

OPTIMASI REVERSED-PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHY RESIDU PESTISIDA PADA VARIASI LAJU ALIR DAN KONDISI ISOKRATIK MENGGUNAKAN *SPREADSHEET*

Budi Yasri, Harmoko dan Amalia Rakhmawati

Akademi Metrologi dan Instrumentasi, Direktorat Standardisasi dan Pengendalian Mutu Kementerian Perdagangan Jawa barat, Indonesia.

Email: budiyasri@gmail.com, mokoindonesia@gmail.com dan amelchantique@gmail.com.

Abstract

The multiresidue method (MRM) in pesticide analysis using LC-MS/MS and / or GC-MS/MS is generally used for pesticide residue analysis because of the large number of registered and permitted pesticides circulating on the market. The process of separating analytes in a reversed phased liquid chromatography (RP-LC) system were affected by several factors, one of which was the mobile phase flow rate. Optimization was carried out to find the separation conditions for the optimum isocratic elution by changing the flow rate and composition of the organic mobile phase. In this study, optimization was carried out with the help of Excel spreadsheets for 9 mixtures of pesticide residue compounds and the optimization results were tested against the separation of 120 mixtures of pesticide residue compounds. The optimal separation obtained in isocratic elution is at flow rate (F) = 0.3 mL/min and the organic mobile phase composition $\phi = 0.40$. However, the optimum isocratic conditions obtained were less suitable when used for separation of 120 mixtures of pesticide residue compounds, because many compounds were eluted at the beginning and at the same time.

Keywords: *pesticide residue, RP-LC, optimization, isocratic elution, flow rate, mobile phase composition*

Abstrak

Metode multiresidu pestisida (MRM) menggunakan LC-MS/MS dan atau GC-MS/MS secara umum digunakan untuk analisis residu pestisida dalam karena banyaknya jumlah pestisida terdaftar dan diijinkan beredar di pasaran. Proses pemisahan analit dalam sistem *reversed phased liquid chromatography* (RP-LC) dipengaruhi oleh beberapa faktor dimana salah satunya adalah laju alir fase gerak. Optimasi dilakukan untuk mencari kondisi pemisahan pada elusi isokratik yang optimum dengan melakukan perubahan terhadap laju alir dan komposisi fase gerak organik. Pada penelitian ini dilakukan optimasi dengan bantuan Excel *Spreadsheet* terhadap 9 campuran senyawa residu pestisida dan hasil optimasi diuji terhadap pemisahan 120 campuran senyawa residu pestisida. Pemisahan optimal yang diperoleh dalam elusi isokratik yaitu pada laju alir (F) = 0,3 mL/menit dan komposisi fase gerak organik $\phi = 0,40$. Namun, kondisi isokratik optimum yang diperoleh tersebut kurang cocok jika digunakan untuk pemisahan terhadap 120

campuran senyawa residu pestisida, karena banyak senyawa terelusi di awal dan pada waktu yang bersamaan.

Kata kunci: residu pestisida, RP-LC, optimasi, elusi isokratik, laju alir, komposisi fase gerak

Pendahuluan

Pestisida hingga saat ini masih digunakan pada hampir semua jenis tanaman pangan untuk menanggulangi hama dan penyakit. Karena toksisitas dari pestisida tersebut terhadap kesehatan, maka ditetapkan *Maximum Residue Limits* (MRLs) berdasarkan *risk assessment*. Uni Eropa yang merupakan importir produk pertanian Indonesia, secara kontinu melakukan kajian dan merevisi MRL menjadi lebih rendah. MRLs sebagian besar residu pestisida ditetapkan berdasarkan *Limit of Determination* (LOD) yaitu sebesar 0,01 mg/kg. Pada tahun 2020, dalam *Commission Regulation European Union* (EU) 2020/1085 (*Commission Regulation* (EU) 2020/1085, 2020), EU menurunkan MRL untuk pestisida *chlorpyrifos* dan *chlorpyrifos methyl* menjadi 0,01 mg/kg untuk semua bahan pangan. Sedangkan Indonesia berdasarkan Peraturan Menteri Pertanian Republik Indonesia Nomor 55/Permentan/KR.040/11/2016 (Kementrian kesehatan RI, 2018) menetapkan MRL *chlorpyrifos* dan *chlorpyrifos methyl* berbeda-beda untuk setiap komoditi dan nilainya jauh lebih tinggi dibandingkan dengan EU MRLs. Ekspor produk pertanian Indonesia masih mendapatkan notifikasi terkait residu pestisida dari *European RASSF* hingga akhir tahun 2018. Publikasi terkait kadar residu pestisida pada produk pertanian Indonesia sangatlah sedikit. Pada komoditi biji kopi, beberapa pestisida masih ditemukan pada kadar di atas 0,01 ppm (Harmoko, Kartasmita, & Tresnawati, 2015). *Anthraquinone* juga ditemukan melebihi 0,02 ppm pada teh (Kartasmita et al., 2020).

