

Focusing Review

親水性相互作用クロマトグラフィー (HILIC)
—開発の背景, および分離モードの特徴

池上 亨, 田窪宏貴, 田中信男

A Perspective of Hydrophilic Interaction Chromatography
—Development and the Characteristics of the separation mode

Tohru Ikegami, Hirotaka Takubo, Nobuo Tanaka

Department of Biomolecular Engineering, Graduate School of Science and Technology,

Kyoto Institute of Technology, Matsugasaki, Sakyo-ku, Kyoto 606-8585

Received for review July 22, 2008. Accepted September 4, 2008.

Abstract

Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) has been focusing attentions of chromatographers in these years, because it is important and useful for the separation of highly polar analytes such as pharmaceutical drugs, neurotransmitters, nucleosides, nucleotides, amino acids, peptides, proteins, oligosaccharides, carbohydrates, and so on. Aqueous organic solvents are used as mobile phases on more polar stationary phases in the HILIC mode separation. A variety of stationary phases including bare silica, and silica phases modified with amino, amide, zwitterionic functional group, polyols including saccharides and other polar groups are used in the separation mode. This review discusses the variation and the historical view of the stationary phases, and column efficiency of HILIC stationary phases in relation to solute and stationary phase structures to provide a perspective of HILIC type stationary phases, and their separation efficiencies and retention tendencies.

Keywords:

緒言

近年, 親水性相互作用型クロマトグラフィー (HILIC) に関する文献と研究の数は劇的に増加している。これは HILIC に用いる様々な固定相が開発され, 各メーカーから発売され始めたことによる。HILIC は順相クロマトグラフィー (NPLC) の一種であり, 水と有機溶媒 (多くの場合アセトニトリル) の混合溶液と, それより高極性の固定相を用いる

分離モードである。古典的な順相クロマトグラフィーには非水溶性の有機溶媒を移動相に用いることが多く, 親水性の化合物の中にはこの溶媒系に溶解しないため分析できないという問題があった。HILIC モードが高極性化合物の分離を研究する様々な科学的分野の研究者たちの注目を集めているのは, 移動相が水系であり, 高極性の化合物も溶解, 分析できるという特徴に依っている。HILIC モードでは, 移動相に有

京都工芸繊維大学 大学院工芸科学研究科 生体分子工学部門
〒606-8585 京都市左京区松ヶ崎御所海道町
電話: 075-724-7801
FAX: 075-724-7710

機溶媒を多く含み、イオン化効率が良いため、Electrospray Ionization–Mass Spectrometer (ESI–MS) を検出部に用いた分析に適している。

HILIC モードでは、古典的な未修飾シリカに加えて、アミノプロピル基、アミド基、ジオール、シアノ基、ポリスクシンイミド誘導体、双性イオン、シクロデキストリンのような多様な高極性官能基が修飾されたシリカゲルが分離に適応可能である [1]。

スルホキシ化ポリマーやジオール基を含むポリマーのようなポリマー基材の固定相も使用可能である [1]。HILIC は高極性化合物をアイソクラティックやグラジエント溶出を用いて分離するときに逆相クロマトグラフィーの代替モードとして使用できるが、その分離性能については未だ詳細な検討が加えられていない。一般的に HILIC モードでは逆相クロマトグラフィーほどの分離性能は発現できないことが知られている [2]。

アミノ酸、ペプチド、糖類、ヌクレオシド、ヌクレオチド、神経伝達物質などの生命情報を司る極性の小分子化合物や、疾病の診断に用いられるバイオマーカーは HILIC を用いる分析の適用例が非常に多い。それらの分析例は薬化学、農業・食物化学、医化学、プロテオミクス、メタボロミクス、グライコミクスに貢献している。

