

PEMISAHAN KROMATOGRAFI PADA FASA TERIKAT DIOL

Julia Kantasubrata

Pusat Penelitian dan Pengembangan Kimia Terapan - LIPI
Jalan Cisit - Sangkuriang, Bandung 40135

INTISARI

Tidak semua pemisahan kromatografi dapat dilakukan pada silika dan alumina, oleh sebab itu dikembangkan fasa terikat yang dibuat dengan jalan mereaksikan organoklorosilan pada gugus-gugus silanol dari silika.

Fasa terikat diol termasuk salah satu perkembangan baru dari fasa terikat polar yang dibuat dengan mereaksikan gugus silanol dari silika dengan GOX (glisidoksipropiltrimetoksisilan). Jenis fasa terikat ini lebih banyak mempunyai aplikasi dalam TLC dan HPLC fasa normal, sedang dalam HPLC fasa terbalik mempunyai keterbatasan karena sifatnya yang mudah mengembang dalam kolom dengan eluen yang mengandung air. Bergantung dari jenis senyawa yang dipisahkan, ikatan hidrogen, kerapatan elektron dan kebasaaan memainkan peranan penting dalam mekanisme interaksi kromatografi dari fasa diol. Penerapannya pada pelat TLC memungkinkan fasa diol dipakai dalam analisa bidimensional. Selain itu dibahas pula aplikasi fasa terikat diol, baik untuk pemisahan senyawa dengan berat molekul besar secara ekslusi, maupun untuk pemisahan senyawa organik sederhana seperti kelompok steroid dengan mekanisme kromatografi fasa normal.

ABSTRACT

Chromatographic separation could not all be done on silica and alumina, therefore bonded phases have been developed by reacting organochlorosilane with the silanol group of silica. One of the new development of polar bonded phase is diol phase, which is prepared by reacting the silanol group of silica with GOX (glycidoxypropyltrimethoxysilane). Diol phase is widely applied in TLC and normal phase HPLC. In reversed phase HPLC, its application is limited, since with eluent containing water, it easily swelled. Depending on the solute being separated, hydrogen bond, electron density and basicity play an important role in the retention mechanism. Its application on TLC plate make it possible to be used in bidimensional analysis. The application of diol phase is also discussed, either for the exclusion separation of solutes with large molecular weight or for the separation of simple organic compounds such as steroids with normal phase chromatography mechanism.

PENDAHULUAN

Pemakaian silika sebagai fasa diam pada pemisahan kromatografi terdesak sedikit demi sedikit oleh adanya perkembangan fasa terikat. Fasa terikat tak polar dari jenis

Si-O-Si-R (R = C₁₈) menjadi sangat populer dewasa ini. Jenis fasa diam ini hanya memerlukan pelarut hidroorganik (campuran air-asetonitril, air-alkohol) yang relatif murah sebagai eluen. Akhir-akhir ini perhatian para kimiawan mulai diarahkan juga pada pemakaian fasa terikat polar dari jenis Si-O-Si-(CH₂)₃-NH₂ (amina), Si-O-Si-(CH₂)₃-C≡N (siano) dan Si-O-Si-(CH₂)₃-OCH₂-CH(OH)-CH₂(OH)(diol).

Pemakaian fasa diol pada mulanya hanya ditujukan untuk kromatografi ekslusi dari berbagai biopolimer seperti protein, enzim dan polisakarida. Baru pada kira-kira tahun 1982, mulai diteliti kemungkinan penggunaan fasa diam diol untuk kromatografi fasa normal dan kromatografi fasa terbalik pada pelat (TLC) maupun kolom (HPLC). Makalah ini akan menguraikan sifat retensi daripada fasa diol dibandingkan terhadap silika, aplikasinya pada berbagai pemisahan kromatografi dan mekanisme retensi yang terjadi pada pemisahan-pemisahan tersebut.

PEMBUATAN FASA TERIKAT DIOL

Fasa terikat diol dapat diperoleh baik dalam bentuk polimer maupun monomer tergantung bentuk mana yang kita inginkan. Dalam hal ini gugus-gugus silanol dari permukaan silika direaksikan dengan GOX (glisidoksipropiltrimetoksisilan) dalam toluen yang sedikit mengandung air (akan diperoleh bentuk polimer) atau dalam toluen anhidrat (akan diperoleh bentuk monomer) (1).