Dengan banyaknya jumlah pestisida terdaftar dan diijinkan beredar di pasaran, maka penggunaan metode pengujian *multi-residue method* (MRM) yang mampu menganalisis sejumlah besar pestisida dalam satu *single-run* adalah pendekatan yang paling umum dan paling efisien. Beberapa metode standar resmi MRM seperti EN 15662:2008 (EN 15662:2008, 2008) yang dipublikasikan oleh the *European Committee for Standardization* (CEN) atau AOAC 2007.01 (*AOAC Official Method* 2007.01., 2007) yang dikeluarkan oleh *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) *International* menggunakan instrumen analisis *gas chromatography coupled to mass spectrometry* (GC-MS) dan/atau *liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry* (LC-MS/MS) telah digunakan secara luas di seluruh dunia untuk pengujian residu pestisida dari berbagai golongan dan dari beragam matriks sampel.

LC-MS/MS adalah instrumen analisis yang sangat baik digunakan dalam penetapan kadar residu pestisida. *Liquid Chromatography* (LC) lebih disukai daripada *Gas Chromatography* (GC) karena pestisida yang digunakan saat ini cukup polar, labil secara termal atau tidak mudah menguap, dan akibatnya terdeteksi dengan tidak baik di GC (Farré, Picó, & Barceló, 2014). Oleh karena itu, LC-MS/MS telah menjadi salah satu alat yang paling baik untuk analisis senyawa organik pada tingkat sub mg/L yang

menyediakan sensitivitas, selektivitas, dan spesifisitas diperlukan untuk memenuhi regulasi negara importir seperti Uni Eropa untuk analisis pestisida dalam sampel air dan makanan. Dalam LC, RPLC merupakan sistem yang umum digunakan dalam pemisahan multiresidu pestisida seperti juga terlampir pada metode standar EN 15662:2008 dan AOAC 2007.01. (Lehotay, 2007) Pada sistem RPLC, beberapa pestisida terelusi dalam waktu singkat dan memiliki bentuk *peak* yang buruk. Hal ini mengindikasikan bahwa pestisida tersebut tidak tertahan didalam kolom pada saat proses pemisahan menggunakan sistem LC. Buruknya pemisaahan tersebut menyebabkan berkurangnya akurasi pada saat dilakukan kuantisasi hasil pengujian dan memungkinkan diperoleh *Limit of Quantification* (LOQ) atau *Reporting Limit* (RL) lebih tinggi dari nilai *Maximum Residue Limits* (MRLs) yang ditetapkan. Beberapa *brand* instrumen LC-MS/MS telah melakukan beberapa penelitian melalui eksperimen yang dipublikasikan melalui *Application Note* untuk mengatasi masalah tersebut dengan cara yang berbeda-beda seperti penggunaan *divert valve* (Kokkalis, E., et. al, 2012), optimasi *temperature values for the ESI source and HSID temperature* (Dalmia et al., 2018), *robust online dilution* (Mastovska et al., 2017).