逆相クロマトグラフィーの分離場であるカラム担体は、殆どの場合アルキル基を含むシリル化剤で化学修飾されたシリカを用いるが、HILIC 型固定相では、化学修飾に用いられている官能基の構造の種類が多いことも特徴である。各種の極性官能基に移動相中の水が濃縮され、固定相表面に「水で濡れた」層ができて、この層と移動相の間の分配平衡が HILIC モードの分離において重要な位置を占めている、とされている [1]。以下に、各種の固定相とその特徴、使用例等を挙げる。

1. HILIC モードの固定相

HILIC という術語は、1990年に Alpert によって最初に提案されたが、その当時は入手可能な HILIC カラムが限られていたこともあり、あまり注目を集めなかった [3]。今日重要となっている HILIC 分離の例は多くが2003年以降に発表されたものである。

1.1 未修飾シリカ

未修飾シリカは順相液体クロマトグラフィーの古典的な固定相として、クロマトグラフィーが発明された後長年にわたって用いられてきた。そして、最近の研究、特に液体クロマトグラフィーと質量分析を連結した HILIC–ESI–MS システムに広く使用されている。MS システムに接続される ESI 型イオン源にとって、HILIC の移動相は好都合であることによる。未修飾シリカによる分離対象は主に生体サンプル（血液や尿等）の中の医薬品とその代謝物であることが多く、殆

どの場合でグラジエント分析が行なわれている。これについては Naidong が詳細な総説を書いている [4]。主要なカラムは Betasil (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) [5], Hypersil (Thermo Scientific) [6], Inertsil (GL Science, Tokyo, Japan) [7], Kromasil (EKA Chemicals, Göteborg, Sweden) [8], Atlantis (Waters) [9–11] などである。Naidong の総説の時点では充填剤の粒子径は 5 μm であったが、近年は 3 μm の粒子を充填したカラムも用いられている [9–11]。Acquity (Waters) は 1.7 μm の粒子を充填したカラムであり、HILIC モードの超高速液体クロマトグラフィー (UPLC) に用いられている [12]。

1.2 アミノシリカ

3–aminopropyl 基を固定したシリカも HILIC モードの分離に使用可能である。1970年代には既に糖類の分離にアミノシリカのカラムが用いられ、今日 HILIC の分離条件と考えられる移動相中で使用されている [1,2]。主要なカラムは YMC–Pack NH2 (YMC, Kyoto, Japan) [13,14], Luna Amino (Phenomenex, Torrance, CA, USA) [15], Hypersil APS2 (Thermo Science) [16], Zorbax NH2 (Agilent, Santa Clara, CA, USA) [17] などがある。アミノシリカの分離対象は糖等の炭水化物 [18], アミノ酸 [19], ペプチド [14], カルボン酸, ヌクレオシド [20,21] テトラサイクリン型抗生物質 [16] などが知られている。アミノシリカカラムの保持傾向は独特である。それは親水性の分配相互作用とイオン交換相互作用が両方発現する場合があるためである。従って酸性官能基を持つ分子の分離挙動には移動相の pH が重要な役割を果たす。アミノシリカカラムは NPLC と HILIC の両方に利用可能な分離媒体であるが、アミノ基の反応性がしばしば問題になる。カルボニル化合物の非可逆な吸着や、固定相の自己分解（特に MS を検出器に用いる場合、バックグラウンドが高くなる）などである。

1.3 アミドシリカ

アミド基を親水性の官能基として含むアミドシリカを充填したカラムは、HILIC 型の分離媒体としては最もポピュラーな分離メディアの 1 つである。代表的なカラムは TSKgel Amide–80 (Tosoh, Tokyo, Japan) であり、単糖類 [22], ペプチド [23,24], ピリジルアミノ化糖 [25], アンモニウム塩 [26], アミノ酸 [27], ポリフェノール [28] などの分離に幅広く使用されている。このカラムは HILIC という術語が提唱される前から、ペプチドや糖のマッピングに利用されている。アミド官能基は化学的に安定であるが、移動相の pH や塩類の添加によってクロマトグラムが変化することがある。ごく最近、TSKgel Amide–80 のタイプのカラムで、3 μm の粒子を充填したものが発売された。理論段高 7 μm の発現が可能な、高性能の HILIC 型カラムであると言える。