Cara yang paling sederhana dalam membuat pelat diol untuk keperluan kromatografi lapisan tipis adalah dengan jalan menebarkan fasa diam diol yang biasa disediakan untuk keperluan HPLC, berupa lapisan tipis diatas suatu pelat gelas (2). Tetapi untuk keperluan-keperluan tertentu seperti misalnya pada kromatografi lapisan tipis tekanan tinggi, pelat yang dihasilkan melalui cara ini tidak mempunyai kerapatan dan keseragaman "packing" yang cukup baik. Pelat diol dengan kualitas yang lebih baik dapat dibuat dengan jalan mereaksikan pelat silika komersial (Si60 MERCK) dengan pereaksi GOX (FLUKA). Proses pembuatannya melalui beberapa tahap pengerjaan, antara lain: Pelat silika yang akan diubah menjadi pelat diol diaktifkan dulu sebelumnya di dalam oven 110° C

Sebagian dari makalah ini telah dipresentasikan pada Temu Ilmiah Himpunan Kimia Indonesia, Surabaya, 18 November 1986.

selama 12 jam. Pelat tersebut kemudian direaksikan dengan pereaksi GOX (1,36 mol/l dalam pelarut THF/toluen anhidrat 50:50), dengan jalan mengelusinya sebanyak 2 kali, dengan 2 arah yang berlawanan (arah elusi ke 2 tegak lurus arah elusi pertama). Elusi dilakukan dalam bejana kromatografi dan selama elusi, bejana diletakkan di dalam suatu desikator. Silika dibiarkan bereaksi dengan pereaksi GOX di dalam oven pada temperatur 110° C selama 12 jam. Pelat kemudian dicuci dengan toluen, toluen/THF 50:50 dan asetonitril/air 90:10 masing-masing sebanyak 2 kali dengan arah tegak lurus satu sama lain. Terakhir kali pelat dielusi sebanyak 2 kali dengan larutan HNO₃ pH 2, dengan 2 arah yang saling tegak lurus dan kemudian dibilas dengan air dan dikeringkan kembali dalam oven pada temperatur 110°C selama 12 jam. Melalui cara ini dapat dihasilkan pelat diol dengan kerapatan "packing" yang cukup tinggi dan homogenitas permukaan yang cukup baik.

DAYA RETENSI PELAT DIOL

Umumnya untuk menguji daya retensi suatu pelat, digunakan campuran "test desaga" yang terdiri dari indofenol biru, sudan merah dan sudan kuning. Daya retensi pelat diol dalam hal ini dibandingkan terhadap daya retensi pelat silika dan NH₂, dalam kondisi standar yang diusulkan oleh Vernin (3). Ternyata fasa diol mempunyai daya retensi yang lebih kecil dari silika dan NH₂, walaupun jika dibandingkan hanya terhadap pelat NH₂, perbedaan tersebut tidak terlalu besar (2).

Pada pelat silika, dengan heksan sebagai eluen, tidak ada satupun dari ketiga komponen "test desaga" yang bergerak dari tempat penotolan. Sedangkan pada pelat diol, dapat diperoleh data sebagai berikut : Rf noda kuning = 0,40, Rf noda warna merah = 0,20 dan Rf noda biru = 0,17. Angka tersebut relatif tinggi dibandingkan dengan data Rf yang diperoleh dengan kondisi yang sama dari pelat NH₂ (Rf noda kuning = 0,11, Rf noda merah = 0,06 dan Rf noda biru = 0,04)

Selanjutnya untuk pelat diol sendiri, dengan menggunakan zat warna lipofil dan hidrofili dapat dicatat data-data sebagai berikut. Dengan heksan sebagai eluen, zat warna lipofil bermigrasi, sedangkan zat warna hidrofili tetap tinggal pada tempat penotolan. Jika heksan kita ganti dengan air, zat warna lipofil tidak bermigrasi sedangkan zat warna hidrofili bergerak dari tempat penotolan. Kenyataan ini memberi kemungkinan untuk menggunakan pelat diol dalam analisa bidimensional dan diharapkan dengan terbukanya kemungkinan tersebut diatas, pelat diol dapat dipakai untuk memisahkan campuran komponen cuplikan yang sangat kompleks.