Optimasi dalam pemisahan kromatografi merupakan hal yang penting untuk mencari resolusi terbaik yang diinginkan dalam waktu minimum. Di dalam melakukan optimasi pada sistem RPLC, ada dua hal yg dilakukan yaitu meningkatkan retensi dan memaksimalkan *peak shape* (Nikitas & Pappa-Louisi, 2009). Beberapa parameter operasional telah dipelajari melalui eksperimen di laboratorium terhadap 150 pestisida menggunakan LC-MS/MS. Parameter operasional dipelajari pengaruhnya terhadap waktu retensi, *peak shape*, dan ionisasi. Namun pada penelitian tersebut digunakan pada laju alir konstan. (Kmellár, Pareja, Ferrer, Fodor, & Fernández-Alba, 2011). Pendekatan kemometri telah digunakan untuk optimasi pemisahan enam (6) persitida karbamat. Laju alir dan persentase fase gerak organik merupakan faktor yang paling berpengaruh terhadap pemisahan kromatografi (Ouertani, El Atrache, & Hamida, 2016). Temperatur kolom tidak memberikan pengaruh signifikan terhadap pemisahan (Kmellár et al., 2011), (Ouertani et al., 2016). Di dalam variabel fase gerak organik sendiri, komposisi fase gerak (Rafferty, Siepmann, & Schure, 2011) dan *modifier* juga berpengaruh terhadap optimasi pemisahan dalam sistem RPLC (Pappa-Louisi, Agrafiotou, & Georgiadis, 2011). Beberapa *software packages* dapat digunakan untuk simulasi proses kromatografi seperti DryLab, PREOPT-W, OSIRIS, MICHROM, CHROMSWORD (Zisi, Mangipa, Boutou, & Pappa-Louisi, 2018). Simulasi proses pemisahan kromatografi juga dapat dilakukan menggunakan Matlab (Nilsson, Borgqvist, Axelsson, & Zacchi, 1999) dan Excel (Fasoula, Nikitas, & Pappa-Louisi, 2017). *Software* berbasis Excel *Spreadsheet* tersebut telah aplikasikan pada pemisahan campuran senyawa benzena dan fenol (Fasoula et al., 2017) dan campuran senyawa ionik dan non-ionik (Zisi et al., 2018).

Pada penelitian ini dilakukan optimasi pemisahan terhadap 9 campuran senyawa residu pestisida pada sistem gradien RP-LC menggunakan *Software* berbasis Excel *Spreadsheet* yang telah dikembangkan sebelumnya (Fasoula et al., 2017). Optimasi

dilakukan pada variasi laju alir komposisi fase gerak pada kondisi isokratik dan *single linear organic modifier-gradients*. Kondisi pemisahan yang optimum kemudian diaplikasikan pada pemisahan 120 pestisida dalam matriks kopi, kakao, lada, dan teh yang termasuk dalam *difficult or unique* matriks grup komoditi (*Document No SANTE/11813/2017*, 2017). Keempat komoditi tersebut merupakan produk pertanian Indonesia yang diekspor ke EU.

Metode Penelitian

a. Bahan Kimia dan Reagen

Standar analisis pestisida dibeli dari Sigma Aldrich - Amerika Serikat (AS) dan Chem Service-AS. Metanol (*grade HPLC*), asetoneitril (*grade HPLC*), asam format, asam asetat, heptana, etil asetat diperoleh dari Merck - Jerman. *Bulk* sorben natrium klorida (NaCl), amina sekunder primer (PSA), Bondesil C18, MgSO₄, dibeli dari Agilent - AS. Sistem pemurnian air Arioso (Cole-Parmer Scientific - AS) digunakan untuk menghasilkan air *Ultrapure*.

b. Larutan Pestisida

Larutan standar stok individu pestisida dengan konsentrasi sekitar 1000 mg/L disiapkan dengan menimbang sekitar 10 mg dalam labu ukur 10 mL dan dilarutkan dalam asetoneitril. Larutan standar disimpan dalam gelap pada suhu -20 °C. Selanjutnya dibuat 1 mg/L campuran 9 pestisida dan 120 pestisida dengan mengencerkan larutan standar stok dengan asetoneitril. Setelah itu, larutan standar campuran 10 mg/L yang digunakan dalam percobaan laboratorium awal dibuat dengan mengencerkan larutan standar 1 mg/L. Sembilan pestisida yang digunakan dalam perilaku kromatografi adalah *cyromazine*, *methamidophos*, *imidacloprid*, *acetamiprid*, *thiacloprid*, *propoxur*, *carbaryl*, *bupirimate*, dan *azoxystrobin*.

c. Ekstraksi Sampel

Ekstrak sampel biji kopi hijau, biji kakao, lada hitam, dan teh dibuat dengan metode QuEChERS termodifikasi. Metode pengujian (Harmoko et al., 2015) Digunakan untuk mendapatkan sampel ekstrak biji kopi hijau, biji kakao, lada hitam, dan teh yang bersih. Selanjutnya, larutan campuran standar 120 pestisida dalam setiap matriks sampel dibuat dengan pengenceran larutan standar 1 mg/L dengan ekstrak sampel bersih. Larutan standar ini kemudian digunakan untuk mengkonfirmasi kondisi pemisahan optimal yang diperoleh dari hasil optimasi.

