

Cromatografia Líquida com Interação Hidrofílica (HILIC)

Fernando M. Lanças

*Universidade de São Paulo, Instituto de Química de São Carlos
13560-970 São Carlos (SP)*

Resumo

O termo HILIC foi proposto por Alpert em 1990, como um acrônimo de “*Hydrophilic-Interaction Chromatography*” (em Português, Cromatografia com Interação Hidrofílica, CIH), para a separação de solutos polares. Esta técnica tem sido também denominada “*Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography*” e “Aqueous Normal Phase”. De uma maneira simples, pode-se dizer que a HILIC é uma forma de HPLC bastante similar à Cromatografia Líquida “em fase normal”, utilizando uma coluna com fase estacionária hidrofílica (“normal”), porém empregando um eluente contendo água, tampão e uma concentração elevada de solvente orgânico miscível com água (típico de “fase reversa”). A ordem de eluição obtida em um sistema HILIC será praticamente oposta àquela obtida empregando-se o modo fase reversa (RP). A retenção é diretamente proporcional à polaridade do soluto, e inversamente proporcional à polaridade da fase móvel. Neste trabalho as principais características, mecanismos de separação e aplicações típicas da HILIC serão apresentadas discutidas criticamente.

Palavras-chave

HILIC, Cromatografia com Interação Hidrofílica, solutos polares, mecanismos de separação, fase normal.

Abstract

HILIC, “*Hydrophilic-Interaction Chromatography*”, was first proposed by Alpert in 1990 for the separation of polar solutes. Sometimes this techniques has also been termed “Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography” and “Aqueous Normal Phase”. In a simple way, HILIC might be described as a variant of normal phase HPLC in which a hydrophobic column is used as stationary phase and a solvent mixture containing a high concentration of an organic solvent miscible with water (and sometimes a buffer) is used as mobile phase. In this work the main characteristics, separation mechanisms and applications of HILIC will be presented and critically discussed.

Keywords

HILIC, Hydrophilic-Interaction Chromatography, Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography, Aqueous Normal Phase, separation mechanisms, normal phase.

1 Introdução

A cromatografia líquida foi a primeira modalidade de cromatografia a ser desenvolvida, sendo sua invenção usualmente atribuída a M. Tswett, no início do século XX. Na forma clássica, essa técnica foi desenvolvida empregando-se uma fase sólida – usualmente um óxido inorgânico como a sílica ou alumina – a qual é acondicionada dentro de um tubo, servindo como meio de separação através da retenção relativa de cada composto nesta fase (denominada estacionária). Para remover os compostos retidos seletivamente na fase estacionária, uma das técnicas consiste em percolar um líquido sobre ela (denominada fase móvel), o qual arrastará os compostos para fora do tubo de acordo com a maior ou menor interação que cada um tenha com a fase estacionária. Durante muito tempo, essa forma de cromatografia foi praticamente a única a ser utilizada, sendo denominada de cromatografia líquida pelo fato de a fase móvel ser um líquido. A grande variedade de compostos polares facilmente disponíveis para funcionarem como fase estacionária, em especial óxidos (sílica, alumina, magnésia, titânia e zircônia) e outros (talco, carvão ativo, argilas, etc.) fez com que a modalidade de cromatografia líquida, mais empregada durante décadas, fosse baseada em uma fase estacionária polar (ex.: sílica – óxido de sílica) e uma fase móvel não polar (ex.: hexano) ou contendo pequenas quantidades de solventes mais polares (ex.: hexano/ diclorometano). Nesse período, esse era considerado o modo “normal” de operar a cromatografia líquida. Nos anos 1970, surgiram as denominadas fases quimicamente ligadas (*bonded phases*), as quais possibilitaram o uso de fases estacionárias mais hidrofóbicas e fases móveis baseadas em soluções aquosas, contendo solventes orgânicos miscíveis com água. Esse novo sistema contendo fases estacionárias com grupos apolares ancorados na sílica (octadecilsilano – C18; octilsilano – C8; hexilsilano – C6, e outros) logo se tornou popular na análise de biomoléculas, em alimentos e na análise de pesticidas de última geração. Tal desenvolvimento deu grande impulso à recém desenvolvida cromatografia líquida moderna, instrumental ou simplesmente HPLC. Uma vez que o novo sistema utilizava fases móveis mais polares (acetonitrila-água; metanol-água) do que as fases estacionárias, a ordem de eluição dos compostos era contrária, inversa ou reversa à da cromatografia líquida

“normal”. Assim, foi cunhado o termo *reversed phase* (RP) ou fase reversa para descrever esse tipo de cromatografia líquida no qual a polaridade da fase móvel é maior do que a da fase estacionária.

