

中药分析技术与应用丛书 ● 总主编 杨秀伟 赵陆华

HONGYAO QIXIANG SEPU FENXI JISHU YU YINGYONG

中药气相色谱

分析技术与应用

主编 杨秀伟 王旗

▶▶ 由权威专家组织编写, **中药领域第一套**成系统的分析技术与应用丛书。在已有技术方法的基础上**本土化创新**, 为广大从事中药物质基础研究及质量控制规范化研究的读者提供**新的视点、新的观念**。



中国医药科技出版社

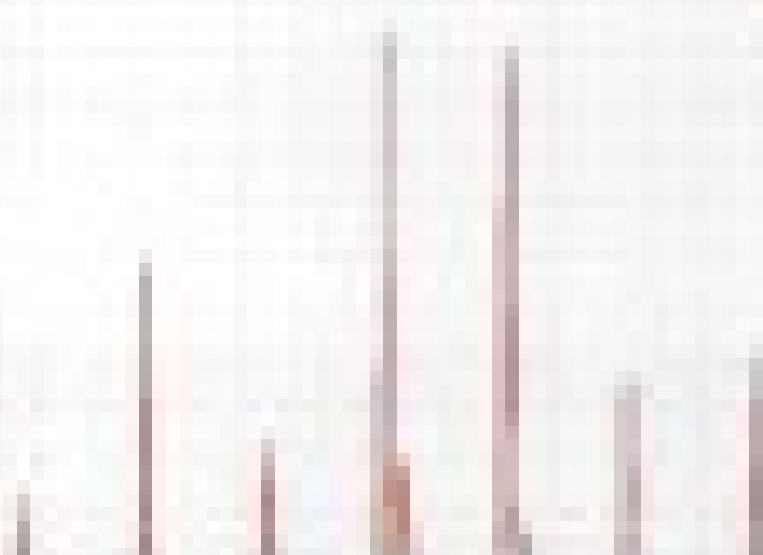
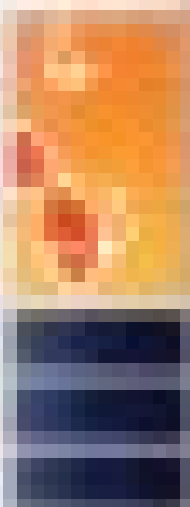
Z

中国药典2015年版
《中药气相色谱分析技术》
《中药气相色谱分析技术》

中药气相色谱 分析技术与应用

主编 张永华 副主编 王 强

本书以《中国药典》2015年版为蓝本，结合气相色谱分析技术，系统介绍了中药气相色谱分析的基本原理、仪器组成、操作程序、方法验证、质量控制、应用案例等内容。全书共分10章，第一章为气相色谱分析的基本原理，第二章为气相色谱仪的组成与操作，第三章为气相色谱分析的方法验证，第四章为气相色谱分析的质量控制，第五章为气相色谱分析的应用案例，第六章为气相色谱分析在中药质量控制中的应用，第七章为气相色谱分析在中药新药研发中的应用，第八章为气相色谱分析在中药炮制中的应用，第九章为气相色谱分析在中药制剂中的应用，第十章为气相色谱分析在中药资源中的应用。



中国医药出版社·北京

中药分析技术与应用丛书

中药气相色谱分析 技术与应用

主 编 杨秀伟 王 旗

中国医药科技出版社

内 容 提 要

本书是“中药分析技术与应用丛书”之一,系统地叙述了气相色谱和气相色谱-质谱联用的基本理论、基本操作、定性和定量分离分析方法以及常见问题的解决方法。介绍了气相色谱和气相色谱-质谱联用技术在中药分离分析上的应用。在科研和查阅大量资料的基础上,对气相色谱和气相色谱-质谱联用技术在中药分离分析上的应用进行了归纳总结,为中药物质基础分析色谱条件的选择提供了便利的条件。本书集理论和应用为一体,内容丰富、文图翔实、科学性强,可供活跃在中药研究与新药开发方面的科研工作者参考。

