

P. HERNÉ

Université de Liège  
Institut de Pharmacie  
Laboratoire d'Analyse des Médicaments

# Détection spectrophotométrique indirecte en chromatographie liquide sur phases greffées

## Applications à l'analyse des médicaments

### RESUME

*En incluant à la phase mobile d'un système de chromatographie liquide à haute performance un constituant qui possède une forte absorption dans le domaine visible du spectre ou dans l'ultraviolet proche, il est possible, après les avoir séparés, de détecter indirectement et de quantifier des substances qui n'absorbent pas d'elles-mêmes à la longueur d'onde de mesure.*

*Les principes de cette «déttection indirecte» et les paramètres susceptibles de l'influencer ont été étudiés, et la méthode a été appliquée à la détermination qualitative et quantitative d'un grand nombre d'analytes entrant dans la composition de médicaments comme principes actifs ou comme excipients.*

### SUMMARY

**Indirect spectrophotometric detection in reversed-phase HPLC. Applications in drug analysis.**

*By inclusion of a high U.V. or visible-absorbing component to the mobile phase of a RP-HPLC system, it is possible, after they were separated by chromatography, to detect indirectly and to quantify analytes which do not themselves absorb at the*

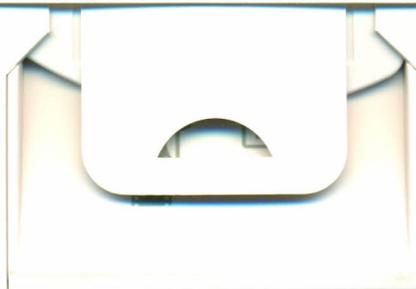
*detection wavelength. The principles of this «indirect detection», as well as the parameters which can influence it were studied, and the method was applied to the qualitative and quantitative determination of a lot of compounds used as active substances or as technological adjuvants in drugs.*

### INTRODUCTION

Si l'expérience a montré que la chromatographie liquide à hautes performances s'accorde d'un grand nombre de détecteurs, c'est cependant aux spectrophotomètres UV-visible que l'analyste a le plus souvent recours. La spectrophotométrie UV-visible est sensible et spécifique, mais elle est peu adéquate pour l'analyse des substances dont l'absorption au-dessous de 220 nm est nulle ou

très faible. C'est le cas de la plupart des molécules aliphatiques, comme les acides aminés, certains alcools, et la majorité de ce que nous avons appelé les substances grasses: alcools, acides, esters gras et glycérides.

Ce sont ces types de molécules qui ont constitué la cible privilégiée du travail que nous avons réalisé.



## FONDEMENTS THEORIQUES DE LA DETECTION INDIRECTE

La détection indirecte consiste en l'inclusion dans la phase mobile d'un système chromatographique d'un agent de détection possédant une forte absorption dans l'UV, particulièrement à une longueur d'onde où les interférences potentielles sont minimales. Grâce à cette substance, et par son intermédiaire, il sera dès lors possible de détecter des composés qui n'absorbent pas d'eux-mêmes à la longueur d'onde de mesure, après qu'ils aient été séparés par HPLC. Cet agent de détection, nous l'avons baptisé «émule».

Comment peut-on, en quelques mots, expliquer le phénomène de la détection indirecte?

Lorsque l'équilibre entre les phases stationnaire et mobile du système chromatographique est atteint, l'émule, comme tous les autres constituants de la phase mobile, est adsorbé sur la phase stationnaire, en quantité plus ou moins importante, selon son affinité pour cette phase et sa concentration dans l'éluant.

A ce moment, l'injection d'un analyte dans le système va provoquer des perturbations dans l'équilibre de l'émule, perturbations qui se manifesteront soit par le déplacement d'une certaine quantité de cet émule fixé sur le support, ce qui aboutit à un enrichissement local de la phase mobile en ce constituant, soit par l'adsorption d'une quantité supplémentaire d'émule sur le support, donc par un appauvrissement local de la phase mobile en cet agent de détection. Ces modifications locales de la concentration de l'émule absorbant se déplaceront le long de la colonne et, arrivées au détecteur, se traduiront par des pics positifs ou négatifs.

Par la suite, l'équilibre initial est rétabli plus ou moins rapidement par la phase mobile fraîche qui atteint la colonne, et cela grâce à des mouvements de solutés exactement contraires à ceux provoqués par l'injection de l'échantillon.

Grâce à l'émule donc, et même s'ils sont transparents à la longueur d'onde de mesure, chaque analyte retenu, et chaque composant retenu de l'éluant, y compris cet émule, est indirectement visualisé par un pic, grâce aux perturbations qu'il entraîne dans l'équilibre de l'agent de détection absorbant. La rétention de chacun des pics observés est caractéristique du composé qui en est directement responsable, et l'aire des pics des solutés est proportionnelle à la quantité injectée. Un chromatogramme obtenu par détection indirecte présentera donc autant de pics «solutés» que l'échantillon injecté contient d'analytes rete-



Figure 1. Détection indirecte de bases organiques sous forme ionisée. Pics «solutés» et pics «système».

