

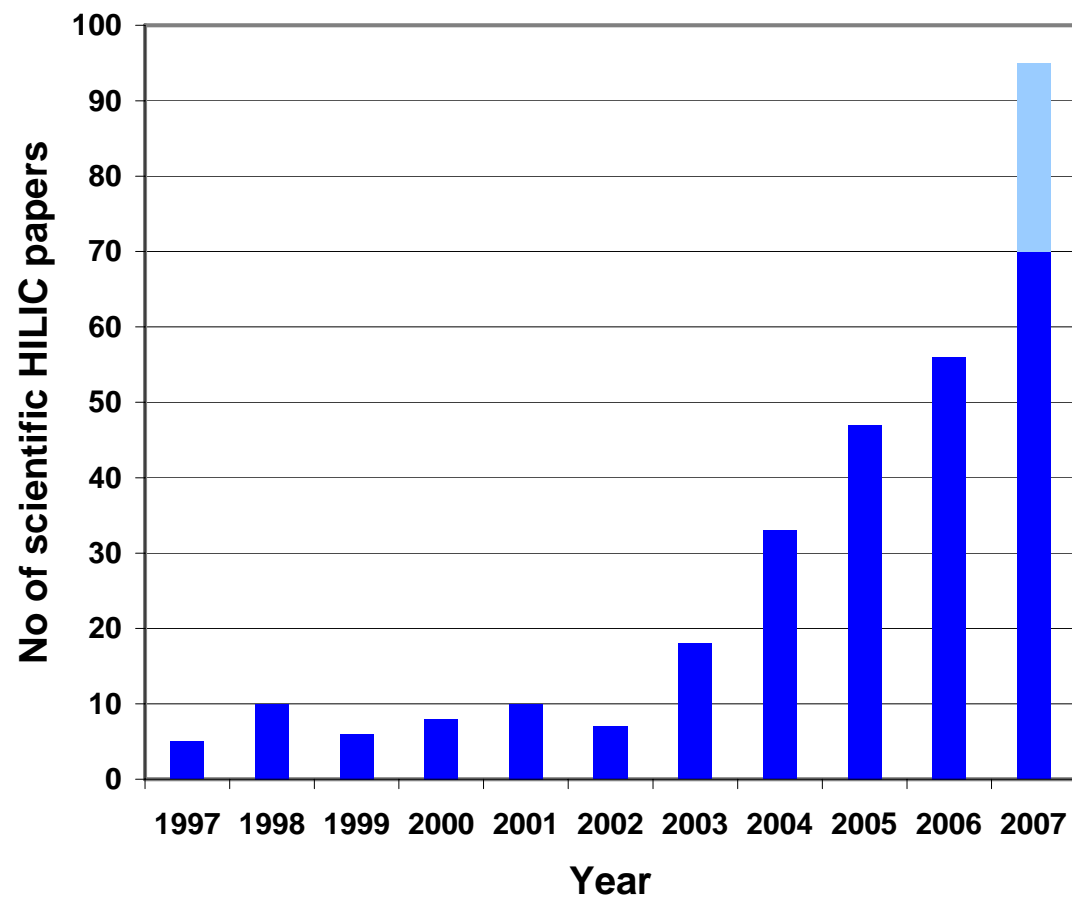
両性イオン基ZICヒリックカラムによる 上手な極性化合物の分離

極性および親水性化合物のヒリック分離 についての最新の進歩

長江徳和 (クロマニックテクノロジーズ)

エイナーポンテン (**SeQuant**)

ヒリックの関心が急増



ヒリックに関する論文の年間発表数^[1+update]

なぜヒリック?

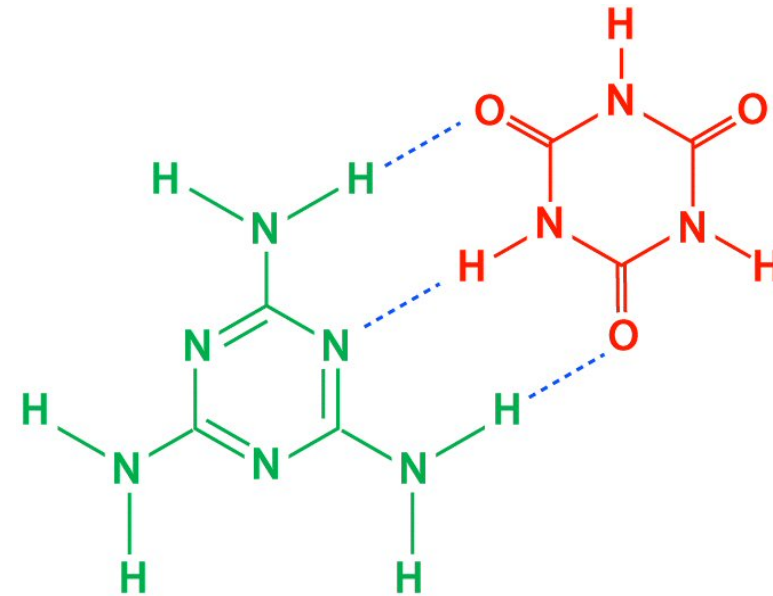
新規な、より効果的な方法による
分析上の問題点の解決!

米国におけるペットフードスキャン
ダル

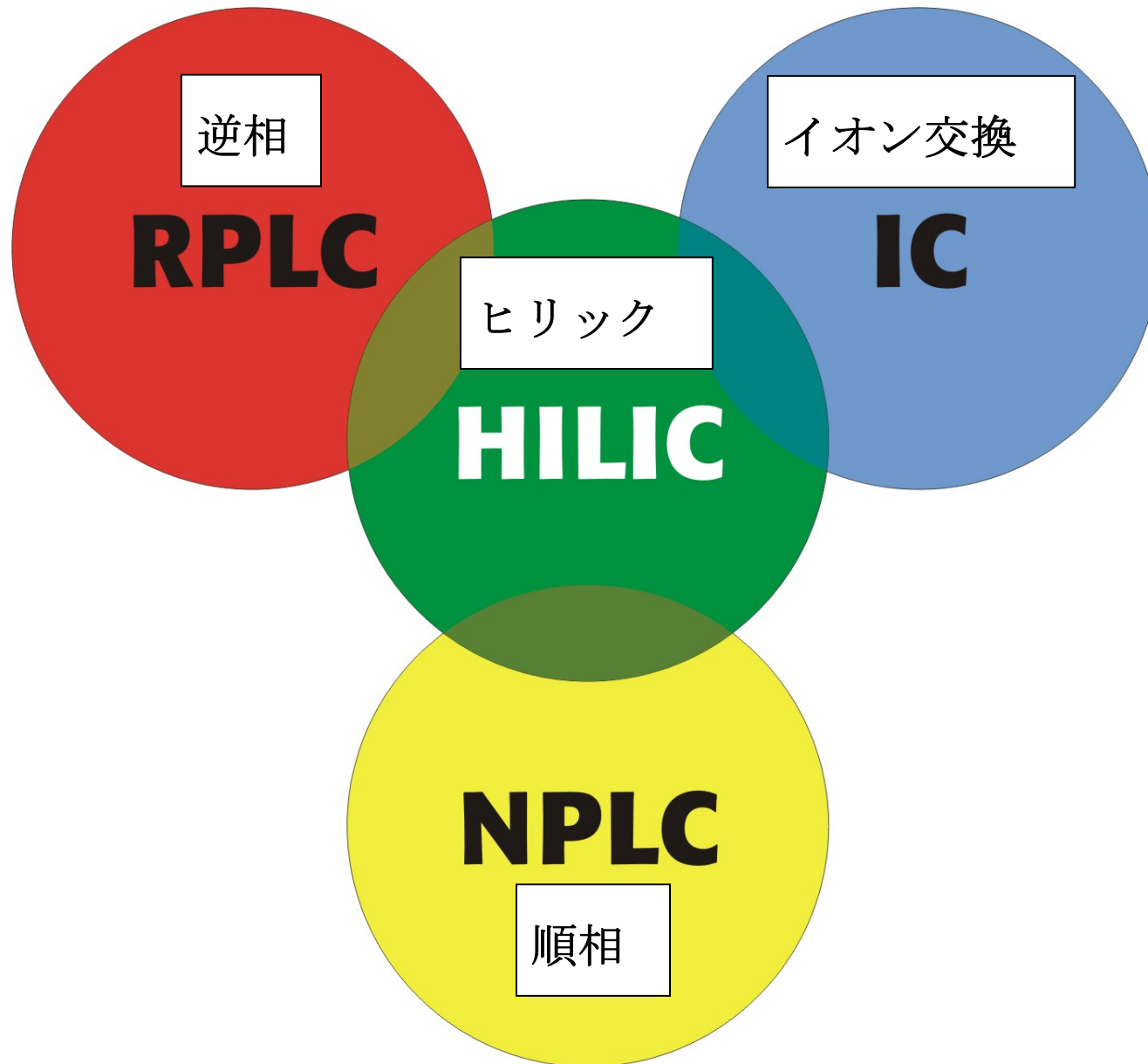
歯磨き中のジェチレングリコール

食品中のアクリルアミド

糖ペプチドの同定



メラミン- シアヌル酸



順相クロマトグラフィー

液体クロマトグラフィーの最初概念

- ❖ 固定相としてセルロースや無機酸化物（シリカ）
- ❖ 非極性移動相（ヘキサンなど）

固定相のおもな限界点

- ❖ 遅い平衡化
- ❖ 不均一なサイトの存在
- ❖ 保持時間の変化

逆相クロマトグラフィー

結合された非極性固定相により順相シリカ由来の問題点が解決された:

- ❖ 再現性
- ❖ 堅牢性
- ❖ 生態関連試料の分析への適合性

逆相は優れた手法となった!

(...しかし電荷を有していたり、強い双極性のある、または水素結合性のある親水性化合物については、まだ問題がある)

親水性化合物のための逆相



親水性化合物を分離するために堅牢な結合相が考案され、様々なアプローチが試みられた:

イオンペアーまたはミセルクロマトグラフィー

- ❖ 機構についてはまだ議論中^[2] **L**質量分析計(**MS**)への適合性が低い^[3]

極性基埋込型固定相

- ❖ 安定性が低く、カラムからの溶出物が多い
- ❖ 水の多い移動相 -> 低い濡れ性 -> 再現性低下^[4]

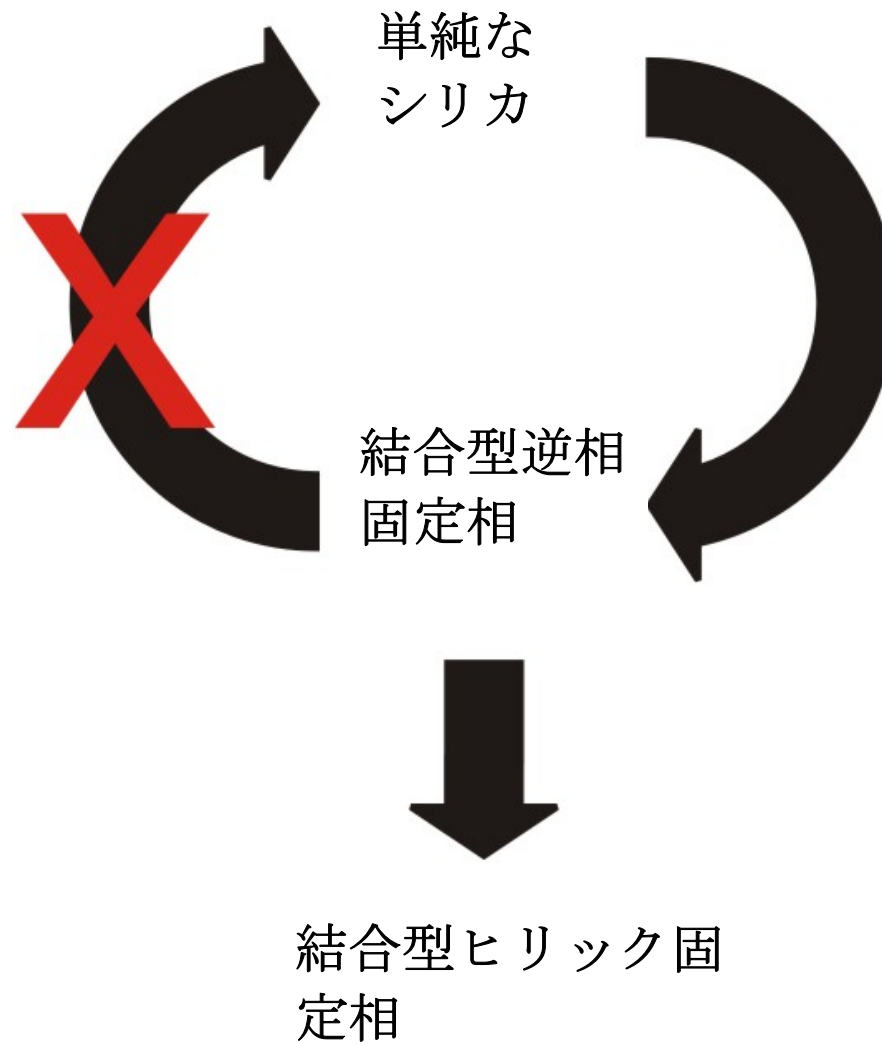
誘導体化

- ❖ 時間の消費と多くの干渉

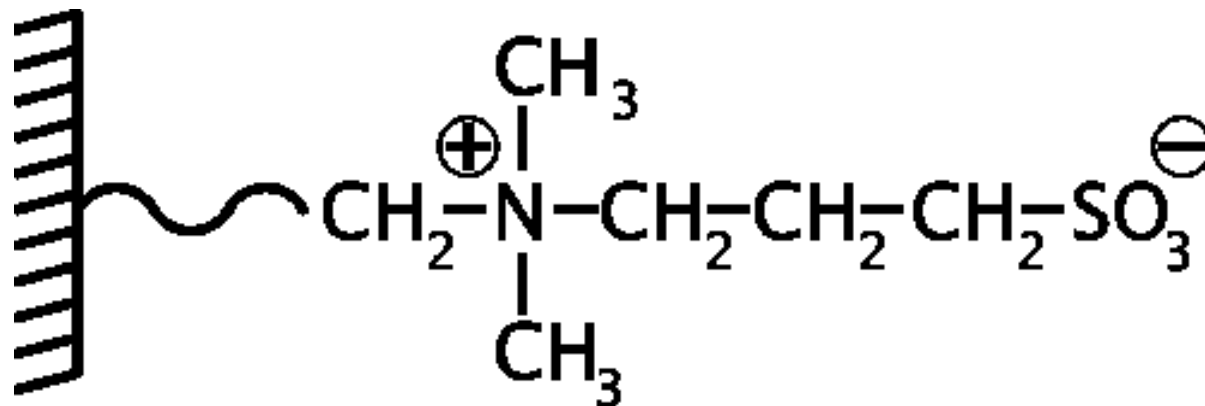
... **LC-MS** には他に代わるべき方法が必要になる...