Além de cromatografia em “fase normal” (NP) e em “fase reversa” (RP), existem dois outros modos de cromatografia líquida: cromatografia de troca-iônica, baseada principalmente em interações eletrostáticas, importantes na análise de compostos iônicos ou altamente polares, e a cromatografia de exclusão por tamanho (SEC).

Enquanto a troca iônica e a exclusão por tamanho possuem nichos próprios e mais seletivos, a cromatografia em fase normal (NP) e em fase reversa (RP) possuem uma faixa mais ampla de aplicações.

A cromatografia em fase reversa tem sido, nos últimos 20 anos, a primeira escolha na análise de moléculas de interesse biológico (aminoácidos, proteínas, fármacos humanos e veterinários), alimentos (carotenóides, açúcares, lipídeos, vitaminas, etc.) e muitos outros campos de aplicação em que se deseja análises de compostos de baixa ou média polaridade. Entretanto, a retenção de compostos polares nesse modo (RP) geralmente requer grande quantidade de água na fase móvel para se obter alguma retenção dos analitos, o que ocasiona diversos problemas, tais como a diminuição da sensibilidade em LC/MS empregando ionização via *electrospray*, e a ruptura da estrutura da superfície da fase estacionária (*dewetting*).

O uso de troca-iônica e emparelhamento de íons também apresentam limitações na análise de compostos polares. Ambos podem funcionar razoavelmente bem quando os analitos são ionizáveis. Porém, os reagentes empregados no emparelhamento de íons geralmente causam supressão de sinal em espectrometria de massas, diminuindo a sensibilidade. Isso pode afetar a análise quantitativa em métodos bioanalíticos. Portanto, existe um espaço não apropriadamente explorado para a análise de solutos polares, sendo a cromatografia, que envolve interação hidrofílica (HILIC), o modo atualmente mais apropriado para preencher tal lacuna (Figura 1).

2 O que significa HILIC?

O termo HILIC foi proposto por Alpert em

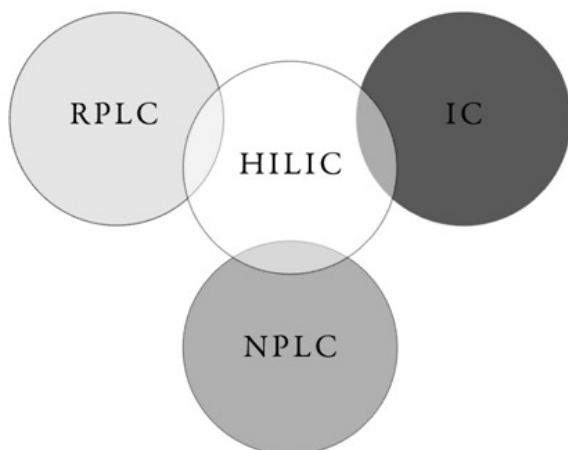


Figura 1 Relacionamento da HILIC com as demais formas de Cromatografia Líquida. RPLC = Cromatografia Líquida em Fase Reversa; NPLC = Cromatografia Líquida em Fase Normal; IC = Cromatografia de Troca Iônica.

1990 como um acrônimo de *Hydrophilic-Interaction Chromatography* (1), ou seja, cromatografia com interação hidrofílica.

Essa técnica tem sido também denominada *Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography* e *Aqueous Normal Phase*. De uma maneira simples, pode-se dizer que HILIC é uma forma de HPLC que utiliza uma separação do tipo fase normal, especialmente a fase estacionária, porém com elementos de fase reversa – em especial a fase móvel. Assim, utiliza uma coluna com fase estacionária hidrofílica (“normal”) e um eluente contendo água, tampão e uma concentração elevada de solvente orgânico miscível com água. A ordem de eluição em um sistema HILIC será praticamente o contrário de um que opera em modo reverso. A retenção é proporcional à polaridade do soluto e inversamente proporcional à polaridade da fase móvel (1).

O uso do modo HILIC vem crescendo bastante nos últimos anos, especialmente com o desenvolvimento de colunas mais estáveis e apropriadas para uso neste modo. A Figura 2 ilustra tal crescimento.

