



BIO-ANALYTISCHE STRATEGIEËN MET BEHULP VAN HOGE DRUK VLOEISTOF-CHROMATOGRAPHIE: DEEL II

Vervolg van deel I in Extract nrl 1994

H. Lingeman

Vakgroep Analytische Chemie, Vrije Universiteit, De Boelelaan 1083, 1081 HV Amsterdam

In deel I van dit overzicht zijn een aantal algemene parameters, chromatografie en detectie besproken, terwijl in deel II de monstervoorbewerking en in deel III de derivatisering aan de orde zullen komen. De Tabellen I - III en de referenties 1 - 11 zijn terug te vinden in deel I.

Eén van de belangrijkste aspecten van een bio-analytische procedure is de monstervoorbereiding (MVB). Er is aangevoeld dat ongeveer 60% van de totale tijd die aan een analyse wordt besteed, nodig is voor MVB. Daarnaast wordt iets meer dan 30% van de totale fout van een analyse veroorzaakt door de MVB. Dit betekent dat het zeker de moeite waard is om aan de MVB meer aandacht te besteden.

Monstervoorbewerking

De belangrijkste reden om een MVB te incorporeren in een totale bio-analytische procedure ligt in de noodzaak om interferenties door matrixcomponenten te elimineren. Alleen dan kan voldoende selectiviteit en gevoeligheid worden bereikt. De vereiste betrouwbaarheid van een bio-analyse kan alleen dan bereikt worden als er relatief schone monsters worden geanalyseerd [1].

In principe wordt uitgegaan van de combinatie van een niet-selectieve (initiële) MVB stap om het biologische monster te stabiliseren, te verrijken of geschikt te maken voor bewaring (b.v. precipitatie, dialyse, ultrafiltratie, invriezen, vriesdrogen, microgolfbestraling) en een selectieve MVB stap (b.v. vloeistof-vloeistof extractie - LLE,

vloeistof-vast extractie - SPE) om het farmacon te isoleren [12].

In de praktijk ligt de scheidingslijn tussen initiële en selectieve MVB stappen minder scherp. Een techniek als LLE kan gebruikt worden om eiwitten te denatureren en te verrijken (de initiële stappen) maar ook om het farmacon te isoleren (Tabel IV).

Uit de doelstelling van de bepalingmethoden en de gemaakte keuzen voor het LC systeem en de reactie / detectie techniek volgt al min of meer welke MVB procedures er in aanmerking komen en of er wel of niet geautomatiseerd dient te worden. Vragen die van belang zijn bij de keuze van de MVB procedure zijn:

- Moet alleen het farmacon of moeten ook de metabolieten worden geanalyseerd? Hierbij moet in ogenschouw worden genomen dat de primaire metabolieten en met name de secundaire metabolieten (conjugaten) polairder zijn dan het farmacon zelf [13].
- Moet de vrije fractie, de fractie gebonden aan plasma / serum eiwitten, of de totale hoeveelheid van het farmacon worden bepaald? Er mag nooit worden aangenomen dat de toegepaste initiële MVB procedure de eiwtbindingen kwantitatief verbreekt [14].
- Is het farmacon in de matrix, enzymatisch en/of chemisch stabiel? Kunnen de monsters zonder meer bewaard worden, moeten ze gestabiliseerd worden (b.v. pH, enzym inhibitie, anti-oxidans) of direct geanalyseerd worden?

Biologische matrix

Over het algemeen worden bio-analyses uitgevoerd in plasma, serum of volbloed. Na stollen en centrifugeren blijft van 1 ml volbloed ongeveer 300-500 μ l serum over en na centrifugeren met een anti-stollingsmiddel blijft ongeveer 500 μ l plasma over. Wat betreft de analyse maakt het meestal niet uit of plasma of serum wordt gebruikt omdat de concentratie aan eiwitten (albuminen en globulinen) ongeveer hetzelfde is. In de praktijk wordt echter meestal plasma gebruikt [13].

