

**SEPARÁCIA ALIFATICKÝCH KARBOXYLOVÝCH KYSELÍN VYUŽITÍM
HYDROFILNE-INTERAKČNEJ CHROMATOGRAFIE
SEPARATION OF ALIPHATIC CARBOXYLIC ACIDS
BY HYDROPHILIC-INTERACTION CHROMATOGRAPHY**

BOHÁČOVÁ Iveta, HALKO Radoslav, HUTTA Milan

Katedra analytickej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Bratislava

Abstrakt

Karboxylové kyseliny tvoria dôležitú skupinu organických zlúčenín, ktoré sú široko používané v rôznych odvetviach ľudskej činnosti. Napríklad v potravinárskom priemysle sú najčastejšie prítomné v nápojoch ako v ovocných džúsoch, mliečnych výrobkoch, víne a octe, alebo sú používané ako potravinárske aditíva. V medicíne karboxylové kyseliny môžu slúžiť ako indikátory celého radu ochorení a vo farmaceutickom priemysle sa využívajú v mnohých liečivách. Z tohto dôvodu je potrebné vyvíjať nové spoľahlivé analytické metódy na ich stanovenie v rôznych environmentálnych, biologických a potravinárskych vzorkách. V našej štúdií bola na separáciu alifatických karboxylových kyselín použitá hydrofilne-interakčná chromatografia. Separácia prebehla na analytickej kolóne so zwitteriónovými funkčnými skupinami. Mobilná fáza sa skladala z vodného roztoku octanu amónneho a acetonitrilu.

Kľúčové slová: Alifatické kyseliny. Hydrofilne-interakčná chromatografia. Separácia

Abstract

Carboxylic acids are an important group of organic compounds that are widely used in various segments of human activities. For example, in the food industry, they are most commonly present in beverages such as fruit juices, dairy products, wine and oats, or are used as food additives. In medicine, carboxylic acid can serve as indicators of a wide range of diseases and are used in many drugs in the pharmaceutical industry. For this reason it is necessary to develop new reliable analytical methods for their determination in different environmental, biological and food samples. In our study, hydrophilic-interaction chromatography was used to separate aliphatic carboxylic acids. Separation was performed on an analytical column with zwitterionic functional groups. The mobile phase consisted of an aqueous solution of ammonium acetate and acetonitrile.

Key words: Aliphatic acids. Hydrophilic-interaction chromatography. Separation

ÚVOD

Štúdium alifatických a aromatických karboxylových kyselín je dôležité, nakoľko tvoria významnú zložku životného prostredia a sú bežne využívané v potravinárstve, poľnohospodárstve a v medicíne. V životnom prostredí sa karboxylové kyseliny nachádzajú najmä v pôdach. Alifatické karboxylové kyseliny ako napríklad kyselina šťaveľová, octová a citrónová, zohrávajú dôležitú úlohu v pôdných

procesoch či už v transporte rastlinných živín alebo v ochrane rastlinných koreňov ktoré sú v kyslých pôdach vystavené toxickým koncentráciám napr. kationov hliníka [1].

Voľné formy alifatických karboxylových kyselín sa nachádzajú v rôznom ovocí, napríklad kyselina jablčná v jablkách či kyselina citrónová v citrusových plodoch. Dôležitú úlohu pri výrobe vína zohrávajú kyselina vínna, mliečna a jablčná, ktoré sa nachádzajú v bobuliach hrozna, prípadne vznikajú počas fermentačného procesu [2]. V potravinárskom priemysle sa ako konzervačná látka využíva napríklad kyselina benzoová, ktorej sodná soľ sa používa na inhibíciu mikroorganizmov v potravinách. Kyselina glukónová je tiež povolená potravinárska prídavná látka, ktorá sa pridáva buď s kyselinou citrónovou alebo ako jej náhrada na vylepšenie chuťových a antioxidačných / konzervačných vlastností potravín.