1.4 スクシンイミド誘導体結合型シリカ

1983年に Alpert は、アミノシリカのポリスクシンイミド誘導体化によって新しいタイプのシリカベースの固定相を合成した [29]。ポリスクシンイミドは種々の HILIC タイプ固定相のプラットフォームと言え、スクシンイミド部分の加水分解やアミノリシス反応によってポリ（アスパラギン酸）、ポリ（2-ヒドロキシエチルアスパルタミド）、のポリ（2-スルホキシエチルアスパルタミド）などの固定相を調製した。これらの固定相を充填したカラムは PolyCAT A, PolyHydroxyethyl A, PolyGlycoplex, および PolySulfoethyl A として 3 μm および 5 μm の粒子を充填したカラムが PolyLC から市販されている [3]。既に報告された主な分離対象は次の通りである。

PolyHydroxyethyl A リン酸化アミノ酸, 多糖類 [3],
ペプチド [30, 31]
PolyGlycoplex オリゴ糖, シアル糖, 多糖類 [32]
PolySulfoethyl A ペプチド [33], 塩基性化合物 [34],
医薬品 [35]

このタイプのカラムは、他の HILIC 型分離媒体に比べてその分離性能（理論段数）があまり高くなくことが欠点であるが、分離選択性の面では興味深い分離媒体である。LC-MS にこのカラムを適用すると、シリカを被覆しているポリマーが流出することでベースラインが高くなることがある。新しいカラムではこの現象は殆ど起こらないが、カラムを長時間使用することでポリマーの溶出が起こるようになる [36]。

1.5 双性イオン結合型シリカ

分子内にアンモニウムカチオンとスルホン酸アニオンの両方を持つ、スルフォアルキルペタインを重合修飾したシリカが近年発売され注目を集めている。このカラムは双性イオンに基づくアニオン分離、カチオン分離にも利用可能である。代表的なカラムは ZIC-HILIC (Merck Se Quant AB, Umea, Sweden) であり、ネオマイシン [37], モルヒネとその誘導体 [38], アミノ糖 [39], 代謝物 [40], *N*-糖化ペプチド [41] などの分離例がある。LC-MS にこのカラムを適用しても、シリカを被覆しているポリマーが流出することでベースラインが高くなることは殆どないことが知られている [42]。このカラムは最も良い分離性能を与える最適線速度がやや遅いことが欠点であるが、選択性や安定性を含めると良い HILIC 型カラムと言える [42]。

1.6 その他の分離媒体

従来、タンパク質等親水性の分子の分離に用いられてきた

ジオール結合型 [43], シアノ基結合型のカラムも HILIC モードでの分離に適用可能だが、あまり分離例は知られていない。ジオール結合型カラムは最近上梓するカラムメーカーもあり、今後分離例が増えることが予想される。シクロデキストリンを結合したシリカによるカラムは、本来光学分割に用いられているが、HILIC モードで糖の分離をする際にも使用可能で、糖鎖の効率よい分離を達成している [44, 45]。ごく最近発売され始めた 1,2,4-トリアゾール結合型シリカ Cosmosil HILIC (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) は、トリアゾールの塩基性に基づくユニークな保持力を持っている。移動相を変えることによって、弱い陰イオン交換固定相としても使用できる [46]。

最近、ソルビトールメタクリレートをグラフト重合したシリカが HILIC 用分離媒体として発表された [47]。このように、新しい分離媒体を調製する試みは続けられており、これからも様々な HILIC 型固定相が現れるものと予測される。