ヒリック - 単刀直入な（簡単な）アプローチ!

- ❖ 水を含む溶媒（移動相），調整が簡単
- ❖ 極性化合物の高い溶解性
- ❖ エレクトロスプレーイオン化(**ESI**)-**MS** の感度向上^[5]
- ❖ 逆相と相関性がない（直交する）^[6]
- ❖ 結合相を有するヒリック固定相が入手可能!

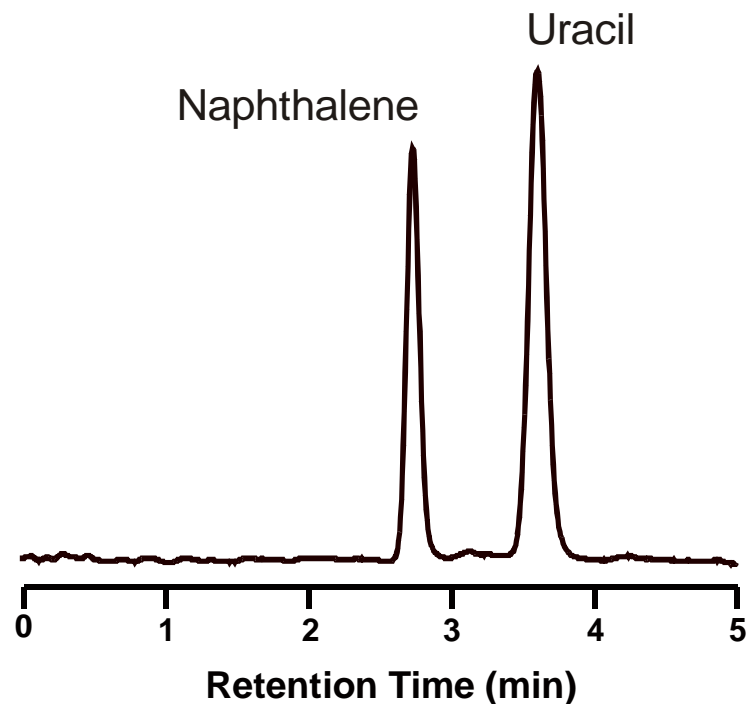


ZIC[®]-HILIC ジック-ヒリック



結合している固定相

逆相と相関性のない（直交する）ヒリック



親水性固定相...

有機溶媒組成比の高い溶離液（移動相）

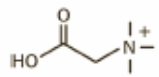
溶離液:

70% (v/v) アセトニトリル

30% (v/v) 水

ZIC[®]-HILICキャピラリカラム
(150 × 0.3 mm, 5 μm, 200 Å)

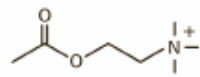
“ヒリック・親水性化合物”...