TABEL IV

MONSTERVOORBEWERKINGSTECHNIKEN

<i>Techniek</i>	<i>Toepassing</i>
Chemische modificatie	Initiële MVB van niet stabiele monsters
Covalente labelling	Initiële MVB van niet stabiele monsters
Dehydradatie	Initiële verwijdering van waterige vloeistoffen
Dialyse	Isolatie van verbindingen (uit-lijn of in-lijn) op basis van molecuulgewicht
Elektroforese	Isolatie van geladen verbindingen, of verwijdering van geladen interferenties
Enzym inhibitie	Stabilisering van verbindingen in eiwit bevattende matrices
Homogenisatie	Initiële MVB van vaste matrices
Hydrolyse	Denaturering van eiwitten
Invriezen	Stabilisering van verbindingen in eiwit bevattende matrices, bewaring van monsters
LLE	Selectieve MVB en monsterverrijking die voor relatief kleine aantallen monsters gebruikt kan worden, wordt vaak gecombineerd met een initiële MVB stap
Microgolfbestraling	Solubilisatie van monsters, denaturatie van eiwitten, ontdooien van monsters
Precipitatie	Denaturatie van eiwitten
Solubilisatie	Initiële MVB van vaste matrices
SPE	Selectieve MVB en monsterverrijking die zowel handmatig als geautomatiseerd uitgevoerd kan worden
Ultrafiltratie	Isolatie van verbindingen op basis van molecuulgewicht
Vriesdrogen	Verwijdering van water, initiële stabilisatie van verbindingen

TABEL V

KEUZE MONSTERVOORBEWERKINGSTECHNIEK

<i>Techniek</i>	<i>Aantal te analyseren monsters per serie</i>			<i>Aantal te meten series per jaar</i>		
	<i>< 10</i>	<i>10-100</i>	<i>> 100</i>	<i>< 5</i>	<i>5-10</i>	<i>> 10</i>
UIT-LIJN						
LLE	++	±	--	±	-	--
SPE	++	+	-	+	±	--
Robotsysteem	--	-	±	-	±	+
IN-LIJN						
Doorstroomstelsel	--	+	++	-	++	++
Kolomschakeltechniek	---	±	++	±	++	++
Monsterwisselaar	±	++	±	++	+	±

LLE, vloeistof-vloeistof extractie; SPE, vaste stof-vloeistof extractie; ++, +, technieken die bij voorkeur toegepast dienen te worden; ±, techniek die in een aantal gevallen goede resultaten geeft; -, --, technieken die bij voorkeur niet toegepast dienen te worden.

Eén van de grootste problemen bij het ontwikkelen van een bio-analytische methode is de aanwezigheid van eiwitten omdat deze de analytische kolom kunnen verstoppert. Vandaar dat het in een aantal gevallen voordelig kan zijn om urine monsters te analyseren omdat hier in principe geen eiwitten in voorkomen. Andere voordelen bij het uitvoeren van analyses in urine zijn, dat het eenvoudig te verkrijgen is, dat de concentraties soms hoger zijn dan in plasma/serum, en dat het afnemen nauwelijks een belasting vormt voor de patiënt. Het nadeel van analyse in urine monsters is dat er wel zeer veel componenten, waaronder metabolieten, in voorkomen [12]. Naast urine en plasma/serum kunnen bij voorbeeld analyses in faeces worden uitgevoerd, dit met name bij farmaca die slecht worden geabsorbeerd of die sterk worden gemetaboliseerd in de gal. Analyses in speeksel, bij voorbeeld bij kleine kinderen, worden ook wel uitgevoerd. Voor een groot aantal niet-eiwit gebonden farmaca bestaat er een vaste relatie tussen de concentratie in plasma en de concentratie in speeksel.