2. 結論

表 1 は、各種の HILIC 型固定相で種々の化合物（グループごとに分かれている）を分離した際の理論段数である。多くは雑誌に掲載されているクロマトグラムから理論段数を推算した結果得た値であり、カラム外効果も含まれているので、ここに示す数値がすぐにそのカラムの性能の良否に繋がるものではない。しかし、分離しようとする分子が既に決まっているとき、どのカラムを選べば良いかを判断する際に有用であると考え、ここにまとめたものである。HILIC の分離モードでは、特定のテストサンプルを用いて種々のカラムに対し横断的な保持特性、分離性能を比較した研究がまだ少ない [48]。分離対象と分離条件（カラムの選択と移動相組成）に関しては、最近総説が発表されたので併せて参考にされたい [49]。HILIC を多次元 HPLC に利用したり [50], イオン交換との混合モードでの分離に応用したり [51] する例が続々と発表されており、今後も HILIC に関する研究は発展していくことが予想される。

なお、モノリス型シリカの骨格上に親水性の置換基を化学修飾したカラムは、一定の圧力限界下で粒子充填型（3 および 5 μm の粒子を充填したもの）に比べて、2～3 倍速い分離条件下で同じ理論段数を発現することが知られている。将来の高速分離、および高性能分離に向けて有望な分離媒体であると考えられるが、まだ市販されていないので本総説では割愛した。興味のある読者は別の総説を参照して頂きたい [2]。

表1 HILIC 型カラムによる各種極性化合物の分離性能（理論段高）の比較

例 10 μ m, 芳香族カルボン酸, 85%MeCN-20 mM AB, UV 芳香族カルボン酸の分離で理論段高が10 μ m であったことを示す。この際の移動相が85% MeCN-20 mM AB（緩衝液の略称は後述）、検出は紫外可視検出器（UV）で行なわれたことを示す。なおこの表に挙げた理論段高は、それぞれの引用文献のクロマトグラムのピーク幅を基に計算したものが多く、誤差を含む値である。引用文献で分析条件の最適化が行なわれているかどうか分からない場合もあるので、この表の値が直ちに各分離媒体の分離性能を示すものではない。 検出器の略称 UV：紫外可視検出器；RI：視差屈折検出器；ESI-MS：エレクトロスプレーイオン化-質量分析計；PAD：パルスアンペロメトリー検出器；ELSD：蒸発光散乱検出器 緩衝液の略称 AB：酢酸アンモニウム緩衝液；CB：クエン酸緩衝液；FB：ギ酸ナトリウム緩衝液；PB：リン酸ナトリウム緩衝液；TB：リン酸トリエチルアンモニウム緩衝液		
	未修飾シリカ	アミノシリカ
酸類	10 μ m, 芳香族カルボン酸, 85% MeCN-20 mM AB, UV [13]	44-60 μ m, 芳香族カルボン酸, 85% MeCN-20 mM AB, UV [13]
塩基類	—	20-35 μ m, アミノアルコール, 80% MeCN, RI [17]
アミド, 尿素類	10 μ m, サリチルアミド, 85% MeCN-20 mM AB, UV [13]	50 μ m, サリチルアミド, 85% MeCN-20 mM AB, UV [13]
ポリオール類	21-25 μ m, エピルビシン, 90% MeCN, 20 mM FB (pH 2.9), UV [8]	13 μ m, 3 μ m column, テトラサイクリン, 85% MeCN, 1 mM CB (pH5), UV [16]
アミノ酸類	—	58-100 μ m, アミノ酸, 60% MeOH, ESI-MS [19]
ペプチド類	—	22-95 μ m, 10 μ m column, ジペプチド, 92% MeCN-2.5 mM AB [14]
核酸類	10-12 μ m, 核酸塩基, ヌクレオシド 85% MeCN-20 mM AB, UV [13]	14-20 μ m, 核酸塩基, ヌクレオシド 85% MeCN-20 mM AB, UV [13]
糖類	33-43 μ m by a 3 μ m column, グルクロン酸誘導体, 87% MeCN-100 mM AB [11]	43-180 μ m by a 10 μ m column, 二糖, 85% MeCN [52]
備考	非可逆的吸着が起こりやすい	試料によっては非可逆的吸着が起こりやすい。カラムが平衡に達するのが遅い、修飾した官能基が剥落することがある。
	アミドシリカ	ポリ（スクシンイミド）誘導体シリカ
酸類	14 μ m, 芳香族カルボン酸, 85% MeCN-20 mM AB, UV [13]	—
塩基類	—	—
アミド, 尿素類	15 μ m, サリチルアミド, 85% MeCN-20 mM AB, UV [13]	—
ポリオール類	250 μ m, ポリフェノール類, 84% MeCN, UV [28]	—
アミノ酸類	—	50-67 μ m, アミノ酸, 80% MeCN-5 mM TB (pH 2.8), UV [3]
ペプチド類	例は多いが、ほとんどがグラジエント条件で分離されている。	33-37 μ m, アトシバン, 89% MeCN-10m M TB, UV [14] ; 69-87 μ m, ジペプチド, 80% MeCN-10 mM TB, UV [3]
核酸類	13-16 μ m, 核酸塩基, ヌクレオシド 85% MeCN-20 mM AB, UV [13]	—
糖類	7 μ m (3 μ m 粒子), 13 μ m (5 μ m 粒子), マンニトール, 75% MeCN RI [53]	57-66 μ m, シアル化糖, 80% MeCN-10 mM TB ; 20-22 μ m, キシログルカン, 70% MeCN-10 mM TB, PAD [32]
備考	カラムへの溶質の吸着は少ない	固定相の剥落が起こることがある