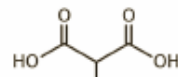
ベタイン



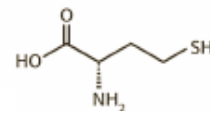
コリン



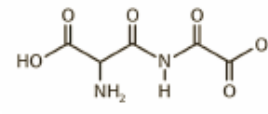
アセチルコリン



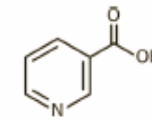
メチルマロン酸



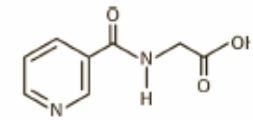
ホモシステイン



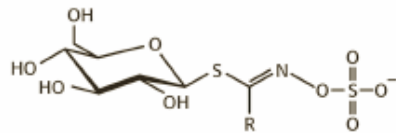
Denticine



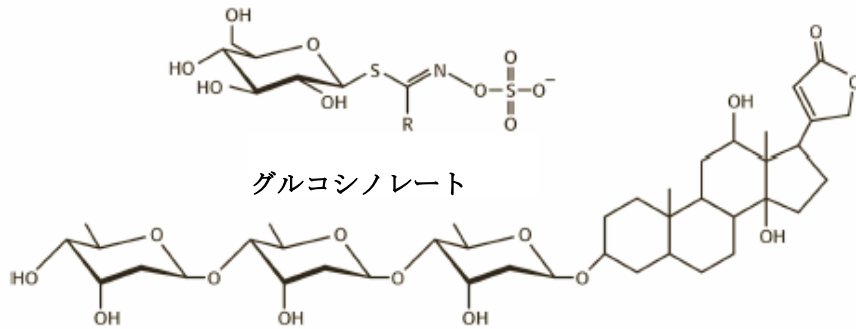
ニコチン酸



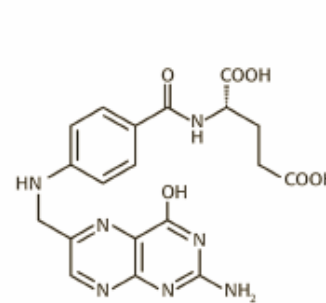
ニコチン酸



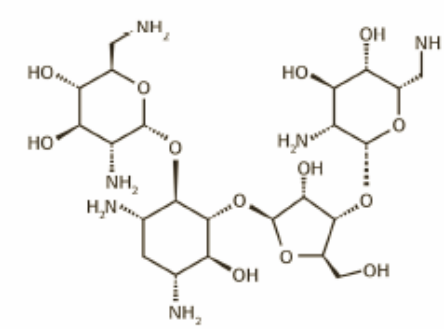
グルコシノレート



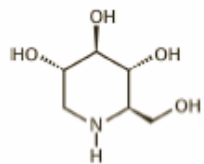
シゴキシン



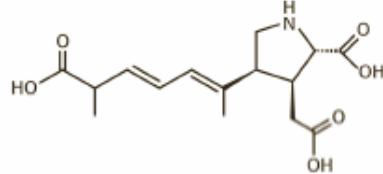
葉酸



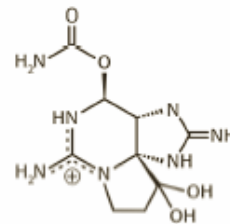
ネオマイン



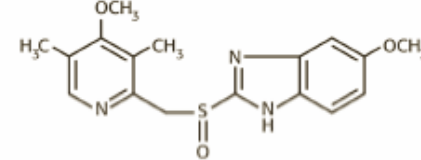
1-デオキシノジリマイシン



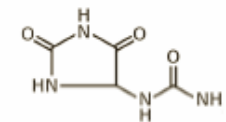
ドーモイ酸



サイトキシン



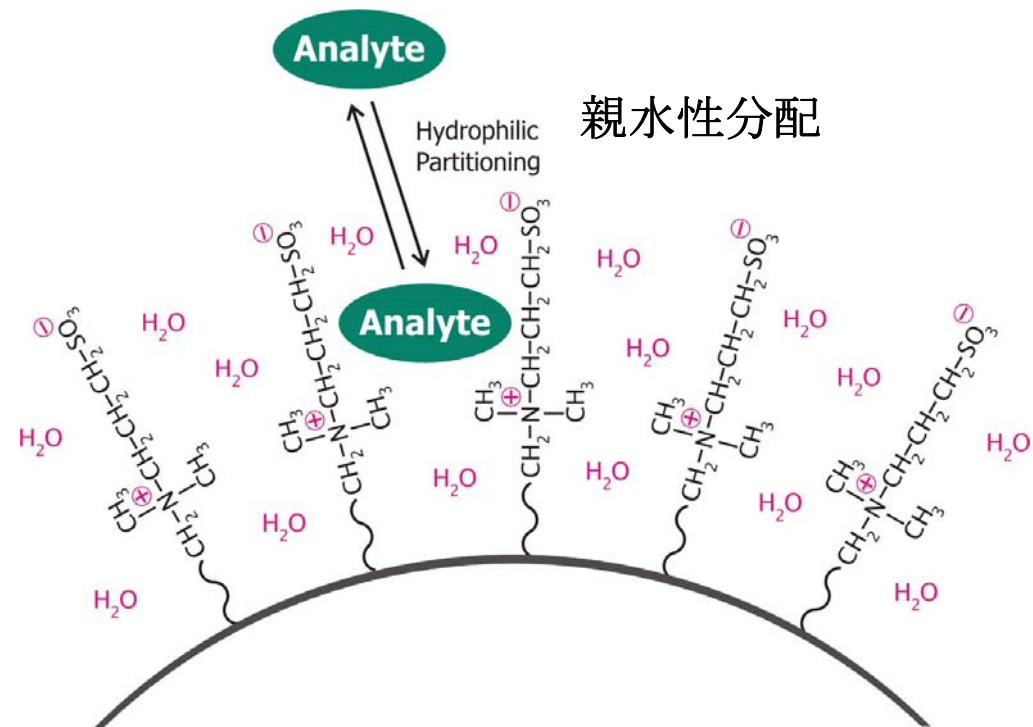
オメプラゾール



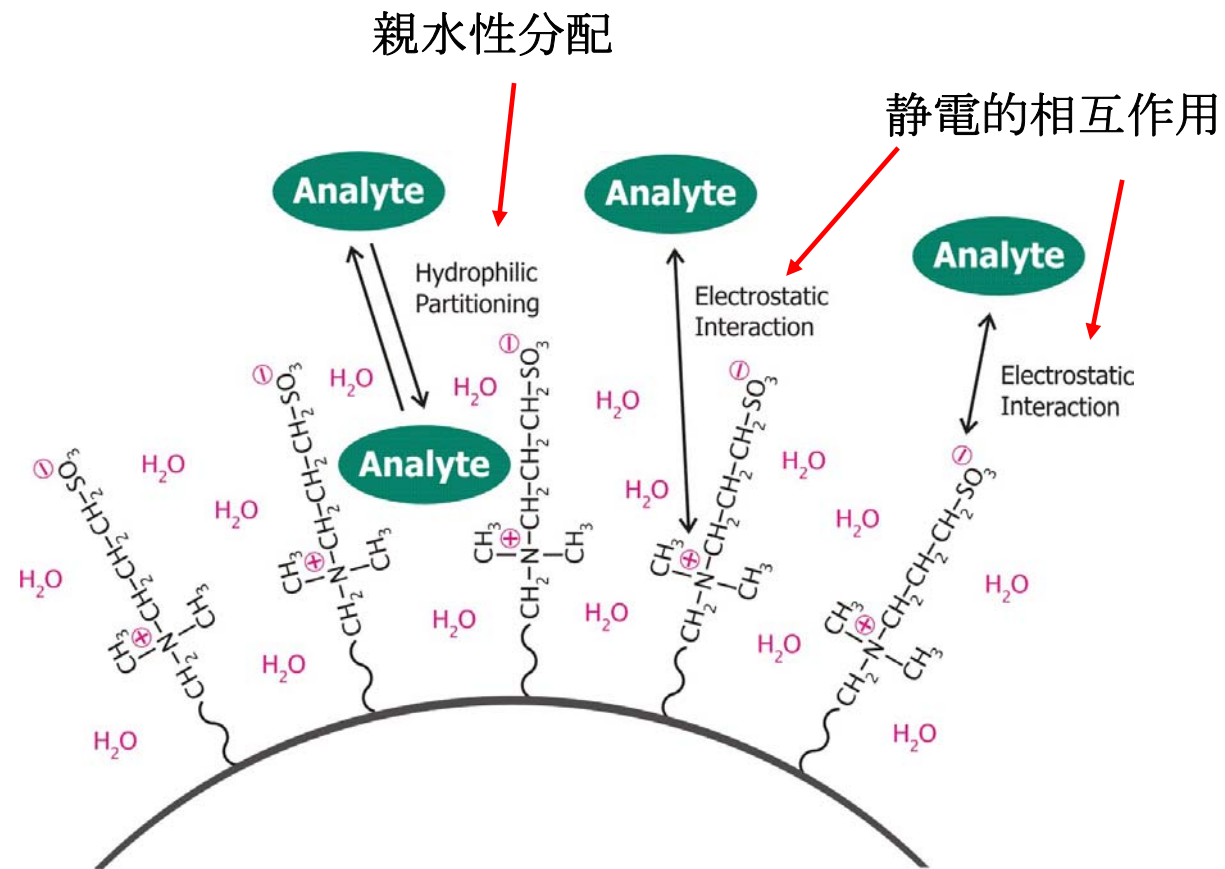
アランドイン

ヒリックの保持機構

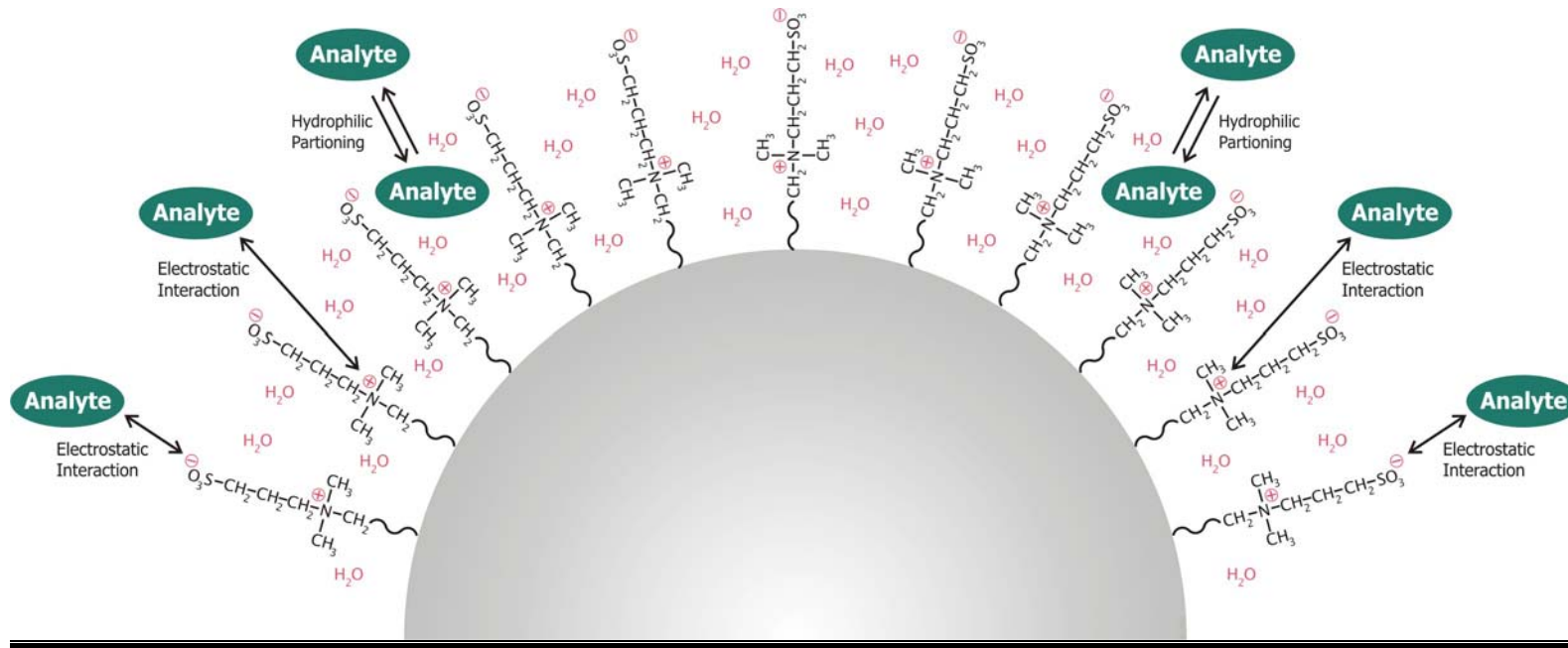
試料成分



ヒリック保持機構

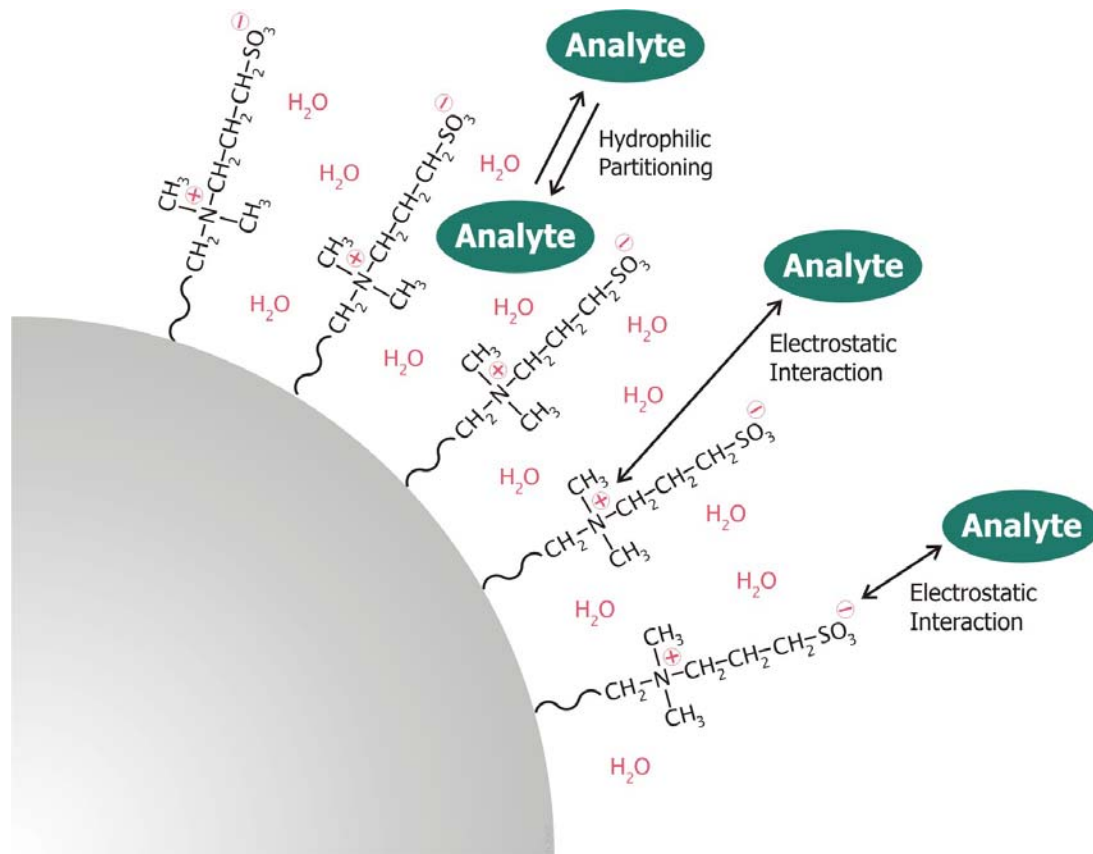


ヒリックの日の出!



...空に雲がかかっているか?

ヒリック機構 – まだ議論中



1952年に **Samuelsson**^[7] によりアンバーライト **IRA-400**でのモノサッカライドの分離としてヒリックが示された。

1990年アルパートにより略語の**"HILIC"** が提案された^[8]

必要とするもの:

固定相表面の水を多く含む相

用いられるもの:

両性イオンは安定的に含水した状態になる

ヒリックの機構

ほとんどのヒリック分離は多様性があると思われる

分配

溶離液（移動相）と含水している固定相との間の液-液分配

クーロン力の相互作用と水素結合性

固定相から、または固定相上の堅固な結合水から生じる相互作用

- ❖ **THF** は水素結合受容体として働くので、**THF**を用いるとアセトニトリルより保持は弱くなる^[9]
- ❖ 水素結合性や多様な機構が報告され。証明されている^[10-12]
- ❖ シアノプロピルカラム - 水素結合性がないので、保持しない^[13]

報告されたヒリックカラムの問題点

ヒリックシリカカラム

- ❖ グラジエント溶離には適さない，しかも操作pH範囲に制限がある^[15]
- ❖ カラム安定化のために何回も注入しないといけない^[12]
- ❖ 試料が過負荷になりやすく，ラングミュア一等温式からずれる挙動をする^[12]

アミノプロピルシリカカラム

- ❖ カラムブランドにより大きな差がある^[14,16]
- ❖ 緩衝液でのカラム平衡化時間が長い，固定相が壊れ溶出する^[17-21]

Poly(2-hydroxyethyl aspartamide)

- ❖ 低いカラム効率^[22]，安定性に限界がある^[23]，固定相が壊れ溶出する^[24]

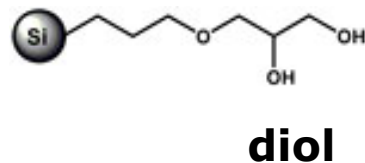
一般的なヒリックの現象

- ❖ イオンも保持され，試料成分と一緒に溶出する → **MS** サプレッション

ヒリック固定相の比較

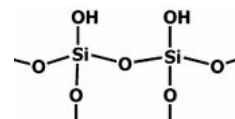
中性

- ❖ イオン相互作用がない
- ❖ 低選択性
- ❖ **pH**-依存しない

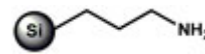


荷電

- ❖ 高選択性
- ❖ 強いイオン相互作用
- ❖ 高濃度緩衝液が必要
- ❖ **pH**-依存する



silica

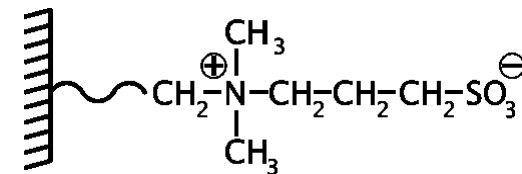


amino

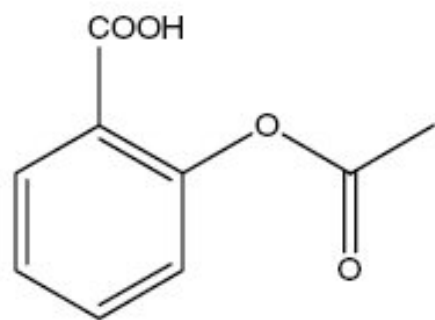
両性イオン

“電荷しているが中性”

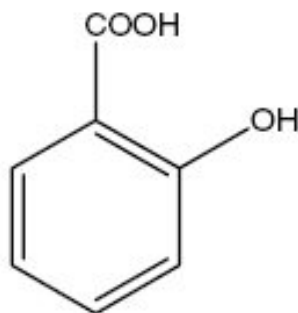
- ❖ 高選択性
- ❖ 弱いイオン相互作用
- ❖ 安定な水和層
- ❖ **pH**-依存しない


ZIC®-HILIC & ZIC®-pHILIC

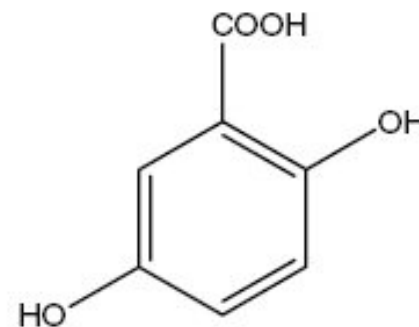
芳香族カルボン酸の分離



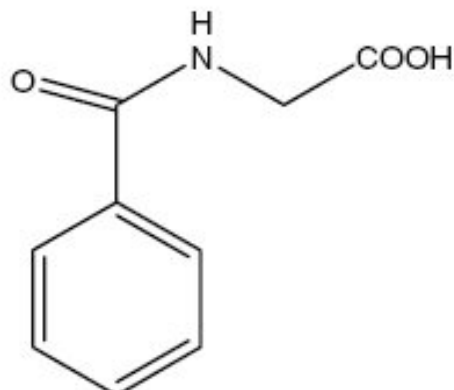
アセチルサリチル酸



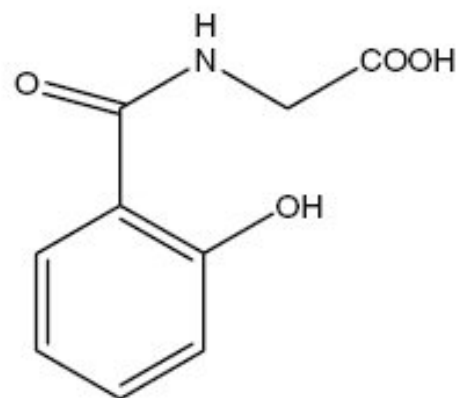
サリチル酸



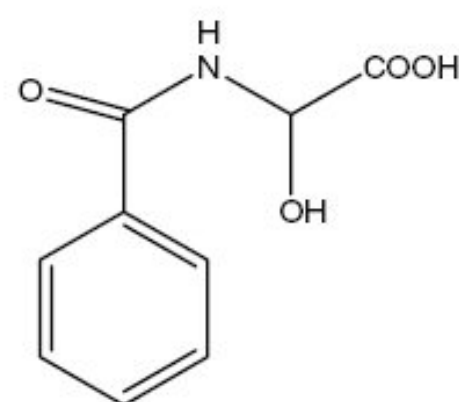
ゲンチシン酸



馬尿酸

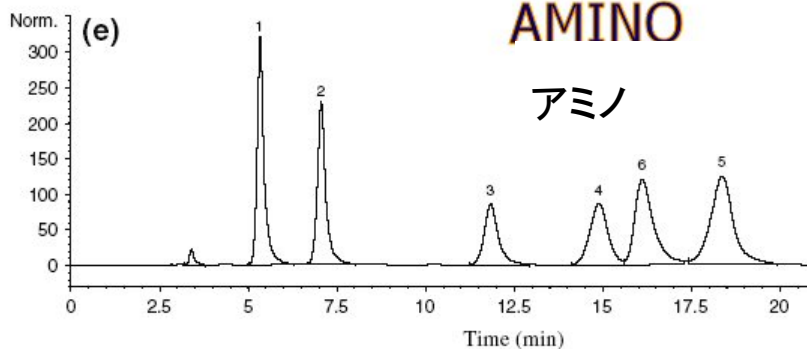
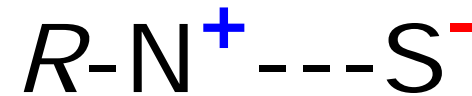
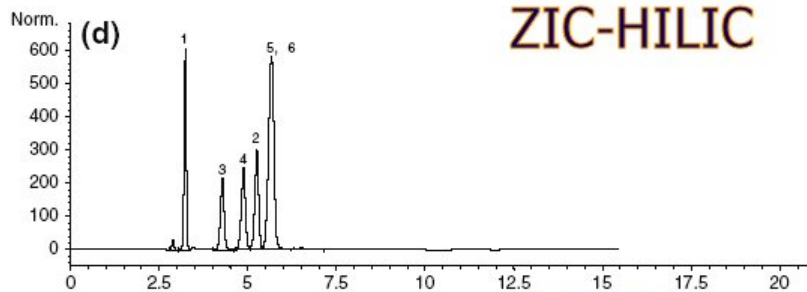
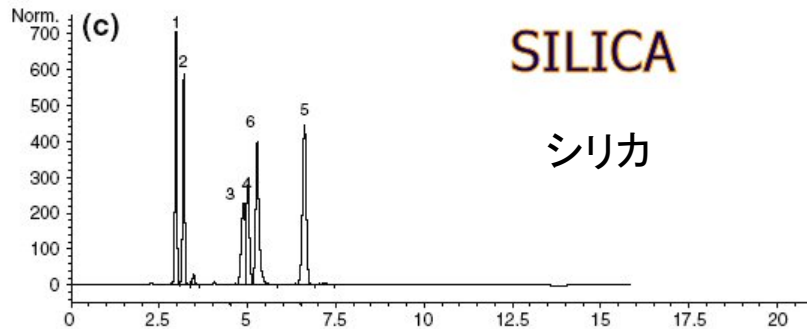