Bij het ontwikkelen van een MVB procedure moeten een aantal factoren goed in de gaten worden gehouden en zo mogelijk worden geoptimaliseerd zoals:

- stabiliteit van het farmacon tijdens de MVB;
- interferentie door verontreinigingen uit reactie- en reagensvaten tijdens de monsternamen, bewaring of MVB;
- recoveries van het farmacon tijdens de MVB;
- verenigbaarheid van het oplosmiddel dat in de laatste stap van de MVB wordt gebruikt met het LC systeem;
- eenvoud van de MVB procedure;
- nauwkeurigheid en precisie van de MVB;
- monsterverrijking in de laatste MVB stap.

Zowel de initiële als de selectieve MVB procedures kunnen in-lijn en uit-lijn met de LC scheiding worden uitgevoerd. De keuze tussen in-lijn en uit-lijn, of automatisering, is afhankelijk van het aantal monsters, het aantal monster series en de gekozen methode. Tabel V toont welke methode, afhankelijk van het

aantal monsters en het aantal series, bij voorkeur dient te worden toegepast.

Initiële monstervoorbewerkingsprocedures

De initiële MVB procedures kunnen onderverdeeld worden in denaturaties, bewaringsprocedures, solubiliseringen en hydrolyses [15].

Denaturatie van eiwit-bevattende monsters is een vereiste om artefactvorming tijdens de analyse door ongewild metabolisme te voorkomen en om de analytische kolom voor verstopping te behoeden. Een denaturatietechniek die in de bio-analyse vaak wordt toegepast, is eiwitprecipitatie. In combinatie met LC wordt veelal methanol of acetonitril gebruikt als precipitatie reagens. Een nadeel hiervan is dat voor 1 ml plasma 2-3 ml organische vloeistof nodig is hetgeen een aanzienlijke verdunning betekent. Bovendien wordt met methanol een vlokkelig precipitaat verkregen wat moeilijk af te centrifugeren is, terwijl met acetonitril een compact neerslag verkregen wordt, waarin occlusie (insluiting, red.) van het farmacon kan plaatsvinden. Een andere mogelijkheid is het gebruik van zuren (b.v. perchloorzuur, trichloorazijnzuur), waarvan relatief weinig nodig is (200 μ l zuur op 1 ml plasma), maar niet alle farmaca zijn stabiel bij lage pH waarden. Belangrijk is echter dat geen enkel reagens in staat is om voor een kwantitatieve verwijdering van de eiwitten te zorgen. Hiervoor moeten technieken als ultrafiltratie [8] en dialyse worden toegepast [16]. Naast de precipitatie reacties worden ook enzymatische methoden gebruikt maar deze hebben als nadeel dat er een overmaat aan enzym moet worden toegevoegd hetgeen tijdens de LC bepaling weer voor problemen kan zorgen [17].

Het bewaren van monsters, voordat ze geanalyseerd worden, kan gebeuren door vriesdrogen of bewaren bij -20°C maar het invriezen van monsters moet altijd relatief snel gebeuren omdat er anders verliezen kunnen optreden bij het weer oplossen van de monsters. De reden hiervoor is dat gedurende de laatste fase van het invriezen een oververzadigde oplossing ontstaat met als gevolg dat bij voorbeeld een slecht oplosbaar neerslag van het farmacon ontstaat.

Het gebruik van microgolven in de bio-analyse is een andere, veelbelovende methode om monsters te solubiliseren, te denatureren, of te ontcoöien zonder dat de monsters gaan ontleden door bij voorbeeld een restant aan enzymactiviteit.

Hydrolyse van monsters kan betrekking hebben op het hydrolyseren van plasma eiwitten, wat bij voorkeur chemisch moet gebeuren en niet enzymatisch, en op het hydrolyseren van farmaconconjugaten wat zoveel mogelijk vermeden moet worden. Het meten van intacte conjugaten is met name belangrijk indien informatie omtrent de metabole route van het farmacon moet worden verkregen [13].