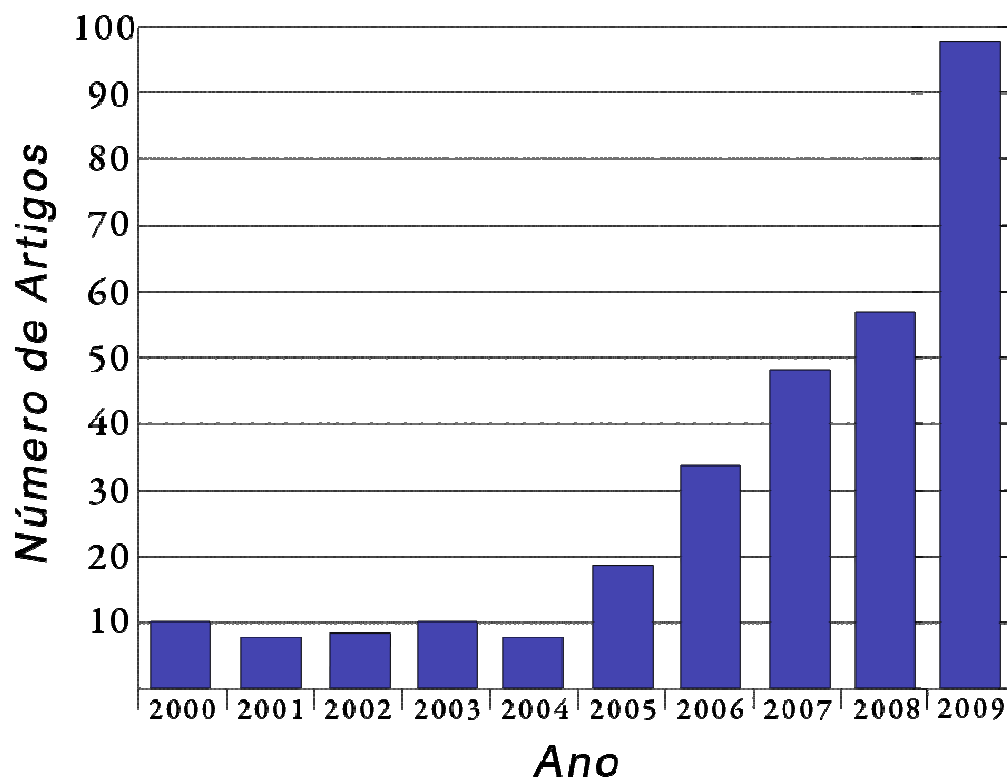


Figura 2 Aumento progressivo do número de publicações envolvendo a técnica HILIC na última década, de acordo com o ISI/Web of Science.

3 Mecanismos de separação em HILIC

No trabalho original sobre o assunto, Alpert (1) propõe a formação de uma camada rica em água na superfície polar da fase estacionária em contraposição a uma fase móvel deficiente em água, criando um sistema de extração líquido-líquido no qual a separação HILIC seria baseada (Figura 3).

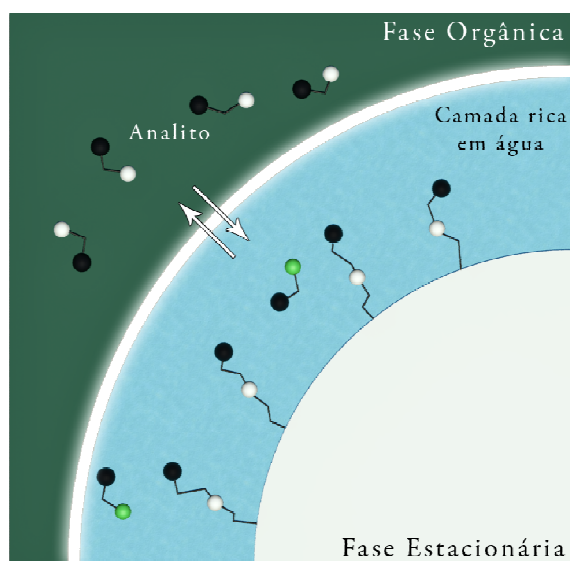


Figura 3 Modelo ilustrando a partição dos solutos da amostra entre a fase móvel (orgânica) e a camada aquosa sobre a superfície da fase estacionária. Observa-se também a ocorrência de outros tipos de interação entre os solutos presentes na camada aquosa e a superfície polar da fase estacionária (geralmente interações eletrostáticas fracas ou ligações de hidrogênio).

Mais recentemente, vários autores têm discutido a contribuição de mecanismos eletrostáticos fracos, assim como interações por partes de hidrogênio entre moléculas polares neutras em condições de elevado conteúdo de solvente orgânico no eluente.