Conditions opératoires.

Phase stationnaire: Nucléosil C 18 (3  $\mu$ )

Phase mobile: Nicotinamide  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M

Hexanesulfonate sodique  $2 \cdot 10^{-3}$  M

Na<sup>+</sup> 0,025 at. gr./L (sous forme de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)

H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M

Solutés: 1. Triéthanolamine 2. Ethylènediamine 3. Nicotinamide (pic système) 4. Pipéridine 5. Hexanesulfonate (pic système).

nus, et autant de pics appelés «système» que la phase mobile renferme de constituants retenus. Un exemple en est donné sur la figure 1, où des bases organiques retenues sous forme de paires d'ions avec l'hexanesulfonate sodique, sont détectées grâce à la nicotinamide. On observe bien un

pic pour chacun des analytes injectés, plus deux pics système, un pour la nicotinamide, le second pour l'ion hexanesulfonate.

Selon les phénomènes qui sont à la base de leur apparition (déplacement ou fixation accrue de l'émule à la phase stationnaire), et selon leur rétention par rapport à cet émule, les pics des analytes seront donc positifs ou négatifs, mais la somme de toutes les surfaces, affectées des signes des pics, sera nulle, ce qui traduit bien le retour du système à l'équilibre initial.

**Tableau I**  
Sens des pics obtenus par détection indirecte

Charge de l'analyte injecté (E)	Sens du pic soluté	
	$k'_E < k'_S$	$k'_E > k'_S$
Identique à S ou non chargé	positif	négatif
Opposée à S	négatif	positif

Ainsi (Tableau I), lorsque l'émule est ionisée, on constate expérimentalement qu'un analyte de même charge que lui, ou encore non chargé, apparaît sous la forme d'un pic positif s'il est élué avant l'émule, alors qu'il sera négatif si sa rétention est supérieure à celle de cet émule, c'est-à-dire si son facteur de sélectivité  $\alpha_s$  par rapport à l'émule (rapport des facteurs de capacité du soluté et de l'émule) est supérieur à 1. Ce schéma sera totalement inversé si la charge de l'analyte est opposée à celle de l'émule.

Pour la première fois, nous avons pu montrer que la détection indirecte est également possible avec un émule non ionisé. Dans la grande majorité des cas, le schéma de réponse obtenu est alors identique à celui qu'on observe lorsqu'analyte et émule sont des ions de même signe, soit des pics positifs avant le pic système de l'émule, et négatifs après. Cependant, dans certaines situations, et particulièrement avec des solutés très lipophiles, le sens des pics peut aussi être inversé.

Outre les règles régissant le sens des pics, nous avons constaté, en observant les chromatogrammes issus de la détection indirecte, que la sensibilité de cette détection ne dépendait que de deux paramètres:

- le facteur de sélectivité des analytes par rapport à l'émule;
- la concentration de l'émule sur la phase stationnaire.

La figure 2 montre que la sensibilité de détection, représentée par le paramètre  $\epsilon^x$  (qui est l'absorp-

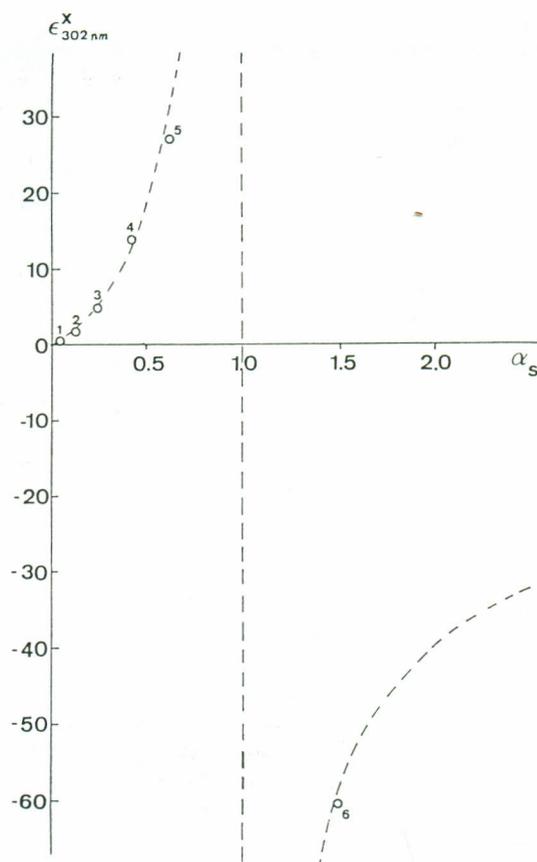


Figure 2. Influence du facteur de sélectivité sur la sensibilité de détection des solutés non ionisés.