d. LC

Pemisahan residu pestisida dilakukan dengan menggunakan sistem Ultra HPLC 1290 *Infinity* (UHPLC) (Agilent Technologies - AS) dan kolom HPLC 100-3 mm dengan penutup ujung Chromolith® Performance RP-18 (Merck - Jerman). Fase gerak A adalah air yang mengandung asam format 0,1% dan fase gerak B adalah asetoneitril. Temperatur kolom dijaga pada suhu konstan 25 °C. Perilaku kromatografi zat terlarut diselidiki melalui percobaan laboratorium pada laju aliran fase gerak 0,2, 0,3, dan 0,5 mL/menit. Proses isokratik dilakukan dengan fraksi volume fase gerak organik yang berbeda ($\phi = 0,4, 0,5, \text{ dan } 0,6$) dalam laju alir yang berbeda. Proses

single linear organic modifier-gradients dilakukan dari fraksi volume awal $\varphi_0 = 0,2$ hingga yang terakhir $\varphi_f = 1,0$. Waktu gradien ditetapkan 10, 15, dan 20 menit dengan waktu mulai ($t_{in} = 0$ menit).

e. *Mass Spectrometry* (MS)

Analisis MS dilakukan dengan menggunakan spektrometer massa *triple quadrupole*, AB Sciex 3500 (AB Sciex - AS). MRM dioperasikan dalam mode ionisasi positif. Parameter operasi Collision gas (CAD), Curtain gas (CUR), tegangan IonSpray (IS) dan temperatur (TEM) dari sumber ion masing-masing ditetapkan pada 8V, 10 V, 5000 dan 500. Tegangan IonSpray (IS) dan suhu (TEM) dari sumber ion ditetapkan masing-masing pada 5000 dan 500. Sumber Ion gas 1 (GS1) dan gas 2 (GS2) ditetapkan masing-masing pada 40 dan 60.

Hasil dan Pembahasan

a. Pengaruh Laju Aliran Fase Bergerak terhadap Retensi Residu Pestisida

Faktor retensi k zat terlarut terhadap variasi laju aliran pada konstanta dapat dijelaskan dengan persamaan (1) (Nikitas & Pappa-Louisi, 2009).

$$\frac{1}{t_{o1}(1+k)} \int_0^{t_R} F(t) dt = 1 \quad (1)$$

di mana t_{o1} adalah waktu penahanan kolom. Tabel 1 di bawah ini menunjukkan pengaruh laju alir pada retensi residu pestisida. Data percobaan dalam kondisi isokratik dilakukan pada laju alir 0,2, 0,3, dan 0,4 mL/menit pada φ ACN = 0,4, 0,5, dan 0,6. Zat terlarut dielusi lebih cepat ketika laju alir dan komposisi fase gerak organik meningkat. Pada laju alir 0,4 mL/menit, lebih banyak zat terlarut yang dielusi pada waktu yang sama atau berdekatan. Hal ini akan mempengaruhi resolusi serta respon sinyal ke instrumen (*signal suppression*).

Tabel 1

Waktu retensi eksperimental isokratik (dalam menit) dari residu pestisida yang diperoleh pada laju alir dan komposisi fase gerak organik yang berbeda

Zat Terlarut	Laju Alir 0,2 mL/menit			Laju Alir 0,3 mL/menit			Laju Alir 0,4 mL/menit		
	$\varphi = 0,4$	$\varphi = 0,5$	$\varphi = 0,6$	$\varphi = 0,4$	$\varphi = 0,5$	$\varphi = 0,6$	$\varphi = 0,4$	$\varphi = 0,5$	$\varphi = 0,6$
<i>Cyromazin</i>	2,82	2,8	2,75	1,89	1,85	1,84	1,41	1,39	1,36
<i>Methamidophos</i>	3,19	3,18	3,16	2,13	2,13	2,11	1,59	1,59	1,58
<i>Imidacloprid</i>	4,09	3,69	3,49	2,69	2,46	2,32	2,02	1,84	1,73
<i>Acetamiprid</i>	4,13	3,71	3,49	2,79	2,5	2,33	2,08	1,86	1,74
<i>Thiacloprid</i>	4,71	3,97	3,63	3,15	2,67	2,42	2,37	2,0	1,81
<i>Propoxur</i>	6,39	4,84	4,1	4,25	3,22	2,72	3,19	2,4	2,04
<i>Carbaryl</i>	7,36	5,15	4,26	4,87	3,42	2,83	3,64	2,58	2,11
<i>Bupirimate</i>	9,29	6,05	4,87	6,15	4,03	3,22	4,63	3,02	2,41
<i>Azoxystrobin</i>	17,61	8,17	5,37	11,71	5,46	3,56	8,9	4,08	2,67

