نویسندگان
مریم یوسفی[۱و۴*]، فاطمه دیرکوند مقدم[۲و۴]، محمود نادری[۳و۴]
*m.yousefi@avicenna.ac.ir

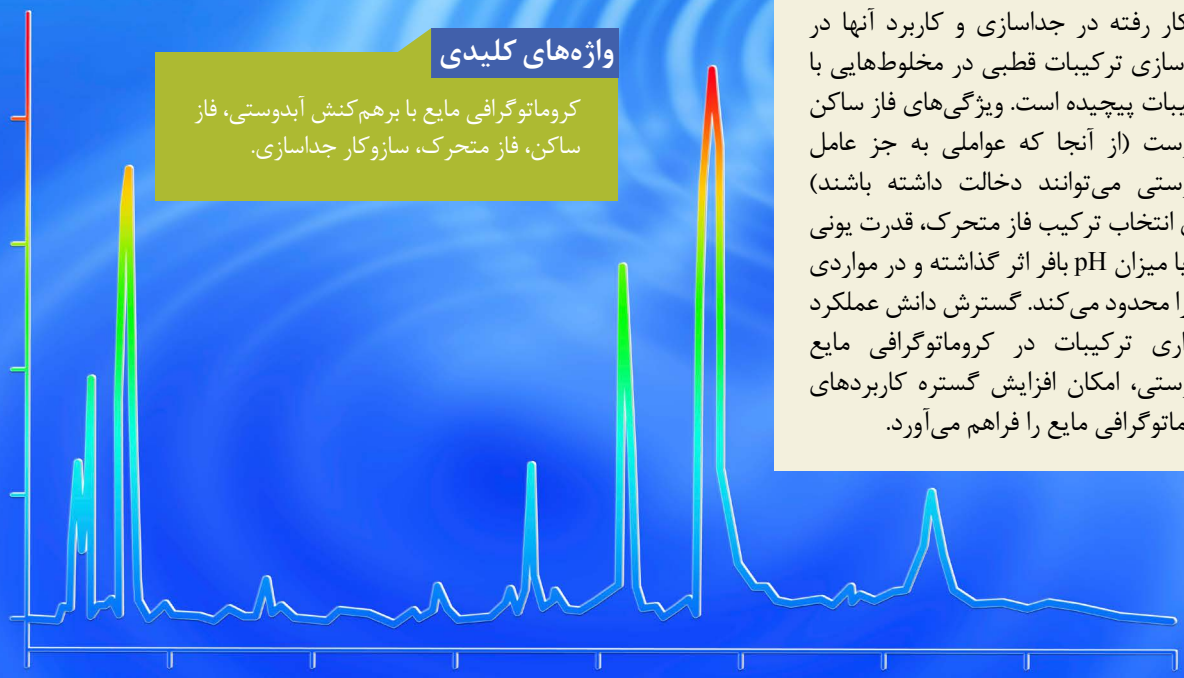
کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی: روشی کارآمد برای جداسازی

چکیده

کروماتوگرافی مایع آبدوستی یکی از روش‌های کارآمد برای جداسازی ترکیبات قطبی کوچک روی فاز ساکن قطبی است. هدف این مقاله، مرور انواع فازهای ساکن به کار رفته در جداسازی و کاربرد آنها در جداسازی ترکیبات قطبی در مخلوط‌هایی با ترکیبات پیچیده است. ویژگی‌های فاز ساکن آبدوست (از آنجا که عواملی به جز عامل آبدوستی می‌توانند دخالت داشته باشند) روی انتخاب ترکیب فاز متحرک، قدرت یونی آن یا میزان pH بافر اثر گذاشته و در مواردی آن را محدود می‌کند. گسترش دانش عملکرد بازداری ترکیبات در کروماتوگرافی مایع آبدوستی، امکان افزایش گستره کاربردهای کروماتوگرافی مایع را فراهم می‌آورد.

واژه‌های کلیدی

کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی، فاز ساکن، فاز متحرک، سازوکار جداسازی.