Conditions opératoires.

Phase stationnaire: Nucléosil C 18 (5  $\mu$ )

Phase mobile: Salicylamide  $3 \cdot 10^{-4}$  M

Méthanol 10 % v/v

Eau 90 % v/v

Solutés: 1. Acétonitrile 2. N, N-diméthylformamide 3. Formiate d'éthyle 4. Isobutanol 5. Acétate d'éthyle 6. 1-pentanol. En pointillé, la courbe calculée à partir de la régression des valeurs expérimentales.

tion molaire apparente du soluté à la longueur d'onde de mesure, c'est-à-dire l'absorption molaire que l'émule lui confère indirectement), est d'autant meilleure que la rétention de l'analyte est proche de celle de l'émule, c'est-à-dire que le facteur de sélectivité est proche de 1. Elle décroît rapidement lorsque l'analyte et l'émule s'éloignent l'un de l'autre. En pratique, nous avons mis en évidence une proportionnalité entre la sensibilité et le rapport  $\alpha_s/1 - \alpha_s$ .

D'autre part, dans toutes les expérimentations auxquelles nous nous sommes livrés, nous avons constaté que la sensibilité de détection des analy-

**Tableau II**  
**Choix de l'émule, d'après la nature des analytes étudiés**

Nature des analytes	Phase stat.	Composition globale de la ph. mobile	Emule choisi	Longueur d'onde de détection
Substances cationiques hydrophiles	C 18	Tampon de pH acide + agent d'appariement anionique	Nicotinamide	260 - 280 nm
Substances cationiques moins polaires	C 18	Tampon de pH acide- peu de méthanol	L - DOPA	250 - 260 nm
Sucres et Polyols	amine	Mélanges AcCN - Méthanol - Eau	Arbutoside	vers 280 nm
Molécules non ionisées très polaires	C 18	Eau - pas ou peu de méthanol (évent. Tampon de pH acide)	Nicotinamide	260 - 280 nm
Molécules non ionisées polaires	C 18 ou Phényle	Eau - jusqu'à 30 % de méthanol (évent. Tampon de pH acide)	Salicylamide	290 - 315 nm
Molécules non ionisées moins polaires	C 18 ou Phényle	Eau - jusqu'au 85 % de méthanol (évent. Tampon de pH acide)	Phénanthrène	260 - 300 nm
Molécules non ionisées peu polaires	C 18 ou Phényle	Eau - 85 à 100 % de méthanol (évent. Tampon de pH acide)	Cholécalciférol	260 - 300 nm
Molécules non ionisées apolaires	C 18	Méthanol - 0 à 20 % de chloroforme	$\beta$ - carotène	vers 430 nm

tes était proportionnelle à la concentration de l'émule sur la phase stationnaire.

Toutes les modifications que l'on peut faire subir à la phase mobile pour améliorer la sensibilité de détection le font en influençant soit le facteur de sélectivité de l'analyte, soit la concentration de l'émule sur la phase stationnaire. D'une façon générale, on peut dire que

- une augmentation de la concentration en émule dans la phase mobile améliorera la sensibilité de détection essentiellement en accroissant la concentration de cet émule sur la phase stationnaire;
- l'addition d'un modificateur organique, comme le méthanol ou l'acétonitrile, à la phase mobile, décroît cette concentration et rend la détection moins sensible;
- lorsque l'émule et les analytes sont ionisés, l'addition d'ions (constituants du tampon, agents d'appariement d'ions, etc.) sera susceptible d'influencer les deux paramètres.

Selon l'ionisation de l'émule, ils modifieront en effet son adsorption sur le support; selon sa nature et celle des analytes, ils pourront provoquer des variations dans le facteur de sélectivité de ceux-ci. Dans les deux cas, la sensibilité de détection s'en ressentira, d'une façon tantôt positive, tantôt négative.

Lorsqu'on assortit la H.P.L.C. d'une détection indi-

recte, le choix de l'émule revêt une grande importance. Nous avons proposé un choix de plusieurs émules (Tableau II) qui couvrent un large éventail de polarités. Chacune de ces substances convient plus particulièrement à la détection d'un type d'analytes déterminé. Nous avons entre autres sélectionné:

- l'arbutoside, ou hydroquinone- $\beta$ -D-glycopyranoside, pour les sucres et polyols particulièrement polaires, séparés sur colonne aminopropyle;
- le nicotinamide, en milieu acide pour les acides aminés et les bases ionisées hydrophiles retenus sur colonne C 18 sous forme de paires d'ions, ou encore en milieu neutre, pour les composés non ionisés particulièrement peu retenus (alcools de faible poids moléculaire,...);
- le salicylamide pour les composés non ionisés un peu moins polaires, qu'on visualisera ainsi vers 300 nm;
- le cholécalciférol, pour les substances grasses classiques (acides, alcools et esters gras);
- enfin, pour les triglycérides, pratiquement apolaires, le bêta-carotène, composé coloré en orangé, qui permet la détection indirecte vers 450 nm.