Karboxylové kyseliny a ich deriváty sa používajú v medicíne ako antiseptické, antireumatické, anestetické, analgetické, antipyretické a nesteroidné protizápalové liečivá. Taktiež slúžia ako indikátory niektorých chorôb, kedy ich vysoká koncentrácia napríklad v moči naznačuje metabolickú poruchu nazývanú organická acidúria, ktorá patrí medzi dedičné metabolické poruchy. Medzi najznámejšie organické acidúrie patria propiónová, glutárová, metylmalónová a pyroglutárová acidúria [3]. Sledovanie karboxylových kyselín je tiež dôležité u pacientov s diabetes mellitus (kyselina 3-hydroxybutyrová), ochorením obličiek (kyselina močová), energetickým metabolizmom (kyselina jablčná a citrónová) a mnohými ďalšími ochoreniami [4].

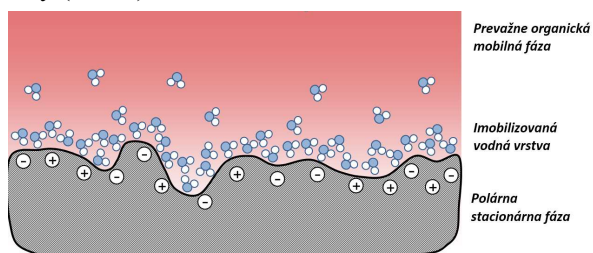
Separácia karboxylových kyselín predovšetkým polárnych alifatických karboxylových kyselín s krátkym alkylovým reťazcom, je v kvapalinovej chromatografii obtiažna. Nakoľko v kvapalinovej chromatografii v systéme obrátených fáz, sú slabo zadržované a eluujú v mŕtvom objeme kolóny, je potrebné hľadať vhodné alternatívy na ich separáciu.

V dnešnej dobe sa do popredia záujmu dostáva hydrofilne interakčná chromatografia (HILIC), ktorej chromatografický systém je ortogonálny voči kvapalinovej chromatografii v systéme obrátených fáz. Vďaka tejto ortogonalite je hydrofilne interakčná chromatografia vhodná na separáciu polárnych látok akými sú alifatické karboxylové kyseliny.

Separáčny mechanizmus hydrofilne interakčnej chromatografie

Pojem hydrofilne interakčná chromatografia (HILIC) zaviedol Alpert [5] v roku 1990 na popisanie LC metódy v ktorej polárne analyty interagujú s polárnou stacionárnou fázou a eluujú v pomerne hydrofóbnej mobilnej fáze. Avšak dávno predtým ako Alpert predstavil pojem HILIC, boli uskutočnené štúdie, ktoré sa zaoberali separáciou polárnych látok na polárnych stacionárnych fázach. Tieto prvotné štúdie zahrňovali separáciu sacharidov [6, 7]. V týchto štúdiách boli autori názoru, že separácia polárnych látok je riadená sorpciou a desorpciou hydroxylových skupín analytov na povrchu stacionárnej fázy. Avšak táto teória platila len pre analyty ktoré obsahovali hydroxylové skupiny, čo výrazne redukovalo jej rozsah a preto ďalšie štúdie viedli k novým teóriám separačného mechanizmu. Ďalší autori, po sledovaní separácií karbohydrátov na čistom silikagély a modifikovanom silikagély aminokupinami, prišli k záveru, že ich separácia je riadená predovšetkým rozdeľovaním analytov medzi dve kvapalnú fázu [8, 9].

Až Alpert objasnil komplexný mechanizmus separácie látok v HILIC [5]. Ten je založený na tom, že polárne skupiny naviazané na povrchu stacionárnej fázy priťahujú molekuly vody z vodno-organickej mobilnej fázy, čím vytvárajú na povrchu silikagélu čiastočne imobilizovanú vodnú vrstvu. Nakoľko je voda miešateľná s organickými rozpúšťadlami používanými v HILIC (acetonitril, metanol) vzniká difúzna vodná vrstva so znižujúcim sa koncentračným gradientom vody smerom do mobilnej fázy (Obr.1).