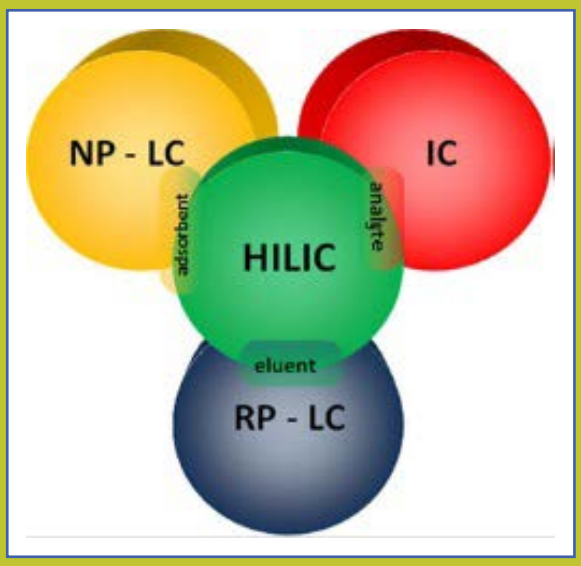
مقدمه

توضیح نظری بازداری آنالیت در کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[۵] موضوع مقالات علمی بسیاری بوده است. سازوکار جداسازی را براساس برهم‌کنش‌های ویژه و غیرویژه به چندین دسته می‌توان تقسیم‌بندی نمود: توزیعی، جذب سطحی، تبادل یونی و اندازه طردی. دو روش کلی کروماتوگرافی فاز نرمال و کروماتوگرافی فاز معکوس را برای جداسازی می‌توان به کار گرفت. در کروماتوگرافی مایع فاز نرمال، فاز ساکن، قطبی‌تر از فاز متحرک است و میزان بازداری با کاهش قطبیت فاز متحرک، افزایش می‌یابد. وضعیتی کاملا متضاد در کروماتوگرافی فاز معکوس دیده می‌شود. کروماتوگرافی فاز نرمال به‌طور گسترده‌ای برای جداسازی طیف وسیعی از ترکیبات از غیرقطبی تا بسیار قطبی کاربرد دارد، اگر چه در گذشته کروماتوگرافی فاز معکوس بسیار متداول بود اما امروزه کروماتوگرافی فاز نرمال دستخوش تغییرات بسیاری گردیده است.

کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی[۶] مانند کروماتوگرافی مایع فاز نرمال[۷] یک روش جداسازی برای ترکیبات

قطبی است، با این تفاوت که جداسازی در روش کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی پیچیده‌تر است. این روش برای نخستین بار توسط آلپرت در سال ۱۹۹۰ معرفی شد [۱] و تعداد مقالات منتشر شده تا سال ۲۰۰۳ رشد قابل ملاحظه‌ای داشت. کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی مزایای بیشتری نسبت به کروماتوگرافی مایع فاز نرمال و فاز معکوس دارد. به‌عنوان مثال، این روش برای ترکیبات موجود در مخلوط‌های پیچیده که در کروماتوگرافی فاز معکوس در معرض شسته شدن هستند، مناسب است. نمونه‌های قطبی همیشه برهم‌کنش خوبی در فاز متحرک آبی در کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی دارند، در حالی که این ترکیبات با مشکل حلالیت ضعیف در کروماتوگرافی فاز نرمال روبرو هستند. در این روش به استفاده از محلول‌های گران قیمت تبادل یونی نیاز نیست و می‌توان آن را به راحتی با طیف‌سنج جرمی به روش یونیزاسیون الکترواسپری همراه کرد. در کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی در مقایسه با کروماتوگرافی فاز معکوس، شویش با حلال آلی با قطبیت کم آغاز شده و به روش گرادیانی شویش آنالیت با افزایش محتوای قطبیت حلال ادامه می‌یابد [۲].

این روش از کروماتوگرافی در واقع به‌منظور جداسازی نمونه‌های قطبی و یونی استفاده می‌شود که از این جهت مشابه کروماتوگرافی یونی است. فاز ساکن ستون در این روش از کروماتوگرافی، مانند کروماتوگرافی نرمال است و همچنین فاز متحرک به کار برده شده در این روش مانند فاز متحرک استفاده شده درکروماتوگرافی فاز معکوس است. شکل (۱) نمایشی از تلفیق این سه روش را به خوبی نشان می‌دهد.