Uma excelente e completa revisão a respeito dos mecanismos de separação em HILIC foi recentemente publicada por Hemstrom e Irgum (2).

4 Fases estacionárias utilizadas em HILIC

4.1. Sílica

Apesar de o número de fases estacionárias haver crescido muito na última década, grande parte dos artigos publicados recentemente sobre o assunto ainda empregam sílica pura, não derivatizada (3-11). Durante muito tempo, acreditou-se que não era adequado empregar a sílica pura em separações bioanalíticas e outras aplicações nas quais analitos polares deveriam ser separados em matrizes complexas. Essa idéia vinha do fato de que em HPLC convencional no “modo normal”, empregando sílica pura e solventes totalmente orgânicos, a superfície da sílica não era suficientemente blindada pelos aditivos adicionados. No modo HILIC, em que se emprega água na fase móvel, a adição de uma fração significativa de água provoca desativação da superfície o suficiente para se obterem resultados reprodutíveis. Porém, em certos casos, adsorção irreversível com sílica pura tem sido observada devido à natureza polar da superfície (10). Por outro lado, a sílica pura oferece vantagens no modo HILIC sobre as fases quimicamente ligadas, especialmente quando usada em sistemas LC/MS, uma vez que, nesse caso, não existe a possibilidade da ruptura da ligação e eliminação do ligante, com criação de sinais espúrios no espectro de massas.

Ainda que pouco conhecidas dos usuários de cromatografia, existem várias técnicas para o preparo de sílica em escala comercial. As técnicas geram sílicas com diferentes características, especialmente no grau de pureza.

A sílica gel tipo A é a forma mais simples e clássica de preparo de sílica e consiste na precipitação de solução de silicato. Sua superfície possui caráter ácido devido à contaminação com metais que ativam grupos silanóis ($\text{Si} - \text{OH}$) da superfície. Pode formar complexos com alguns solutos e causar retenção muito forte (às vezes, irreversível) e assimetria nos picos.

A sílica gel tipo B é formada pela agregação de sílica sol no ar, é mais pura que a sílica A, contém quantidades muito menores de metais e é mais estável em pH intermediário e mais elevado (pelo menos até 9), produzindo melhores separações, especialmente de compostos que apresentam caráter básico.

A sílica do tipo C possui em sua superfície grupos não polares $\text{Si} - \text{H}$ (hidreto de silício) ao invés dos grupos polares $\text{Si} - \text{OH}$, comuns nos

outros tipos de sílica, o que a torna menos polar. No modo HILIC, pode ser utilizada na separação tanto de compostos de caráter ácido quanto básico. Como o grupo hidreto é menos polar, ele apresenta pouca atração pela água, aumentando a reprodutibilidade da retenção tanto em fases móveis orgânicas (“fase normal”) quanto aquosas (“HILIC”).

A Figura 4 ilustra a superfície da sílica convencional (tipos A e B, nas quais são evidenciados os grupos Si-OH) e da sílica tipo C (na qual são evidenciados os grupos Si-H).

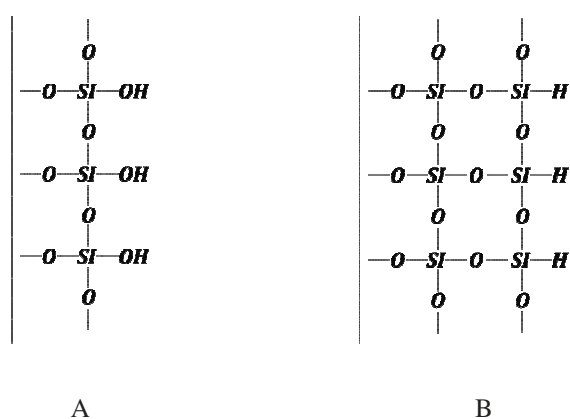


Figura 4 Comparação entre a superfície da sílica convencional (sílica tipos A e B) evidenciando os grupos silanóis (Si-OH), obtidas por processos como aluminossilicatos e sol-gel (esquerda) e a sílica tipo C, com grupos hidreto na superfície.

4.2 Fases quimicamente ligadas

As fases baseadas em grupos Ciano, Diol, Amino e outros grupos quimicamente ligados são geralmente preparadas por meio de modificação química na superfície da sílica gel, de maneira similar às utilizadas no preparo de fases C18 e C8 empregadas em cromatografia líquida em fase reversa (RP-LC).