Comme on peut le voir sur le tableau II, cette liste n'est évidemment pas limitative.

#### APPLICATIONS A L'ANALYSE DES MEDICAMENTS

Nous avons utilisé la technique de la détection indirecte pour analyser, tant qualitativement que

quantitativement, une grande variété de substances chimiques, que nous avons choisies parce



qu'elles pouvaient entrer dans la composition de médicaments, soit en tant que principes actifs, soit en tant qu'excipients. Voici un échantillon des résultats auxquels nous sommes parvenus.

Dans la catégorie des substances ionisées, c'est d'abord aux acides aminés que nous nous sommes intéressés. Avec un nombre de phases mobiles limité, et une colonne C 18, nous sommes parvenus à la détecter tous de manière indirecte, et à les quantifier dans plusieurs spécialités pharmaceutiques. Nous avons dû cependant faire la distinction entre les acides aminés nettement

polaires et ceux qui le sont moins. Les seconds peuvent être chromatographiés sous forme de paire d'ions avec l'acide perchlorique (Fig. 3) et visualisés grâce à la L-Dopa, qui est elle-même un acide aminé diphénolique qui absorbe dans l'U.V. Par contre (Fig. 4), pour avoir un temps de rétention suffisant, les acides aminés polaires requièrent l'addition à la phase mobile d'un agent d'appariement d'ions anionique. Dans l'exemple de cette figure, qui montre la séparation de 8 de ces acides aminés polaires, c'est à l'octylsulfate sodique que nous avons accordé notre préférence. L'émule est ici le nicotinamide, qui permet la détection aux environs de 260 nm.

La figure 5 montre le même émule, cette fois non ionisé, servant à la détection de deux alcools inférieurs, l'isopropanol et le propylèneglycol, employés comme excipients dans une préparation

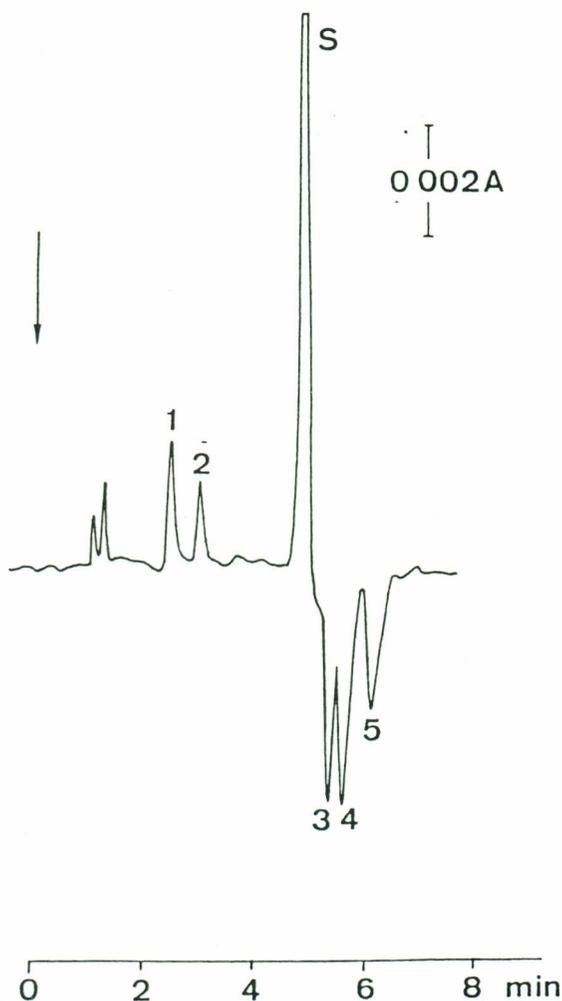


Figure 3. Détection indirecte d'acides aminés peu polaires.  
Conditions opératoires.

Phase stationnaire: Nucléosil C 18 ( $5 \mu$ )

Phase mobile: L - DOPA  $2 \cdot 10^{-4}$  M

HClO<sub>4</sub> 0,02 M

$\lambda$  de détection: 254 nm

Solutés: 1. Valine 2. Méthionine 3. Isoleucine 4. Leucine  
5. Norleucine S. L-DOPA (pic système).