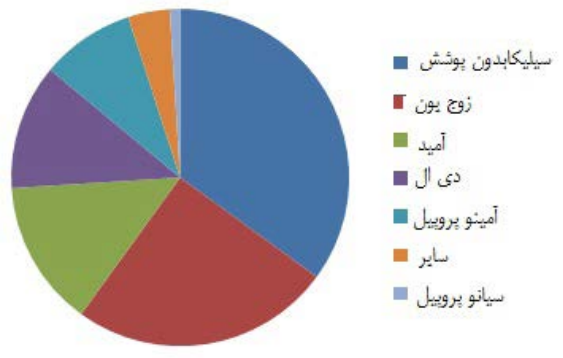
شکل ۱: نموداری از تلفیق روش‌های مختلف در کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی [۳]

HILIC مزایای ویژه‌ای بر کروماتوگرافی فاز نرمال و معکوس متداول دارد. برای نمونه، این روش برای آنالیز ترکیبات در سیستم‌های پیچیده که در کروماتوگرافی فاز معکوس جداسازی نمی‌شوند، کارامد است. نمونه‌های قطبی حلالیت خوبی در حلال‌های آبی دستگاه HILIC دارندکه در این حالت بر حلالیت پایین آنها در حلال‌های فاز نرمال غلبه می‌شود. در دستگاه HILIC به واکنشگرهای زوج یون گران قیمت نیازی نیست و می‌توان سیستم را با دستگاه طیف‌سنج جرمی به ویژه در روش یونیزاسیون الکترواسپری هم جفت نمود. برخلاف کروماتوگرافی فاز معکوس، شستشوی گرادیانی با حلال آلی با قطبیت کم شروع می‌شود و سپس آنالیت‌های قطبی با افزایش میزان آب از ستون خارج می‌شوند [۴]. یک فاز متحرک مطلوب درصد بالایی از حلال آلی دارد تا حساسیت بالاتری فراهم کند و همچنین بازداری مناسبی برای ترکیبات یونی قطبی فراهم آورد. امروزه HILIC به یک روش جداسازی مناسب برای ترکیبات غیربادار به شدت هیدروفیل و ترکیبات آمفی فیلیک که در فاز معکوس بسیار قطبی‌تر از آن هستند که بازداری شوند و بار کافی هم ندارند که در کروماتوگرافی تبادل یونی به روش موثری بازداری شوند، تبدیل شده‌است. HILIC مشکلاتی که پیشتر در زمینه جداسازی اسیدهای آلی کوچک، داروهای بازی و بسیاری دیگر از ترکیبات خنثی یا باردار وجود داشته است را حل کرده است. این روش برای آنالیز کربوهیدرات‌ها، پپتیدها و ترکیبات دارویی تاکنون استفاده شده‌است.

فازهای ساکن در کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی

از هر سطح قطبی می‌توان برای جداسازی با روش کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی استفاده کرد. فاز ساکن معمول در این روش، سیلیکا یا سیلیکای بدون پوشش است که با گروه‌های عاملی قطبی اصلاح شده‌است. اولین نسل از این حالت جداسازی توسط لیندن و همکاران [۵] آغاز شد که جداسازی کربوهیدرات‌ها روی فاز ساکن آمینو - سیلیکا با مخلوطی از استونیتریل و آب با نسبت‌های حجمی ۷۵ به ۲۵ بود.