サリチル尿酸

 α -ヒロドキシ馬尿酸

Investigating the Effect of Chromatographic Conditions on Retention of Organic Acids in Hydrophilic Interaction Chromatography Using a Design of Experiment Y. Guo, S. Srinivasan, S. Gaiki, *Chromatographia*, 66 (2007) 223-229

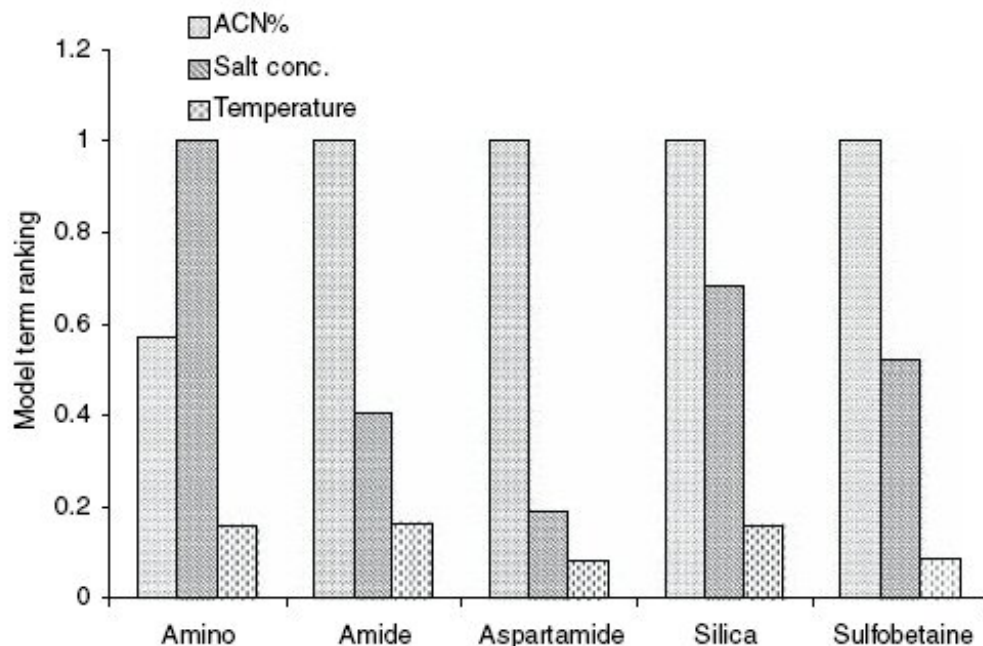
芳香族カルボン酸の分離



移動相: アセトニトリル/水 (85/15, v/v) 含む 10 mM 酢酸アンモニウム (pH ~ 6.8)

Y. Guo, S. Srinivasan, S. Gaiki,
Chromatographia, 66 (2007) 223-229

芳香族カルボン酸の分離



ファクターランキング

アセトニトリル

最も重要

温度

重要でない

移動相中の塩濃度

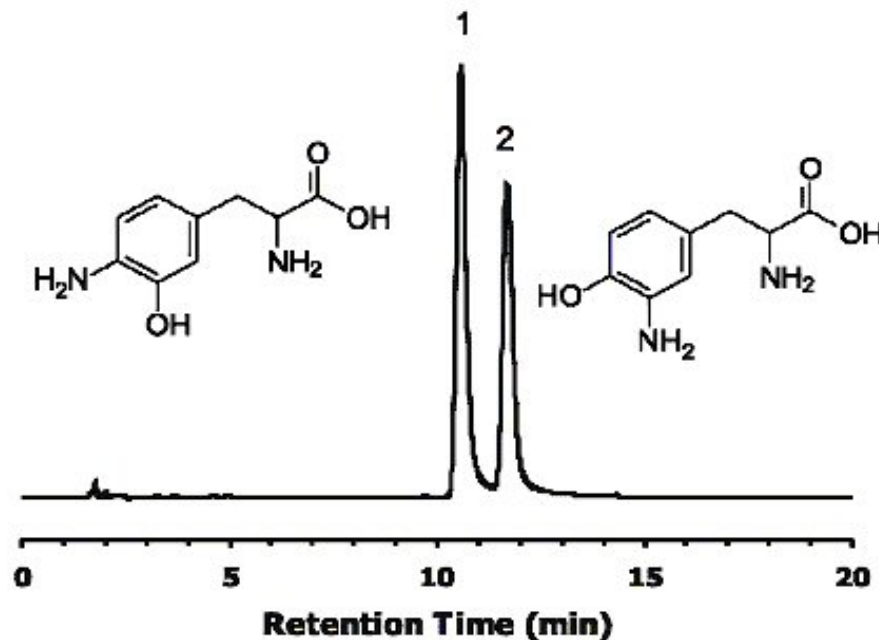
カラムによって大きな差がある

EXPERIMENTAL DESIGN
Model term ranking

移動相pHの影響は?

Y. Guo, S. Srinivasan, S. Gaiki,
Chromatographia, 66 (2007) 223-229

芳香族カルボン酸の分離- 異性体

ZIC[®]-HILIC150 x 2.1mm, 3.5 μ m, 100 Å

移動相:

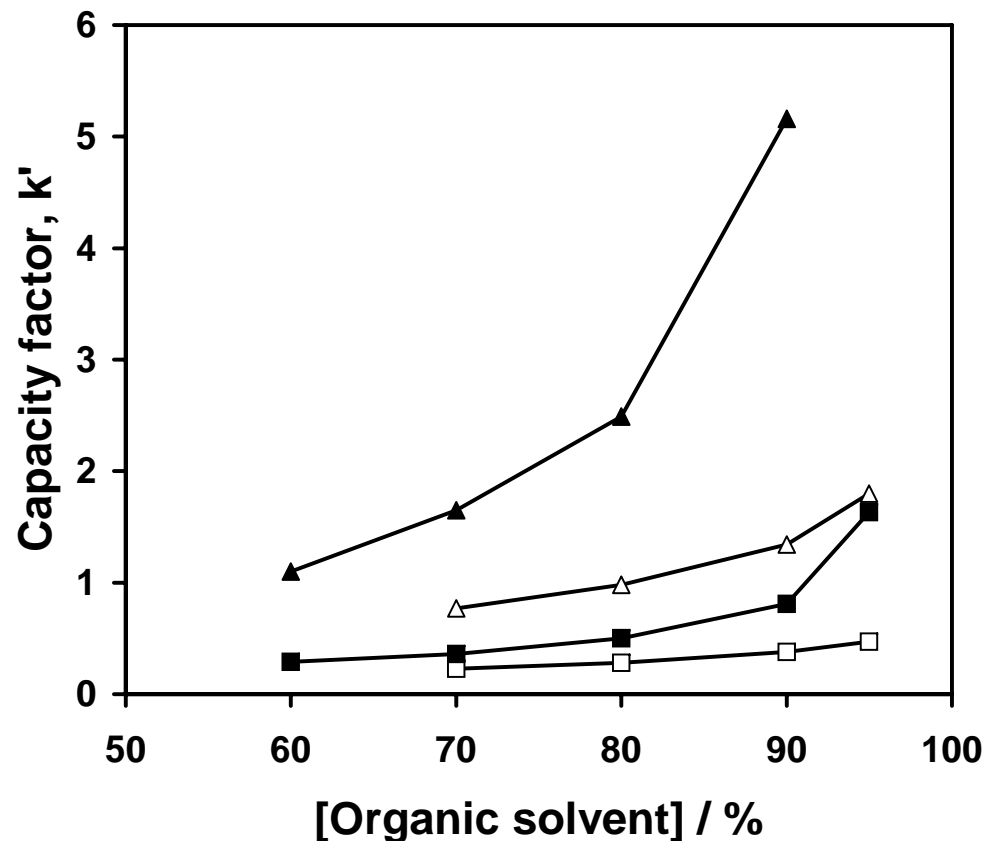
82/12 (v/v) ACN/NH₄Ac
(overall 12 mM, pH 4.5)

流速:

150 μ L/min, UV @ 254 nm

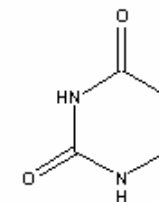
D. Nezireviā, K. Årstrand, B. Kågedal
J. Chromatogr. A, 1163 (2007) 70-79

保持に及ぼす有機溶媒の影響

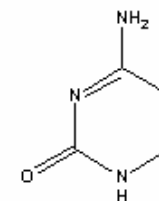


メタノール (□, △) or アセトニトリル (■, ▲) / 水
; 10 mM ギ酸加える

- ❖ アセトニトリルの方がより保持が大きい
- ❖ メタノールの強い水素結合性が水の層を乱す



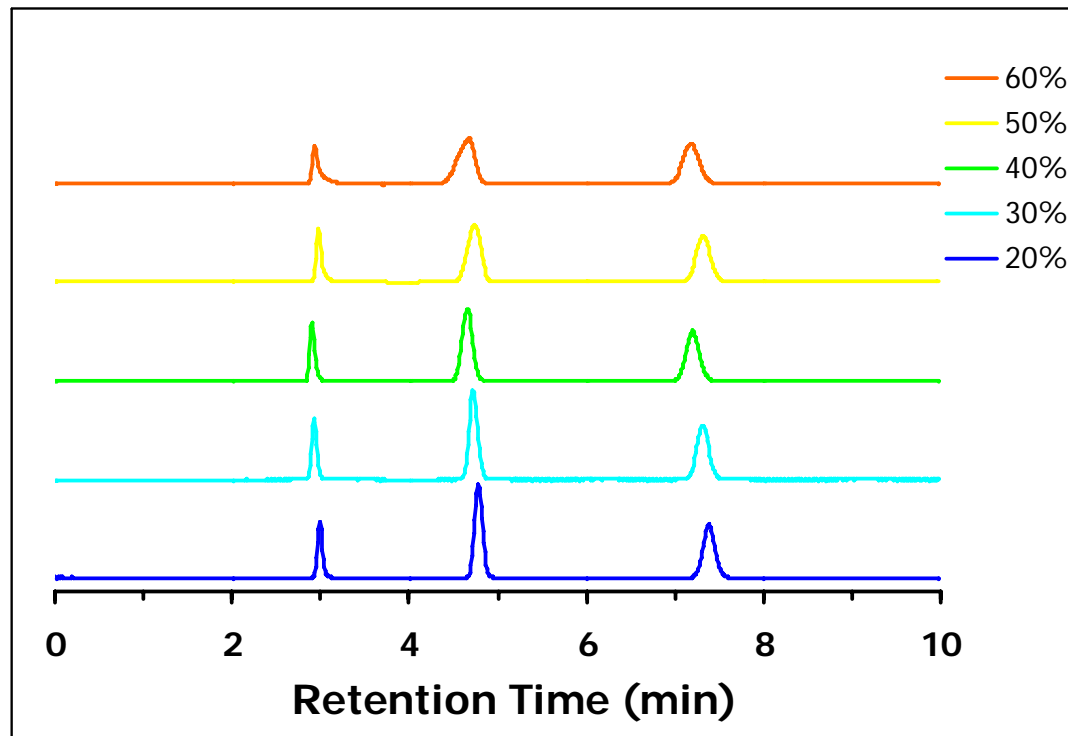
uracil (□, ■)



cytosine (△, ▲)

ヒリックにおける試料溶解溶媒の影響

試料溶液の水比率



水に溶かした試料は注入量を減らす必要がある!