Column	双性イオン結合型シリカ	トリアゾール結合型シリカ
酸類	12–21 μm , 芳香族カルボン酸 85% MeCN–5 mM AB, UV [13]	11 μm , シュウ酸, 50% MeCN–10 mM PB (pH 7), UV; 17 μm , 安息香酸, 50% MeCN–10 mM AB, UV [46]
塩基類	15 μm , モルヒネ, 70% MeCN–20 mM AB, UV [42]	33 μm , ベンズアミジン, 90% MeCN–10 mM AB, UV [46]
アミド, 尿素類	13 μm , サリチルアミド, 85% MeCN–20 mM AB, UV [13]	17 μm , 尿素, 90% MeCN, UV; 20 μm , シアヌル酸, 50% MeCN–10 mM AB, UV [46]
ポリオール類	26–35 μm , フラボノイド, 75% MeCN–30 mM AB, UV [42]	11 μm , ロイシン; 13 μm , バリン; 14 μm ; イソロイシン; 70% MeCN–10 mM AB, UV; 30 μm , ヒスチジン, 70% MeCN–10 mM CB, UV [46]
アミノ酸類	–	14 μm , 1,2,6–ヘキサントリオール, 90%MeCN, ELSD [46]
ペプチド類	33 μm , ニューロテンシン; 56 μm , ブラジキニン; 70% MeCN–50 mM AB, UV [42]	35 μm , オキシトシン, 70% MeCN–10 mM AB, UV; 33 μm , アンジオテンシン II, 50% MeCN–10 mM AB, UV [46]
核酸類	17–21 μm , 核酸塩基, スクレオシド, 85% MeCN–20 mM AB, UV [13]; 36–84 μm スクレオチド, 70% MeCN–100 mM AB, UV [42]	14 μm , ウリジン, 90% MeCN–10 mM AB, UV; 21 μm , シチジン, 80% MeCN–10 mM AB, UV [46]
糖類	33–38 μm , モルヒネ配糖体, 70% MeCN–20 mM AB, UV [42]	30 μm , グルコース, 60% MeCN–20 mM PB (pH 7), RI, 18 μm ; グルコース–1–リン酸エステル, 60% MeCN–20 mM PB (pH 7), RI [46]
備考	固定相の剥落は少ない。	応用例が豊富