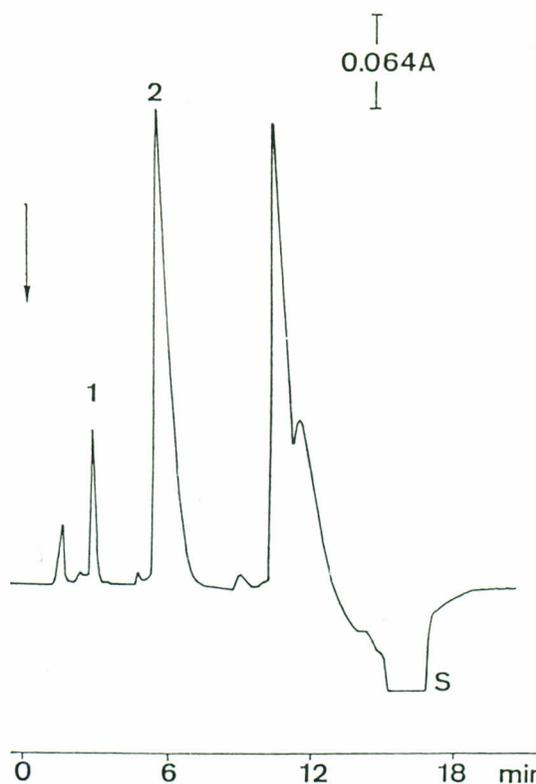


Figure 5. Détection et quantification d'alcools et de polyols aliphatiques.

Conditions opératoires.

Phase stationnaire: Nucléosil C 18 ( $3 \mu$ )

Phase mobile: Nicotinamide  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M dans l'eau.

$\lambda$  de détection: 262 nm

Solutés: 1. Propylèneglycol 2. Isopropanol S. Nicotinamide (pic système).

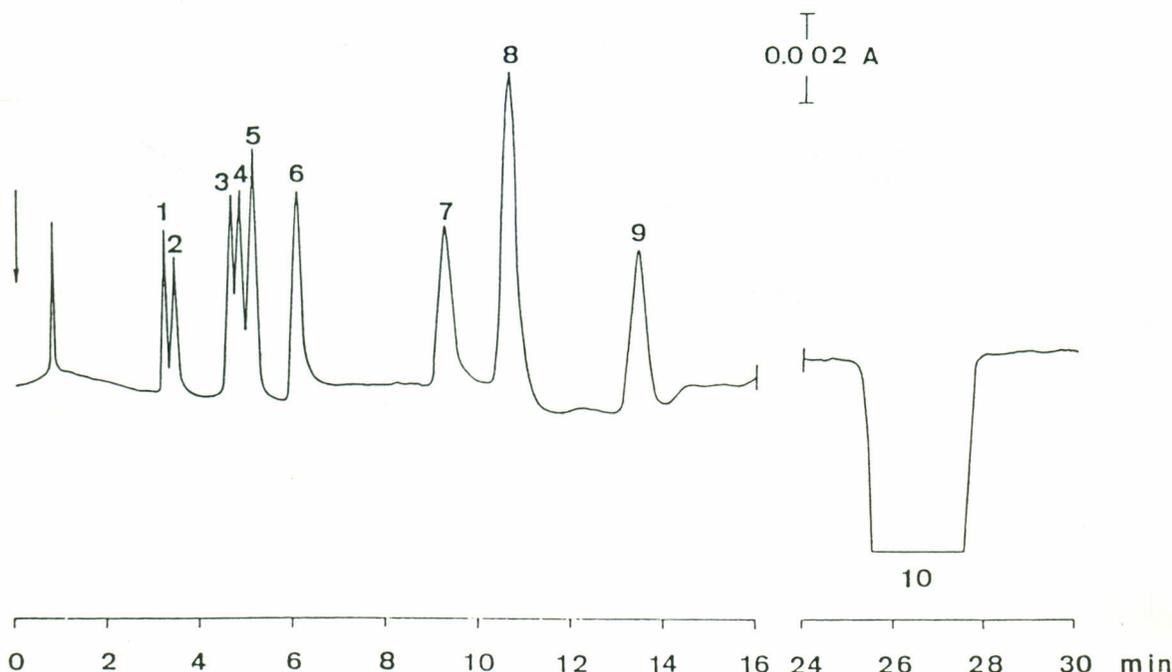


Figure 4. Détection indirecte d'acides aminés hydrophiles.

Conditions opératoires.

Phase stationnaire: Ultrasphère ODS ( $5 \mu$ )

Phase mobile: Nicotinamide  $2 \cdot 10^{-4}$  M

n-Octylsulfate sodique  $10^{-3}$  M

$H_3PO_4$  0,05 M

$\lambda$  de détection: 254 nm

Solutés: 1. Glycine 2. Acide aspartique 3. Thréonine 4. Acide glutamique 5. Alanine 6. Cystéine 7. Proline 8. Acide  $\alpha$ -aminobutyrique 9. n-Octylsulfate (pic système) 10. Nicotinamide (pic système).

pharmaceutique à usage dermatologique. Cet exemple fait ressortir un des avantages de la détection indirecte, à savoir la facilité de sa réalisation pratique. L'échantillon complexe a été injecté directement après dilution dans la phase mobile, sans qu'aucune extraction préalable n'ait été nécessaire. Cette phase mobile, d'ailleurs, est simplement une solution de nicotinamide dans l'eau.