b. Optimasi dengan Variasi Laju Alir

Optimasi pemisahan campuran zat terlarut dengan bantuan komputer (Zisi et al., 2018), (Fasoula et al., 2017) dilakukan dengan studi eksperimen laboratorium tentang perilaku kromatografi zat terlarut pada beberapa kondisi isokratik; penentuan parameter model retensi yang dapat disesuaikan dengan menyesuaikan data retensi eksperimen dari masing-masing analit; pemodelan bentuk *peak* setiap analit; penentuan kondisi pemisahan optimal, uji akurasi kondisi optimal dengan membandingkan kromatogram eksperimental dan kromatogram prediksi.

Data retensi isokratik tiap zat terlarut pada beberapa laju alir selanjutnya dilengkapi dengan model retensi kuadrat dalam sistem RPLC (Persamaan 2). Dalam persamaan ini terdapat tiga parameter yang dapat diatur yaitu a, b, dan c.

$$\ln k = c_0 + c_1\varphi + c_2\varphi^2 \quad (2)$$

Model *peak* kromatografi Gaussian dengan tinggi, lebar, dan parameter respon detektor adalah h, D, dan y, masing-masing, dinyatakan dalam Persamaan 3, digunakan untuk menyesuaikan bentuk *peak* setiap zat terlarut dalam komposisi fase gerak organik yang berbeda, φ .

$$y = h(t_R) \exp\left(\frac{-(t - t_R)^2}{D(t_R)^2}\right) \quad (3)$$

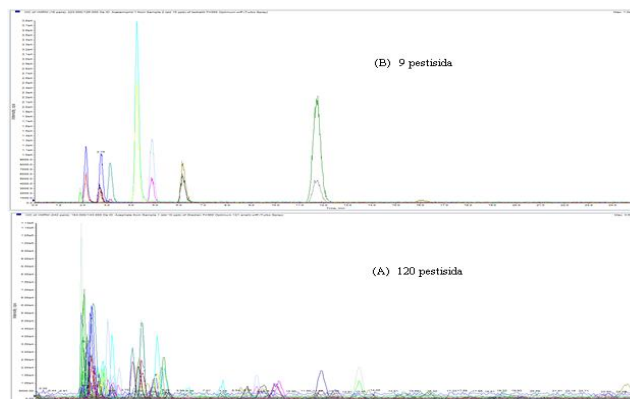
dimana $h(t_R) = h_0 + h_1t_R + h_2t_R^2 \quad (4)$

$$D(t_R) = D_0 + D_1t_R + D_2t_R^2 \quad (5)$$

Nilai parameter yang bisa diatur adalah c_0 , c_1 , c_2 , h_0 , h_1 , h_2 , D_0 , D_1 , dan D_2 kemudian ditransfer ke *spreadsheet* untuk digunakan dalam optimasi pada kondisi isokratik dan *single linear organic modifier-gradients*.

c. Optimasi dengan Kondisi Isokratik

Kondisi optimum pemisahan yang diperoleh dari optimasi menggunakan *spreadsheet* pada kondisi isokratik adalah pada $\varphi = 0,50$ untuk aliran 0,2 mL/menit, $\varphi = 0,40$ untuk aliran 0,3 mL/menit, $\varphi = 0,36$ untuk aliran 0,4 mL/menit. Laju alir 0,3 mL/menit memberikan pemisahan terbaik dibandingkan dengan laju aliran 0,2 dan 0,4 mL/menit. Gambar 1 di awah ini menunjukkan kromatogram dari 9 pestisida (a) dan 120 pestisida (b) yang bekerja pada kondisi isokratik optimum ($F = 0,3$ mL/menit, $\varphi = 0,40$). Pada gambar terlihat bahwa multiplikasi pestisida tidak sesuai untuk kondisi isokratik, karena banyak zat terlarut yang terelusi pada awal elusi dan bersamaan pada waktu yang sama.



Gambar 1.
Kromatogram LC-MS/MS dari campuran (A) 9 pestisida dan (B) 120 pestisida pada konsentrasi 10 µg/L diperoleh pada kondisi isokratik optimal ($F = 0,3$ mL/menit, $\phi = 0,40$)

Kesimpulan

Pemisahan optimal dalam elusi isokratik diperoleh pada $F = 0,3$ mL/menit dan $\phi = 0,40$. Namun, kondisi pemisahan tersebut kurang sesuai jika digunakan untuk pemisahan terhadap 120 senyawa, karena banyak senyawa terelusi pada awal elusi dan pada waktu yang bersamaan. Optimasi pemisahan pada kondisi gradien perlu dilakukan lebih lanjut.

