

## Durch Verstehen der HILIC Trennmechanismen Ergebnisse verbessern!

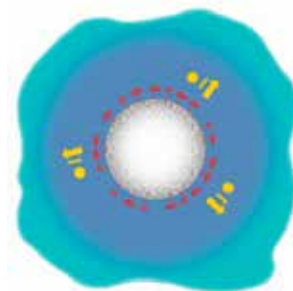
Die Hydrophile-Interaktions-Flüssigchromatographie (HILIC) ist speziell für die Analytik ionisierter und polarer Substanzen geeignet. Sie ist dadurch eine wertvolle orthogonale Methode zur Reversed-Phase Chromatographie (RP). Da HILIC auf anderen Separationsmechanismen basiert als RP, eröffnet dies die Möglichkeit für 2-D orthogonale Chromatographie, wenn die Analyten in beiden Modi Retention aufweisen. Zusätzlich führt der Einsatz hoher Konzentrationen

organischen Lösemittels in der mobilen Phase zu Vorteilen. Dazu zählen beispielsweise reduzierter Säulendruck und eine Erhöhung der Sensitivität bei Lichtstreuungsdetektoren (ELSD), Charged Aerosol Detektoren (CAD) oder Elektrospray-Ionisations Massenspektrometrie (ESI-MS). Wir stellen hier ein Review vor, das die Einflüsse auf den Trennmechanismus in HILIC beleuchtet und ein hilfreiches Werkzeug für die Methodenentwicklung und Fehlersuche darstellt.

### Was beeinflusst eine HILIC Separation?

In HILIC sind drei Mechanismen hauptsächlich für die Retention der Analyten verantwortlich:

1. die **Adsorption der Analyten an polaren Gruppen** der stationären Phase über Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatische (Coulomb-) und Dipol-Wechselwirkungen
2. die **Verteilung von Analyten zwischen mobiler Phase und der semi-immobilisierten Wasserschicht auf der stationären Phase** und
3. **Ionenaustausch.**<sup>[1]</sup>



Folglich können eine Vielzahl von Parametern einen Einfluss auf die Retention verschiedener Substanzen in der HILIC Analytik haben. Die Effekte verschiedener stationärer Phasen, Puffer-Konzentration und -pH Wert, Säulentemperatur

und Wahl des organischen Lösemittels wurden in einer Anzahl verschiedener Studien untersucht. Dabei wurde eine Auswahl unterschiedlicher neutraler, saurer und basischer Analyten betrachtet.<sup>[2]</sup>

**Stationäre Phase > pH der mobilen Phase > Konzentration des organischen Lösemittels > Pufferkonzentration > Säulentemperatur**

### Betrachtung der stationären Phase

Eine große Anzahl neuer Trägermaterialien wurde vorgeschlagen und auf Eignung in der HILIC getestet. Doch am weitesten verbreitet sind Kieselgel-basierte Phasen. Die Eigenschaften von Kieselgel und Kieselgel-Hybriden sind gut untersucht und verstanden. Darüber hinaus zeichnen sich

diese durch hohe Trenneffizienzen und symmetrische Peakformen aus. Es ist also keine Überraschung, dass ein breites Spektrum verschiedener Liganden auf Kieselgeloberflächen gebunden und die resultierenden stationären Phasen bereits eingehend nach Ihren Eigenschaften untersucht wurden.<sup>[3-5]</sup>

Generell können HILIC Stationärphasen intuitiv nach ihren chemischen Eigenschaften und -Struktur eingeteilt werden.<sup>[4]</sup> Einige Beispiele sind:

Neutral geladenen Liganden: **Diol, Cyano, PFP, Amid** (z.B. **YMC-Triart Diol-HILIC, YMC-Triart PFP**)

Positiv geladene Liganden: **Amino, Polyamin, Imidazol** (z.B. **YMC-Pack NH<sub>2</sub>, YMC-Pack Polyamine II**)

Negativ geladene Liganden: **blankes Kieselgel, Polyasparaginsäure** (z.B. **YMC-Pack SIL**)