MEKANISME RETENSI PADA FASA DIOL

Pada fasa diol yang diharapkan memegang peranan dalam mekanisme retensi kromatografi adalah gugus-gugus fungsi OH dari diol. Interaksi utama diharapkan terjadi antara gugus-gugus OH dari fasa diam dengan gugus-gugus fungsional dari komponen cuplikan. Dalam mempelajari interaksi kromatografi dari fasa diol telah diambil contoh pemisahan senyawa fenol, steroid, basa *xanthine* dan poliaromatik hidrokarbon (4,5,6).

Fenol yang mempunyai gugus OH dapat diambil sebagai contoh yang paling sederhana dalam mempelajari mekanisme retensi pada fasa diol. Dari data retensi beberapa senyawa

fenol pada kolom diol dengan eluen isooktan/kloroform 50:50 (4) dapat ditarik kesimpulan bahwa untuk golongan senyawa ini yang memegang peranan penting dalam interaksi kromatografi adalah ikatan hidrogen antara gugus OH dari fenol dengan gugus OH fasa diol. Kuat lemahnya ikatan hidrogen dipengaruhi oleh adanya gugus substitusi pada kedudukan meta atau para dari molekul fenol.

Gugus pendorong elektron memperlemah ikatan hidrogen ($k' \text{ p-cresol} = 1,40$ dibandingkan terhadap $k' \text{ fenol} = 1,84$) (k' adalah faktor kapasitas yang merupakan ukuran retensi suatu komponen dalam kolom; $k' = t_r - t_0/t_0$), sedangkan gugus penarik elektron memperkuat ikatan tersebut dan sebagai akibatnya senyawa dengan gugus penarik elektron relatif lebih tertahan kuat pada kolom. Diambil sebagai contoh p-fluorofenol ($k' = 2,35$), p-bromofenol ($k' = 2,53$), p-klorofenol ($k' = 2,53$) dan p-nitrofenol ($k' = 5,40$). Tidak diberikan data mengenai pengaruh gugus substitusi pada posisi ortho, tetapi dapat diduga bahwa adanya gugus yang relatif besar dalam kedudukan ortho akan menimbulkan efek sterik terhadap interaksi kromatografi.

Berbagai macam steroid telah dicoba dipisahkan diatas suatu pelat diol menggunakan 3 macam eluen yaitu: heptan/isopropanol 80:20, trikloretilen dan karbontetraklorida (2). Estrone dan testosterone yang mempunyai gugus hidroksil merupakan senyawa-senyawa yang relatif paling ditahan didalam kolom (Rf nya berturut-turut 0,12 dan 0,15). Untuk senyawa steroid yang tidak mempunyai gugus hidroksil seperti progesterone (Rf = 0,62), Androsterone (Rf = 0,26) dan 5-Androstene-17-one (Rf = 0,22), interaksi kromatografinya ditentukan oleh besarnya kerapatan elektron disekitar atom yang mungkin membentuk ikatan hidrogen dengan fasa diol. Progesterone yang mempunyai gugus CH₃ sebagai gugus pendorong elektron merupakan senyawa yang ditahan paling lemah, karena sama halnya seperti pada senyawa fenol, terdapatnya gugus pendorong elektron akan memperlemah ikatan hidrogen yang terbentuk. Data Rf yang dikemukakan diperoleh dengan menggunakan trikloretilen sebagai eluen.

Tiga senyawa yang paling penting dari golongan basa *xanthine* adalah theophylline, theobromine dan kafein. Datas pelat diol dapat dihasilkan pemisahan yang sempurna dari ketiganya dengan menggunakan metil tertierbutil eter sebagai eluen (2). Pemisahan dari kelompok senyawa ini didasarkan pada sifat kebasaaan, jadi dalam hal ini terdapat interaksi antara gugus fungsi alkohol dari fasa diol yang sedikit bersifat asam dengan senyawa dari golongan basa *xanthine*. Kafein yang kebasaaannya paling kecil memberikan angka Rf yang paling besar (Rf = 0,75). Sedangkan untuk senyawa theophylline dan theobromine yang sifat kebasaaannya hampir sama, perbedaan retensi diterangkan lewat gugus substitusi yang terdapat pada atom N dari lingkaran benzen. Terdapatnya 2 gugus pendorong elektron (CH₃) pada atom N untuk senyawa theophylline, memperlemah ikatan hidrogen yang terbentuk antara senyawa tersebut dengan fasa diol. Sebagai akibatnya theobromine (Rf = 0,37) lebih ditahan kuat dibandingkan theophylline (Rf = 0,50).