BIBLIOGRAFI

- Dalmia, Avinash, Cudjoe, Erasmus, Astill, Toby, Jalali, Jacob, Weisenseel, Jason P., Qin, Feng, Murphy, Molly, Ruthenberg, Travis, Shelton, C. T., & Woodbridge, O. N. (2018). *A Single Cannabis LC/MS/MS Method to Meet California Pesticide and Mycotoxin Residues Regulatory Requirements*.
- Farré, M., Picó, Y., & Barceló, D. (2014). Application of Ultra-High Pressure Liquid Chromatography Linear Ion-Trap Orbitrap to Qualitative and Quantitative Assessment of Pesticide Residues. *Journal of Chromatography A*, 1328, 66–79.
- Fasoula, S., Nikitas, P., & Pappa-Louisi, A. (2017). *Teaching Simulation and Computer-Aided Separation Optimization in Liquid Chromatography by Means of Illustrative Microsoft Excel spreadsheets*. ACS Publications.
- Harmoko, Harmoko, Kartasmita, Rahmana Emran, & Tresnawati, Astika. (2015). QuEChERS Method for the Determination of Pesticide Residues in Indonesian Green Coffee Beans Using Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Mathematical and Fundamental Sciences*, 47(3), 296–308.
- Kartasmita, Rahmana E., Kurniawan, Fransiska, Amelia, Tasia, Dewi, Chandrini M., Harmoko, Harmoko, & Pratama, Yoga. (2020). Determination of Anthraquinone in Some Indonesian Black Tea and Its Predicted Risk Characterization. *ACS Omega*,

5(32), 20162–20169.

Kementrian kesehatan RI. (2018). *Hasil utama riskesdas 2018*. 61.

Kmellár, Béla, Pareja, Lucía, Ferrer, Carmen, Fodor, Péter, & Fernández-Alba, Amadeo R. (2011). Study of The Effects of Operational Parameters on Multiresidue Pesticide Analysis by LC–MS/MS. *Talanta*, 84(2), 262–273.

Lehotay, S. (2007). AOAC official method 2007.01 Pesticide Residues in Foods by Acetonitrile Extraction and Partitioning with Magnesium Sulfate. *Journal of AOAC International*, 90(2), 485–520.

Mastovska, K., Zulkoski, J., Deal, E., Vaclavik, L., Koesukwiwat, U., Halbardier, J. F., Zweigenbaum, J., & Glauner, T. (2017). Improved LC-MS/MS pesticide Residue Analysis Using Triggered MRM and On-Line Dilution. *Application Note 5991-7193EN*.

Nikitas, Panagiotis, & Pappa-Louisi, Adriani. (2009). Retention Models For Isocratic and Gradient Elution in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1216(10), 1737–1755.

Nilsson, Bernt, Borgqvist, Per, Axelsson, Anders, & Zacchi, Guido. (1999). Simulation of Chromatographic Processes Using MATLAB. *Computers & Chemical Engineering*, 23, S715–S718.

Ouertani, Randa, El Atrache, Latifa Latrous, & Hamida, Néjib Ben. (2016). Chemometrically Assisted Optimization and Validation of Reversed Phase Liquid Chromatography Method for The Analysis of Carbamates Pesticides. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 154, 38–44.

Pappa-Louisi, Adriani, Agrafiotou, P., & Georgiadis, I. (2011). Separation Optimization in Reversed-Phase Liquid Chromatography by Using Alkanol Additives in the Mobile Phase: Application to Amino Acids. *Talanta*, 85(4), 2241–2245.

Rafferty, Jake L., Siepmann, J. Ilja, & Schure, Mark R. (2011). Mobile Phase Effects in Reversed-Phase Liquid Chromatography: A Comparison of Acetonitrile/Water and Methanol/Water Solvents as Studied by Molecular Simulation. *Journal of Chromatography A*, 1218(16), 2203–2213.

Zisi, Chrysostomi, Mangipa, Athina Maria, Boutou, Eleftheria, & Pappa-Louisi, Adriani. (2018). Separation Optimization of a Mixture of Ionized and Non-Ionized Solutes Under Isocratic and Gradient Conditions in Reversed-Phase HPLC by Means of Microsoft Excel Spreadsheets. *Separations*, 5(1), 19.