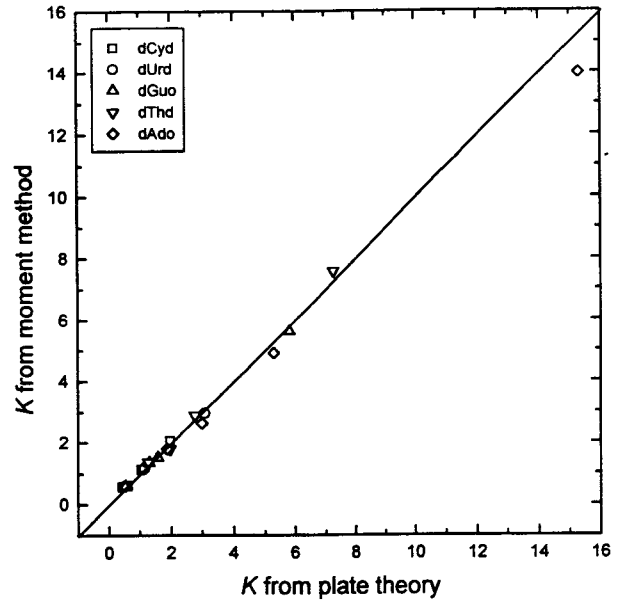


Fig. 7. Comparison of equilibrium constants by the plate theory and the moment method (organic modifier : acetonitrile).

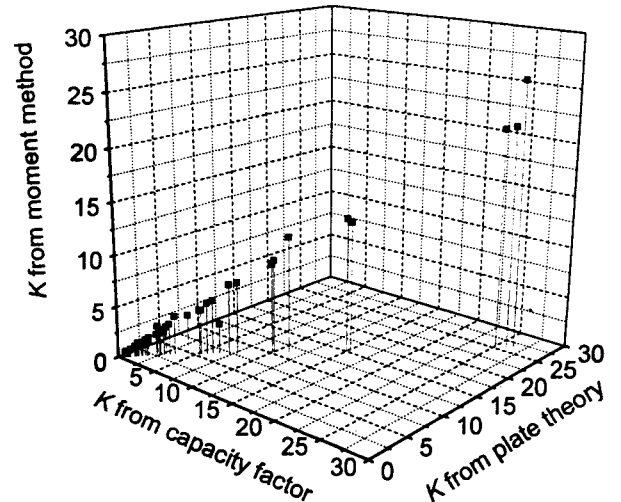


Fig. 8. Comparisons of the equilibrium constants.

배용출(gradient elution)의 과정에서의 평형상수를 알 수 있다면 이에 대한 용출곡선도 알 수 있다. 이 방법을 이용한 결과는 다음에 발표될 예정이다.

크로마토그래피 분리에서 중요한 평형상수를 구하기 위해서 단이론에 의한 방법, 모멘트에 의한 방법, 용량 인자를 이용하는 방법을 사용한 결과, 각기 방법에 의한 테옥시리보뉴클레오사이드의 평형상수는 서로 유사하였다. 간단한 수식을 사용하는 단이론에 의한 방법은 나머지 두 방법이 사용되는 변수들의 값을 가정해야 하는

어려움 때문에 비교적 쉽게 적용할 수 있다.

감 사

본 연구는 한국과학재단에서 지원한 핵심연구과제(과제번호 971-1107-048-2)의 1차년도 결과입니다.

참 고 문 헌

1. C. W. Gehrke, K. C. Kuo, and R. W. Zumwalt, *J. Chromatogr.*, **188**, 129 (1980).
2. 노경호, 최대기, 황경엽, 이운용, *화학공업과 기술*, **8**, 425 (1990).
3. A. S. Said, "Theory and Mathematics of Chromatography", Dr. Alfred Huthig Verlag GmbH Heidelberg, 117 (1981).
4. 노경호, A. V. Larin, *Korean J. Chem. Eng.*, **12**, 442 (1995).
5. 노경호, A. V. Larin, *Korean J. Chem. Eng.*, **12**, 512 (1995).
6. A. Leo, C. Hansch, and D. Elkins, *Chem. Rev.*, **71**, 525 (1971).
7. T. Fujita, J. Iwasa, and C. Hansch, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 5175 (1964).
8. G. G. Nys and R. F. Rekker, *Eur. J. Med. Chem.*, **9**, 361 (1974).
9. R. Collander, *Acta Chem. Scand.*, **5**, 774 (1951).
10. Motoyuki Suzuki, "Adsorption Engineering", Elsevier, 125 (1990).
11. Snyder, L. R. and Quarry, M. A., *J. Liquid Chromatogr.*, **10**, 1789 (1987).
12. S. D. Nogare and R. S. Juvet, "Gas-Liquid Chromatography : Theory and Practice", 4th. ed., John Wiley & Sons, New York, 135 (1966).
13. A. S. Said, *A.I. Ch. E. J.*, **2**, 477 (1956).