图书在版编目(CIP)数据

中药气相色谱分析技术与应用/杨秀伟,王旗主编. —北京:中国医药科技出版社,2011.8

(中药分析技术与应用丛书/杨秀伟,赵陆华总主编)

ISBN 978-7-5067-4946-6

I. ①中… II. ①杨… ②王… III. ①中药化学成分—气相色谱—相分析 IV. R284.1

中国版本图书馆CIP数据核字(2011)第036421号

美术编辑 陈君杞

版式设计 郭小平

出版 中国医药科技出版社

地址 北京市海淀区文慧园北路甲22号

邮编 100082

电话 发行:010-62227427 邮购:010-62236938

网址 www.cmstp.com

规格 787×1092mm $\frac{1}{16}$

印张 26

字数 554千字

彩插 14

版次 2011年8月第1版

印次 2011年8月第1次印刷

印刷 三河市华新科达彩色印务有限公司

经销 全国各地新华书店

书号 ISBN 978-7-5067-4946-6

定价 98.00元

本社图书如存在印装质量问题请与本社联系调换

丛书编委会

◎ 顾问

于德泉 肖培根 陈凯先 胡之璧

◎ 总主编

杨秀伟 赵陆华

◎ 副主编 (以姓氏笔画为序)

王广基 孔令义 毕开顺 杜力军

严拯宇 吴春福 陆建伟 陈常青

罗国安 季一兵 屈凌波 相秉仁

钟国跃 黄璐琦 蔡少青

本书编委会

◎ 主编 杨秀伟 王 旗

◎ 编者 (以姓氏笔画为序)

王亚君 王 迎 王丽霞

王 旗 李珂珂 杨秀伟

杨鑫宝 张 鹏 徐 菟

高 昕 郭巧生 郭庆梅

陶海燕 韩美华 滕 杰

前 言

中药是中华民族在与疾病长期斗争过程中积累的宝贵财富，其有效的实践和丰富的知识中蕴含着深厚的科学内涵，是中华民族优秀传统文化的重要组成部分之一，为中华民族的繁衍昌盛和人类健康做出了突出贡献。在继承发扬中药优势特色的基础上，充分利用现代科学技术方法和手段，不断推动中药现代化和国际化进程，以满足时代发展和民众日益增长的医疗保健和用药安全需求。

中药具有基源多样性、生态环境多样性、化学物质结构多样性、生物活性多样性、配伍应用多样性、临床应用多样性等特点，成就了中药是多组分、非线性、多元化、多环节发挥效应的复杂体系。无论认为中药是一种文化还是认为中药是一种实践活动，皆存在物质基础。中医的“辨证论治”植根于人体的高级活动物质，“理法方药”植根于中药中存在的作用物质。“辨证论治”和“理法方药”的和谐统一，是中药对疾病的预防、治疗和康复起作用的基础。中药中化学物质结构的多样性，决定了物质基础研究方法的多样性，决定了中药材在规范化种植/养殖、道地中药材质量评价、优良品种培育、最佳采收期、饮片炮制和煎煮、中成药生产工艺优化、剂型选择、中成药等质量研究上用一种定性、定量技术方法难以满足质量标准制定的要求；同时，中药的质量标准亦要求相应的配套生产设备技术能够响应中药质量标准。因此，中药质量控制的技术方法显得尤其重要，是中药系统工程研究中的核心内容之一。近年来，随着科学技术水平的飞速发展，带动了各种仪器设备功能的完善、更新换代和新型仪器设备的研制，针对于不同化学物质结构特点而设计的各种检测设备、分析和数据处理程序、试剂等的不断出现，给中药质量控制技术方法的选择提供了硬件和软件条件。考虑中药质量控制或评价定性、定量技术方法的可操作性和适用性，推出《中药分析技术与应用丛书》，包括《中药薄层色谱分析技术与应用》、《中药高效液相色谱分析技术与应用》、《中药毛细管电泳分析技术与应用》、《中药气相色谱分析技术与应用》、《中药结构的核磁共振波谱分析技术与应用》和《中药液相色谱-质谱联用分析技术与应用》等，以期能带给广大读者和从事中药物质基础研究、质量控制规范化研究的科研人员新的视点、新的观念、新的技术方法，在已有技术方法的基础上本土化创新，以推动中药物质基础和质量标准研究发展，提高中药产品和产业技术水平。