Dari data harga Rf berbagai senyawa anilin pada pelat diol (5) dapat dikatakan bahwa prinsip dasar pemisahan anilin pada fasa diol adalah interaksi elektron antara pasangan elektron bebas dari atom N dengan atom H dari gugus OH pada fasa diol. Jadi dalam hal ini yang memegang peranan penting pada interaksi kromatografi adalah kerapatan elektron disekitar atom N. Makin besar kerapatan elektron tersebut, senyawa

makin tertahan kuat pada fasa diam. Hal ini ditunjukkan dengan jelas pada data retensi senyawa 4-kloroanilin ($R_f = 0,19$), 3-kloroanilin ($R_f = 0,24$) dan 2-kloroanilin ($R_f = 0,46$). Tetapi meskipun demikian, hal tersebut hanya berlaku jika efek sterik dapat diabaikan. Dari data retensi 3,5 dimetilanilin ($R_f = 0,35$) dan 2,4,6 trimetilanilin ($R_f = 0,57$) jelas terlihat bahwa meskipun kerapatan elektron disekitar atom N untuk 2,4,6 trimetilanilin cukup besar, tetapi senyawa tersebut relatif kurang tertahan pada fasa diam karena pengaruh efek sterik. Data R_f yang dikemukakan diperoleh dengan menggunakan sikloheksan/dibutyleter (fraksi molar 0,05) sebagai eluen.

Data retensi dari berbagai senyawa poliaromatik hidrokarbon (kelompok aza-arene) menunjukkan bahwa urutan elusi senyawa merupakan fungsi dari kerapatan elektron atom N dan efek sterik terhadap atom N tersebut. Untuk kelompok aza-arene ini ternyata retensi senyawa tidak tergantung dari kebasaaan (4) dan berlawanan dengan sifat kelompok anilin, makin besar kerapatan elektron disekitar atom N justru menyebabkan retensi senyawa makin kecil. Lebih-lebih lagi jika berdekatan dengan atom N tersebut terdapat gugus pendorong elektron. Diberikan sebagai contoh 2,4,6 trimetil piridin ($k' = 3,3$), 2 etil 4 metil piridin ($k' = 3,9$), 3 metil piridin ($k' = 3,9$) dan 4 metil piridin ($k' = 6,7$). Tetapi gejala ini sebenarnya lebih baik diterangkan melalui pengaruh efek sterik. Makin banyak gugus substitusi pada lingkaran, retensi senyawa makin kecil. Sebagai contoh dapat diberikan data retensi senyawa-senyawa piridin diatas.

KROMATOGRAFI FASA TERBALIK

Penggunaan fasa diol pada jenis kromatografi fasa terbalik telah dijajagi (6,7,8) dan hasilnya ternyata hanya membawa harapan untuk kromatografi lapisan tipis (TLC). Untuk kromatografi kolom, ternyata fasa diol mempunyai kecenderungan mengadsorpsi air secara irreversibel dan hal ini teramati secara visual dengan naiknya tekanan secara terus menerus pada pompa, selama kolom disetimbangkan dengan eluen yang banyak mengandung air.

Gejala ini disebabkan oleh terdapatnya sebagian fasa terikat diol dalam bentuk polimer yang dapat mengadsorpsi air, yang menimbulkan proses pembengkakan (swelling) didalam kolom, sehingga terjadi perubahan porositas butir-butir "packing" dan karenanya terjadi kenaikan tekanan.

Pada kromatografi lapisan tipis yang tidak memerlukan periode stabilisasi, perkembangan dari kromatografi fasa terbalik ini membawa banyak harapan. Sifat kromatografi fasa diol pada jenis kromatografi fasa terbalik ini serupa dengan sifat kromatografi fasa terikat C_{18} . Dengan eluen air/asetonitril 75:25, pola pemisahan dari campuran benzen, duren, naftalen, 1 metil naftalen dan penantren pada fasa diol serupa dengan pola pemisahan yang teramati pada fasa C_{18} . Retensi komponen merupakan fungsi dari jumlah lingkaran dan jumlah atom karbon yang terkandung pada lingkaran aromatik tersebut.