Obrázok 1 Schematický obrázok difúznej vodnej vrstvy na povrchu polárnej stacionárnej fázy v HILIC

Analyt, ktorý je rozpustený v mobilnej fáze tak podlieha rozdeľovaniu medzi dve kvapalnú fázy: 1. na vodu bohatšiu stacionárnou fázou a 2. prevažne organickú mobilnú fázu. Polárnejšie analyty majú potom vyššiu afinitu k čiastočne imobilizovanej vodnej vrstve než k organickej mobilnej fáze.

Separácia karboxylových kyselín

Z karboxylových kyselín sa autori vo väčšine prác zaoberali separáciou aromatických kyselín a ich derivátov. Greco a kol. študovali separáciu hydroxy-, dihydroxy- a trihydroxybenzoových kyselín spolu s aminobenzoovými kyselinami na zwitteriónovej (ZIC) stacionárnej fáze a sledovali vplyv prídavku acetonitrilu do mobilnej fázy, vplyv koncentrácie solí v mobilnej fáze a zmenu pH. Z nameovaných výsledkov autori dospeli k záveru, že separáčny mechanizmus týchto kyselín je riadený rozdeľovaním a pravdepodobne aj adsorpciou [10]. Guo a kol. študovali vplyv chromatografických podmienok na separáciu šiestich karboxylových aromatických kyselín na rôznych stacionárnych fázach (amidová, aspartamidová, silikagélová, sulfobetainová a aminová). Najnižšie rozlíšenie týchto kyselín bolo na čistej silikagélovej stacionárnej fáze a sulfobetainovej stacionárnej fáze. Naopak veľmi silné zadržanie vykazovali testované kyseliny na aminovej stacionárnej fáze [11]. Škeríková a Jandera separovali jedenásť fenolových kyselín metódami HILIC a reverznofázovou chromatografiou (RP-LC). HILIC separácia sa ukázala byť účinnejšia oproti RP-LC, kedy za použitia gradientovej elúcie sa im podarilo metódou HILIC odseparovať desať z jedenástich testovaných fenolových kyselín, zatiaľ čo metódou RP-LC odseparovali len sedem kyselín [12]. Fenolové kyseliny boli predmetmi záujmu aj v iných prácach [13, 14].

Štúdium separácie jednoduchých alifatických karboxylových kyselín v HILIC nebolo uskutočňované v takom rozsahu ako v prípade aromatických karboxylových kyselín. Separácia homocysteínu, kyseliny metylmalónovej a kyseliny jantárovej v klinickej diagnostike bola uskutočnená Appelblodom a Abrahamssonom na sulfoalkylbetainovej ZIC stacionárnej fáze s hmotnostnou detekciou [15]. Kyselina jantárová a mliečna a ďalšie organické látky boli stanovené v metabolomických štúdiách [16]. Kyselina vínna, ferulová a citrónová boli stanovené v džúsoch a vínach [17]. Jedna z mála prác, ktorá sa zaoberala separáciou väčšieho počtu alifatických karboxylových kyselín bola práca Kitanovského

a kol. [18]. Separáciu jedenástich alifatických karboxylových kyselín uskutočnili na amidovej kolóne a následne aplikovali na ich stanovenie v atmosférických aerosólov. Marrubini a kol. porovnávali selektivitu separácie alifatických karboxylových kyselín na štyroch ZIC stacionárnych fázach. Ako mobilnú fázu použili fosforečnanový tlmivý roztok s hodnotou pH 7,5, ktorá v konečnom dôsledku nebola vhodná nakoľko spôsobovala upchatie kolóny približne po 50-tich dávkovaniach [19].