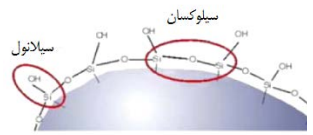
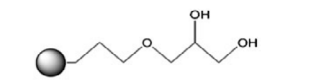
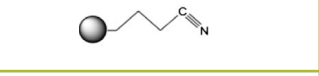
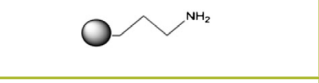
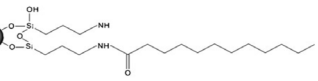
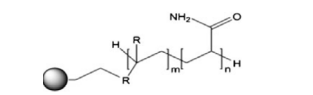
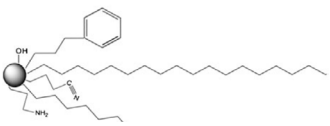
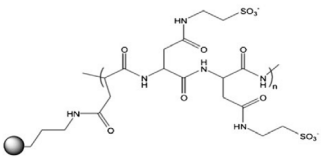
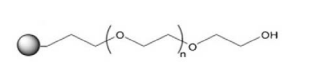
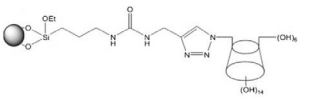
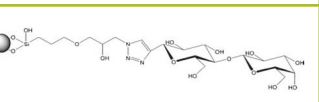
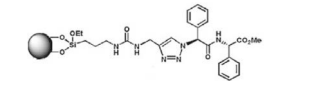
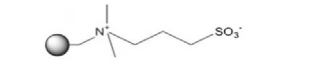
نسل بعدی از جداسازی با استفاده از فاز ساکن با پایه دی ال و آمید – سیلیکا بود. ستون‌های با پایه دی ال - سیلیکا در جداسازی پروتئین‌ها استفاده شده‌اند [۶و۷]. پس از آن سیلیکای متخلخل با قطر ذرات ۲ میکرون وارد بازار شد ولی همچنان سیلیکای بدون پوشش با ۳۵ درصد کاربرد، بالاترین مورد مصرف را داشته است. در شکل (۲) انواع فازهای ساکن براساس درصد کاربرد نشان داده شده‌است.



شکل ۲: انواع فازهای ساکن براساس درصد کاربرد [۸].

در طی پانزده سال گذشته، نسل دوم و سوم فاز ساکن به بازار راه پیدا کرده‌اند که بیشتر این فازهای ساکن فازهای جامد با برهم‌کنش‌های چندگانه و پیچیده هستند. تنوع فازهای ساکن در HILIC بسیار بیشتر از سیستم‌های فاز معکوس است. فازهای ساکن به کار گرفته شده در HILIC را می‌توان به فازهای ساکن قطبی و یونی تقسیم‌بندی نمود. جدول (۱) ساختارهای متفاوت فاز ساکن را که در این روش کروماتوگرافی استفاده می‌شوند، نشان می‌دهد. با این که تعداد و تنوع فازهای ساکن زیاد است اما هنوز فاز ساکنی مانند C۱۸ درHILIC وجود ندارد که به اندازه آن پرکاربرد باشد. فازهای دی الی، آمینو، آمید و سایر فازها با اصلاح شیمیایی سطح سیلیکا ژل مشابه آن چه در فاز معکوس برای C۱۸ انجام می‌شود، تهیه می‌شوند.

جدول ۱: فازهای ساکن در جداسازی به روش HILIC

ماده پر کننده	ساختار فاز ساکن
سیلیکای مشتق‌سازی نشده که دارای گروه‌های عاملی مانند سیلوکسان و سیلانول است به همراه (و یا بدون) مقادیر اندک فلزات	
فاز ساکن دی الی	
فاز ساکن سیانو	
فاز ساکن آمینو	
آلکیل آمید	
فاز ساکن آمید	
فاز مخلوط	
ساختارهای پلیمری مشتقات پلی (سوکسین ایمید)	
پلی اتیلن گلایکول/سیلیکا	
بتا – سیکلودکسترین	
ساکارید (مالتوز)	
دی پپتید	
زوج یون سولفو بتایین	

فازهای متحرک در کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی

فاز متحرک معمولی در این روش، حلال‌های آلی قطبی امتزاج‌پذیر مانند استونیتریل و آب است [۱]. با این حال، حلال‌های غیرپروتون دهنده[۸] مانند تتراهیدروفوران و دی‌اکسان که قابلیت اختلاط با آب را دارند نیز می‌توانند مورد استفاده قرار گیرند. الکل‌ها نیز به‌عنوان فاز متحرک به کار گرفته می‌شوند، اگر چه برای رسیدن به همان درجه بازداری نسبت به مخلوط حلال غیرپروتون دهنده و آب درصد بالاتری از الکل باید استفاده شود. توانایی نسبی حلال‌ها در شویش به‌صورت خلاصه در لیست زیر نشان داده شده‌است:

آب> متانول~ دی‌متیل فرمامید > دی‌اکسان> اتانول> استونیتریل> پروپانول ~ ایزوپروپانول> استون

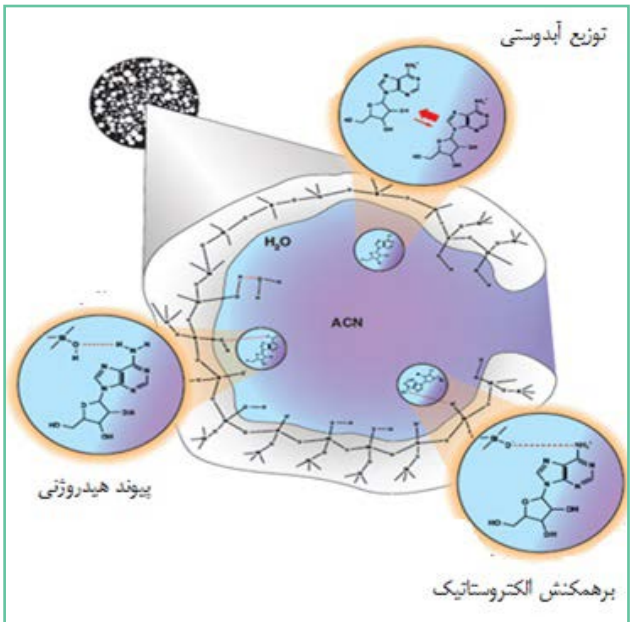
جداسازی در کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی در دو حالت ایزوکراتیک[۹] با درصد بالایی از حلال آلی و یا گرادیان[۱۰] انجام می‌شود که در حالت گرادیان با شویش با درصد بالایی از یک حلال آلی آغاز شده و به تدریج درصد حلال آلی کاهش و به درصد حلال آبی افزوده می‌شود. در پایان شویش نیز درصد بالایی از حلال آبی وارد دستگاه می‌شود [۱]. چنین تصور می‌شود که در کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی فاز متحرک روی سطح فاز ساکن قطبی، یک لایه غنی از آب در برابر یک فاز متحرک با درصد آب کم تشکیل می‌شود. این حالت منجر به ایجاد یک سیستم استخراج مایع/مایع می‌شود و در نتیجه جداسازی با توزیع نمونه بین دو فاز متحرک مایع و فاز ساکن مایع شده، انجام می‌شود [۹].

افزودنی‌های فاز متحرک

افزودنی‌های یونی مانند آمونیوم استات و آمونیوم فرمات به‌طور معمول برای کنترل pH و قدرت یونی فاز متحرک استفاده می‌شوند. در HILIC این افزودنی‌ها در قطبیت آنالیت سهیم شده و منجر به تغییر در بازداری آنالیت می‌شوند. برای آنالیت‌های قابل یونیزه شدن مانند آنتی بیوتیک‌های آمینوگلیکوزیدی، pH را باید به‌گونه‌ای تنظیم نمود که اطمینان حاصل شود تنها یک فرم یونی از آن وجود دارد. هیچ بافری برای جداسازی آنالیت‌های قطبی خنثی مانند کربوهیدرات‌ها لازم نیست. استفاده از سایر نمک‌ها (مانند سدیم پرکلرات ۳۰۰ - ۱۰۰ میلی‌مولار) را می‌توان برای افزایش قطبیت فاز متحرک استفاده نمود [۱۰].

سازوکار کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی

سازوکار کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی می‌تواند مانند روش کروماتوگرافی فاز معکوس شرح داده شود با این تفاوت که فاز ساکن، قطبی است. در این روش فاز متحرک با درصد بالایی از حلال آلی (معمولا بیشتر از ۶۰ درصد استونیتریل) به همراه درصد کمی از حلال آبی (بافر یا دیگر حلال‌های قطبی) است. از مهم‌ترین عوامل دخیل در این نوع کروماتوگرافی می‌توان به برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک ضعیف و پروتون دهندگی بین نمونه‌های قطبی خنثی و فاز متحرک شدیدا آلی اشاره نمود (شکل (۳)). بنابراین، اصل اساسی جداسازی در کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی بر میزان قطبیت نمونه و حلالیت آن بنا نهاده شده‌است. همین امر وجه تمایز آن با کروماتوگرافی یونی است که در آن جداسازی براساس میزان یونیزاسیون نمونه صورت می‌گیرد. بنابراین، نمونه‌های قطبی‌تر بازداری بیشتری روی سطح فاز ساکن غنی شده از آب نسبت به نمونه‌های کمتر قطبی، خواهند داشت. در مقابل، نمونه‌های با قطبیت کمتر، بازداری کمتری داشته و زودتر از ستون خارج می‌شوند.