Zwitterionische Liganden: **Peptides, Sulfbetaine**

Da die Auswahl der stationären Phase den größten Einfluss auf die Selektivität der Trennung hat, ist es für die Entwicklung und Optimierung von Methoden wichtig eine „Werkzeugkiste“ möglichst verschiedener Materialien zur Hand zu haben. Beispielsweise zeigt eine **unmodifizierte Kieselgel Phase** eine schwache Korrelation der Retentionsfaktoren verglichen mit anderen Phasen. Die hohe elektrostatische Abstoßung und reduzierte Retention saurer Analyten und erhöhte Retention basischer Analyten macht diese Phase zu einem hervorragenden ersten Kandidaten für die Werkzeugkiste des Chromatographen, da die Phasenselektivität so verschieden ist.<sup>[2,6]</sup>

Aufgrund der neutralen Liganden zeigen **Diol** und **Amid**-Phasen eine gute Korrelation zueinander und hohe Retention für neutrale polare Analyten. Sie weisen außerdem reduzierte sekundäre Interaktionen für ionisierte Analyten auf, was sie zu einer guten Wahl für Applikationen macht in denen symmetrische Peakformen und hohe Sensitivität vorausgesetzt sind. Sie sollten ebenfalls in die Werkzeugkiste aufgenommen werden. Neben der guten hydrophilen Selektivität basieren die Unterschiede dieser Phasen zum Großteil auf ionischen Effekten der **Amid** Phasen, die in manchen Fällen auch zu Peaktailing führen können.

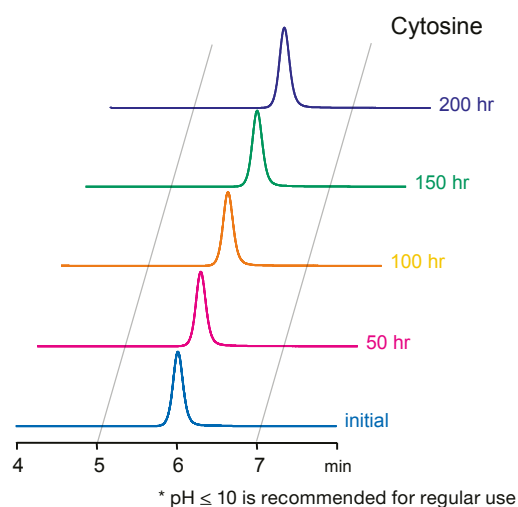
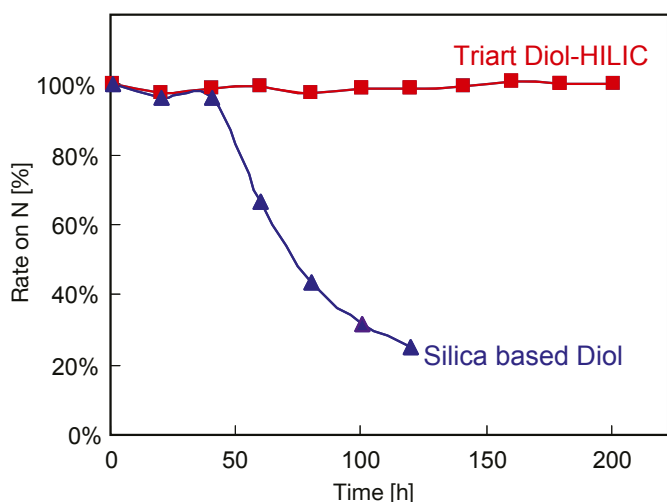
Saure Analyten werden von **Amino** Phasen retardiert, was auf die starken elektrostatischen Effekte und Ionentausch zurückzuführen ist, wobei Basen weitestgehend von diesen

positiv geladenen Phasen abgestoßen werden. Es ist gut bekannt, dass **Amino** Phasen in vielen Applikationen eine stark reduzierte Lebensdauer aufweisen. Dies ist vermutlich darauf zurückzuführen, dass der pH-Wert der Oberfläche des Materials durch den Liganden höher ist als der der mobilen Phase. Diesem Effekt kann durch neuartige Materialien entgegengewirkt werden, die gemischte Amine als Liganden verwenden um den Oberflächen PH zu senken, durch Polymerbeschichtung geschützt sind oder als Basismaterial Kieselgel-Hybrid Technologie verwenden.