当然，中药物质基础研究和质量控制技术还处于探索阶段，本套丛书亦存在挂一漏万之处，敬请广大读者评论并提出宝贵意见，使其伴随中药科技的发展不断完善。

丛书编委会

2011年1月

编写说明

伴随科学技术的飞速发展，越来越多的高新技术运用到中药成分的提取、分离、定性和定量分析等研究上。这些高新技术对于指导中药新药材的发现和中药材的规范化种植/养殖、中药制剂质量的在线检测等以提高其质量、减少服用剂量、提高生产效率、降低环境污染等方面起到积极的推动作用。可以预见，高新技术在中药领域的广泛运用必将极大地推动中药现代化的进程。

高新技术在中药领域中应用比较多、且普及的是分离分析技术。分离方法的问世，可以追溯到中世纪炼丹术的出现；复杂多组分混合物的分离，则始于1903年色谱问世之后。分离分析是从分析的角度将一个欲分析样品中的组分分离出来，随后或在分离的同时对单个组成进行定性和定量分析。气相色谱和质谱皆为气相分离分析技术，两者联用最为成功和成熟，其分离度和分析速度迄今依然是其他联用技术难以达到的。适合于用气相色谱分离的样品，用质谱作为检测器，可提高分析方法的灵敏度、专属性和通用性，利用庞大的标准质谱库可获得化合物的结构信息等，是定性和定量分析的优良工具，极大满足了中药复杂多成分同时定性和定量分析的需求。

本书第一章至第五章重点介绍了气相色谱和气相色谱-质谱联用（GC-MS）的基础知识；第六章和第七章普及性地介绍了方法学研究和经常遇到的问题以及解决方法；第八章和第九章重点介绍了气相色谱和气相色谱-质谱联用技术在中药材物质基础研究、兴奋剂和农药残留等检测上的应用；第十章介绍了GC-MS分析新进展。全书主要为著者们的科研成果，附录收录了3000余篇单味中药的气相色谱和气相色谱-质谱联用分析的研究论文，为中药物质基础分析色谱条件的选择提供了便利的条件和参考。本书集理论和应用为一体。

本书内容丰富、文图翔实、科学性强，可供活跃在中药研究与新药开发的科研工作者参考。由于著者们水平有限和时间仓促，错误和疏漏之处在所难免，敬请同仁、专家及读者指正。

杨秀伟

2011年2月

目 录

第一章 绪论	(1)
第一节 分离方法的分类	(1)
第二节 色谱方法的分类	(2)
第三节 色谱法的特点和应用	(2)
一、特点	(2)
二、色谱法的应用	(3)
第四节 气相色谱法的优点及与其他色谱法的区别	(3)
一、优点	(3)
二、与其他色谱法的区别	(4)
三、局限性	(4)
第二章 气相色谱基础	(5)
第一节 气相色谱基本原理	(5)
一、分析过程	(5)
二、基本原理	(5)
第二节 气相色谱基本概念	(7)
一、有关色谱柱的术语/概念	(7)
二、有关色谱图的术语/概念	(8)
三、有关保留值的术语/概念	(8)
四、有关分离参数的术语/概念	(9)
第三节 气相色谱分类	(9)
一、按色谱柱分类	(9)
二、按两相所处的物态分类	(10)
三、按分离机制分类	(10)
四、按进样方式分类	(11)
第三章 气相色谱仪器	(12)
第一节 气相色谱仪的基本构造	(12)
一、气路系统	(12)
二、进样系统	(13)
三、分离系统	(13)