Z naštudovanej literatúry vyplýva, že využitie HILIC na separáciu polárnych látok v dnešnej dobe stále narastá. Okrem separácie karboxylových kyselín sa využíva predovšetkým na separáciu cukrov v jedle a nápojoch [20], cukrov v tradičnej čínskej medicíne [21], glykozaminoglykánov [22] a glykoproteínov [23]. Množstvo prác sa zaoberá separáciou aminokyselín [10], nukleových kyselín, nukleozidov [24], flavonoidov [25], peptidov [26] a proteínov [27]. HILIC našla využitie aj vo farmaceutickom priemysle, kde je nevyhnutnosťou stanovenie polárnych účinných farmaceutických látok na nízkych koncentračných úrovniach, kde použitie RP-LC metódy nepostačuje. Medzi zaujímavé aplikácie HILIC patrí stanovenie folátov (kyselina listová, tetrahydrofolát, 5-metyltetrahydrofolát a 5-formyltetrahydrofolát) v ľudskej plazme [28].

MATERIÁL A METÓDY

Chemikálie

Všetky štandardné látky testovaných karboxylových kyselín boli zaobstarané od firmy Merck (Darmstadt, Nemecko). Názvy testovaných kyselín a ich skratky sú uvedené v tabuľke 1. Zásobné roztoky alifatických karboxylových kyselín boli pripravené rozpustením príslušnej hmotnosti, prípadne zriedením príslušného objemu v acetonitrile < 99 % (Merck, Darmstadt, Nemecko). Octan amónny (NH₄Ac) od firmy Merck (Darmstadt, Nemecko), bol použitý na prípravu tlmivého roztoku a mobilnej fázy. Na prípravu všetkých vodných roztokov bola použitá ultračistá deionizovaná voda, ktorá bola pripravená systémom Water Pro PS (Labconco, USA) a následne bola prečistená systémom Simplicity® Ultrapure (Milipore, Molsheim, Francúzsko).

Príprava zásobných roztokov

Zásobné roztoky alifatických karboxylových kyselín: šťaveľová, malónová, metylénjantárová, fumarová, maléinová, jantárová, jablčná, vínna, glutárová, o koncentrácií 10 g/l a kyseliny adipová, pime-

Tabuľka 1 Názvy a skratky testovaných kyselín

Skratka	Triviálny názov kyseliny
ADI	Kyselina adipová
FOR	Kyselina mravčia
FUM	Kyselina fumarová
GLT	Kyselina glutárová
GLU	Kyselina glukónová
LAC	Kyselina mliečna
MAL	Kyselina jablčná
MLE	Kyselina maléinová
MLO	Kyselina malónová
MSC	Kyselina metylénjantárová
OXA	Kyselina šťaveľová
PIM	Kyselina pimelová
PRO	Kyselina propiónová
SUB	Kyselina suberová
SUC	Kyselina jantárová
TAR	Kyselina vínna

lová a suberová, ktorých koncentrácie boli 5 g/l boli pripravené rozpustením 250 mg, resp. 125 mg štandardnej látky v 25 ml 80% vodného roztoku acetonitrilu. Zásobné roztoky alifatických karboxylových kyselín: mravčia, propiónová, mliečna a glukónová o koncentrácií 10 ml/l boli pripravené napipetovaním 250 µl štandardného roztoku do 25 ml odmernej banky a boli doplnené 80% vodným roztokom acetonitrilu. Následne boli zásobné roztoky prefiltrované cez PTFE mikrofilter Econofilter (25 mm / 0,20 µm). Pracovné roztoky alifatických karboxylových kyselín boli pripravené zriedením zásobných roztokov použitou mobilnou fázou. Vodný roztok octanu amónneho bol pripravený navážením príslušnej hmotnosti octanu amónneho a jeho rozpustením v ultračistej deionizovanej vode. Vodný roztok octanu amónneho a acetonitrilu bol vždy zmiešaný mimo chromatografického systému. Výsledná mobilná fáza bola následne upravená pomocou ultrazvukovej vane po dobu 15 minút.