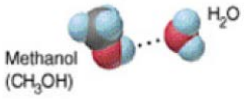
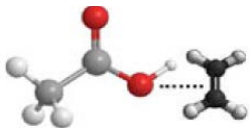
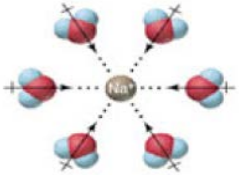
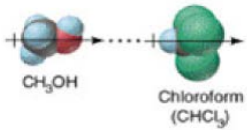
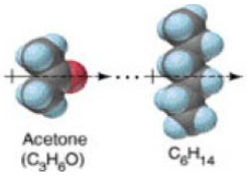
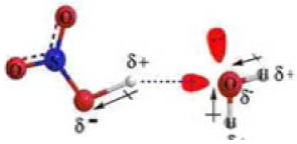
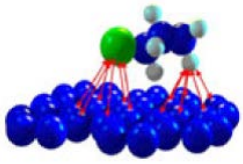
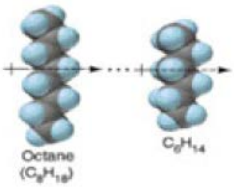
شکل ۳: سازوکار کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی [۸].

پدیده بازداری در HPLC به انواع مختلف برهم‌کنش‌های هم‌زمان بین مولکولی میان حل شونده و فاز ساکن، حل شونده و فاز متحرک، فاز ساکن و فاز متحرک بستگی دارد. انواع برهم‌کنش‌های بین مولکولی در جدول (۲) نشان داده شده‌است.

فرضیه‌های موجود پیشنهاد می‌کند که بازداری، از تفاوت توزیع آنالیت ناشی می‌شود. البته این فرضیه فاقد توضیح کامل و جامع است. در این روش سازوکار جداسازی بر پایه تفاوت توزیع آنالیت تزریق شده میان فاز متحرک غنی از استونیتریل و لایه غنی از آب جذب سطحی شده روی سطح فاز ساکن هیدروفیلی است (شکل (۳)). هر قدر آنالیت هیدروفیل‌تر باشد تعادل توزیع به سمت لایه آبی تثبیت شده روی فاز ساکن حرکت می‌کند و بنابراین آنالیت بیشتر بازداری می‌شود.

زمانی که غلظت استونیتریل (یا سایر حلال‌های آلی) افزایش می‌یابد آب بیشتر با سطح فاز ساکن قطبی (برای نمونه سطح سیلیکای بدون پوشش) برهم‌کنش می‌کند. در این مورد، استونیتریل نمی‌تواند با سیلانول‌های باقی‌مانده روی سطح فاز ساکن برهم‌کنشی داشته باشد و بنابراین، این سیلانول‌ها بدون پوشش باقی‌مانده و مولکول‌های آب می‌توانند به آنها اتصال یابند.

جدول ۲: انواع برهم‌کنش‌ها میان آنالیت، فاز ساکن و فاز متحرک [۱۱]