四、控制温度系统	(13)
五、检测和放大记录系统	(13)
第二节 色谱柱	(13)
一、色谱柱	(14)
第三节 固定液和担体	(16)
一、固定液	(17)
二、担体(载体)	(18)
三、实用技术	(18)
第四节 检测器	(19)
一、检测器类型	(19)
二、对检测器性能指标的要求	(22)
三、实用技术	(23)
第四章 顶空气相色谱	(24)
第一节 基本原理和分类	(24)
一、基本原理	(24)
二、分类和特点	(24)
第二节 影响顶空色谱分析的因素	(27)
一、样品的性质	(27)
二、样品量	(27)
三、平衡温度	(28)
四、平衡时间	(28)
五、与样品瓶有关的因素	(29)
第三节 实用技术	(29)
一、消除或减少基质效应的方法	(30)
二、应用实例	(30)
第五章 气相色谱-质谱联用	(32)
第一节 GC-MS 联用仪的组成	(32)
第二节 GC-MS 联用仪的工作原理	(33)
一、工作原理	(33)
二、优点	(34)
第三节 GC-MS 联用仪主要性能指标	(35)
第四节 GC-MS 联用仪的操作步骤	(36)
第六章 方法学研究	(38)
第一节 分离条件和样品预处理	(38)
一、分离条件的选择	(38)

二、样品的特殊处理	(38)
第二节 定性分析	(38)
利用保留时间值的定性分析法	(39)
第三节 定量分析	(39)
一、定量方法	(39)
二、研究实例	(40)
第七章 常见问题及解决	(45)
一、使用填充柱掌握不好和安装时易出错	(45)
二、火点不燃	(45)
三、仪器灵敏度达不到要求	(46)
四、如何选择合适的密封垫	(46)
五、如何判断进样口密封垫是否该换和如何更换	(46)
六、进样时应注意的问题	(46)
七、如何防止进样针不弯	(46)
八、检测时不出峰或峰形不好时的解决办法	(46)
九、出现标定峰丢失及其解决方法	(47)
十、前沿峰出现的原因及其解决办法	(47)
十一、拖尾峰出现的原因及其解决办法	(47)
十二、只有溶剂峰的原因及其解决办法	(48)
十三、宽溶剂峰的原因及其解决办法	(48)
十四、出现假峰的原因及其解决办法	(48)
十五、出现基线不规则或不稳定的原因及其解决办法	(48)
十六、以往工作良好的色谱柱出现未分辨峰	(49)
十七、分离度下降的解决方法	(49)
十八、BPX70 毛细管柱是否可用于 GC-MS 分析	(49)
十九、如何减少色谱柱中的纵向扩散	(50)
二十、色谱分离条件选择的指标	(50)
二十一、分析样品的分析	(50)
二十二、GC 初始操作条件的确定	(51)
二十三、色谱柱柱长的选择	(52)
二十四、填充柱柱管的选择和处理	(52)
二十五、柱温的选择	(52)
二十六、气化室温度的选择	(52)
二十七、如何选择程序升温操作条件	(53)
二十八、对气体纯度选择的一般原则	(53)
二十九、不同检测器对使用气体纯度的要求	(53)
三十、怎样纯化 GC 用气体	(53)