Bei der Wahl der stationären Phase spielt der pH-Wert der mobilen Phase eine weitere komplexe Rolle. Anwendungen bei extremen pH-Werten bedeuten chemischen Stress für die stationäre Phase, der zu Verlust an Säulenleistung führt. Bei pH-Werten über 6 kann Kieselgel hydrolysieren, was bei **unmodifizierten Kieselgel** Materialien von größerer Bedeutung ist, da keine Liganden die Oberfläche schützen.<sup>[2]</sup>

Modifizierte **Kieselgel-Hybrid** Materialien besitzen eine breitere pH Stabilität und werden nicht bei hohem pH-Wert hydrolysiert. Sie bieten eine erhöhte Lebensdauer und reduzierte Restsilanol-Aktivität (die alle kieselgelbasierten Materialien zeigen und jeder Trennung einen Kationenaustauschmechanismus auferlegt). Zusätze wie TFA oder HFBA können diesen Effekt weiter reduzieren, sind aber nicht kompatibel mit manchen Detektionsmethoden oder den meisten Puffersystemen.

## Stability at high pH (pH 11, 50 °C)\*



Säule: 5 µm, 150 x 4,6 mm ID  
 Bestell-Nr: TDH12S05-1546PTH  
 Eluent: acetonitril / Wasser / NH<sub>3</sub> (90/10/0,1) pH 11.3  
 Flussrate: 1,0 mL/min  
 Temperatur: 50 °C  
 Probe: Cytosine

## Betrachtung der mobilen Phase

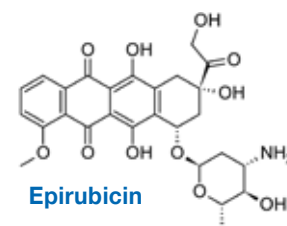
In HILIC besteht die mobile Phase aus hohen Konzentrationen organischen Lösemittels (60–97%) und niedrigen Konzentrationen wässrigen Puffers (3–40%). Das hat den Vorteil einer geringeren Viskosität des Laufmittels und resultiert somit in reduziertem Rückdruck, selbst bei Verwendung langer Säulen. Die Flüchtigkeit der Eluenten führt weiterhin zu einer erhöhten Sensitivität bei Verwendung auf Verdampfung basierender Detektoren.<sup>[7]</sup> Allerdings sorgen die unterschiedlichen überlappenden Trennmechanismen in HILIC und im speziellen der Aufbau einer stabilen Wasserschicht auf der Oberfläche der stationären Phase zu längerer Äquilibrierungsdauer, was vor allem bei Gradientenmethoden bedacht werden muss.

**Acetonitril (ACN)** ist das am häufigsten verwendete Lösemittel in der analytischen HILIC, da es sich durch gute UV-Transparenz und niedrige Viskosität auszeichnet. Wenn der ACN Anteil der mobilen Phase erhöht und der wässrige Anteil erniedrigt wird, steigt die Retention der Analyten signifikant, zeigt dabei aber keine lineare Abhängigkeit des Retentionsfaktors.<sup>[2]</sup> Der

Grund hierfür die Überlagerung von Adsorptions- und Verteilungsmechanismen der Analyten als auch die Änderung des thermodynamischen pH, die mit einer Veränderung des Anteils an organischem Lösemittel in der mobilen Phase einhergeht. Komplette oder teilweise Substitution von ACN mit **Alkoholen wie Methanol (MeOH), Ethanol (EtOH) oder Isopropanol (IPA)** reduziert die Retention durch Abschwächung der Wasserstoffbrückenbindungen und Störung der Ausbildung einer stabilen oberflächlichen Wasserschicht der stationären Phase und führt so in den meisten Fällen zu negativen Effekten auf die Reproduzierbarkeit der Methode.<sup>[8-12]</sup>