3. 文献

- [1] Hemstrom, P.; Irgum, K. *J. Sep. Sci.* **2006**, 29, 1784–1821.
- [2] Ikegami, T.; Tomomatsu, K.; Takubo, H.; Horie, K.; Tanaka, N. *J. Chromatogr. A* **2008**, 1184, 474–503.
- [3] Alpert, A. J. *J. Chromatogr.* **1990**, 499, 177–196.
- [4] Naidong, W. *J. Chromatogr. B* **2003**, 796, 209–224.
- [5] Song, Q.; Naidong, W. *J. Chromatogr. B* **2006**, 830, 135–142.
- [6] Li, W. K.; Li, Y. H.; Francisco, D. T.; Naidong, W. *Biomed. Chromatogr.* **2005**, 19, 385–393.
- [7] Naidong, W. Lee, J. W.; Jiang, X.; Wehling, M.; Hulse, J. D.; Lin, P. P. *J. Chromatogr. B* **1999**, 735, 255–269.
- [8] Li, R. P.; Huang, J. X. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1041, 163–169.
- [9] Kawamoto, T.; Yano, M.; Makihata, N. *Anal. Sci.* **2006**, 22, 489–490.
- [10] Ji, H. Y.; Jeong, D. W.; Kim, Y. H.; Kim, H. H.; Yoon, Y. S.; Lee, K. C.; Lee, H. S. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2006**, 20, 2127–2132.
- [11] Cohen, S.; Lhuillier, F.; Mouloua, Y.; Vignal, B.; Favetta, P.; Guitton, J. *J. Chromatogr. B* **2007**, 854, 165–172.
- [12] Grumbach, E. S.; Diehl, D. M.; Neue, U. D. *J. Sep. Sci.* **2008**, 31, 1511–1518.
- [13] Guo, Y. Gaiki, S. J. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1074, 71–80.
- [14] Oyler, A. R.; Armstrong, B. L.; Cha, J. Y.; Zhou, M. X.; Yang, Q.; Robinson, R. I.; Dunphy, R.; Burinsky, D. J. *J. Chromatogr. A* **1996**, 724, 378–383.
- [15] Christopherson, M. J.; Yoder, K. J.; Hill, J. T. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **2006**, 29, 2545–2558.
- [16] Valette, J. C.; Demesmay, C.; Rocca, J. L.; Verdon, E. *Chromatographia* **2004**, 59, 55–60.
- [17] Guo, Y.; Huang, A. H. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2003**, 31, 1191–1201.
- [18] Beilmann, B.; Langguth, P.; Hausler, H.; Grass, P.; *J. Chromatogr. A* **2006**, 1107, 204–207.
- [19] de Person, M.; Hazotte, A.; Elfakir, C.; Lafosse, M. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1081, 174–181.
- [20] Kind, T.; Tolstikov, V.; Fiehn, O.; Weiss, R. H. *Anal. Biochem.* **2007**, 363, 185–195.
- [21] Pack, B. W.; Risley, D. S. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1073, 269–275.
- [22] Risley, D. S.; Yang, W. Q.; Peterson, J. A. *J. Sep. Sci.* **2006**, 29, 256–264.
- [23] Yoshida, T. *J. Chromatogr. A* **1998**, 808, 105–112.