Prístroje a zariadenia

Na separáciu karboxylových kyselín bol použitý kvapalinový chromatograf Elite LaChrom od firmy Merck – Hitachi (Darmstadt, Nemecko). Namerané dáta boli vyhodnotené pomocou programu EZ-Chrom Elite ver. 3.1.7.

Na separáciu kyselín bola použitá chromatografická kolóna SeQuant ZIC-HILIC (150 × 4,6 mm I.D, 5 µm) so sulfobetainovými funkčnými skupinami (Merck, Darmstadt, Nemecko).

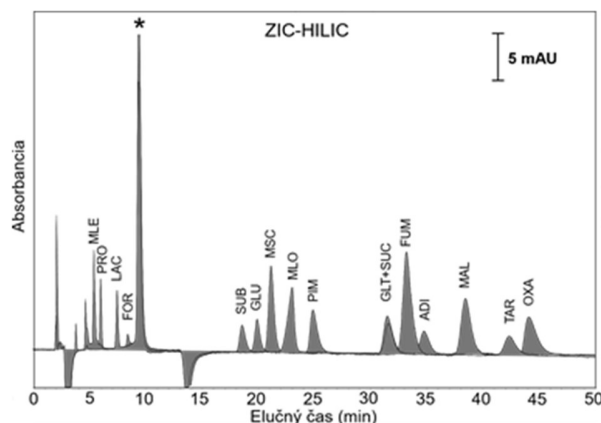
VÝSLEDKY A DISKUSIA

V našej štúdií sme na separáciu vybraných alifatických kyselín použili HPLC v HILIC móde v kombinácii s UV detekciou. Mobilná fáza v HILIC pozostávala z acetonitrilu a vodného roztoku octanu amónneho. Na separáciu bola použitá izokratická elúcia. Študovali sme rôzne chromatografické podmienky vrátane obsahu vody v mobilnej fáze, látkovej koncentrácie octanu amónneho (iónová sila) a teploty kolóny.

Zmena zloženia mobilnej fázy mala veľký vplyv na zadržanie alifatických karboxylových kyselín v HILIC. Zvýšením obsahu vody v mobilnej fáze sa elučné časy alifatických karboxylových kyselín skracovali, nakoľko, voda v HILIC predstavuje najsilnejšie elučné činidlo. Zadržanie polárnych látok je preto so vzrastajúcim obsahom vody vo vodno-organická mobilnej fáze menšie. Pri zvýšení látkovej koncentrácie octanu amónneho v mobilnej fáze, došlo k zvýšeniu hodnôt retenčných faktorov alifatických karboxylových. Mohlo to byť spôsobené znížením elektrostatických interakcií medzi analytmi a stacionárnou fázou, nakoľko použitá kolóna obsahuje nabitú sulfobetainovú funkčnú skupinu.

Pri zmene teploty kolóny sme pozorovali nezvyčajné správanie kyseliny šťaveľovej, vínnej a fumarovej kedy sa ich hodnoty retenčných faktorov so zvyšujúcou sa teplotou zväčšovali. Pre ostatné analyty sa hodnoty retenčných faktorov znižovali. Toto správanie naznačuje že primárny separačný mechanizmus kyseliny šťaveľovej, vínnej a fumarovej je odlišný od primárneho separačného mechanizmu ostatných testovaných kyselín.

Na obrázku 2 je zobrazená separácia alifatických kyselín, kedy za optimálnych chromatografických podmienok bola dosiahnutá separácia s rozlíšením väčším ako 1 pre čo najväčší počet testovaných kyselín. Zo záznamu môžeme vidieť, že všetky testované kyseliny boli na kolóne zadržané a všetky, okrem kyseliny glutárovej a kyseliny jantárovej, boli odseparované. Nedostatkami vyvinutej metódy je dlhší čas separácie testovaných kyselín a tvar pík, ktorý je pre dlhšie zadržané kyseliny širší a pre posledné dve elujúce kyseliny, kyselinu vínnu a šťaveľovú, má chvostujúci charakter. Tieto nedostatky je možné upraviť zmenou stacionárnej fázy, prípadne zmenou mobilnej fázy.