ZIC[®]-HILIC 150 × 4.6 mm, 5 μm

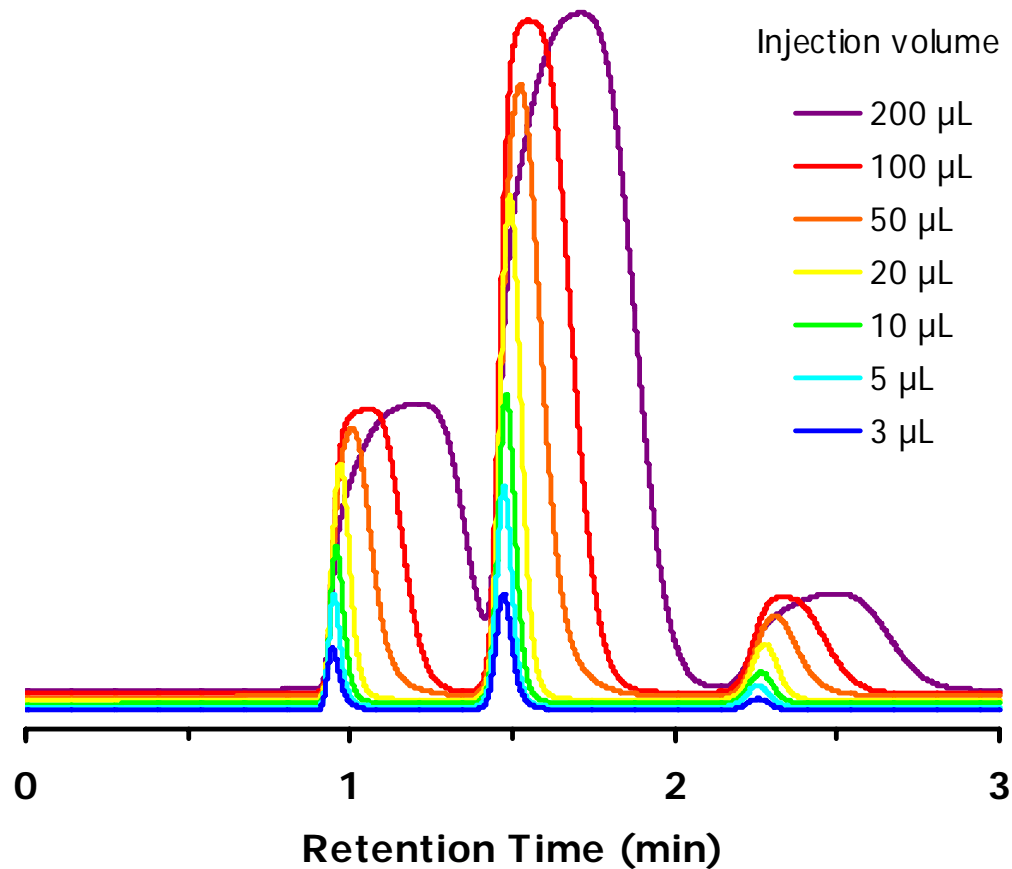
溶離液: 80% (v/v) アセトニトリル
20% (v/v) NH₄OAc 5 mM

UV 検出: 254 nm

注入:

トルエン, ウラシル, シトシン, 10 μL 有機溶媒と水の組成比を変えている

容量負荷量



カラム:

ZIC[®]-HILIC 50 × 4.6 mm, 5 µm

注入:

トルエン, ウラシル, シトシン
3-200 µL 移動相に溶かす

溶離液:

80% (v/v) アセトニトリル
20% (v/v) 5 mM NH₄Ac

流速: 0.5 mL/min

圧力: 1.1 MPa

UV 検出: 254 nm

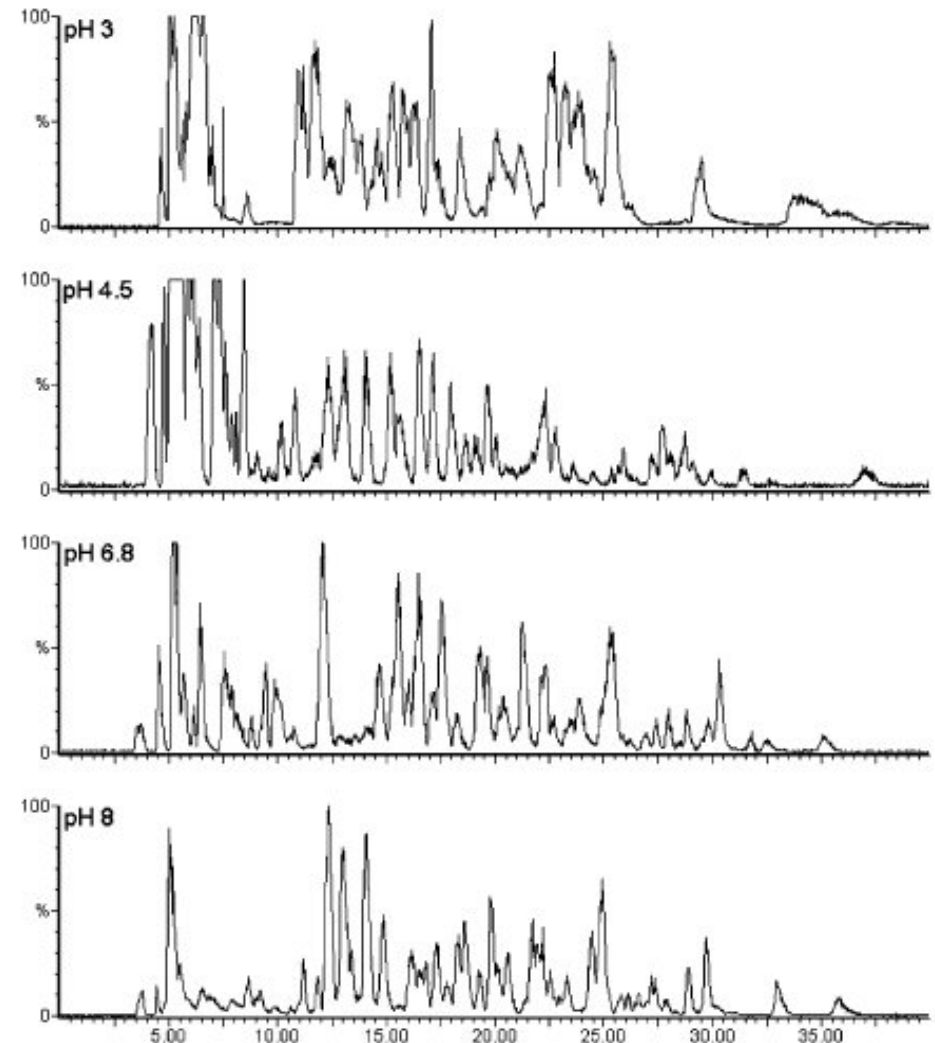
移動相pHによる選択性の最適化

ペプチド分離

LC-MS ベースピーククロマトグラム

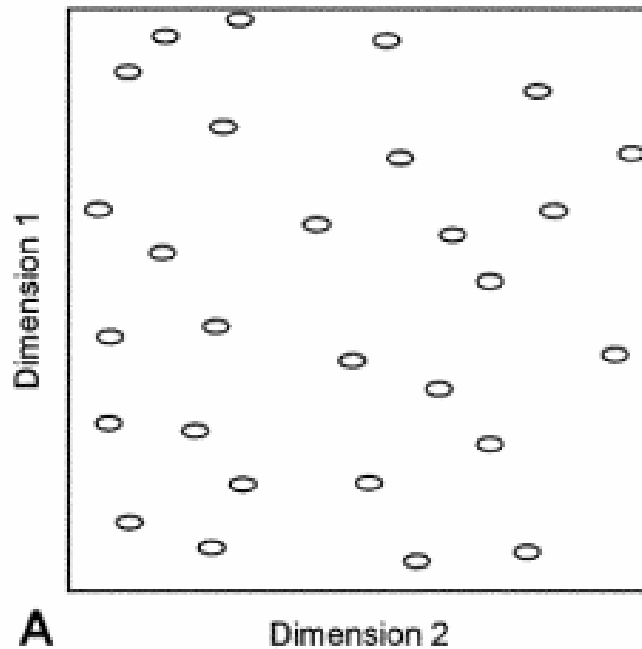
ZIC[®]-HILIC, 1.0 mm x 150 mm,
3.5 μm カラムをオンラインでQ-
TOF Micromass MSに接続

緩衝液pH は図中に示す;
pH= 3, 4.5, 6.8, and 8

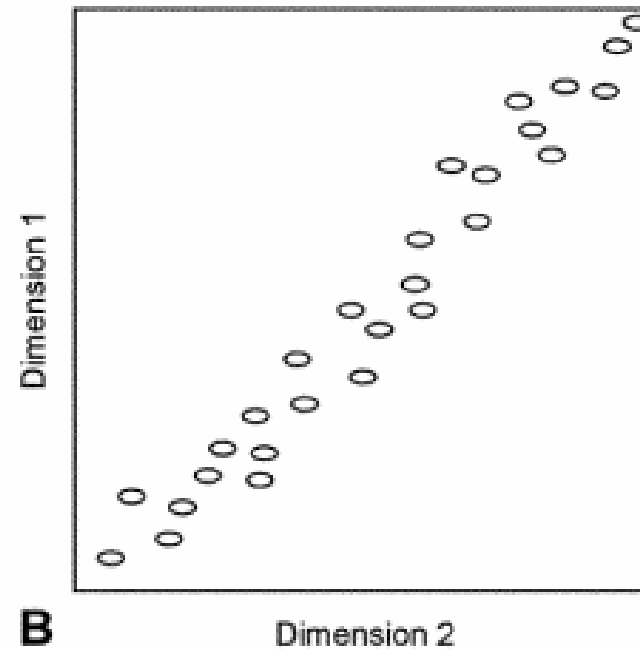


Evaluation and Optimization of ZIC-HILIC-RP as an Alternative MudPIT Strategy, P. J. Boersema, N. Divecha, A. J. R. Heck, S. Mohammed, *J. Proteome Res.*, 6 (2007) 937-946

直交対非直交（相関性なし・あり）



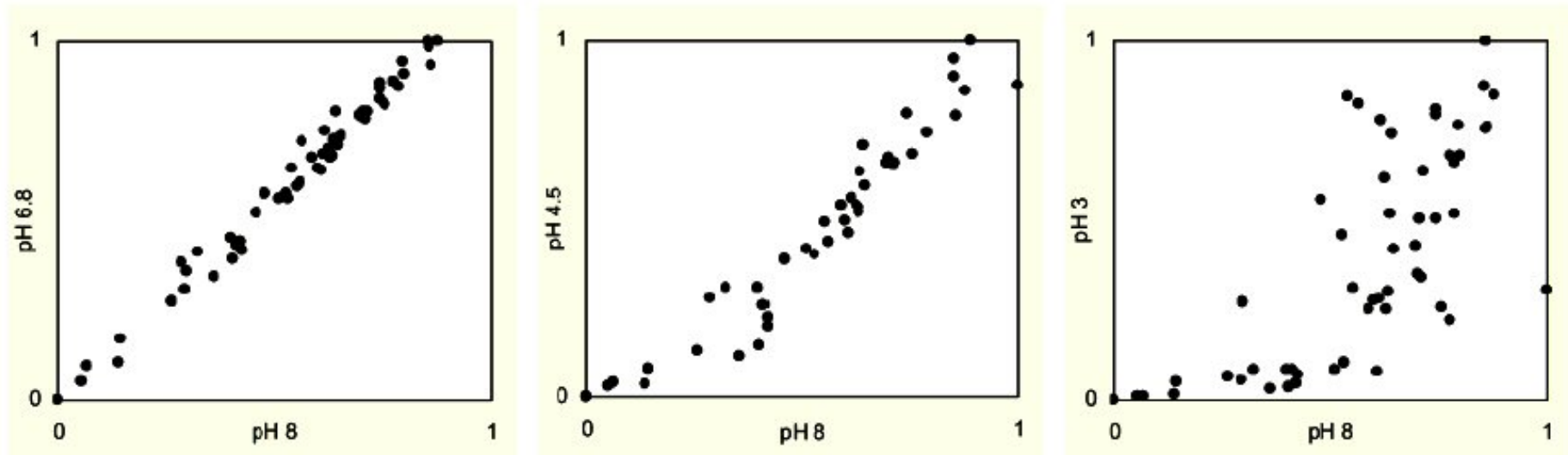
orthogonal
2D-separation



non-orthogonal
2D-separation

Jeffery et al.; Handbook of capillary electrophoresis, 2nd ed. CRC, Boca Raton, pp 765–790

移動相pHによる選択性の最適化

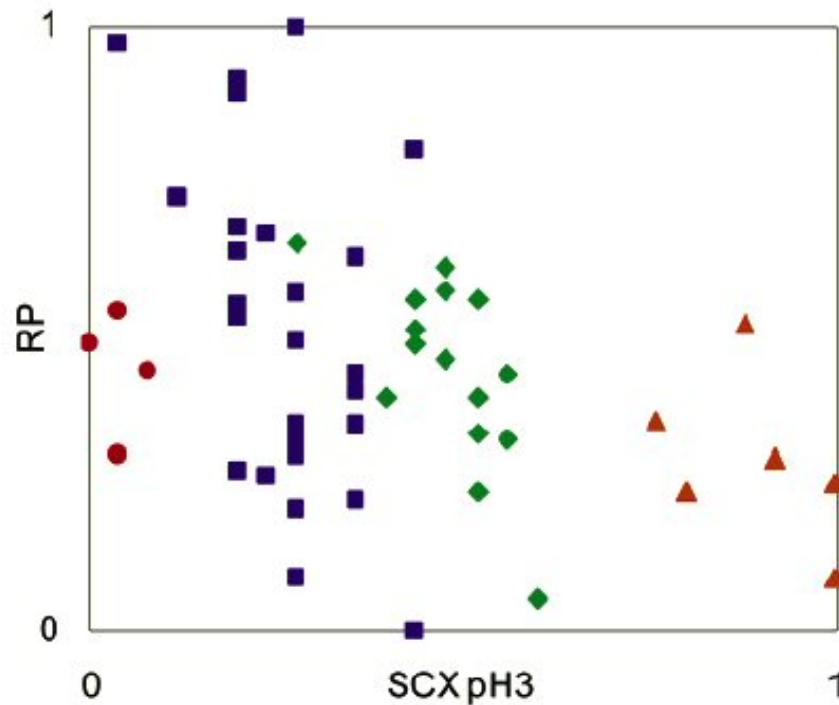


ZIC[®]-HILICカラムを用い、異なったpH条件で検出された全てのペプチドの標準化された保持時間

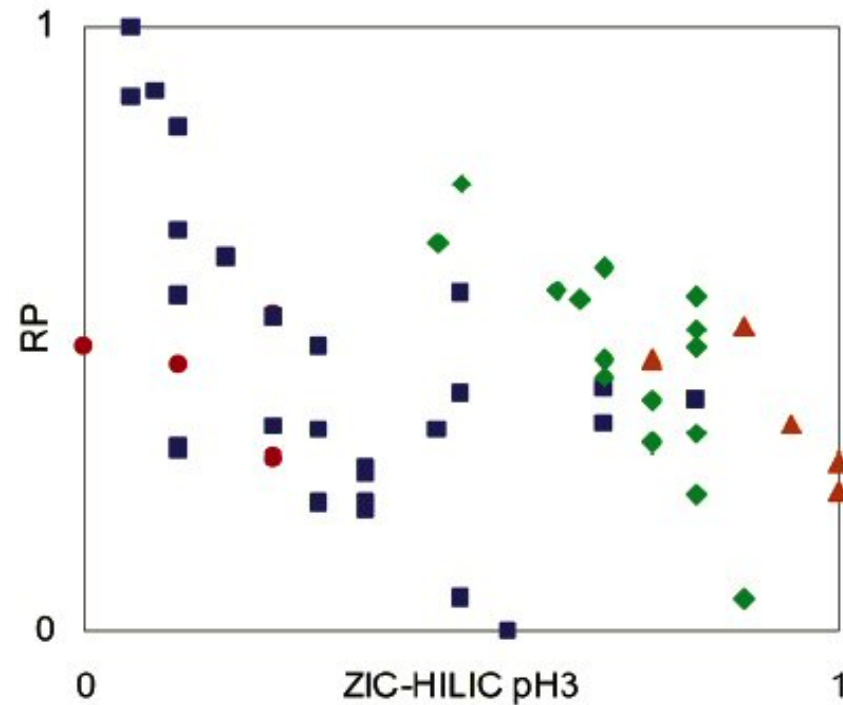
“ペプチドの正味の荷電量の変化は固定相とペプチド間の相互作用を変えるだけでなく、異なった分離を創出することにもつながる”