Uma das primeiras fases quimicamente ligadas a ser utilizada no modo HILIC era constituída de grupos aminopropil quimicamente ligados à sílica. Essas fases requerem tempos longos de equilíbrio quando determinados tampões são empregados. Outro problema com essa fase é que colunas do tipo aminopropil sílica de diferentes

fabricantes apresentam comportamentos diferentes, como demonstrado por Guo e Huang (12) e por Olsen (13). Um cuidado importante com as fases do tipo aminopropil sílica é relativo à sua estabilidade limitada em eluentes aquosos, o que leva à rápida perda de ligante, deteriorando a forma dos picos quando operada no modo HILIC (14-16). Para contornar esse problema, desenvolveram-se empacotamentos contendo grupos amino, porém baseados em polímeros orgânicos ao invés de sílica. Essas novas fases podem ser empregadas em condições ácidas ou básicas no modo HILIC, com maior estabilidade (17).

Várias colunas apresentando grupos amida quimicamente ligados à sílica foram preparadas especialmente para HILIC e são comercializadas por diferentes empresas. Um exemplo envolve as fases baseadas no grupo amida ao invés de amino. Geralmente o grupo amida é ligado à superfície da sílica gel por meio de um pequeno espaçador (grupo alquil); em contraste com os grupos amino, não possui caráter básico, dependendo menos do pH e apresentando menor propensão à adsorção irreversível (18).

Outra fase interessante para HILIC baseia-se no grupo diol quimicamente ligado à sílica. Ela foi uma das primeiras fases quimicamente ligadas a serem desenvolvidas em HPLC (NP) com a intenção de resolver o problema de adsorção na sílica pura. A elevada polaridade e as propriedades apropriadas para formação de pontes de hidrogênio dos dióis, juntamente com a maior estabilidade da ligação à estrutura da sílica, sugerem ser essa uma fase bastante apropriada para ser utilizada no modo HILIC. Mesmo assim, existem poucas aplicações de fases do tipo diol em HILIC até o momento (19,20).

As fases baseadas em cianopropil quimicamente ligadas à sílica foram muito populares no início da HPLC em fase normal. Entretanto, por não apresentarem capacidade de formação de ligações de hidrogênio e, portanto, pouca retenção de compostos polares em fases móveis aquosa-orgânicas, não são muito promissoras em HILIC (21). Outra limitação dessas fases é a instabilidade mecânica na presença de solventes de polaridade intermediária.

4.3 Troca iônica

O emprego de resinas trocadoras de íons para separação de sacarídeos e outros compostos neutros, em condições HILIC, é conhecido há

muito tempo. Apesar de apresentarem na época baixa eficiência e separações lentas, a seletividade dessas colunas motivou seu posterior desenvolvimento.

As colunas de troca iônica atualmente empregadas no modo HILIC são muito mais eficientes. Assim, monossacarídeos, glicóis e glicerol foram separados em resina de troca iônica à base de estireno entrecruzado com divinilbenzeno, usando acetonitrila – água como eluente (22). Mecanismos mistos envolvendo troca catiônica/ troca aniônica/ HILIC em resinas à base de sílica têm sido empregados com sucesso para separação de dipeptídeos (23).

4.4 Fases zwitteriônicas

Recentemente uma nova fase estacionária baseada no caráter zwitteriônico da sulfoalquilbetaina foi desenvolvida para uso em HILIC. Apesar de inicialmente empregada na análise de sais inorgânicos e proteínas, atualmente tem sido utilizada para várias outras aplicações (24-26). Baseia-se em uma fase polimérica grafitizada com cadeias zwitteriônicas de sulfoalquilbetaina de sal interno de 3-sulfopropildimetilalquil amônio como grupo funcional em sílica de poros largos. A presença de um grupo amônio quaternário e um grupo sulfônico na razão 1:1 na mesma cadeia pendente resulta em uma carga líquida próxima de zero na camada ligada. Essa fase adsorve fortemente água em sua superfície, a qual passa a fazer parte da fase estacionária e controlar o mecanismo da retenção por meio de processos de partição.

4.5 Outras fases estacionárias empregadas em HILIC

Vários outros tipos de fase estacionária foram desenvolvidos e estão em uso no modo HILIC.

Colunas capilares monolíticas foram preparadas por polimerização de derivados da fosforilcolina na superfície da sílica gel (27). Colunas capilares monolíticas foram preparadas pela copolimerização de derivados da betaina com etileno dimetaacrilato para a separação de compostos ácidos, básicos e neutros no modo HILIC, usando fases móveis acetonitrila-água com teores de ACN superiores a 60%.