Zoals al eerder aangegeven is het essentieel om het percentage eiwitbinding van het farmacon te bepalen en/of kwantitatief alle eiwitten te verwijderen. Een relatief nieuwe techniek in de bio-analyse, die hiervoor zeer geschikt is, is ultrafiltratie [8]. Door middel van centrifugatie met een vaste-hoek-rotor wordt een selectief transport van het farmacon over een anisotroop membraan verkregen. Verbindingen met een molecuulgewicht kleiner dan de grenswaarde van het membraan kunnen het membraan wel en verbindingen met een hoger molecuulgewicht kunnen het membraan niet passeren. Tegenwoordig bestaan er membranen met grenswaarden van 500 Dalton tot 300 kiloDalton. De voordelen van ultrafiltratie ten opzichte van klassieke dialyse technieken zijn dat het een relatief snelle methode is, dat temperatueffecten van minimaal belang zijn en dat er relatief weinig uitwisselingsvloeistof nodig is. De belangrijkste toepassingen van deze techniek zijn verrijking van monsters, verwijdering van zouten en vloeistoffen, fractionering naar molecuulgewicht, het verrichten van eiwitbinding studies en het kwantitatief verwijderen van eiwitten en andere macromoleculen.

Een andere eveneens nieuwe methode is het gebruik van in-lijn dialyse als initiële MVB techniek voor de verwijdering van macromoleculen. Een in-lijn dialysesysteem bestaat uit 2 perspex blokken waar tussen zich het dialysemembraan bevindt. Aan één kant van het membraan wordt de monster- (donor)stroom aangevoerd en aan de andere kant van het

membraan stroomt de acceptorvloeistof bestaande uit zuiver water door het dialyseblok. Tijdens het dialyseproces kunnen alleen de moleculen die een lager molecuulgewicht hebben dan de grenswaarde van het membraan passeren. Op deze manier zijn in ongeveer 5 - 10 min recoveries tot 90% te verkrijgen. Er treedt echter een aanzienlijke verdunning op, hetgeen betekent dat een verrijgingsstap noodzakelijk is. Na de in-lijn dialyse worden de monsters allereerst door middel van een in-lijn voorkolom verrijkt alvorens ze op de analytische kolom worden gescheiden. Met behulp van absorptiedetectie bij 360 nm zijn de bepalingsgrenzen in plasma voor mitomycine C, bij voorbeeld, ongeveer 2 ng/ml [16].

Het ideaal is natuurlijk om de MVB geheel over te slaan of om deze te combineren met de LC scheiding. In een aantal gevallen kan dit gebeuren door de initiële MVB uit te voeren op een met de analytische kolom in-lijn geschakelde voorkolom [18]. Het is echter alleen aantrekkelijk deze techniek te gebruiken indien relatief grote aantallen monsters moeten worden geanalyseerd.

Een relatief nieuwe techniek op dit gebied is het gebruik van de zogenaamde 'internal-surface reversed-phase' materialen [19]. Dit is een silica matrix met kleine poriën. Buiten de poriën is dit materiaal gemodificeerd met een hydrofiele fase en binnen de poriën met hydrofobe fase. De eiwitten kunnen de poriën niet binnendringen en zullen niet vertraagd worden terwijl de farmaca de poriën wel binnen dringen en daar selectief vertraagd worden. Op deze fase kunnen plasma monsters zonder voorbehandeling rechtstreeks worden geïnjecteerd.

Selectieve monstervoorbewerkingsprocedures

Afhankelijk van het aantal monsters dat geanalyseerd moet worden, hoe vaak bepaalde metingen verricht moeten worden en de complexiteit van een matrix kunnen een aantal selectieve MVB methoden worden toegepast. De MVB procedure zal eerder geautomatiseerd worden wanneer het aantal te analyseren monsters toeneemt, bepaalde series vaker herhaald moeten worden, de matrix ingewikkelder wordt, of de concentraties van de te analyseren farmaca lager worden (Tabel

V). Een andere belangrijke reden om de MVB in-lijn of geautomatiseerd uit te voeren is dat dit de reproduceerbaarheid ten goede zal komen.