نوع برهم‌کنش		ویژگی‌ها	انرژی [kJmol-1]	مثال
برهم‌کنش شیمیایی	پیوند هیدروژنی	میان هیدروژن یک گروه پروتون دهنده و اتم گیرنده هیدروژن، در درون یک مولکول و یا بین دو مولکول مختلف تشکیل می‌شود.	۱۷-۴-	
	برهم‌کنش دهنده-گیرنده	میان زوج الکترون دهنده (باز لوییس) و گیرنده الکترون (اسید لوییس) تشکیل می‌شود.	۱۷-۴-	
برهم‌کنش فیزیکی	یون-دوقطبی	یون‌ها روی یک مولکول خنثی قرار می‌گیرند.	۱۷-۴-	
	دوقطبی-دوقطبی	میان دو جزء خنثی از نظر بار الکتریکی اما دارای دوقطبی لحظه‌ای به‌وجود می‌آید.	۱۷-۴-	
	دوقطبی-دوقطبی القایی	میان مولکول‌های دارای دوقطبی لحظه‌ای و مولکول‌های غیرقطبی ایجاد می‌شود.	۱۷-۴-	
	دوقطبی موقت-دوقطبی القایی	اگر دو ذره خنثی به هم نزدیک شوند به روش الکتروستاتیکی یکدیگر را جذب می‌کنند.	۱۷-۴-	
برهم‌کنش‌های بین مولکولی (واندروالس)		نیروی ضعیف جاذبه میان اجزای مولکول‌های منفرد که با افزایش فاصله به سرعت کاهش می‌یابد.	۴-۲-	
برهم‌کنش‌های هیدروفوبی		نیروهایی که در محیط آبی میان مولکول‌های آب گریز به‌وجود می‌آید.	۴-	

مزایای کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی

مزایای اصلی استفاده از کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی به شرح زیر است:

- نگهداری ترکیبات آبدوست که بدون استفاده از یک عامل جفت یونی در کروماتوگرافی معکوس مشکل است؛
- ترتیب شویش در درجه اول به درجه آبدوستی نمونه بستگی دارد، بنابراین انتخاب و ترتیب خروج از ستون در کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی برعکس کروماتوگرافی معکوس است؛
- به‌طور کلی، محتوای بالای حلال آلی در فاز متحرک باعث بالا رفتن درصد سیگنال به نویز (S/N) می‌شود؛
- فشار کم، به دلیل ویسکوزیته پایین حلال‌های آلی در فاز متحرک. این امر به ما اجازه می‌دهد که از شدت جریان بالاتری برای آنالیز سریعتر استفاده کنیم، به‌ویژه در مواقعی که از ستون با قطر ذرات ۲ میکرون استفاده می‌شود [۱۲]. به‌طور کلی، فشار در کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی ۳-۲ برابر کمتر از کروماتوگرافی معکوس است؛
- کاهش دنباله‌دار شدن شدن پیک‌ها. این پدیده زمانی مشاهده شده‌است که نمونه روی فاز ساکن قطبی در روش کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی قرار می‌گیرد [۱۳]؛
- قابلیت استخراج با فاز جامد، در صورتی که در حلال ۱۰۰ درصد اپروتیک حل شود، می‌توان به‌صورت مستقیم و بدون نیاز به خشک کردن یا بازسازی در فاز متحرک به دستگاه تزریق کرد [۱۴].

محدودیت‌های استفاده از کروماتوگرافی مایع با برهم‌کنش آبدوستی

یکی از محدودیت‌های رایج در کروماتوگرافی با برهم‌کنش آبدوستی، در شکل پیک‌ها است که از عدم تطابق حلال نمونه و فاز متحرک حاصل می‌شود. استفاده از حلال‌های آبی (با قدرت شویش بالا) برای آماده‌سازی نمونه، باعث اختلال در تقسیم ذرات نمونه با فاز ساکن شده و در شکل پیک اختلال ایجاد می‌کنند. از دیگر اثرات منفی که در استفاده از حلال‌های کاملا آبی به‌وجود می‌آید، می‌توان به سرریز شدن از ستون، کاهش زمان بازداری و وضوح پیک اشاره کرد. برای عملکرد خوب کروماتوگرافی توصیه می‌شود فاز متحرک حاوی بیش از ۵۰ درصد حلال آلی باشد [۱۴]. با این حال، این موضوع می‌تواند سبب حلالیت برای نمونه‌های بسیار قطبی شود. جانسون و همکاران به این مشکل با استفاده از یک لوپ حلقوی تزریق نمونه که با حلال آلی احاطه شده‌است، اشاره کرده‌اند.