- [24] Yoshida, T. *J. Chromatogr. A* **1998**, 811, 61–67.
- [25] Kuraya, N.; Hase, S. *Anal. Biochem.* **1996**, 233, 205–211.
- [26] Guo, Y. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **2005**, 28, 497–512.
- [27] Langrock, T.; Czihal, P.; Hoffmann, R. *Amino Acids* **2006**, 30, 291–297.
- [28] Yanagida, A.; Murao, H.; Ohnishi–Kameyama, M.; Yamakawa, Y.; Shoji, A.; Tagashira, M.; Kanda, T.; Shindo, H.; Shibusawa, Y. *J. Chromatogr. A* **2007**, 1143, 153–161.
- [29] Alpert, A. J. *J. Chromatogr.* **1983**, 266, 23–37.
- [30] Karnoup, A. S.; Turkelson, V.; Anderson, W. H. K. *Glycobiology* **2005**, 15, 965–981.
- [31] Zhu, B. Y.; Mant, C. T.; Hodges, R. S. *J. Chromatogr.* **1991**, 548, 1324.
- [32] Alpert, A. J.; Shukla, M.; Shukla, A. K.; Zieske, L. R.; Yuen, S. W.; Ferguson, M. A. J.; Mehler, A.; Pauly, M.; Orlando, R. *J. Chromatogr. A* **1994**, 676, 191–202.
- [33] Litowski, J. R.; Semchuk, P. D.; Mant, C. T.; Hodges, R. S. *J. Peptide Res.* **1999**, 54, 1–11.
- [34] Zhang, K.; Yan, C.; Zhang, Z. C.; Wang, Q. S.; Gao, R. Y. *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* **2003**, 26, 2119–2131.
- [35] Fu, H. J.; Jin, W. H.; Xiao, H.; Xie, C. H.; Guo, B. C.; Zou, H. F. *Electrophoresis* **2004**, 25, 600–606.
- [36] Mihailova, A.; Lundanes, E.; Greibrokk, T. *J. Sep. Sci.* **2006**, 29, 576–581.
- [37] Oertel, R.; Renner, U.; Kirch, W. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2004**, 35, 633–638.
- [38] Bengtsson, J.; Jansson, B.; Hammarlund–Udenaes, M. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, 19, 2116–2122.
- [39] Oertel, R.; Neumeister, V.; Kirch, W. *J. Chromatogr. A* **2004**, 1058, 197–201.
- [40] Idborg, H.; Zamani, L.; Edlund, P. O.; Schuppe–Koistinen, I.; Jacobsson, S. P. *J. Chromatogr. B* **2005**, 828, 9–13.
- [41] Hagglund, P.; Matthiesen, R.; Elortza, F.; Hojrup, P.; Roepstorff, P.; Jensen, O. N.; Bunkenborg, J. *J. Proteome Res.* **2007**, 6, 3021–3031.
- [42] SeQuant, http://www.sequant.de/products/products_sequant.shtml
- [43] Tanaka, H.; Zhou, X. J.; Ohira, M. *J. Chromatogr. A* **2003**, 987, 119–125.
- [44] Armstrong, D. W.; Jin, H. *J. Chromatogr.* **1989**, 462, 219–232.
- [45] Liu, Y.; Ugaonkar, S.; Verkade, J. G.; Armstrong, D. W. *J. Chromatogr. A* **2005**, 1079, 146–152.
- [46] HPLC Chromatogram index Cosmosil HILIC, Nacalai Tesque, Kyoto (2007).
http://www.nacalai.co.jp/cosmosil/img-HILIC/HILIC%20Index_JP20070321-Link.pdf
- [47] Persson, J.; Hemstrom, P.; Irgum, K. *J. Sep. Sci.* **2008**, 31, 1504–1510.
- [48] Wu, J.-Y.; Bicker, W.; Lindner, W. *J. Sep. Sci.* **2008**, 31, 1492–1503.
- [49] Dejaegher, B.; Mangelings, D.; Heyden, Y. V. *J. Sep. Sci.* **2008**, 31, 1438–1448.
- [50] Jandera, P. *J. Sep. Sci.* **2008**, 31, 1421–1437.
- [51] Mant, C. T.; Hodges, R. S. *J. Sep. Sci.* **2008**, 31, 1573–1584.
- [52] Brons, C.; Olieman, C. *J. Chromatogr.* **1983**, 259, 79–86.
- [53] TSK gel Application Note, TSK–GEL Amide–80 normal phase chromatography columns for the separation of saccharides, Tosoh, Tokyo,
http://www.separations.us.tosohbioscience.com/NR/rdon-lyres/41B82826-9C84-4EBE-80A9-9BD80C9E21D7/0/L_NPC_AN_Amide80_02.pdf