Obrázok 2 Mobilná fáza: 30 mmol/l octan amónny + acetonitril (20:80 v/v); prietok mobilnej fázy 0,8 ml/min; teplota kolóny 22 °C, dávkovaný objem 10 µl; UV detekcia 215 nm. Identifikácia pík: vid' tabuľka 1, *systémový pik

ZÁVER

V tejto práci sme sa zaoberali možnosťou využitia HILIC metódy na separáciu alifatických karboxylových kyselín. Na základe zatiaľ dosiahnutých výsledkov, môžeme konštatovať, že aj napriek niektorým nedostatkom má HILIC metóda veľký potenciál v separácii malých polárnych molekúl, ktorý je potrebné naďalej rozvíjať. V budúcnosti sa preto budeme venovať štúdiu separácie polárnych látok na rôznych HILIC stacionárnych fázach a zameriame sa na separáciu alifatických kyselín, či už medicínskeho alebo potravinárskeho významu a ich stanovením v reálnych vzorkách.

PodĎakovanie

Práca vznikla za finančnej podpory Agentúry na podporu výskumu a vývoja na základe zmluvy č. APVV-17-0318 a zmluvy č. SK-KR-18-0009.

ZOZNAM BIBLIOGRAFICKÝCH ODKAZOV

- [1] VAN HEES, P.A.W., VINOGRADOFF, S.I., EDWARDS, A.C., et al. Low molecular weight organic acid adsorption in forest soils: Effects on soil solution concentrations and biodegradation rates. *Soil Biology and Biochemistry*. 2003; 35: 1015-1026.
- [2] FARKAŠ, J. *Biotechnológia vína*. 2. vyd., Bratislava: Alfa, 1983. 978 s. ISBN 63-076-83.
- [3] LEHOTAY, D.C., CLARKE, J.T. Organic acidurias and related abnormalities. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*. 1995; 32: 377-429.
- [4] GOODMAN, L.S., GILMAN, A. *The phar-*