Voor relatief kleine series monsters (< 25) die éénmalig, of enkele malen per jaar bepaald moeten worden, ligt een initiële MVB procedure (b.v. precipitatie) in combinatie met een uit-lijn LLE of SPE het meest voor de hand. Bij het toenemen van het aantal monsters komen achtereenvolgens de monsterwisselaars - semi-flexibele automatiseringssystemen waarmee een beperkt aantal handelingen kan worden verricht, de kolomschakeltechnieken - automatiseringssystemen waarmee slechts één of twee handelingen kunnen worden uitgevoerd, de doorstroomsystemen - semi-flexibele automatiseringssystemen waarmee een zeer beperkt aantal handelingen kan worden verricht en de robotsystemen - flexibele automatiseringssystemen waarmee nagenoeg alle handelingen kunnen worden uitgevoerd, in aanmerking. Het zal duidelijk zijn dat het verschil maakt of een bepaalde serie monsters iedere week, iedere maand of ieder jaar moet worden geanalyseerd. Hierbij geldt in principe hoe hoger de frequentie des te eerder er moet worden geautomatiseerd (Tabel V). Ten slotte is de complexiteit van de biologische matrix een belangrijke parameter. Hoe complexer de matrix des te eerder moet er geautomatiseerd worden om goed reproduceerbare resultaten te verkrijgen. Een en ander zal hieronder in meer detail besproken worden.

De monsterwisselaars, kraanschakeltechnieken, doorstroom- en robotsystemen hebben ieder hun eigen voor- en nadelen:

- Monsterwisselaar: kan een beperkt aantal handelingen (b.v. pipetteren, verdunnen, mengen, SPE) geautomatiseerd uitvoeren, is relatief goedkoop, flexibel en de ontwikkeling van een methode kost weinig tijd [20].
- Kolomschakeltechniek: door gebruik te maken van meerdere schakelkranen kunnen verschillende LC kolommen in serie of parallel worden gebruikt waardoor er veel mogelijkheden zijn om de selectiviteit, en daardoor de gevoeligheid, van het systeem te verbeteren, hoge reproduceerbaarheid, weinig flexibel omdat voor iedere toepassing

een eigen systeem moet worden gebouwd, ontwikkeling van een methode kost redelijk veel tijd [21].

- Doorstroomstelsel: in-lijn systeem waarmee één of twee handelingen (b.v. dialyse, verrijking) zeer reproduceerbaar kunnen worden uitgevoerd, flexibel, goedkoop, ontwikkeling van een nieuwe methode kost weinig tijd [16].
- Robotsysteem: kan in principe vergelijkbare handelingen verrichten als de mens, is niet sneller dan een mens maar kan langer werken en onder extreme condities, kostbaar, reproduceerbaar, flexibel, ontwikkeling van een nieuwe toepassing kost veel tijd [22].

LLE's worden vooral gebruikt bij de analyse van relatief kleine aantallen monsters [12]. De noodzakelijke selectiviteit wordt verkregen door de juiste keuze van extractievloeistof, pH en extractietechniek (b.v. ionpaar-, terugextractie). De belangrijkste beperkingen van LLE zijn dat er emulsies gevormd kunnen worden, dat de methode nogal tijdrovend is en dat er monsterverliezen tijdens het afdampen van de organische fase kunnen ontstaan. Een voordeel is dat in een aantal gevallen de LLE zowel voor denaturatie, voor isolatie als voor monsterverrijking gebruikt kan worden.

SPE is bij voorkeur geschikt voor het verwerken van gecompliceerde monsters, omdat hier gebruik gemaakt kan worden van combinaties van verschillende stationaire fasen [23]. Tevens zijn SPE procedures zeer geschikt voor de bepaling van lage concentraties (ng/ml). Ook in het sub-ng/ml gebied zijn de recoveries vaak boven de 80%.

Bij SPE wordt voornamelijk gebruik gemaakt van chemisch gemodificeerde silica fasen omdat hiermee goed reproduceerbare resultaten worden verkregen, ze een groot toepassingsgebied hebben en omdat er relatief veel over bekend is. Eén van de voordelen van het gebruik van SPE is dat deze methode zowel uit-lijn, geautomatiseerd, als in-lijn met de LC analyse kan worden uitgevoerd. Daar in de bioanalyse monsters met een volume van ongeveer 100 μ l tot 1 ml in bewerking moeten worden genomen, zijn SPE methoden tegenwoordig de meest gebruikte selectieve MVB techniek aan het worden in de

bio-analyse.