Jadi dalam hal ini yang berperan pada mekanisme kromatografi adalah kerangka hidrokarbon dari fasa diol yang mengadakan interaksi hidrofob dengan kerangka hidrokarbon senyawa yang dipisahkan. Retensi benzen lebih kecil daripada naftalen dan penantren, retensi duren lebih besar daripada benzen dan retensi 1 metil naftalen lebih besar dibandingkan dengan naftalen. Mekanisme retensi seperti ini sangat menarik karena dapat dipakai untuk menjajagi kemungkinan analisa

bidimensional dari kelompok senyawa poliaromatik hidrokarbon. Jenis analisa bidimensional membutuhkan dua arah elusi yang saling tegak lurus dengan dua mekanisme kromatografi yang berbeda. Mula-mula kita dapat memisahkan senyawa poliaromatik hidrokarbon pada kromatografi fasa normal dengan heksan sebagai eluen, kemudian elusi yang kedua dilakukan pada kromatografi fasa terbalik dengan eluen air/asetonitril. Hal ini membuka kemungkinan bagi pemisahan campuran yang sangat kompleks seperti fraksi minyak bumi.

APLIKASI FASA TERIKAT DIOL

Fasa terikat diol banyak digunakan pada kromatografi eksklusi (9,10), terutama untuk pemisahan polimer sintesis yang larut dalam air (1,11), protein (10,12), enzim (13) dan polisakarida seperti carrageenan, alginate dan pectin (14). Dilaporkan pula penggunaan fasa diol untuk pemisahan oligomer polietilenglikol dan surfaktan nonionik (15). Berat molekul komponen yang dapat dipisahkan berkisar antara 10.000 hingga 100.000 (9).

Selain pada kromatografi eksklusi, fasa diol juga banyak digunakan pada pemisahan kromatografi fasa normal (16). Pemisahan asam fenolat yang semula banyak dilakukan pada fasa tak polar seperti C_8 , ternyata apabila dilakukan pada fasa diol dapat menghasilkan resolusi yang lebih baik (17). Selain itu urutan retensi dari komponen-komponen fenolat pada kolom diol tidak sepenuhnya merupakan kebalikan dari kolom C_8 . Hal ini berarti bahwa kedua kolom mempunyai selektifitas yang berbeda dan dapat dijadikan sebagai komplemen kolom yang satu terhadap yang lain.

Resolusi pemisahan senyawa biflavon pada kolom diol juga relatif lebih baik apabila dibandingkan dengan pemisahannya pada kolom C_8 atau C_{18} . Pada kolom C_{18} , puncak komponen mengalami "tailing" (berekor) dan dua isomer biflavon yaitu ginkgetin dan isoginkgetin tidak terpisah sama sekali, sedangkan pada kolom diol keduanya dapat terpisah sempurna (18). Fasa diol juga dapat digunakan untuk pemisahan hormon steroid (19,20,21), corticosteroid (22) dan senyawa hidrokarbon aromatik (8,23).

KESIMPULAN

Didalam mekanisme kromatografi pada fasa diol, yang memegang peranan penting adalah ikatan hidrogen atau interaksi asam-basa antara senyawa yang dipisahkan dengan sisi aktif fasa diol. Kuat lemahnya ikatan hidrogen ditentukan oleh kerapatan elektron disekitar atom yang membentuk ikatan tersebut. Kerapatan elektron diatas bervariasi sesuai dengan gugus substitusi yang dimilikinya. Selain dari itu, efek sterik memainkan peranan yang tidak kalah pentingnya.

Fasa diol selain digunakan pada kromatografi eksklusi untuk pemisahan berdasarkan berat molekul, juga dapat digunakan untuk kromatografi fasa normal dan kromatografi fasa terbalik. Pada kromatografi fasa terbalik, fasa diol akan mempunyai perkembangan yang pesat, hanya pada jenis kromatografi lapisan tipis, karena kolom diol mempunyai kecenderungan mengadsorpsi air secara tak reversibel, hal mana dapat mengurangi banyak efisiensi kolom. Berlainan dengan kolom, ternyata pada diol dapat tahan terhadap campuran eluen yang mengandung air tanpa kehilangan sifat retensi dan efisiensinya.