از دیگر محدودیت‌های استفاده از دستگاه کروماتوگرافی با برهم‌کنش آبدوستی می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- سازوکار جنبشی در کروماتوگرافی با برهم‌کنش آبدوستی کندتر از کروماتوگرافی فاز معکوس است، که این نتیجه به‌طور معمول ۲ تا ۴ برابر طولانی‌تر از فاز معکوس است؛
- زمانی که از نسبت بالای حلال‌های آلی استفاده می‌شود اندازه‌گیری دقیق pH نمی‌تواند انجام شود؛
- تصوری رایج اما اشتباه در رابطه با ستون‌های کروماتوگرافی با برهم‌کنش آبدوستی این است که، این ستون‌ها ترکیبات را به روش مشابهی حفظ می‌کنند. در واقع یکی از ابهامات مکرر در توسعه روش کروماتوگرافی با برهم‌کنش آبدوستی، انتخاب ستون مناسب برای استفاده است.

نتیجه‌گیری

در سالهای اخیر HILIC رشد روز افزونی را شاهد بوده است. فازهای ساکن متنوع و متعددی ساخته شده‌اند که در محدوده وسیعی به‌ویژه در زمینه داروها و متابولیت‌های آنها که بسیار قطبی هستند، کاربرد پیدا کرده‌اند. توانایی جداسازی منحصر به فرد HILIC و خصلت مکمل بودن آن در برابر کروماتوگرافی فاز معکوس، آن را به روش ایده‌آلی برای کروماتوگرافی چند بعدی تبدیل ساخته است که قدرت جداسازی را به‌گونه‌ای چشمگیر افزایش می‌دهد. این روش برای جداسازی بیشتر ترکیبات قطبی از ترکیبات باردار گرفته تا ترکیبات غیرباردار در مخلوط‌های پیچیده مناسب است. دلیل دیگر، عمومیت یافتن این روش، توانایی جفت شدن طیف‌سنج جرمی با HILIC است چرا که فاز متحرک HILIC با طیف‌سنج جرمی سازگار است و حساسیت بالایی را نیز فراهم می‌آورد.

پی‌نوشت

۱. دکتری شیمی آلی، مرکز تحقیقات ریز فناوری زیستی، پژوهشکده فناوری‌های نوین علوم پزشکی جهاد دانشگاهی ابن‌سینا
۲. کارشناس ارشد کشاورزی، آزمایشگاه مرکزی دانشگاه کشاورزی و منابع طبیعی رامین خوزستان
۳. کارشناس ارشد شیمی آلی، بخش تحقیقات گیاهان دارویی، موسسه تحقیقات جنگل‌ها و مراتع کشور
۴. عضو کارگروه تخصصی کروماتوگرافی شبکه آزمایشگاهی فناوری‌نانو

5. High performance liquid chromatography (HPLC)
6. Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)
7. Normal phase liquid chromatography
8. Aprotic
9. isocratic
10. gradients

مراجع

[1] Alpert AJ (1990) J Chromatogr A 499:177–196.
[2] Cubbon S, Bradbury T, Wilson J, Thomas-Oates J (2007) Anal Chem 79:8911–8918.
[3] Buszewski B & Noga S (2012). Anal Bioanal Chem, 402:231–247.
[4] Alpert AJ, Shukla M, Shukla AK, Zieske LR, Yuen SW, Ferguson MAJ, Mehlert A, Pauly M, Orlando R (1994) Chromatogr A 676:191–202.
[5] Linden JC, Lawhead CL (1975) J Chromatogr A 105:125–133.
[6] Regnier FE, Noel R (1976) J Chromatogr Sci 14:316–320
[7] Rubinstein M (1979) Anal Biochem 98:1–7.
[8] Thermo Scientific (2014). HILIC Separations Technical Guide.
[9] Naidong W (2003) J Chromatogr B 796:209–224.
[10] Hong Bui NT, Verhage JJ, Irgum K (2010) J Sep Sci 33:2965–2976.
[11] Buszewski B, Krupczyńska K, Gadzała-Kopciuch RM, Rychlicki G, Kaliszan R (2003) J Sep Sci 26:313–321.
[12] McCalley, D.V., 2010, J. Chromatogr. A, 1217, 3408.
[13] Gritti F.; dos Santos Pereira A.; Sandra P. and Guiochon G., 2010, J.Chromatogr. A, 1217, 683.
[14] Jandera P., 2011, Anal. Chim. Acta, 692, 1.