In een aantal gevallen kan de selectiviteit echter verbeterd worden door gebruik te maken van speciale fasen, zoals bij voorbeeld de metaal beladen fasen voor de isolatie van thiolen, of alumina voor de isolatie van catecholaminen (CA) [24].

CA zijn endogene verbindingen, die bij een pH > 8 selectief geadsorbeerd worden aan alumina en bij een pH < 5 gedesorbeerd. De geautomatiseerde analyse van CA wordt uitgevoerd op met perchloorzuur onteiwitte plasma monsters. Na introductie van het monster wordt met een bufferoplossing de juiste pH voor de adsorptie ingesteld. De CA worden geadsorbeerd aan het alumina in een kleine voorkolom. Nadat deze voorkolom voldoende is gewassen, worden de CA met een zure bufferoplossing gedesorbeerd en geanalyseerd op een omkeer-fase (RP) systeem en ten slotte gedetecteerd met behulp van elektrochemische detectie.

Een andere methode om de selectiviteit te verbeteren is door gebruik te maken van de combinatie van LLE en SPE. Het probleem bij de bio-analyse van relatief polaire verbindingen met behulp van RP-LC is dat er laat-eluerende pieken (b.v. vetzuren) in de chromatogrammen voorkomen. Deze hydrofobe verbindingen kunnen nu door middel van een voor-extractie met dichloormethaan of hexaan worden verwijderd waarna het monster gezuiverd en verrijkt kan worden met behulp van SPE [13].

Behalve de eerder besproken in-lijn dialyse technieken zijn de kolomschakeltechnieken in de bio-analyse van wezenlijk belang [21,25]. In aanvulling op eenvoudige monsterisolatie en monsterverrijking kunnen deze technieken gebruikt worden om door middel van meerkoloms LC de signaal-ruis verhouding te verbeteren door selectief de achtergrond te verminderen.

Een aardig voorbeeld is de 'heart-cutting' techniek, die zeer geschikt is voor de bepaling van farmaca in gecompliceerde matrices zoals lever en nier homogenaten. Deze techniek kan op twee manieren worden uitgevoerd: met twee identieke kolommen en twee verschillende loopmiddelen, of met twee verschillende

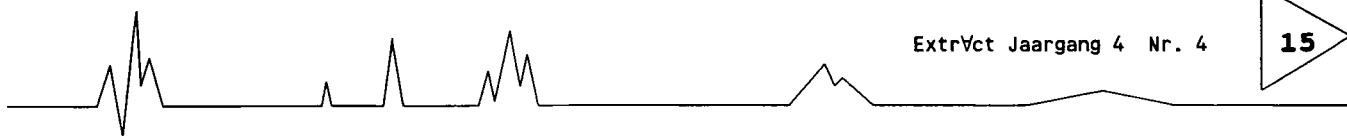
kolommen en één mobiele fase. Essentieel is echter dat er in eerste instantie verrijking op de top van de tweede kolom plaats vindt. Bij voorbeeld bij de analyse van chloramfenicol in nierweefsel wordt de eerste scheiding uitgevoerd op een 25 cm kolom [21]. De eerste eluensfractie van deze kolom wordt doorgepoeld naar het afvalvat, vervolgens worden er twee zesweg kranen geschakeld en wordt een chloramfenicol bevattende fractie naar een tweede 25 cm kolom gespoeld. Hierna worden de beide kranen weer in de oorspronkelijke positie gezet waardoor laat eluerende pieken van de eerste 25-cm kolom weer naar het afvalvat worden gespoeld en chloramfenicol op de tweede 25-cm kolom kan worden gekwantificeerd.