Polímeros polares não iônicos também foram preparados e empregados em HILIC; oligo-

nucleotídeos foram separados em coluna monolítica capilar à base de hidroximetacrilato (28).

A Figura 5 ilustra a estrutura química de algumas fases estacionárias, pertencentes a diferentes classes químicas, comercialmente disponíveis (modificado de *Anal Bioanal Chem.* 2008 May; 391(1): 151–159.).

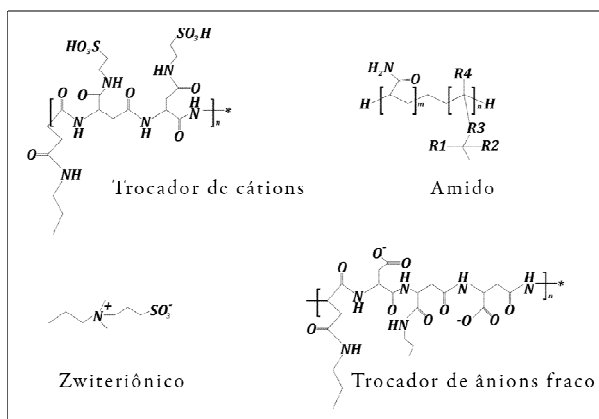


Figura 5 Exemplos de algumas fases estacionárias empregadas no modo HILIC

5 A fase móvel em HILIC

A fase móvel típica empregada para separação de compostos não ionizáveis em HILIC consiste em uma solução contendo acetonitrilo (ACN ou MeCN ou cianeto de metila) e pequena proporção de água. Nesses casos, como na separação de carboidratos, não é necessário o uso de tampões. Em princípio, qualquer solvente aprótico que seja miscível com água (exemplo dioxano e THF) pode ser usado como fase móvel em HILIC. Álcoois também podem ser empregados, mas em concentração maior para se obter boa retenção. Para compostos ionizáveis, a escolha de um tampão adequado é difícil devido à baixa solubilidade dos tampões tradicionalmente usados em fase reversa, tais como fosfato em fases móveis, contendo altas proporções de solventes orgânicos.

Considerando que a estabilidade das colunas baseadas em sílica (ainda as mais empregadas em HILIC) é comprometida com o aumento do pH, é comum empregar-se, nesse modo, aditivos ácidos, principalmente ácido fórmico e ácido acético. Entretanto, em soluções que contêm elevado teor de solvente orgânico, o pH dessas soluções á-

cidas aumenta em função da supressão da ionização, podendo causar distorção na forma dos analitos ionizados. Aditivos iônicos, tais como formato e acetato de amônio, são bastante empregados para controlar o pH da fase móvel e a força iônica do meio e resolver o problema da baixa ionização dos ácidos em meio orgânico. Além disso, esses tampões são voláteis o suficiente para serem compatíveis com seu uso no acoplamento LC/MS.

A HILIC é compatível com o uso de gradiente de eluição. Tipicamente o gradiente é iniciado com pequena quantidade de água e elevada quantidade do solvente orgânico (mais “fraco”), diminuindo-se ao longo do gradiente a quantidade do solvente orgânico e aumentando a de água (solvente “forte”).

6 Aplicações da HILIC

As primeiras aplicações do HILIC foram inicialmente voltadas à análise de carboidratos. A Figura 6 ilustra a separação de oligossacarídeos em uma coluna HILIC contendo grupos alquil alcoóis ligados à superfície da sílica. Atualmente existem aplicações que demonstram o uso da técnica desde pequenas moléculas até proteínas.

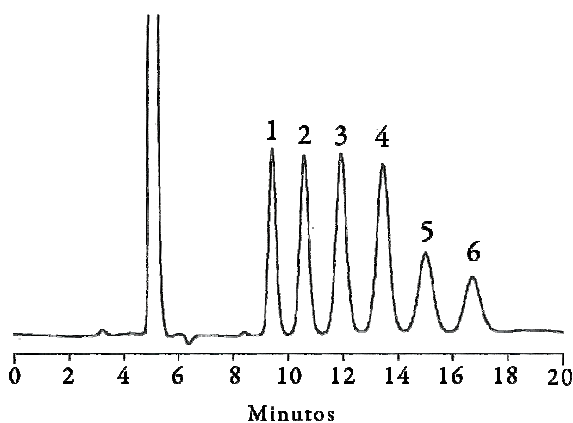


Figura 6 Separação de oligossacarídeos no modo HILIC.

1= maltose; 2= maltotriose; 3= maltotetrose; 4= maltopentose; 5= maltoexose; 6= maltoeptose.