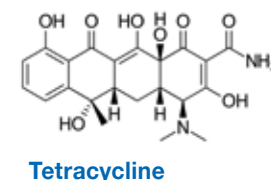
Ein Auflisten verschiedener Lösemittel relativ zu ihrer Stärke in HILIC ist durch die verschiedenen überlagerten Trennmechanismen nicht leicht und ist daher stark von der Wahl der stationären Phase und den Analyten abhängig. Beispielsweise ergibt sich aus der Trennung von Derivaten des polaren inhibitorischen Pharmazeutikums Epirubicin die Reihenfolge:

**Methanol > Isopropanol > Tetrahydrofuran > ACN**



während bei der Trennung von polaren Tetracyclin Antibiotika auf Amino-Phasen folgende Reihenfolge der Elutionsstärke erhalten wird:

**Tetrahydrofuran > Methanol > Isopropanol > ACN**



Auffällig ist, dass ACN unter allen getesteten Bedingungen das schwächste Lösemittel war.<sup>[13]</sup>

Die Retention schwacher Säuren und Basen kann stark durch den pH-Wert der mobilen Phase beeinflusst werden, während starke Säuren und Basen eine geringere pH Abhängigkeit zeigen. Der hauptsächliche Retentionsmechanismus für diese Substanzen sind Coulomb-Wechselwirkungen zwischen geladenen Gruppen der stationären Phase und geladenen Analyten. Daher ist der Einfluss des pH-Wertes auf den Ladungszustand der stationären Phase ebenfalls ein wichtiger Faktor, der zur Trennung dieser Substanzen bedacht werden muss.

Kleine saure Moleküle als Zusätze zur mobile Phase wie Ameisensäure, Essigsäure oder Phosphorsäure können als brauchbarer „Puffer“ dienen oder halten zumindest den pH-Wert relativ konstant, besitzen aber meist nicht die nötige Ionenstärke in hohen ACN Konzentrationen um die Silanolaktivität ausreichend zu reduzieren und so die

Peaksymmetrie zu verbessern.<sup>[14-15]</sup> Da Silanole der stationären Phase bei einem pH von etwa 2-3 voll protoniert sind wird TFA oder HFBA eingesetzt um deren Nettoladung zu neutralisieren und so den Kationenaustauschmechanismus mit basischen Analyten zu runterdrücken.<sup>[16]</sup> Allerdings kann dieses Vorgehen eine erhöhte Abstoßung oder sogar Ausschluss von sauren Analyten von der stationären Phase bedeuten, was speziell bei Verwendung von Kieselgel und Amid-Phasen auftritt. Es wird vermutet das dies durch eine Anreicherung von Protonen an der Wasser/Eluent Grenzfläche und/oder von geladenen ACN Artefakte durch Hydrolyse hervorgerufen wird, allerdings bedarf es weitere Untersuchungen dieser Effekte um konkrete Rückschlüsse ziehen zu können. <sup>[17-19]</sup> Vor allem wenn TFA oder HMBA als Ionenpaar-Reagenz eingesetzt werden müssen sollte man diese Effekte bedenken.

Die Verwendung von **Salzen der Ameisensäure, Phosphorsäure, sowie Oxalsäure, Kohlensäure und Zitronensäure als Pufferionen** ist etabliert um die Retention zu beeinflussen und Peakformen zu verbessern, zeigt aber nur geringen Effekt auf die Selektivität der Trennung selbst.<sup>[15,20]</sup> Das bedeutet, dass höhere Auflösung und Sensitivität durch ein Screening verschiedener Pufferkonzentrationen und -Komponenten möglich ist. Die am meisten verwendeten Puffersysteme in HILIC sind Ammonium-Formiat und -Acetat, da sie auch in hohen ACN Konzentrationen löslich sind und durch ihre Verdampfbarkeit ein geeignetes System für Anwendungen in der LC-MS darstellen.