DAFTAR PUSTAKA

1. D.P. Herman, L.R. Field and S. Abboth, The size exclusion chromatographic behavior of synthetic water-soluble polymers on diol bonded phase supports, *J. Chromatogr. Sci.* 19: 470-76 (1981)
2. A.M. Siouffi, J. Kantasubrata, M. Righezza, E. Mincsovcis, E. Tyihak, Thin layer plates with diol modification for use in a forced flow system, Proceedings of the second international symposium on instrumental high performance thin-layer chromatography, Wurzburg, 1985, hal. 201-10
3. G. Vernin, *La chromatographie en couche mince*, Dunod, Paris, 1970, hal.33
4. M. Righezza, Rapport de stage de maitrise, Universite d'Aix Marseille III (1982)
5. J. Kantasubrata, Rapport de stage de DEA, Universite d'Aix Marseille III (1983)
6. M. Righezza, Rapport de stage de DEA, Universite d'Aix Marseille III (1983)
7. A.M. Siouffi, J. Kantasubrata, G. Guiochon, Proceedings of the 15th international symposium on chromatography, Nurnberg, 1984, hal. 173
8. A.M. Siouffi, M. Righezza, G. Guiochon, Separation of aromatic compounds by liquid chromatography on diol-bonded phase columns, *J. Chromatogr.* 368 : 189-202 (1986)
9. S. Mori, M. Kato, High performance aqueous size-exclusion chromatography with diol-bonded porous glass packing materials, *J. Chromatogr.* 363 : 217-222 (1986)
10. P. Roumeliotis, K.K. Unger, Assessment and optimization of system parameters in size exclusion separation of proteins on diol-modified silica columns, *J. Chromatogr.* 218 : 535-546 (1981)
11. H. Engelhardt, D. Mathes, High-performance exclusion chromatography of water-soluble polymers with chemically bonded stationary phases, *J. Chromatogr.* 185 : 305-319 (1980)
12. D.E. Schmidt, Jr., R.W. Giese, D. Conron, B.L. Karger, High performance liquid chromatography of proteins on a diol-bonded silica gel stationary phase, *Anal. Chem.* 52: 177-182 (1980)
13. P. Roumeliotis, K.K. Unger, Preparative separation of proteins and enzymes in the mean molecular-weight range of 10,000 - 100,000 on Lichrosorb diol packing by high-performance size-exclusion chromatography, *J. Chromatogr.* 185: 445-452 (1979)
14. G. Sworn, W.M. Marrs, R.J. Hart, Characterisation of carageenans by high performance size-exclusion chromatography using Lichrospher 1000 Diol column, *J. Chromatogr.* 403 : 307-311 (1987)
15. I. Zeman, Application of bonded diol phases for separation of ethoxylated surfactants by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 363 : 223-230 (1986)
16. A.W. Salotto, E.L. Weiser, K.P. Caffey, R.L. Carty, S.C. Racine, L.R. Snyder, Relative retention and column selectivity for the common polar bonded-phase columns. The diol-silica column in normal-phase high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 498 : 55-65 (1990)
17. L. Nagels, W. Van Dongen, J. De Brucker, H. De Pooter, High-performance liquid chromatographic separation of naturally occurring esters of phenolic acids, *J. Chromatogr.* 187 : 181-187 (1980)
18. F.B. Scheid, A. Guth, R. Anton, High-performance liquid chromatography of biflavones from *Ginkgo biloba L.*, *J. Chromatogr.* 245 : 261-267 (1982)
19. M. Schoneshofer, H.J. Dulce, Comparison of different high-performance liquid chromatographic systems for the purification of Adrenal and Gonadal steroids prior to immunoassay, *J. Chromatogr.* 164 : 17-28 (1979)
20. M.J. O'Hare, E.C. Nice, M. Capp, Reversed and normal phase high-performance liquid chromatography of 18-Hydroxylated steroids and their derivatives. Comparison of selectivity, efficiency and recovery from biological samples, *J. Chromatogr.* 198 : 23-39 (1980)
21. E.H.J.M. Jansen, H. Van Blitterswijk, P.W. Zoontjes, R.B. Miedema, R.W. Stephany, Selectivity of a diol phase high-performance liquid chromatographic system in trace analysis of anabolic compounds, *J. Chromatogr.* 347 : 375-378 (1985)
22. G. Cavina, G. Moretti, R. Alimenti, B. Gallinella, Analysis of natural corticosteroids in adrenal extracts and in biological fluids by high-performance liquid chromatography, *J. Chromatogr.* 175 : 125-140 (1979)
23. M.M. Krahn, T.K. Collier, D.C. Malins, Aromatic hydrocarbon metabolites in Fish: Automated extraction and high-performance liquid chromatographic separation into conjugate and non-conjugate fractions, *J. Chromatogr.* 236 : 441-452 (1980).