Na análise de pequenas moléculas, especialmente altamente polares, a HILIC destaca-se na análise de compostos de caráter básico, cuja análise

se por fase reversa requer o uso da técnica de emparelhamento de íons. Esse campo de aplicação da HILIC tem crescido muito recentemente, e um grande número de moléculas pequenas, pertencentes a várias funções químicas, tem sido analisadas com sucesso por essa técnica (29-31). Uma vez que muitos fármacos e drogas veterinárias são compostos de elevada polaridade, a HILIC tem sido empregada na análise dessa classe, especialmente quando presentes em baixas concentrações (32,33). Na área de desenvolvimento farmacêutico, a HILIC tem sido bastante utilizada (34-36), inclusive no estudo de fitoterápicos (37).

Moléculas de tamanho intermediário ou maiores, como vários tipos de toxinas (38,39), aminoácidos e peptídeos (40,41), carboidratos (42,43), proteômica (44) e metabolômica (45), também têm sido analisadas com sucesso empregando-se HILIC.

7 ERLIC

Se uma coluna de troca iônica é eluída com uma fase móvel predominantemente orgânica, os solutos podem ser retidos por meio de interações hidrofílicas, mesmo que eles tenham a mesma carga da fase e estacionária. Essa combinação fase estacionária iônica-fase móvel orgânica foi denominada, em 2008, por Alpert, de ERLIC (*Electrostatic Repulsion Hydrophilic Interaction Chromatography*, ou Cromatografia de Interação Hidrofílica com Repulsão Eletrostática) (46). Nessa forma particular de HILIC, a superfície iônica da fase estacionária é utilizada para repelir um grupo polar iônico comum, pertencente a um analito ou a um grupo de analitos, de maneira a facilitar a separação dos demais grupos polares presentes na amostra. Isso permite a separação isocrática de misturas que usualmente requerem o uso de gradiente de eluição, tais como aminoácidos, peptídeos, nucleotídeos, fosfopeptídeos e outras classes de biomoléculas polares (46). Em se tratando de uma técnica ainda bastante recente, avalia-se que novas aplicações da ERLIC surgirão nos próximos anos, demonstrando seu potencial, particularmente na separação de analitos altamente carregados como peptídeos, que são de difícil separação por outras técnicas analíticas.

8 Conclusões

De forma simplificada, a HILIC pode ser vista como uma forma de cromatografia que utiliza fases estacionárias típicas da “fase normal” e eluentes típicos do modo “fase reversa”. O desenvolvimento de novas colunas e novas aplicações tem fortalecido o reconhecimento da HILIC como uma forma própria de HPLC. Apesar de o mecanismo de separação provavelmente não envolver apenas partição como imaginado inicialmente (“HILIC puro”), em amostras reais a separação é multimodal, envolvendo também interações coulômbica ou ligação de hidrogênio. Independente do debate acerca do real mecanismo de separação HILIC, esse modo de cromatografia líquida tem ganho bastante atenção nos últimos anos, e o número de aplicações na análise de compostos polares tem apresentado significativo crescimento, especialmente na área acadêmica. O surgimento do interesse na comercialização de colunas HILIC por praticamente todas as grandes empresas da área é um sintoma de que o investimento nessa área será grande, e por longo tempo. Vale a pena conferir.