P. J. Boersema, N. Divecha, A. J. R. Heck, S. Mohammed, *J. Proteome Res.*, 6 (2007) 937-946

2D-LC 標準化されたペプチドの保持時間のプロット



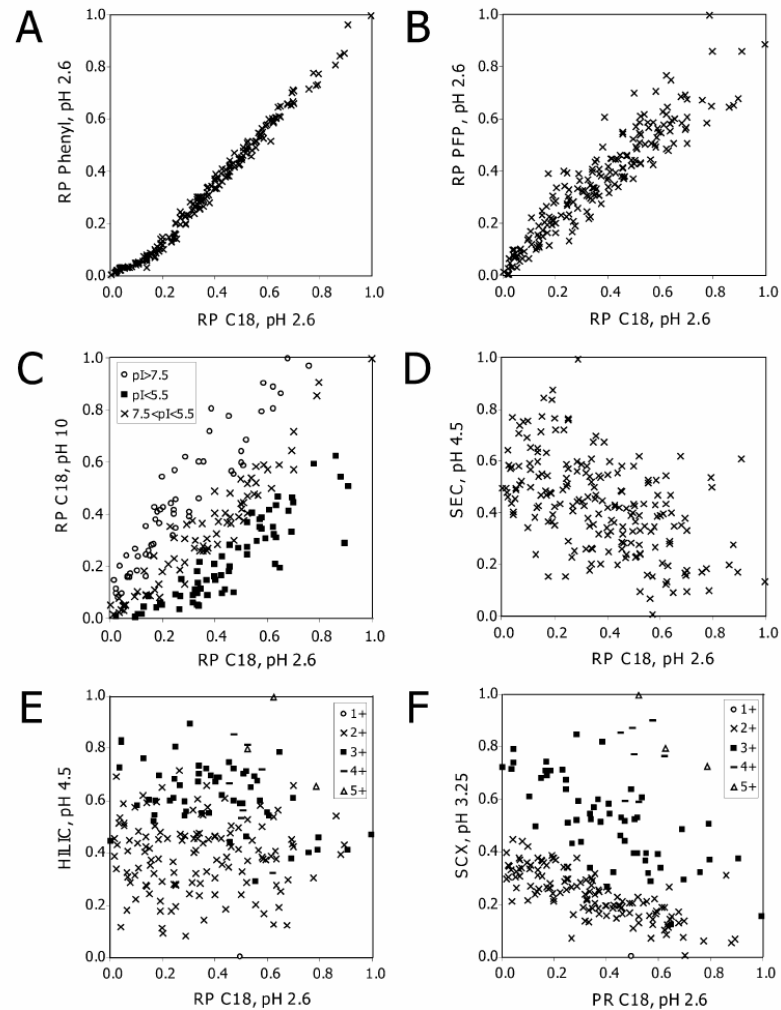
強カチオン交換-逆相
イオン交換基の影響



ZIC-HILIC-逆相
さらに直交 (相関性がない)

ペプチドの正味の電荷 (○) 1+, (□) 2+, (◇) 3+ and (△) >3+

2D ペプチド分離



A-C 逆相 **x** 逆相
 最高のピーク数
 しかし直交しない(相関あり)

F 強カチオン交換 **x** 逆相
 高塩濃度のため**MS**検出に適さない

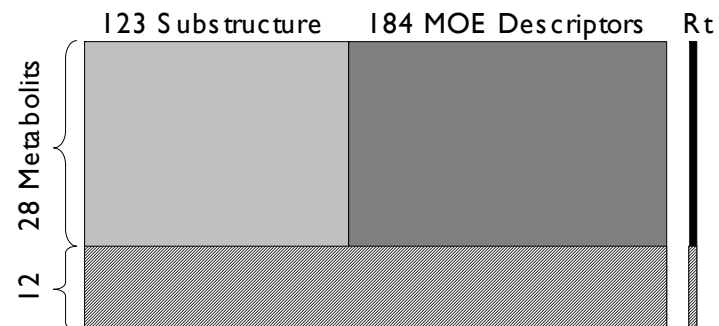
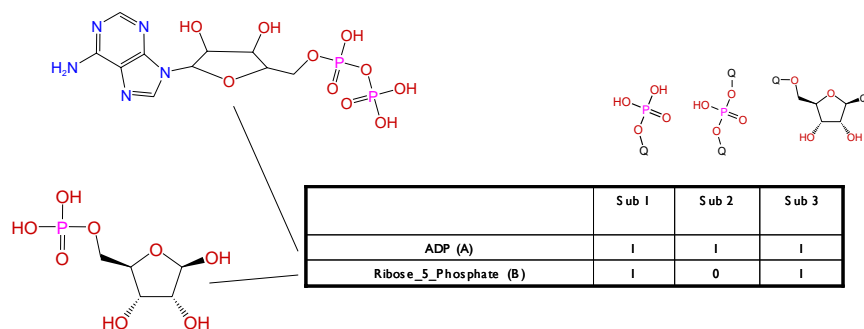
E ヒリック **x** 逆相
 最高の直交性で, 多次元分離に
 最も見込みのあるアプローチ

Gilar *et. al.*; Anal. Chem., 77(19) 2005, 6426-6434

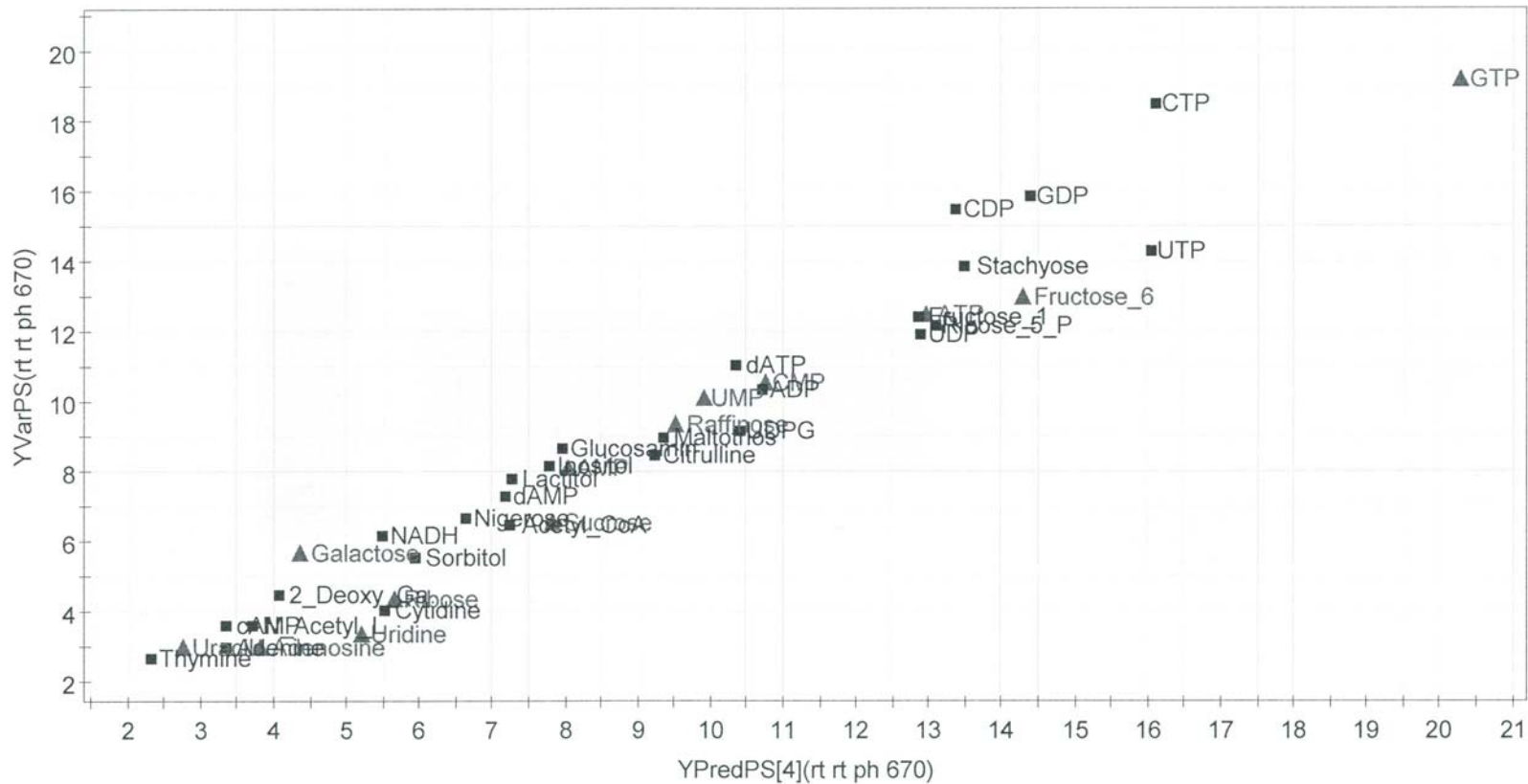
ヒリックモードの保持機構の要因は？

分子サイズ，疎水性部位，親水性部位，**Log P**（水とオクタノールの分配係数），水素結合性，分極率，双親和性モーメントなど

化学的構造から保持予測はできるか？



ZIC[®]-HILIC の保持の予測値対実測値



グラジエント溶離

ZIC[®]-pHILIC 150 x 2.1mm, 5 μ m

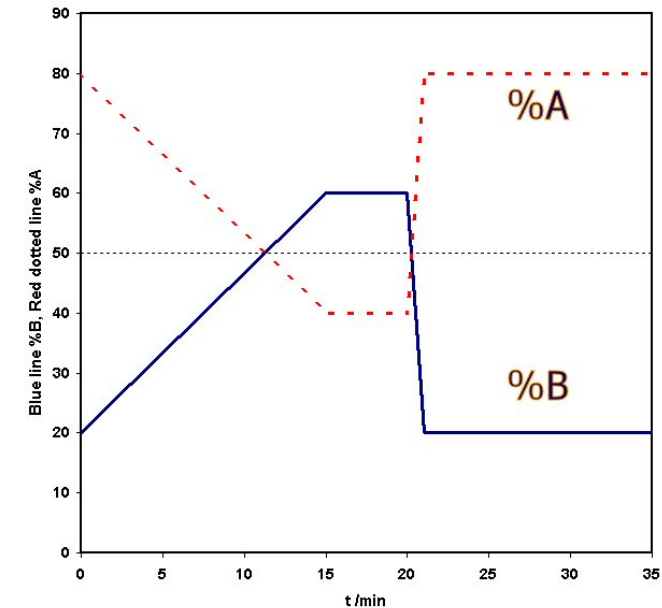
移動相:

A: アセトニトリル

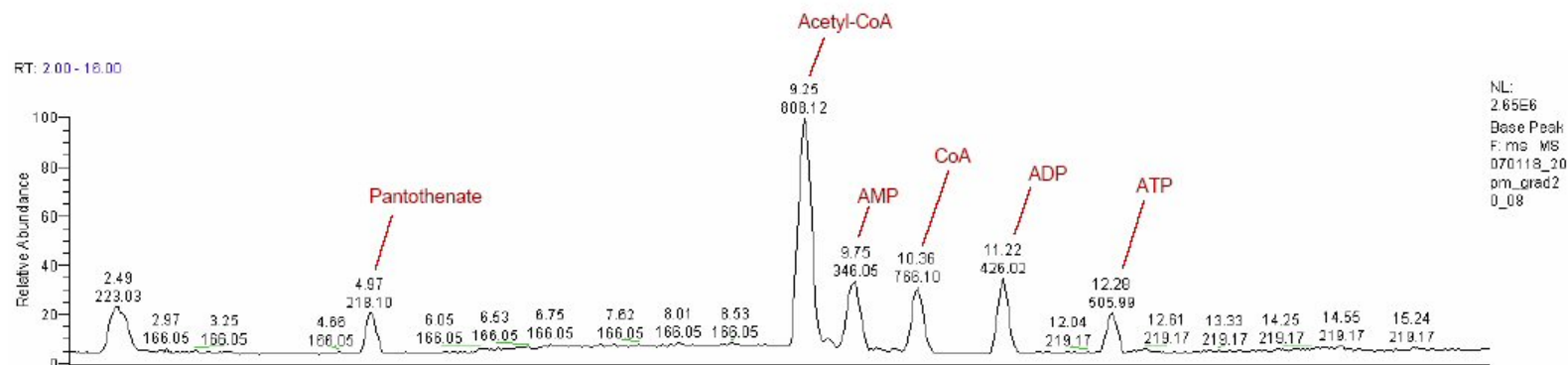
B: 10 mM (NH₄)₂CO₃ + 0.2% NH₄OH

流速: 100 μ L/min, 注入: 1 μ L (20 pmol)