三十一、热导检测器的工作原理	(54)
三十二、影响热导检测器灵敏度的因素	(54)
三十三、常用的 GC 进样方式	(54)
三十四、分流/不分流进样	(54)
三十五、毛细管色谱时非线性分流的主要原因	(55)
三十六、GC 法定量的依据	(55)
三十七、测量峰面积的方法	(55)
三十八、常用的定量方法和注意事项	(55)
三十九、使用校正因子进行定量计算时的注意事项	(56)
四十、利用保留值定性	(56)
第八章 GC 和 GC - MS 在中药分析中的应用	(57)
第一节 在中药分析中的应用	(57)
一、概述	(57)
二、检测分析方法	(57)
三、中药材的前处理技术	(57)
四、GC - MS 分析实例	(65)
第二节 在毒品和兴奋剂分析中的应用	(188)
第三节 在中药农药残留分析中的应用	(190)
一、概述	(190)
二、农药残留检测分析方法	(191)
三、分析实例	(195)
第四节 在糖和苷分析中的应用	(213)
一、糖的三甲基硅醚衍生物的制备	(214)
二、糖腈乙酸酯衍生物的制备	(214)
三、三氟乙酸酯衍生物的制备	(215)
四、单糖酰化衍生物的 GC - MS 联机分析	(215)
第九章 中药的 GC 和 GC - MS 指纹图谱研究	(220)
第一节 中药指纹图谱研究概况	(220)
一、中药质量评价与中药指纹图谱	(220)
二、中药指纹图谱的特点和建立方法	(221)
三、中药色谱指纹图谱结果的评价	(222)
第二节 中药气相色谱指纹图谱技术标准及试验规程	(223)
一、中药注射剂指纹图谱研究的技术要求(暂行) ^[18]	(223)
二、气相色谱指纹图谱试验操作规程 ^[19]	(229)
三、中药注射剂色谱指纹图谱实验研究技术指南(试行) ^[20]	(231)
第三节 中药色谱指纹图谱“计算机辅助相似度评价系统”软件	(240)

一、安装	(240)
二、MATLAB 设置	(241)
三、运行	(242)
四、预处理	(242)
五、查看	(246)
六、指纹谱图模式分析	(246)
七、谱峰识别	(248)
八、谱峰匹配	(250)
九、共有模式	(250)
十、计算权重	(250)
十一、相似度计算	(251)
十二、加权指纹谱图的相似度	(252)
第四节 气相色谱指纹图谱在中药质量控制中的应用	(253)
一、考察不同产地药材质量	(253)
二、评价药材真伪的定性鉴别	(259)
三、考察原药材、中间体和成药的质量一致性	(265)
第十章 GC-MS 分析新进展	(280)
第一节 全二维气相色谱的原理、仪器和数据处理	(280)
一、原理	(280)
二、仪器	(283)
三、全二维气相色谱检测器	(284)
四、分辨率和灵敏度	(285)
第二节 全二维气相色谱的应用	(285)
一、定性和定量分析	(285)
二、应用实例	(286)
附录 单味中药 GC 和 GC-MS 分析论文	(309)

第一章 绪 论

伴随科学技术的飞速发展,越来越多的高新技术运用到中药有效成分的提取、分离、定性和定量分析等研究上。这些高新技术对于指导中药新药材的发现,中药材的规范化种植/养殖,中药制剂质量的在线检测等以提高其质量、减少服用剂量、提高生产效率、降低环境污染等方面起到积极的推动作用。可以预见,高新技术在中药领域的广泛运用必将极大地推动中药现代化的进程。高新技术在中药领域中应用比较多、且普及的是分离技术。分离方法的问世,可以追溯到中世纪炼丹术的出现;复杂多组分混合物的分离,则始于1903年色谱^[1,2]问世之后。

第一节 分离方法的分类

分离方法可根据平衡过程、速率过程、推动力、阻力、滞留作用等进行分类。在这些机制中,迁移和平衡是最基本的要素。迁移有化学势能和流两个控制因素,化学势能既控制迁移,亦控制平衡状态;流既可以是气体流,亦可以是液体流或超临界流体流。由于化学势能和流的作用形成了分离过程,因此,分离方法可以分为九类^[3]:静态系统(无流系统):①连续的总化学势分布,包括电泳、等电聚焦、等速电泳、速率区域沉降、等密度沉降;②不连续的总化学势分布,包括简单的提取、吸附、结晶、蒸馏、蒸发、升华、离子交换,以及渗析;③混合的总化学势分布,包括电沉积、静电沉积、电解精练、电渗析、平衡沉淀。有流系统中与总化学势梯度平行的流:④连续的总化学势梯度,包括淘析、逆流电泳;⑤不连续的总化学势梯度,包括过滤、超滤、反渗透、加压渗析、区域熔融;⑥混合的总化学势梯度,包括电过滤;有流系统中与总化学势梯度垂直的流:⑦连续的总化学势梯度,包括超层场流分离;⑧不连续的总化学势梯度,包括色谱、逆流分配、分馏、泡沫分馏、多级两相过程;⑨混合的总化学势梯度,包括场流分离、热重力分离、电倾析。