Referências Bibliográficas

1. A. J. Alpert, *J Chromatogr.* 499 (1990) 177-196
2. P. Hemstrom, K. Irgum, *J. Sep. Sci.* 2006, 29 1784-1821
3. Eerkes, A., Show, W. Z., Naidong, W., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 31, 917 – 928.
4. Naidong, W., Eerkes, A., *Biomed. Chromatogr.* 2004, 18 28 – 36.
5. Pam, J. W., Song, Q., Shi, H. H., King, M., *Rapid Commum. Mass Spectrum.* 2004, 18, 2549 – 2557.
6. Qi, S., Junga, H., Yong, T., Li, A. C., *J Chromatogr. B*, 2005, 814, 105 – 114
7. Qi, S., Naidong, W., *J. Chromatogr. B* 2006, 830, 135 – 142
8. Li, W. K., Li, Y. H., Francisco, D. T., Naidong, W., *Biomed. Chromatogr.* 2005, 19, 385 – 393
9. Hsieh, Y. S., Chen, J. W., *Rapid Commum. Mass Spectrum.* 2005, 19, 3031 – 3036.
10. Li, R. P., Huang, J. X., *J. Chromatogr. A* 2004, 1041, 163 – 169
11. Huang, J. X., Li, R. P., *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 2005, 28, 2737 – 2751
12. Guo, Y., Huang, A. H., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 31, 1191 – 1201
13. Olsen, B. A., *J. Chromatogr. A* 2001, 913, 113 – 122
14. Wonnacott, D. M., Patton, E. V., *J. Chromatogr.* 1987, 389, 103 – 113
15. Bjorklund, M., Hearn, M. T. W., *J. Chromatogr. A* 1996, 728, 149 – 169
16. Lafosse, M., Herbreteau, B., Dreaux, M., Morimallorym, L., *J. Chromatogr.* 1989, 472, 209 – 218.
17. Person, M., Hazotte, A., Elfakir, C., Lafosse, M., *J. Chromatogr. A* 2005, 1081, 174 - 181
18. Yoshida, T., *Anal. Chem.* 1997, 69, 3088 – 3043
19. Peterson, J., Allikmaa, V., Subbi, J., Pekk, T., Lopp, M., *Evr. Poly. J.*, 2003, 39, 33 – 42
20. Tanaka, H., Zhov, X. J., Masayoshi, O., *J. Chromatogr. A* 2003, 987, 119 – 125
21. West, C., Lesellier, E., *J. Chromatogr. A* 2006, 1110, 200 – 213
22. Samuelson, O., Swenson, B., *Anal. Chim. Acta* 1963, 28, 426 – 432.
23. Strege, M. A., Stevenson, S., Lawrence, S. M., *Anal. Chem.* 2000, 72, 4629 – 4633.
24. Jiang, W., Irgum, K., *Anal. Chem.* 1999, 71, 333 – 344.
25. Viklund, C., Irgum, K., *Macromolecules* 2000, 33, 2539 – 2544.
26. Jiang, W., Fischer, G., Girmay, Y., Irgum, K., *J. Chromatogr. A* 2006, 1127, 82 – 91.
27. Jiang, W., Fischer, G., Girmay, Y., Irgum, K., *J. Chromatogr. A* 2006, 1127, 82 – 91.

28. Holdsvendova, P., Suchankova, J., Buncek, M., Backovska Biochem. Biophys. Methods 2007, 70, 23 -29.
29. Li, W. K., Li, Y. H., Francisco, D. T., Naidong, W., Biomed. Chromatogr. 2005. 19, 385 – 393
30. McKlown, A. P., Everhy, M. R., Lomax, H., Johnson, C. M., J. Sep. Sci. 2001. 24, 835 – 842
31. Appelblad, P., Abrahamson, P., LCGC 2005, September 24 – 25
32. Garbis, S. D., Nelse-Boonstra, A., West, C. E., Van Breemen, R. B., Anal. Chem. 2001, 24, 835 – 842
33. Brown, S. D., White, C. A., Bartlett, M. G., Rapid Commun. Mass Spectrom. 2002, 16, 1871 – 1876
34. Strege, M. A., Anal. Chem. 1998, 70, 2439 – 2445
35. Strege, M. A., Stevenson, S., Lawrence, S. M., Anal.Chem. 2000, 72, 4629 – 4633
36. Idhorg, H., Zamani, L., Edlund, P. O., Schupre-Koistinen, I., Jacobsson, S. P., J. Chromatogr. B 2005, 828, 14 – 20
37. Koh, H. L., Lau, A. J., Chan, E. C. Y., Rapid Commun. Mass Spectrom. 2005, 19, 1237 – 1244
38. Dell’Aversano, C., Hess, P., Quilliam, M. A., J. Chromatogr. A 2005, 1081, 190 – 201
39. Ciminiello, P., Dell’Aversano, C., Fattorusso, E., Forino, M., Toxicon 2006, 47, 174 – 181
40. Yoshida, T., J. Chromatogr. A 1998, 808, 105 – 112
41. Oyler, A. R., Armstrong, B. L., Cha, J. Y., Zhov, M. X., J Chromatogr. A 1996, 724, 378 – 383
42. Montero, C. M., Doderio, M. C. R., Sanchez, D. A. G., Barroso, C. G., Chromatographia 2004, 59, 15 – 30
43. Wang, Q. J., Fang, Y. Z., J. Chromatogr. B 2004, 812, 309 – 324
44. Gilar, M., Olivova, P., Daly, A. E., Gebber, J. C., Anal. Chem. 2005, 77, 6426 – 6434
45. Tolstikov, V. V., Fiehn, O., Anal. Biochem. 2002, 301, 298 – 307
46. Alpert, A.J., Anal. Chem. 2008,80,62-76