Puffersysteme bei pH9 oder höher können die Selektivität signifikant ändern, speziell bei quaternären Ammonium-Derivaten, die erhöhte Retention unter diesen Bedingungen durch ionische Wechselwirkungen mit deprotonierten Silanolen aufweisen. Da sich die meisten Kieselgel-basierten Materialien unter diesen Bedingungen schnell auflösen, ist die Verwendung neuartiger **Kieselgel-Hybrid** Phasen ein Weg dieses Hindernis zu umgehen. Ein Screening in der Me-

thodenentwicklung bei erhöhten pH Werten ist dann möglich ohne die Lebensdauer der Säule zu beeinträchtigen.

**Die Konzentration des verwendeten Puffers** hat vor allem einen großen Einfluss auf die Retention von ionisierten Analyten, da bei diesen elektrostatische Wechselwirkungen und Ionenaustausch die hauptsächlichen Trennmechanismen darstellen. Variation in einem Bereich zwischen 5–20mM Pufferkonzentration kann zu einer drastischen Änderung der Selektivität führen.<sup>[2]</sup> Kombiniert mit der Eigenschaft von hochorganischen Flüssigkeiten mit der Zeit zu verdampfen, ist dies eine häufig auftretende Quelle für nicht-reproduzierbare Ergebnisse wenn Eluenten nicht regelmäßig frisch angesetzt werden. Auf der anderen Seite führt dieser „Abschirmungseffekt“ der Silanole durch Gegenionen der mobilen Phase zu Selektivitätsänderungen, der durch genaues Einhalten der Pufferkonzentration reproduzierbar genutzt werden kann. Außerdem wird durch Erhöhen der Salzkonzentration auch das Volumen der adsorbierten Wassersicht erhöht was zu einer sukzessiven Erhöhung der Retention neutraler Analyten führt.<sup>[21-22]</sup>

## Säulentemperatur

Höhere Säulentemperaturen reduzieren die Viskosität der mobilen Phase, wodurch auch der Arbeitsdruck niedriger wird. Allerdings hat die Temperatur in HILIC noch weitere Effekte auf die Ionisation der Liganden der stationären Phase, Silanole, Puffer Komponenten und Analyten, die komplex voneinander abhängig sind. Variation der Temperatur in einem Bereich von 30–50 °C führt generell zu einer Verringerung der Retention der Analyten von 3–30% mit steigender Temperatur.<sup>[2, 12]</sup> Andererseits zeigen manche basischen Ana-

lyten ein umgekehrtes Verhalten mit steigender Temperatur. Die Retention wird also erhöht. Dieser Effekt ist bisher nicht ausreichend erklärt und bedarf weiterer Untersuchung. Aufgrund des relativ kleinen Einflusses der Temperaturänderung auf die Selektivität der Trennung, findet dieser Parameter häufig in der Methodenentwicklung kaum Beachtung. Um reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wird die Säulentemperatur konstant gehalten und dadurch Temperaturfluktuationen in der Umgebung zu kompensiert.

## Probeninjektion

Der Einfluss des Injektionslösemittels auf die HILIC Separation und resultierende Peakformen ist bereits sehr gut an kleinen Molekülen und Peptiden untersucht.<sup>[23]</sup> Generell sollten Proben in **reinem ACN** gelöst und injiziert werden um optimale Peakform und Auflösung zu erhalten. **Höhere Anteile an Wasser im Injektionslösemittel führen zu einem Verlust an Trenneffizienz** da die Analyten in einer wässrigen Front ohne Rückhalt eluieren.<sup>[20]</sup>

In Fällen in denen es nicht möglich ist die Probe in ACN zu injizieren, weil sie nicht löslich ist oder Peptide aggregieren konnte gezeigt werden, dass das Reduzieren des Injektionsvolumens diese Effekte reduzieren kann. Beispielsweise ergaben Protein- und Antikörperproben aus Biopharmazeutika in HILIC befriedigende Ergebnisse bei