- macological basis of therapeutics*. 9. vyd., New York: McGraw-Hill, 1996. 1905 s. ISBN 9780070262669.
- [5] ALPERT, A.J. Hydrophilic-interaction chromatography for the separation of peptides, nucleic acids and other polar compounds. *Journal of Chromatography A*. 1990; 499: 177-196.
- [6] LINDEN, J.C. Liquid chromatography of saccharides. *Journal of Chromatography A*. 1975; 105: 125-133.
- [7] BOUMAHRAZ, M., DAVYDOV, Y.V., KISELEV, V.A. Separation of carbohydrates by liquid chromatography on silica gel, adding adsorption modifiers to the eluent. *Chromatographia*. 1982; 15: 751-756.
- [8] ORTH, P., ENGELHARDT, H. Trennung von Zuckern an chemisch modifizierten Kieselgelen. *Chromatographia*. 1982; 15: 91-96.
- [9] NIKOLOV, Z.L., REILLY P.J. Retention of carbohydrates on silica and amine-bonded silica stationary phases: application of the hydration model. *Journal of Chromatography A*. 1985; 325: 287-293.
- [10] GRECO, G., GROSSE, S., LETZEL, T. Study of the retention behavior in zwitterionic hydrophilic interaction chromatography of isomeric hydroxy- and aminobenzoic acids. *Journal of Chromatography A*. 2012; 1235: 60-67.
- [11] GUO, Y., SRINIVASAN, S., GAIKI, S. Investigating the Effect of Chromatographic Conditions on Retention of Organic Acids in Hydrophilic Interaction Chromatography Using a Design of Experiment, *Chromatographia*. 2007; 66: 223-229.
- [12] ŠKEŘÍKOVÁ, V., JANDERA, P. Effects of the operation parameters on Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography separation of phenolic acids on zwitterionic monolithic capillary columns. *Journal of Chromatography A*. 2010; 1217: 7981-7989.
- [13] JANDERA, P., VYŇUCHALOVÁ, K., NEČILOVÁ, K. Combined effects of mobile phase composition and temperature on the retention of homologous and polar test compounds on polydentate C8 column. *Journal of Chromatography A*. 2013; 1317: 49-58.
- [14] ARAL, T., ARAL, H., ZIYADANOGULLARI, B., et al. Synthesis of a mixed-model stationary phase derived from glutamine for HPLC separation of structurally different biologically active compounds: HILIC and reversed-phase applications. *Talanta*, 2015; 131: 64-73.
- [15] APPELBLAD, P., ABRAHAMSSON, P. Mass spectrometric detection of homocysteine, methylmalonic acid and succinic acid using HILIC on a zwitterionic stationary phase. *LC GC Europe*. 2005; 18 (3): 47-48.
- [16] SCHIESEL, S., LÄMMERHOFER, M., LINDNER, W. Multitarget quantitative metabolic profiling of hydrophilic metabolites in fermentation broths of β -lactam antibiotics production by HILIC-ESI-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2010; 396: 1655-1679.
- [17] EHLING, S., COLE, S. Analysis of organic acids in fruit juices by liquid chromatography-mass spectrometry: An enhanced tool for authenticity testing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011; 59: 2229-2234.
- [18] KITANOVSKI, Z., GRGIĆ, I., VEBER, M. Characterization of carboxylic acids in atmospheric aerosols using hydrophilic interaction liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 2011; 1218: 4417-4425.
- [19] MARRUBINI, G., PEDRALI, A., HEMSTRÖM, P., et al. 2013. Column comparison and method development for the analysis of short-chain carboxylic acids by zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography with UV detection. *Journal of Separation Science*. 2013; 36: 3493-3502.
- [20] MARTÍNEZ MONTERA, C., RODRÍGUEZ DODERO, M.C., GUILLÉN SÁNCHEZ, D.A., et al. Analysis of Low Molecular Weight Carbohydrates in Food and Beverages: A Review. *Chromatographia*. 2004; 59: 15-30.
- [21] WANG, Q., FANG, Y. Analysis of sugars in traditional Chinese drugs. *Journal of Chromatography B*. 2004; 812: 309-324.
- [22] VYNIOS, D.H., KARAMANOS, N.K., TSIGANOS, C.P. Advances in analysis of glycosaminoglycans: Its application for the assessment of physiological and pathological states of connective tissues. *Journal of Chromatography B*. 2002; 781: 21-38.
- [23] NOVOTNY, M.V., MECHREF, Y. New hyphenated methodologies in high-sensitivity glycoprotein analysis. *Journal of Separation Science*. 2005; 28: 1956-1968.
- [24] SCHUSTER, G., LINDNER, W. Additional investigations into the retention mechanism of

- hydrophilic interaction liquid chromatography by linear solvation energy relationships. *Journal of Chromatography A*. 2013; 1301: 98-110.
- [25] SOUKUP, J., JANDERA, P. The effect of temperature and mobile phase composition on separation mechanism of flavonoid compounds on hydrosilated silica-based columns. *Journal of Chromatography A*. 2012; 1245: 98-108.
- [26] ZHU, B.Y., MANT, C.T., HODGES, R.S. Hydrophilic-interaction chromatography of peptides on hydrophilic and strong cation-exchange columns. *Journal of Chromatography A*. 1991; 548: 13-24.
- [27] MIZZEN, C.A., ALPERT, A.J., LÉVESQUE, L. Resolution of allelic and non-allelic variants of histone H1 by cation-exchange-hydrophilic-interaction chromatography. *Journal of Chromatography B*. 2000; 744: 33-46.
- [28] GARBIS, S.D., MELSE-BOONSTRA, A., WEST, C.E. Determination of folates in human plasma using hydrophilic interaction chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*. 2001; 73: 5258-8564.