Le propylène glycol, ainsi que la glycérine et certains hydrates de carbone encore plus polaires, peuvent aussi être séparés sur une phase stationnaire de type aminopropyle (Fig. 6), qui se comporte comme une phase classique, et retient d'autant plus les analytes que ceux-ci sont polaires. Si on inclut à une phase mobile faite d'un mélange d'acétonitrile et d'eau, un hétéroside polaire et absorbant dans l'U.V. comme l'arbutoside, les polyols et les hydrates de carbone peuvent être détectés indirectement, et apparaissent sous forme de pics positifs avant le pic de l'arbutoside, et négatifs après.

Dans le domaine des molécules non ionisées, c'est avec une sensibilité très élevée que nous sommes parvenus à doser le cholestérol (Fig. 7) qui, sur colonne phényle, est élué juste après le cholécalférol, qui tient le rôle de l'émulse. La longueur d'onde de mesure (295 nm) n'engendre que peu d'interférences, ce qui, joint à la sensibilité très grande, fait de notre méthode une méthode de choix pour le dosage de cet important alcool, méthode qui pourrait même probablement être appliquée aux milieux biologiques.

Outre le cholestérol, nous avons consacré une part importante de nos recherches aux substances dites grasses, c'est-à-dire aux alcools, acides et esters aliphatiques à longue chaîne carbonée, y compris les triglycérides.

La plupart des substances grasses, à l'exception des triglycérides, peuvent être détectées de manière indirecte si on utilise comme émulse le cholécalférol, et comme solvant d'éluion un mélange de méthanol (au moins 90 % v/v) et d'acide phosphorique 0,05 M, de manière à main-

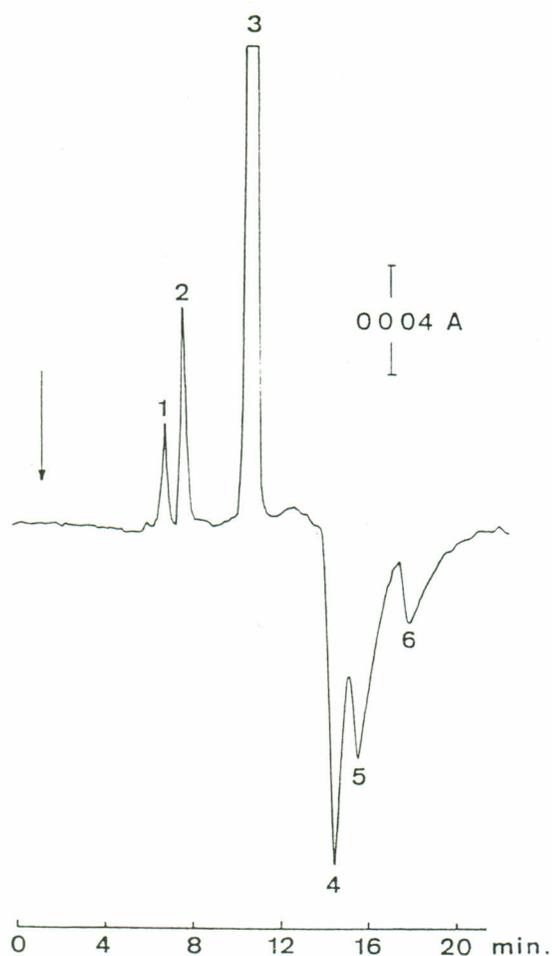


Figure 6. Séparation et détection indirecte d'hydrates de carbone et de polyols.

*Conditions opératoires.*

Phase stationnaire: Nucléosil  $\text{NH}_2$  ( $10 \mu$ )

Phase mobile: Arbutoside  $2,5 \cdot 10^{-4}$  M

Acétonitrile 50 % v/v

Méthanol 50 % v/v

$\lambda$  de détection: 283 nm

Solutés: (25 - 75  $\mu\text{g}$ ): 1. Ethylène glycol 2. Glycérol 3. Arbutoside (pic système) 4. Sorbose 5. Fructose 6. Sorbitol.

tenir les acides sous forme non ionisée. La figure 8 montre le chromatogramme que l'on obtient en injectant, dans une colonne C 18, les acides gras obtenus par saponification et extraction chloroformique d'une masse pour suppositoires. Les quatre acides gras principaux intervenant dans la composition de cette masse sont les acides laurique, myristique, palmitique et stéarique. Il en est ainsi de la plupart des «*adeps solidus*» du marché belge, dont nous avons fait une étude exhaustive. Ils ne se différencient l'un de l'autre, de ce



Figure 7. Détection indirecte du cholestérol sur colonne Phényle.