Konzentrationen von 65–80% ACN, wenn diese in reinem Wasser injiziert wurden. Das Injektionsvolumen darf dabei etwa 0.1% des Säulenvolumens nicht übersteigen.<sup>[24]</sup> Diese Strategie könnte ebenfalls für die Analytik von Umweltpollen z.B. aus Oberflächengewässern genutzt werden. Die generell geringen Analytkonzentrationen in diesen Applikationen setzen allerdings voraus, dass sehr sensitive Detektionsmethoden angewandt oder Analyten durch Probenaufarbeitungstechniken angereichert werden. Kleine Moleküle die in ACN unlöslich sind können potentiell auch in reinem IPA oder IPA/ACN Mischungen injiziert werden, solange die Löslichkeit hier gewährleistet ist. Für Peptide ist es gängig diese in reinem EtOH oder IPA zu lösen um Denaturierungen zu limitieren.<sup>[23]</sup>

## Detektionsmethoden

Durch die hohen Konzentrationen leichtflüchtiger Lösemittel ist in der HILIC die Sensitivität verschiedener Detektoren stark erhöht.<sup>[25]</sup> Außerdem wird die Ausbildung feiner geladener Tröpfchen in der CAD und ESI-MS durch die geringere Oberflächenspannung der Lösemittel begünstigt. Das Design der ESI Ionenquelle hat dabei ebenfalls einen großen Einfluss auf die relative Sensitivität. Für die meisten Analyten kann mit einer Sensitivitätserhöhung von einer Größenordnung im Vergleich zu RP gerechnet werden,

wobei auch Verbesserungen bis zu einem Faktor von 800 beobachtet wurden.<sup>[26]</sup>

Es ist für Methoden, die auf diese Detektoren zurückgreifen von größter Wichtigkeit einen konstanten pH-Wert und Pufferkonzentration einzuhalten. In der ESI-MS kann ein Screening verschiedener Pufferkonzentrationen helfen die Effekte durch Ionenunterdrückung zu evaluieren, die der gewonnenen Sensitivität wieder etwas entgegenwirken.

## Zusammenfassung und Fazit

Durch den hohen Anteil organischen Lösemittels in der mobilen Phase und die unterschiedlichen Separationsmechanismen bietet die HILIC als orthogonale Trennmethode gegenüber der RP einzigartige Vorteile. Als ein Resultat der semi-immobilisierten Wasserschicht auf der stationären Phase spielen Massentransfer und das Diffusionsverhalten der Analyten eine größere Rolle in der HILIC Kinetik. Als Konsequenz ist das Trennverhalten von Analyten in der HILIC weniger gut vorhersehbar oder verstanden als in anderen LC Modi.

Die größten Änderungen in der Selektivität werden durch eine Änderung der Chemie der stationären Phase hervorgerufen, während eine Änderung im Anteil organischen

Lösemittels und Gradientenläufe eher einen Einfluss auf die Retention an sich als die Selektivität hat. Der pH-Wert und die Verwendung verschiedener Puffersalze und deren Konzentration in der mobilen Phase haben einen erheblichen Effekt auf die Ladung der Analyten, der stationären Phase, das Volumen der Wasserschicht und die Selektivität der stationären Phase in Bezug auf Silanolaktivität.

Die Säulentemperatur hat nur einen vergleichsweise kleinen Effekt, es ist aber ratsam diese aus Gründen der Reproduzierbarkeit wenigstens konstant zu halten.

Zusammenfassend können wir die folgenden generellen Tipps für reproduzierbare HILIC Methodenentwicklung und Fehlersuche geben:

- Selektivitäten von verschiedenen stationären Phasen sind sehr unterschiedlich in HILIC. Ein Screening verschiedener Phasen ergibt den größten Unterschied in der Trennung und kann zu einer geeigneteren Wahl für Ihre Analyse führen.
- Die mobile Phase sollte wenigstens 3 % und höchstens 40 % wässrigen Anteil enthalten um die Ausbildung der oberflächlichen Wasserschicht der stationären Phase zu gewährleisten.
- Abhängig von der Applikation und Detektionsmethode empfehlen wir Pufferkonzentrationen von bis zu 10 mM und das Puffern beider verwendeten Eluenten um Mischbarkeit und Reproduzierbarkeit zu erhöhen.
- Geeignete Puffersysteme sind Ammoniumsalze der Ameisensäure, Essigsäure, Kohlensäure oder Triethylaminphosphat für volle Löslichkeit in hohen ACN Konzentrationen und um ungewünschte sekundäre Wechselwirkungen möglichst gering zu halten. Säuren wie Ameisensäure oder TFA als Zusätze können im Vergleich zu echten Puffern zu mangelhaften Ergebnissen führen.
- Verwenden Sie aprotische Lösemittel wie ACN, THF oder Aceton als schwachen Eluenten. Protische Lösemittel wie Alkohole verringern generell die Retention und stören die oberflächliche Wasserschicht der Stationärphase.
- Bedenken Sie den pKa Ihrer Analyten und deren Ladungszustand bei bestimmten pH-Werten. Es gehört zur guten Praxis mindestens 1-2 pH-Einheiten über oder unter dem pKa der Analyten zu arbeiten und mindestens drei verschiedene pH-Werte in der Methodenentwicklung zu screenen. Messen Sie den pH-Wert nachdem das organische Lösemittel zugesetzt wurde.
- Lösen Sie Ihre Proben in hohen Konzentrationen organischen Lösemittels (pures ACN oder andere aprotische oder protische Lösemittel) oder bis zur Startkonzentration an Organik in Ihrer Methode um Vermischungseffekte und negative Partition zu reduzieren. Injizieren Sie nie in höherem Wasseranteil oder wenn dies unumgänglich ist reduzieren Sie das Injektionsvolumen signifikant.
- Geben Sie Ihrer HILIC-Phase genügend Zeit zur Äquilibration. Wir empfehlen isokratische Methoden und mindestens 20 Säulenvolumen vor der Analyse und nach einer Gradientenelution. Wenn Sie Gradienten verwenden, halten Sie die Gradientensteigung so flach wie möglich und so steil wie nötig. Oder fahren sie kleine Plateaus in der Methode.