検出: FTMS, ESI ネガティブモード, スキャン
100-1000 m/z

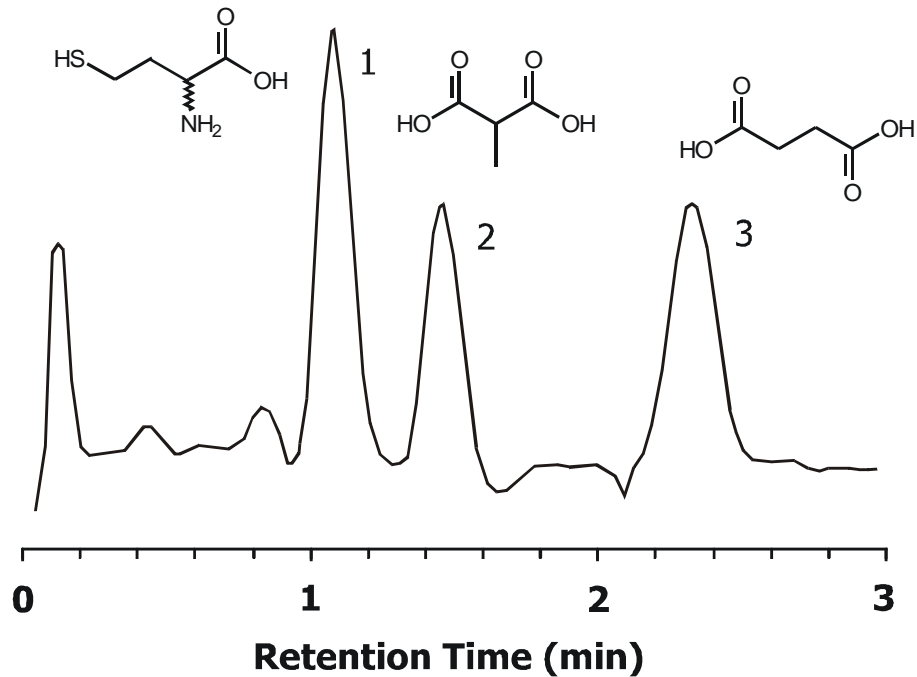


T.Pluskal, K.Nagao and M.Yanagida
GO Cell Unit, Initial Research Project, Okinawa Institute of Science and
Technology, 12-22 Suzuki, Uruma-shi, Okinawa 904-2234, JAPAN



NL:
2.65E6
Base Peak
F: ms MS
070118_20
pm_grad2
0_08

ZIC[®]-HILIC バイオマーカーとして

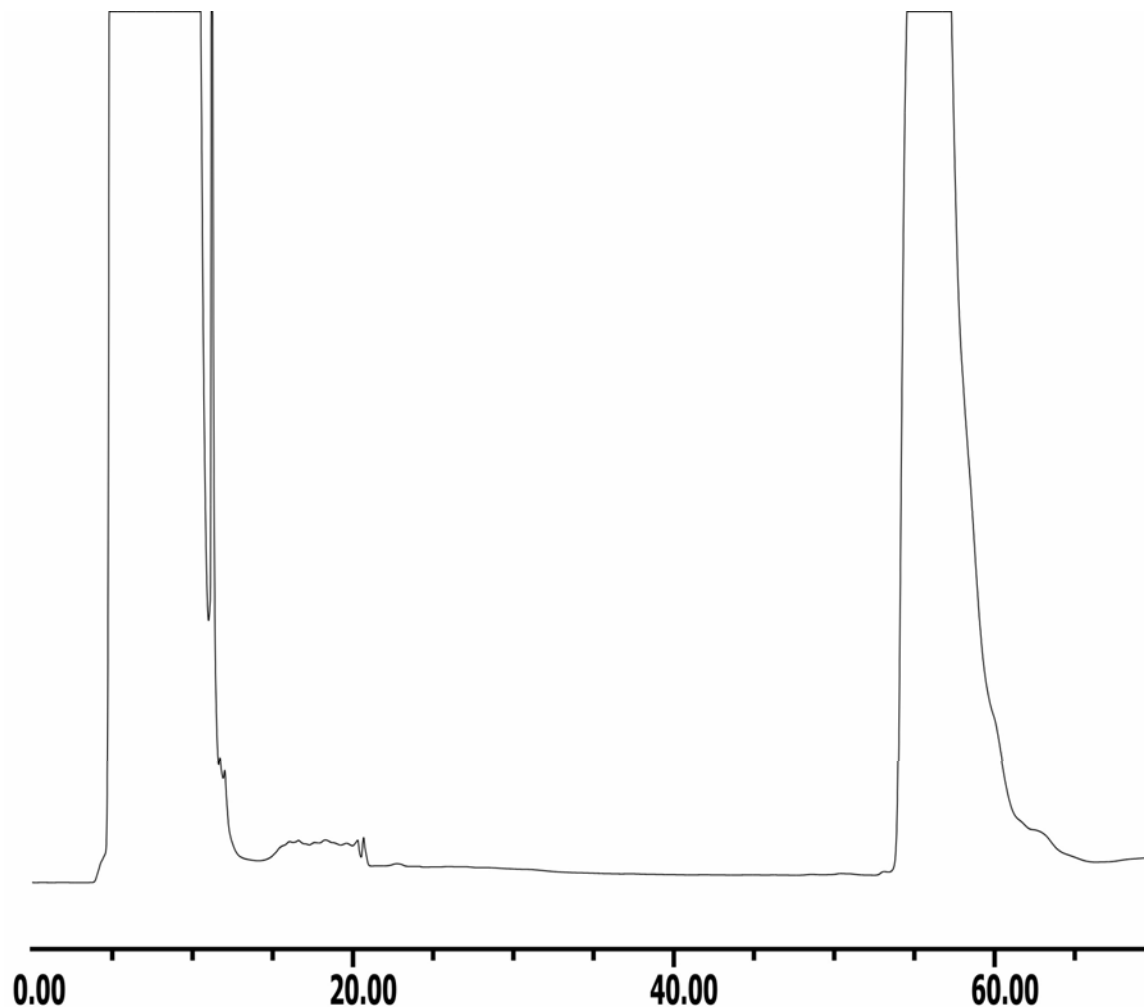


アセトニトリルを用いた血漿ペプチドの沈殿

ホモシステイン (1),
メチルマロン酸 (2)
コハク酸(3)



セミ分取ヒリック分離



4.8 kDa O-アセチル化糖ペプチド
の精製

カラム:

ZIC[®]-HILIC 250 × 7.5 mm, 5 μm

溶離液: グラジエント55分間で **80-
>45%** アセトニトリル/ **10 mM**

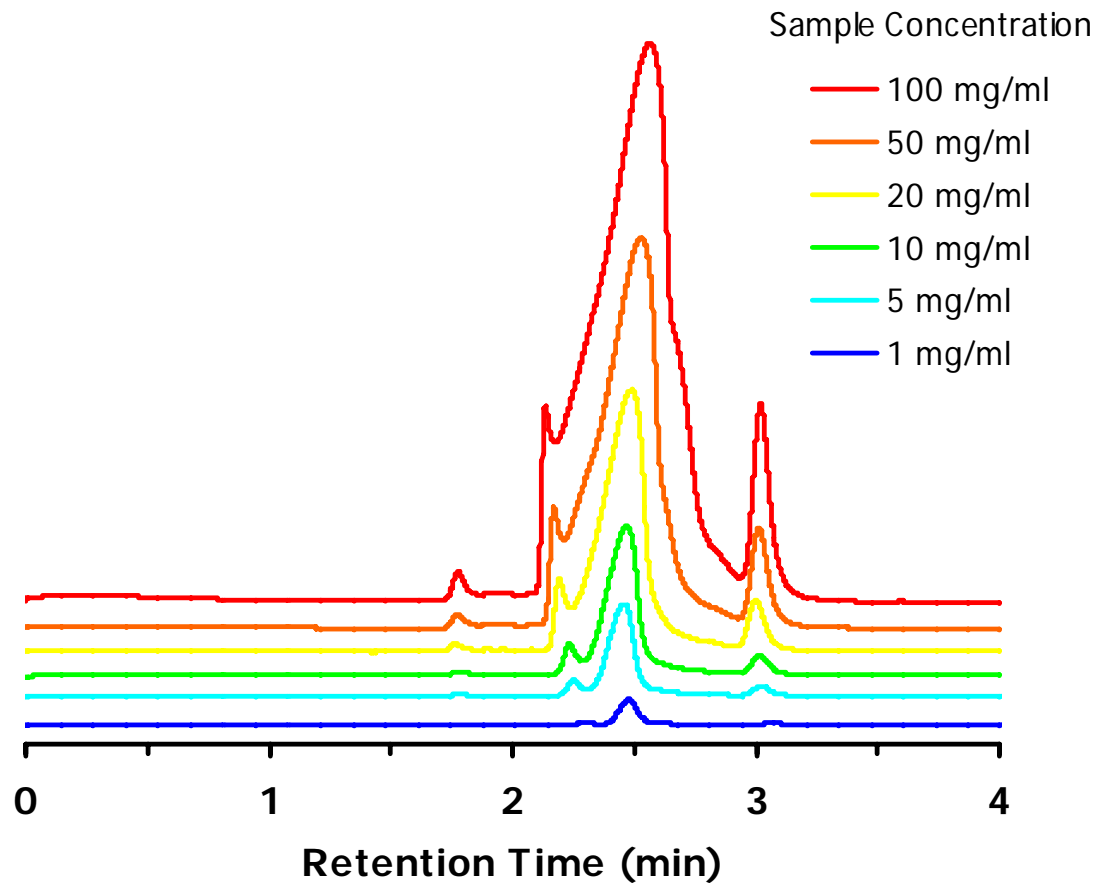
NH₄OAc, その後**25分間 45%** アセトニ
トリル

流速: **1.2 mL/min**

試料: **3 mL**, 最高で **7-10 mg/mL** の抽
出物を初期の移動相に最高で**15%**のエタノ
ール加えた溶媒に溶かしたもの

未精製物**85mg**から**15 mg** 分取

高質量負荷量



カラム:

ZIC[®]-HILIC 150 × 20 mm, 5 μm

注入:

0.5 mL 移動相に溶かす

溶離液:

90% (v/v) アセトニトリル
10% (v/v) 5 mM NH₄Ac

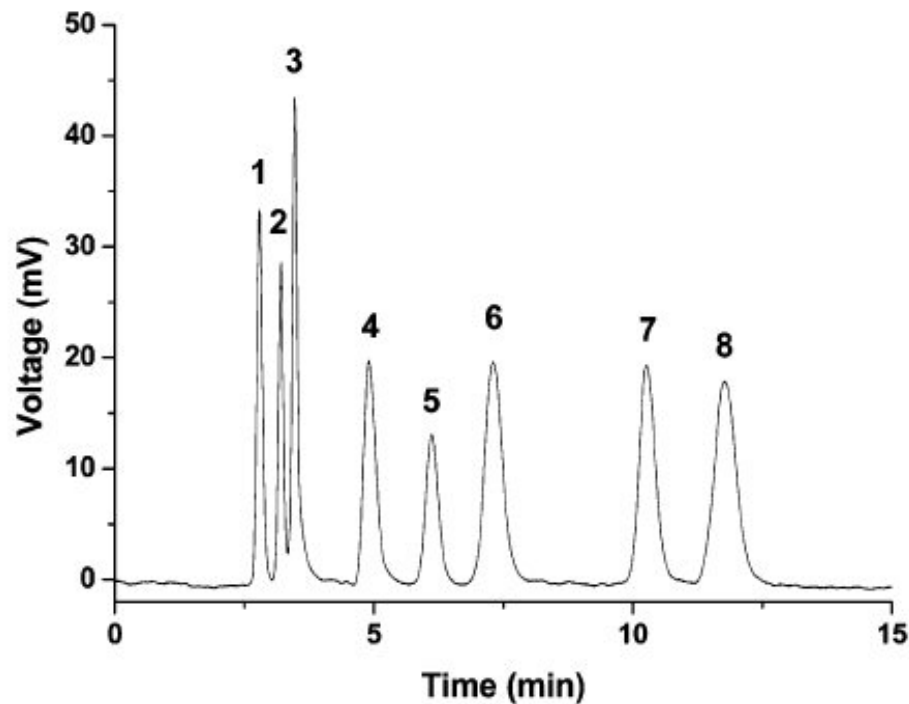
流速: **18.6 mL/min**

試料: ニコチンアミド

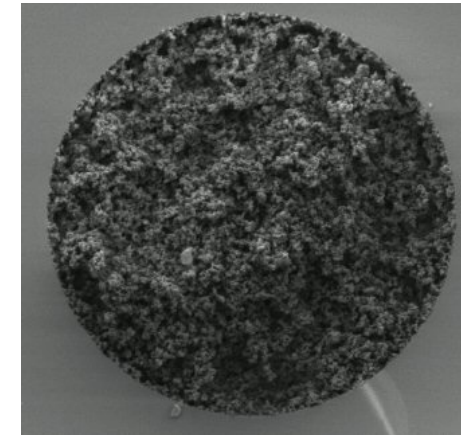
カラム圧力: **6.3 MPa**

UV 検出: **305 nm**

両性イオン型ポリマーモノリスを用いたヒリック



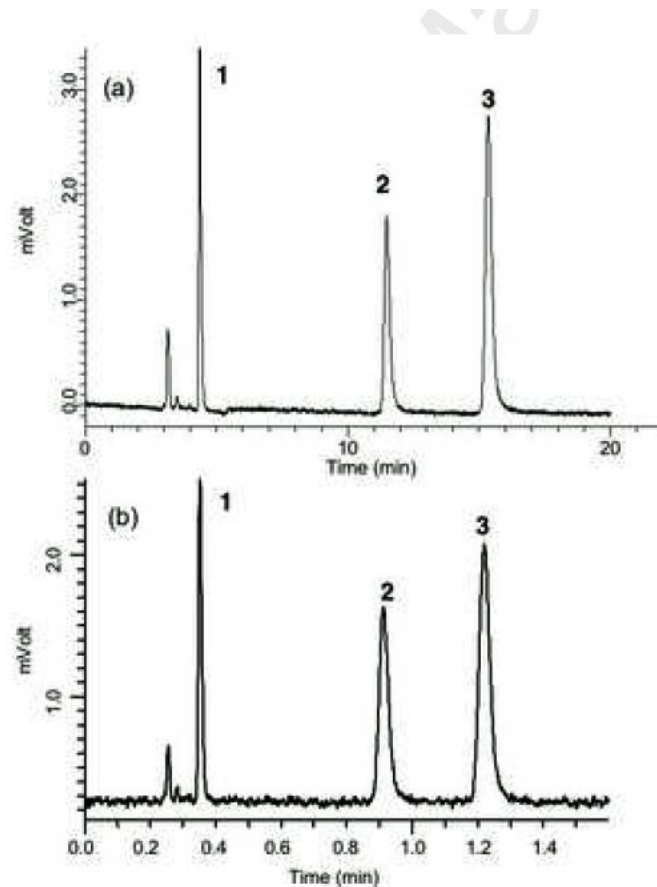
- (1) トルエン; (2) メタクリルアミド;
(3) アクリルアミド; (4) チミン; (5) ウラシル;
(6) アデニン; (7) チオ尿素; (8) シトシン