*Conditions opératoires.*

Phase stationnaire: Nucléosil Phényle ( $7 \mu$ )

Phase mobile: Cholécalférol  $2 \cdot 10^{-4}$  M

$\text{H}_3\text{PO}_4$  0,05 M 20 % v/v

Méthanol ad 100 %

$\lambda$  de détection: 295 nm

Solutés: 1. Cholestérol (5  $\mu\text{g}$ ) ( $\epsilon^x$  6400) 2. Cholécalférol (pic système).

point de vue, que par la proportion de chacun de ces acides gras. En règle générale, plus le point de fusion de la masse considérée est élevé, moins la fraction laurique est importante.

Les triglycérides, qu'ils soient saturés comme dans les masses pour suppositoires, ou insaturés comme dans les huiles alimentaires, sont trop lipophiles pour être élués d'une colonne octadécyle dans les mêmes conditions opératoires. Ils obligent à recourir à des phases mobiles constituées de méthanol contenant entre 5 et 20 % (v/v) de chloroforme, et à un émule particulièrement peu polaire, le bêta-carotène, qui a l'avantage d'avoir une absorption très importante dans le visible (Fig. 9). Dans ce cas, le sens des pics est inversé:

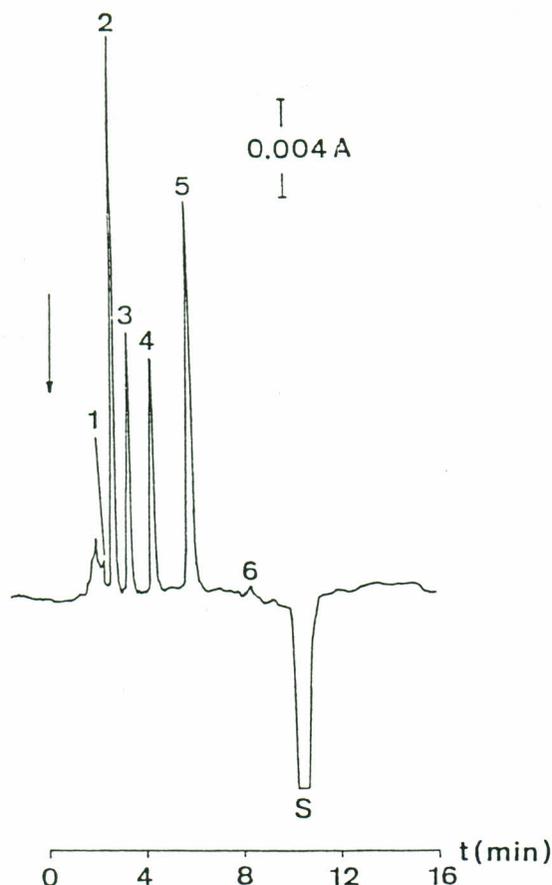


Figure 8. Séparation des acides gras présents dans le résidu de saponification d'une masse pour suppositoires (Witepsol W 45).

Conditions opératoires.

Phase stationnaire: Lichrospher C 18 ( $5 \mu$ )

Phase mobile: Cholécalficérol  $2.10^{-4}$  M

Méthanol 95 % v/v

$H_3PO_4$  0,05 M 5 % v/v

$\lambda$  de détection: 295 nm

Débit: 0,7 ml/min.

Solutés: 1. Acide caprique 2. Acide laurique 3. Acide myristique 4. Acide palmitique 5. Acide stéarique 6. Acide arachidique.

S. Cholécalficérol (pic système).

ils sont négatifs avant le pic système de l'émule, et positifs après. Ceci suggère que le mécanisme qui est à la base de cette détection indirecte est lui aussi différent.

Les conditions opératoires que nous avons développées, et qui sont une fois de plus très aisées à reproduire en pratique, sont parmi les plus simples et les plus fiables de toutes celles qui ont été proposées pour l'analyse des triglycérides. Elles doivent par exemple permettre de vérifier sans

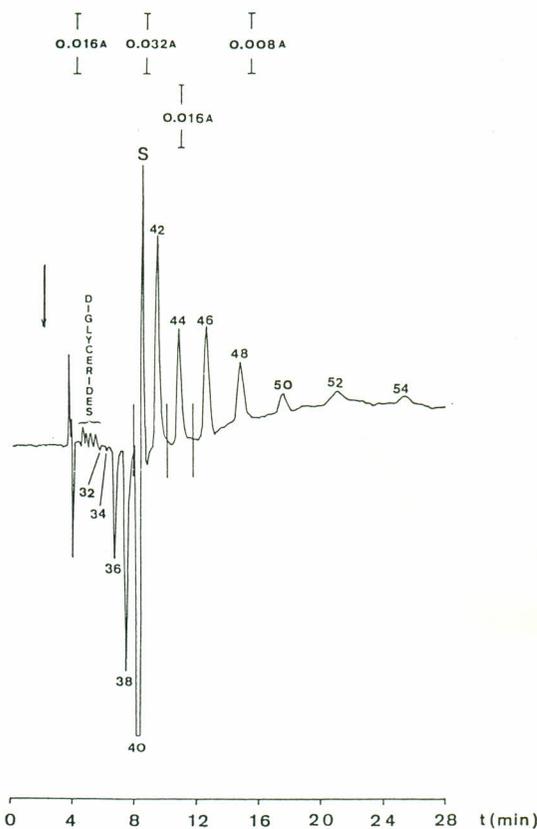


Figure 9. Séparation des di- et triglycérides d'une masse pour suppositoires.