- [1] D.V. McCalley, Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography, *J.Chromatogr. A* 1523 (2017) 49-71
- [2] A. Kumar, J.C. Heaton, D.V. McCalley, Practical investigation of the factors that affect the selectivity in hydrophilic interaction chromatography, *J.Chromatogr. A* 1276 (2013) 33-46.
- [3] P. Jandera, Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: a review, *Anal. Chim. Acta* 692 (2011) 1-25.
- [4] Y. Guo, S. Gaiki, Retention and selectivity of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5920-5938.
- [5] L.Z. Qiao, X.Z. Shi, G.W. Xu, Recent advances in development and characterization of stationary phases for hydrophilic interaction chromatography, *Trac-Trend Anal. Chem.* 81 (2016) 23-33.
- [6] N.P. Dinh, T. Jonsson, K. Irgum, Probing the interaction mode in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 5880-5891.
- [7] D.V. McCalley, Evaluation of the properties of a superficially porous silica stationary phase in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A* 1193 (2008) 85-91.
- [8] S.M. Melnikov, A. Holtzel, A. Seidel-Morgenstern, U. Tallarek, A molecular dynamics view on hydrophilic interaction chromatography with polar-bonded phases: properties of the water-Rich layer at a silica surface modified with diol-functionalized alkyl chains, *J. Phys. Chem. C* 120 (2016)13126-13138
- [9] S.M. Melnikov, A. Holtzel, A. Seidel-Morgenstern, U. Tallarek, Evaluation of aqueous and non-aqueous binary solvent mixtures as mobile phase alternatives to water-acetonitrile mixtures for hydrophilic interaction liquid chromatography by molecular dynamics simulations, *J. Phys. Chem. C* 119 (2015) 512-523
- [10] J.Y. Wu, W.G. Bicker, W.G. Lindner, Separation properties of novel and commercial polar stationary phases in hydrophilic interaction and reversed-phase liquid chromatography mode, *J. Sep. Sci.* 31 (2008)1492-1503
- [11] Z.G. Hao, C.Y. Lu, B.M. Xiao, N.D. Weng, B. Parker, M. Knapp, C.T. Ho, Separation of amino acids, peptides and corresponding Amadori compounds on a silica column at elevated temperature, *J. Chromatogr. A* 1147 (2007)165-171.
- [12] Z.G. Hao, B.M. Xiao, N.D. Weng, Impact of column temperature and mobile phase components on selectivity of hydrophilic interaction chromatography(HILIC), *J. Sep. Sci.* 31 (2008) 1449-1464.
- [13] R.P. Li, Y. Zhang, C.C. Lee, L.M. Liu, Y.P. Huang, Hydrophilic interaction chromatography separation mechanisms of tetracyclines on amino-bonded silica column, *J. Sep. Sci.* 34 (2011) 1508-1516.
- [14] D.V. McCalley, Is hydrophilic interaction chromatography with silica columns a viable alternative to reversed-phase liquid chromatography for the analysis of ionisable compounds? *J. Chromatogr. A* 1171 (2007) 46-55.
- [15] J.C. Heaton, J.J. Russell, T. Underwood, R. Boughtflower, D.V. McCalley, Comparison of peak shape in hydrophilic interaction chromatography using acidic salt buffers and simple acid solutions, *J. Chromatogr. A* 1347 (2014)39-48.
- [16] M. Kosmulski, The pH dependent surface charging and points of zero charge.VI. Update, *J. Colloid Interf. Sci.* 426 (2014) 209-212.
- [17] D.V. McCalley, Study of retention and peak shape in hydrophilic interaction chromatography over a wide pH range, *J. Chromatogr. A* 1411 (2015) 41-49
- [18] D.V. McCalley, Effect of mobile phase additives on solute retention at low aqueous pH in hydrophilic interaction liquid chromatography, *J.Chromatogr. A* 1483 (2017) 71-79.
- [19] X.R. Lei, C. Gong, Y.L. Zhang, X. Xu, Influence of the acetamide from acetonitrile hydrolysis in acid-contained mobile phase on the ultra violet detection in high performance liquid chromatography, *Chromatographia* 79(2016) 1257-1262.
- [20] J.C. Heaton, D.V. McCalley, Some factors that can lead to poor peak shape in hydrophilic interaction chromatography, and possibilities for their remediation, *J. Chromatogr. A* 2016 (1427) 37-44.
- [21] D.V. McCalley, U.D. Neue, Estimation of the extent of the water-rich layer associated with the silica surface in hydrophilic interaction chromatography, *J. Chromatogr. A* 1192 (2008) 225-229.
- [22] S.M. Melnikov, A. Holtzel, A. Seidel-Morgenstern, U. Tallarek, A molecular dynamics study on the partitioning mechanism in hydrophilic interaction chromatography, *Angew. Chem. Int. Edit.* 51 (2012) 6251-6254.
- [23] J. Ruta, S. Rudaz, D.V. McCalley, J.L. Veuthey, D. Guillarme, A systematic investigation of the effect of sample diluent on peak shape in hydrophilic interaction liquid chromatography, *J. Chromatogr. A* 1217 (2010)8230-8240.
- [24] A. Periat, S. Fekete, A. Cusumano, J.L. Veuthey, A. Beck, M. Lauber, D.Guillarme, Potential of hydrophilic interaction chromatography for the analytical characterization of protein biopharmaceuticals, *J. Chromatogr. A*1448 (2016) 81-92.
- [25] C.R. Mitchell, Y. Bao, N.J. Benz, S.H. Zhang, Comparison of the sensitivity of evaporative universal detectors and LC/MS in the HILIC and the reversed-phase HPLC modes, *J. Chromatogr. B* 877 (2009) 4133-4139.
- [26] A. Periat, J. Boccard, J.L. Veuthey, S. Rudaz, D. Guillarme, Systematic comparison of sensitivity between hydrophilic interaction liquid chromatography and reversed phase liquid chromatography coupled with mass spectrometry, *J. Chromatogr. A* 1312 (2013) 49-57.