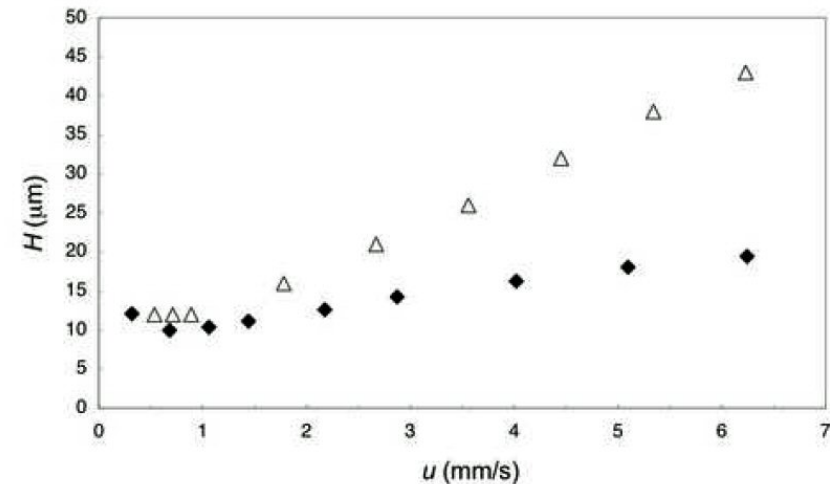
- カラム: ポリマーモノリス
285 mm x 100 μ m
- 溶離液: **5 mM** ギ酸アンモニウム **pH 3.0**
in ACN/H₂O (95/5,v/v)
- 流速: **800 nL/min**
- 検出: **UV 214 nm**
- 注入: **100 nL**

Hydrophilic Interaction Chromatography Using Methacrylate-Based Monolithic Capillary Column for the Separation of Polar Analytes. Zhengjin Jiang, Norman W. Smith, Paul D. Ferguson, and Mark R. Taylor, *Anal. Chem.*, 79 (3), 1243 -1250, 2007

シリカモノリスを用いたヒリック



(1) ウリジン, (2) グアノシン, (3) アデノシン



カラム: シリカ ポリ(アクリル酸)モノリス
200 mm x 200 μ m

溶離液: アセトニトリル/水
(0.2% ギ酸) = 90/10

流速: **1.06 mm/s and 13.1 mm/s**

注入: **2 μ L** スプリット

Highly efficient monolithic silica capillary columns modified with poly(acrylic acid) for hydrophilic interaction chromatography
Kanta Horie, Tohru Ikegami, Ken Hosoya, Nabil Saad, Oliver Fiehn and Nobuo Tanaka, *J. Chromatogr. A*, 1164(2007)198-205

Literature

1. Hemström P., and Irgum K., *J. Sep. Sci.* **2006**, 29, 1784–1821
2. Garcia M. C., *J. Chromatogr. B* **2005**, 825, 111-123.
3. Gustavsson, S. Å., Samskog, J., Markides, K., Långström, B., *J. Chromatogr. A* **2001**, 937, 41-47.
4. Walter, T. H., Iraneta, P., Capparella, P., *J. Chromatogr. A* **2005**, 1075, 177-183.
5. J. Bengtsson, B. Jansson, M. Hammarlund-Udenaes, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19 (**2005**) 2116-2122
6. Wang, X. D., Li, W. Y., Rasmussen, H. T., *J. Chromatogr. A* **2005**, 1083, 58-62.
7. Samuelson, O., Sjöström, E., *Sven. Kem. Tidskr.* **1952**, 64, 305-314.
8. A.J. Alpert, *J. Chromatogr. b*, 499, 17
9. Li, R. P., Huang, J. X., *J. Chromatogr. A* **2004**, 1041, 163-169.
10. Yoshida, T., *J. Biochem. Biophys. Meth.* **2004**, 60, 265-280.
11. T. Yoshida, *J. Chromatogr. A* **1998**, 811, 61-67.
12. Berthod, A., Chang, S. S. C., Kullman, J. P. S., Armstrong, D. W., *Talanta* **1998**, 47, 1001-1012.
13. Yoshida, T., Okada, T., *J. Chromatogr. A* **1999**, 840, 1-9.
14. Guo, Y., Huang, A. H., *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2003, 31, 1191-1201.
15. Guo, Y., Gaiki, S., *J. Chromatogr. A* **2005**, 1074, 71-80.
16. Olsen, B. A., *J. Chromatogr. A* **2001**, 913, 113-122.
17. Valette, J. C., Demesmay, C., Rocca, J. L., Verdon, E., *Chromatographia* **2004**, 59, 55-60.
18. Wonnacott, D. M., Patton, E. V., *J. Chromatogr.* **1987**, 389, 103-113.
19. Björklund, M., Hearn, M. T. W., *J. Chromatogr. A* **1996**, 728, 149-169.
20. Lafosse, M., Herbreteau, B., Dreux, M., Morinallorym, L., *J. Chromatogr.* **1989**, 472, 209-218.
21. Pisano, R., Breda, M., Grassi, S., James, C. A., *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2005**, 38, 738-745.
22. Tolstikov, V. V., Fiehn, O., *Anal. Biochem.* **2002**, 301, 298-307.
23. Zywicki, B., Catchpole, G., Draper, J., Fiehn, O., *Anal. Biochem.* **2005**, 336, 178-186.
24. Mihailova, A., Lundanes, E., Greibrokk, T., *J. Sep. Sci.*, **2006**, 29, 576-581.

Some additional ref's

http://www.sequant.com/sn/p_notes.php?id=7

Analysis of Moniliformin in Maize Plants Using Hydrophilic Interaction Chromatography

J. L. Sørensen, K. F. Nielsen, U. Thrane, J. Agric. Food Chem., (2007) in press (on web Oct. 26)

Development and Validation of a Liquid Chromatographic-Tandem Mass Spectrometric Method for Determination of Oseltamivir and its Metabolite Oseltamivir Carboxylate in Plasma, Saliva and Urine

N. Lindegårdh, W. Hanpithakpong, Y. Wattanagoon, P. Singhasivanon, N. J. White, N. P. Day, J. Chromatogr. B, (2007) in press (on web Sept. 19)

Secreted Glycoprotein from Live Zaire ebolavirus-Infected Cultures: Preparation, Structural and Biophysical Characterization, and Thermodynamic Stability

L. G. Barrientos, A. M. Martin, R. M. Wohlhueter, P. E. Rollin, J. Infect. Des., 196 (2007) (Suppl. 2) S220-S231

2D LC Separation and Determination of Bradykinin in Rat Muscle Tissue Dialysate with On-Line SPE-HILIC-SPE-RP-MS

S. R. Wilson, M. Jankowski, M. Pepaj, A. Mihailova, F. Boix, G. V. Truyols, E. Lundanes, T. Greibrokk, Chromatographia, 66 (2007) 469-474

Investigating the Effect of Chromatographic Conditions on Retention of Organic Acids in Hydrophilic Interaction Chromatography Using a Design of Experiment. Y.

Guo, S. Srinivasan, S. Gaiki, Chromatographia, 66 (2007) 223-229

Hydrophilic Interaction Liquid Chromatographic Analysis of Aminohydroxyphenylalanines from Melanin Pigments

D. Nezireviã, K. Årstrand, B. Kågedal, J. Chromatogr. A, 1163 (2007) 70-79

An Enzymatic Deglycosylation Scheme Enabling Identification of Core Fucosylated N-Glycans and O-Glycosylation Site Mapping of Human Plasma Proteins. P.

Hägglund, R. Matthiesen, F. Elortza, P. Højrup, P. Roepstorff, O. Nørregaard Jensen, J. Bunkenborg

J. Proteome Res., 6 (2007) 3021- 3031

Application of a New Zwitterionic Hydrophilic Interaction Chromatography Column for Determination of Paralytic Shellfish Poisoning Toxins. M. Diener, K. Erler, B.

Christian, B. Luckas, J. Sep. Sci., 30 (2007) 1821-1826

Improved Hydrophilic Interaction Chromatography Method for the Identification and Quantification of Glucosinolates

K. L. Wade, I. J. Garrard, J. W. Fahey, J. Chromatogr. A, (2007) in press

Simultaneous Determination of the Advanced Glycation End Product N-Carboxymethyllysine and its Precursor, Lysine, in Exhaled Breath Condensate using Isotope-Dilution Hydrophilic-Interaction Liquid Chromatography Coupled to Tandem Mass Spectrometry

T. Schettgen, A. Tings, C. Brodowsky, A. Müller-Lux, A. Musiol, T. Kraus, Anal. Bioanal. Chem., 384 (2007) 2783-2791

Evaluation and Optimization of ZIC-HILIC-RP as an Alternative MudPIT Strategy

P. J. Boersema, N. Divecha, A. J. R. Heck, S. Mohammed, J. Proteome Res., 6 (2007) 937-946

Structural Assignment of Disialylated Biantennary N-Glycan Isomers Derivatized with 2-Aminopyridine using Negative-ion Multistage Tandem Mass Spectral Matching

H. Ito, K. Yamada, K. Deguchi, H. Nakagawa, S.-I. Nishimura, Rapid. Commun. Mass Spectrom., 21 (2007) 212-218

Separation and Identification of Phytosiderophores and their Metal Complexes in Plants by Zwitterionic Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography Coupled to Electrospray Ionization Mass Spectrometry

Y. Xuan, E. B. Scheuermann, A. R. Meda, H. Hayen, N. von Wirén, G. Weber, *J. Chromatogr. A*, 1136 (2006) 73-81

Direct Structural Assignment of Neutral and Sialylated N-Glycans of Glycopeptides using Collision-Induced Dissociation MSn Spectral Matching

H. Ito, Y. Takegawa, K. Deguchi, S. Nagai, H. Nakagawa, Y. Shinohara, S.-I. Nishimura, *Rapid. Commun. Mass Spectrom.*, 20 (2006) 3557-3565

Simultaneous Determination of Positive and Negative Counterions Using a Hydrophilic Interaction Chromatography Method

D. S. Risley, B. W. Pack, *LCGC North America*, 24 (2006) 776-785 [pdf]

Simple Separation of Isomeric Sialylated N-Glycopeptides by a Zwitterionic Type of Hydrophilic Interaction Chromatography

Y. Takegawa, K. Deguchi, H. Ito, T. Keira, H. Nakagawa, S.-I. Nishimura, *J. Sep. Sci.*, 29 (2006) 2533-2540

Hydrophilic Interaction Chromatography [Review]

P. Hemström, K. Irgum, *J. Sep. Sci.*, 29 (2006) 1784-1821

Separation of Isomeric 2-Aminopyridine Derivatized N-Glycans and N-glycopeptides of Human Serum Immunoglobulin G by Using a Zwitterionic Type of Hydrophilic-Interaction Chromatography

Y. Takegawa, K. Deguchi, T. Keira, H. Ito, H. Nakagawa, S.-I. Nishimura, *J. Chromatogr. A*, 1113 (2006) 177-181

Metabolic Fingerprinting of Rat Urine by LC/MS: Part 1. Analysis by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography–Electrospray Ionization Mass Spectrometry

H. Idborg, L. Zamani, P.-O. Edlund, I. Schuppe-Koistinen, S. P. Jacobsson, *J. Chromatogr. B*, 828 (2005) 9-13

Metabolic Fingerprinting of Rat Urine by LC/MS: Part 2. Data Pretreatment Methods for Handling of Complex Data

H. Idborg, L. Zamani, P.-O. Edlund, I. Schuppe-Koistinen, S. P. Jacobsson, *J. Chromatogr. B*, 828 (2005) 14-20

On-line Desalting and Determination of Morphine, Morphine-3-glucuronide and Morphine-6-glucuronide in Microdialysis and Plasma Samples using Column Switching and Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry

J. Bengtsson, B. Jansson, M. Hammarlund-Udenaes, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 19 (2005) 2116-2122

Evaluation of the Separation of Acidic Compounds by Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC)

N. Nagae, T. Enami, and N. Fujita, *G.I.T. Laboratory Journal*, 5 (2005) 32-33

Retention Behavior of Small Polar Compounds on Polar Stationary Phases in Hydrophilic Interaction Chromatography

Y. Guo, S. Gaiki, *J. Chromatogr. A*, 1074 (2005) 71-80

Development of a Solid Phase Extraction-Liquid Chromatographic Method for the Determination of Amoxicillin in Plasma

N. Lindegårdh, T. Singtoroj, A. Annerberg, N. Day, *Therapeutic Drug Monitoring*, 27 (2005) 503-508

A New Strategy for Identification of N-Glycosylated Proteins and Unambiguous Assignment of Their Glycosylation Sites Using HILIC Enrichment and Partial Deglycosylation

P. Hägglund, J. Bunkenborg, F. Elortza, O. Nørregaard Jensen, P. Roepstorff, *J. Proteome Res.*, 3 (2004) 556-566