分离方法本身又分为分离分析和分离制备。在上述九类中,色谱方法伴随科学技术的发展衍生出几十种方法。

我们日常工作中常见的分离多是根据物理状态不同而进行分离。如过滤时液体通过滤纸,而未溶解的固体物质则留在滤纸上。当然,滤液中可能会有部分已溶解的固体物质,而滤纸上的固体也会夹带一些液体,分离效率达不到1。我们常用萃取来分离溶解性不同的物质,用离心来分离密度不同的物质。还有利用沸点、分子尺寸、极性、带电状态和化学反应性能等物理化学性质分离不同的物质。

第二节 色谱方法的分类

色谱分离技术是借助色谱分离原理而使混合物中各组分分离的技术。将色谱分离技术应用于分析化学,称为色谱分析。简单地说,色谱是由于被分离物质的吸附程度不同,在外加流体的作用引起的滞留作用差异。因此,自1903年Tswett提出色谱之后,许多色谱方法不断被推出。当移动相为气体时,称为气相色谱(gas chromatography, GC);为超临界流体时,称为超临界流体色谱(supercritical fluid chromatography, SFC);为液体时,称为液相色谱(liquid chromatography, LC)。在气相色谱中,如固定相为吸附剂,称为气固色谱;如固定相为液体,称为气液色谱。根据色谱柱的填充方式,又分为填充柱和毛细管柱色谱等等。常见的色谱方法总结在表1-1,所能解决的问题相异。为了达到理想的目的,必须了解各种因素对分离效率的影响和各种方法的潜力及局限性。欲想发挥每种方法的最大功能,必须充分理解色谱的基本原理,才有可能使色谱条件达到最佳状态,得到最优化的结果。

表1-1 色谱方法分类

1. 移动相	气相 液相(正相、反相) 超临界流体	4. 梯度	非梯度 梯度: 梯度洗脱 程序升温 热色谱 程序升流速
2. 滞留机制	吸附 分配 键合相 离子交换 凝胶色谱 分子大小排阻 憎水	5. 维度	一维 二维 多维
3. 柱或平面	柱(填充、毛细管) 平面(薄层色谱、纸色谱)	6. 物理尺度	微口径、小口径标准

第三节 色谱法的特点和应用

色谱方法较多,各有其特点,决定了其应用广泛,覆盖面较广。

一、特点

(一) 高选择性

组分在柱中反复分配平衡次数多;被分析物质性质与固定相性质匹配良好,组分与固定相的相互作用力环境友好,对于理化性质极为相似的组分可以得到良好分离。

(二) 高效能

在短时间内完成诸多物质的定性、定量分析。

(三) 高灵敏度

某些色谱分析可以分析质量分数为 $10^{-6} \sim 10^{-9}$ 数量级、检出限量低至 10^{-11} g 的物质, 适用于微量和痕量分析。甚至使用高灵敏度检测器可以检测出 10^{-13} g 的痕量物质。

二、色谱法的应用

(1) 色谱法广泛应用于极为复杂的混合物成分分析。

(2) 液相色谱法在大、小分子有机化合物, 贵金属、有机金属化合物等的分析上得到了广泛的应用。

(3) 色谱分离是一种非常有效的提纯物质的技术, 常用于制备分离, 得到高纯度样品。

(4) 色谱-质谱联用仪已成为研究分子结构的重要手段。

第四节 气相色谱法的优点及与其他色谱法的区别

在色谱分析中, GC 法是开发较早且比较成熟的色谱分析方法之一, 普及性亦较好。

一、优点

与其他色谱方法相比, GC 法有许多优点。由于 GC 法是基于色谱柱能分离样品中各组分、检测器能连续响应、能同时对各组分进行定性定量的一种色谱分离分析方法, 因此, 具有分离效率高、灵敏度高、分析速度快等优点。