Conditions opératoires.

Phase stationnaire: Lichrospher C 18 ( $5 \mu$ )

Phase mobile:  $\beta$ -carotène  $10^{-5}$  M

Eau 0,2 % v/v

Chloroforme 20 % v/v

Méthanol ad 100 %

$\lambda$  de détection: 432 nm

Injection: 250  $\mu$ g de masse (ici, Witepsol W 35).

problème la reproductibilité des méthodes de fabrication des graisses semi-synthétiques et même, si besoin est, de déceler et d'identifier les falsifications des huiles alimentaires, d'une façon plus sûre et beaucoup plus rapide que ne le feraient les méthodes physiques et chimiques traditionnelles.

Nous sommes par exemple parvenus à quantifier chacun des constituants de différents mélanges de triglycérides, sans avoir besoin d'injecter des substances de référence, en nous basant uniquement sur la relation existant entre la concentration en bêta-carotène sur la phase stationnaire, le facteur de sélectivité de ces constituants, et la sensibilité de leur détection.

## CONCLUSION

Pour conclure, nous dirons qu'au moment où nous avons commencé à nous y intéresser, la détection indirecte, associée à la CLHP en phases inversées, en était à ses tout débuts.

Nous avons contribué à en préciser les règles générales, notamment dans le cas où la phase mobile contient d'autres constituants retenus que l'émule. Novateurs en matière d'utilisation d'émules non ionisés, nous avons mis en évidence les deux schémas de réponse, inverses l'un de l'autre, qu'on peut observer dans ce cas. Après avoir défini les conditions d'apparition de ces deux schémas, nous avons émis l'hypothèse que si l'un est dû à des phénomènes de compétition entre analytes et émule, c'est plutôt à une complexation de ces deux espèces l'une par l'autre qu'il faut imputer l'autre.

Nous avons découvert, pour la sensibilité de

détection d'analytes aussi bien chargés que non chargés, l'importance de la concentration de l'émule sur la phase stationnaire, et nous avons étudié, dans les deux cas, l'influence des différents composants de la phase mobile sur cette concentration, ainsi que sur le facteur de sélectivité des analytes, l'autre paramètre déterminant dans la sensibilité de détection.

Enfin, nous avons démontré par toute une série d'exemples pratiques que la détection indirecte, couplée à la CLHP, est une méthode simple, fiable et générale pour l'identification et surtout le dosage des substances de faible absorption dans l'ultraviolet ou le visible. Une méthode qui, à notre avis, recule encore les frontières du domaine d'application de la chromatographie liquide à haute performance.

## REMERCIEMENTS

Il nous est agréable de remercier tous ceux qui nous ont permis de mener à bonne fin ce travail et tout particulièrement:

Monsieur le Professeur J. Bosly,

Messieurs J. Crommen et J. Bonnard, Docteurs en Sciences Pharmaceutiques,  
Et tout le Service d'Analyse des Médicaments de l'Université de Liège.

*Cet exposé résumant le travail ayant obtenu le prix de la Société Belge des Sciences Pharmaceutiques a été présenté lors de l'Assemblée générale du 14 avril 1989.*

P. HERNÉ  
Institut de Pharmacie  
Laboratoire d'analyse des médicaments  
5, rue Fusch  
4000 Liège

## BIBLIOGRAPHIE SUCCINCTE

J. CROMMEN et P. HERNÉ, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **2** (1984) 241.

P. HERNÉ, M. RENSON et J. CROMMEN, *Chromatographia*, **19** (1984) 274.

J. CROMMEN, G. SCHILL et P. HERNÉ, *Chromatographia*, **25** (1988) 397.

G. SCHILL et J. CROMMEN, *Trends in Anal. Chem.*, **6** (1987) 111.

J. CROMMEN, in «CRC Handbook of H.P.L.C. for the Separation of Aminoacids, Peptides and Proteins», Volume I, pp. 175-185, William S. Hancock Ed., CRC Press, Boca Raton, Florida (1984).

J. CROMMEN, G. SCHILL et L. HACKZELL, *Chromatographia*, **24** (1987) 252.

E. ARVIDSSON, L. HACKZELL, G. SCHILL et D. WESTERLUND, *Chromatographia*, **25** (1988) 430.

P. HERNÉ, Thèse de Doctorat, Liège, 1988.