Samenvatting

De keuze van de meest geschikte LC methode zal over het algemeen samen met de keuze van het detectiesysteem op de minste problemen stuiten. Wel zullen in een aantal gevallen gradiënt-eluties en/of kolomschakeltechnieken moeten worden toegepast om de gewenste selectiviteit en/of gevoeligheid te verkrijgen. Aan de detectiekant wordt, afhankelijk van de vereiste bepalingsgrens, gekozen tussen absorptie, fluorescentie of elektrochemische detectie en in die gevallen dat ook structuurinformatie moet worden verkregen tussen diode-array en massaspectrometrische detectie.

Wat de MVB procedures betreft wordt onderscheid gemaakt tussen niet-selectieve en selectieve technieken. De voor de hand liggende niet-selectieve (initiële) technieken zijn: eiwit precipitatie, microgolfbestraling en invriezen voor het stilleggen van ongewenste enzymactiviteit; microgolfbestraling en vriesdrogen voor het bewaren en ontdoien van monsters; ultrafiltratie voor het bepalen van het percentage eiwitbinding en dialyse voor het kwantitatief verwijderen van eiwitten.

LLE is bij uitstek geschikt voor de selectieve MVB van een klein aantal monsters terwijl SPE gebruikt kan worden voor de selectieve MVB van grotere series monsters. Het ontwikkelen van kolomschakeltechnieken heeft alleen dan zin wanneer een grote serie monsters eenmalig moet worden geanalyseerd of



wanneer kleinere series frequent moeten worden bepaald. Het inzetten van robot-systemen is alleen zinvol wanneer een redelijk grote serie monsters, met hierin een aantal bewerkelijke en/of tijdrovende stappen, regelmatig moet worden doorgemeten.

Literatuur

- [12] H. Lingeman and U.R. Tjaden, in H. Lingeman and W.J.M. Underberg (Eds.), 'Detection-Oriented Derivatization Techniques in Liquid Chromatography', Dekker, New York, 1990.
- [13] H. Lingeman, G.W.M. Meussen, C. van der Zouwen, W.J.M. Underberg en A. Hulshoff, in E. Reid, B. Scales en I.D. Wilson (Eds.), 'Bioactive analytes, including CNS drugs, peptides and enantiomers', Plenum, Londen, 1986.
- [14] E.H. Taylor en B.H. Ackerman, J. Liq. Chromatogr., 10 (1987) 323.
- [15] J.A.F. de Silva, J. Chromatogr., 273 (1983) 19.
- [16] U.R. Tjaden, E.A. de Bruijn, R.A.M. van der Hoeven, C. Jol, J. van der Greef en H. Lingeman, J. Chromatogr., 420 (1987) 53.
- [17] H. Nielsen, J. Chromatogr., 381 (1986) 63.
- [18] A. Farjam, G.J. de Jong, R.W. Frei, U.A.Th. Brinkman, W. Haasnoot, A.R.M. Hamers, R. Schilt en F.A. Huf, J. Chromatogr., 452 (1988) 419.
- [19] I.H. Hagestam en P.C. Pinkerton, Anal. Chem., 57 (1985) 1757.
- [20] E.A. Hogendoorn, P. van Zoonen en U.A.Th. Brinkman, Chromatographia, 31 (1991) 285.
- [21] U.R. Tjaden, D.S. Stegehuis, H.J.E.M. Reeuwijk, H. Lingeman en J. van der Greef, Analyst, 113 (1988) 171.
- [22] J.V. Pivnichny, A.A. Lawrence en J.D. Stong, J. Chromatogr. Sci., 25 (1987) 181.
- [23] R.D. McDowall, J.C. Pearce en G.S. Murkitt, J. Pharm. Biomed. Anal., 4 (1986) 3.
- [24] H.J.E.M. Reeuwijk, H. Lingeman, J. de Jong, U.R. Tjaden en J. van der Greef, Anal. proc., 420 (1987) 301.
- [25] H. Irth, E.R. Brouwer, G.J. de Jong, U.A.Th. Brinkman en R.W. Frei, J. Chromatogr., 439 (1988) 63.