(一) 分离效率高

可以选用各种固定相, 且由于柱阻力小, 因而可用细而长的色谱柱, 使分离能力大大提高。由于采用程序升温, 分离效果更好。它对性质极为相似的烃类异构体、同位素等有很强的分离能力, 能分析沸点十分接近的复杂混合物。如近年发展比较快的毛细管柱 GC 法可分析汽油中 50 ~ 100 多个组分; 在中药挥发性成分分析中, 亦显示了其强大的威力。

(二) 灵敏度高

流动相采用化学惰性的气体, 不干扰被分离组分的检出, 因而可采用各种高灵敏、高选择性的检测器。使用高灵敏度检测器可检测出 $10^{-11} \sim 10^{-13} \text{ g}$ 的痕量物质, 在中药、农药残留分析上应用颇多。

(三) 分析速度快

由于气态样品的传质速度快, 组分在气、液两相间很快建立平衡; 而且用气体作流动相时柱内阻力小, 可以用高的载气流速冲洗。相对于化学分析法而言, 沸程较窄的组分在几秒钟内即可完成分析; 一般情况下, 完成一个样品的分析仅需要几分钟, 一般样品在 30min 内完成; 沸程较宽的组分在几小时内可分析完成。新型 GC 仪普遍配有色谱工作站,

能自动给出色谱峰,打印出保留时间和分析结果,分析速度更快,更方便。此外,GC 分析所用样品量少,通常气体样品仅需要 1ml,液体样品仅需要 1 μ l。

二、与其他色谱法的区别

虽然在原理上 GC 法与柱色谱法(如高效液相色谱法、薄层色谱法)类似,但亦有许多明显的不同。

(1) 在 GC 中,混合物的分离在液态的固定相与气态的流动相之间进行。而在柱色谱中,固定相为固态而流动相为液态。

(2) 在 GC 中,使用的柱是放置在一个温度可控的恒温箱中的,而在典型的柱色谱中并无这样的温度控制装置。高效液相色谱法已发展了温度可控的柱温箱。

(3) 在 GC 中,气相中物质的浓度只是气体蒸气压的函数,此与分馏类似。它们都主要利用混合物中各个组分的沸点(或蒸气压)的差异对混合物中的各个组分进行分离。但分馏通常用于常量的混合物的分离,而气相色谱所分离的物质则要少得多(微量分析)。

三、局限性

(1) 由于色谱峰不能直接给出定性的结果,它不能用来直接分析未知物,必须用已知纯物质的色谱图进行对照、比较。

(2) 被分析样品在仪器允许温度的范围内(一般商品仪器设计柱温在 450 $^{\circ}$ C 以下,实用工作温度在 50~350 $^{\circ}$ C)必须能够气化;对于分子量大、挥发性低、不稳定和极性强的组分往往需要制成适当的衍生物;尽管能够气化,但结构不稳定的化合物也不适宜 GC 分析。在 GC-MS 联用分析时,受到质谱质量检测范围的限制。

(3) 热不稳定被分析样品化学结构有可能被破坏。

参考文献

- [1] Ettre L. S., Sakodinskii K. I., M. S. Tswett and the discovery of chromatography I: Early work (1899 - 1903). *Chromatographia*, 1993, 35: 223 - 231.
- [2] Ettre L. S., Sakodinskii K. I., M. S. Tswett and the discovery of chromatography II: Completion of the development of chromatography (1903 - 1910). *Chromatographia*, 1993, 35: 329 - 338.
- [3] Giddings J.C. Unified Separation Science. John Wiley & Sons, Inc., New York, N. Y., 1991: 143, 145.