

· 综 述 ·

亲水作用色谱法 (HILIC) 的方法开发策略及其在铂类抗癌药分析中的应用

秦智莹,任光辉,谭雅男,王永涵,赵娣,李宁,卢杨,陈西敬

(中国药科大学基础医学与临床药学院,江苏南京 211198)

摘要:亲水作用色谱法解决了大多数极性化合物的色谱分离问题,其已成为包括铂类抗癌药在内的许多极性化合物的色谱分离的首选。亲水作用色谱法在极性化合物的分离与检测、药代动力学研究等的应用均日益广泛。如何高效地完成亲水作用色谱的方法开发是药物分析科学家和药代动力学科学家都面临的重要问题,然而目前还没有专门的文献对此进行系统化的整理和研究。本文以此为切入点,围绕亲水作用色谱法方法开发中的固定相选择、流动相筛选、pH 值与洗脱的优化等方面,综述了亲水作用色谱(HILIC)的方法开发策略,以及其在铂类抗癌药分析中的应用。

关键词:亲水作用色谱;方法开发;极性化合物;铂类抗癌药

中图分类号:R917 文献标识码:A 文章编号:2095-5375(2018)11-0654-005

doi:10.13506/j.cnki.jpr.2018.11.009

Strategies for method development of hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and application in platinum drugs

QIN Zhiying, REN Guanghui, TAN Yanan, WANG Yonghan, ZHAO Di, LI Ning, LU Yang, CHEN Xijing
(School of Basic Medical Sciences and Clinical Pharmacy, China
Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China)

Abstract:Hydrophilic interaction liquid chromatography have solved chromatographic separation problems of polar compounds such as platinum drugs. The application of hydrophilic interaction liquid chromatography is increasingly widely in pharmaceutical analysis as well as pharmacokinetic study. How to complete the method development of hydrophilic interaction liquid chromatography is an important problem for researchers. However, few references are available. This paper summarized the method development of polar compounds by hydrophilic interaction liquid chromatography in pharmacokinetic studies, including selection of stationary phase, selection of mobile phase, optimization of pH and elution gradient, and application in platinum drugs.

Key words:Hydrophilic interaction liquid chromatography; Method development; Polar compounds; Platinum drugs

自 1990 年 Alpert 首次提出亲水作用色谱(HILIC)的概念,亲水作用色谱便受到了药代动力学科学家们的持续关注与应用研究^[1-4]。直至今,新的 HILIC 固定相依旧层出不穷,亲水作用色谱的保留机制仍是色谱分离研究的热点^[5-9]。商业化的亲水作用色谱柱(HILIC)早在 2003 年初就进入研发阶段,目前市场上已有多种类型的亲水作用色谱柱,涉及的固定相类型也是非常多。可以说,亲水作用色谱

在不到 30 年的时间里已经发展为一项较为成熟的色谱分离技术。

在药物分析和药代动力学的研究中,包括铂类抗癌药在内的大多数极性化合物一直是研究的难点,这很大一部分的原因在于此类化合物的色谱分离相对比较困难,检测方法比较复杂。通用型的反向色谱可以满足大多数化合物的保留与定量,但其对极性化合物的保留却不佳或者没有保留。这

基金项目:国家自然科学基金(No.81473272,81503148)

作者简介:秦智莹,女,研究方向:药物代谢动力学,E-mail:cpuqinzhiming@163.com

通信作者:陈西敬,男,教授,博士生导师,研究方向:药物代谢动力学,Tel:025-86185379,E-mail:chenxj-lab@hotmail.com

给极性化合物的药物分析工作带来很大的挑战。更大的挑战是极性化合物的药代动力学研究,由于所需要分析的样本多是生物样本,其中的各种内源性物质或盐类在反向色谱中与极性化合物容易共洗脱,影响其检测的精密度与准确度。亲水作用色谱却可以通过其特有的保留机制来显著地提高极性化合物的保留,同时也为一般极性化合物和可离子化的药物的样本提供新的分离模式^[3,10-11]。随着亲水作用色谱的广泛应用以及质谱技术的快速发展,铂类抗癌药和强极性化合物在不同基质甚至细胞内药代动力学研究成为可能^[2,10,12]。亲水作用色谱并非一般所熟知的正相色谱,尽管二者的洗脱方式很类似,但亲水作用色谱的溶剂系统为反相色谱的模式。由于其使用了有机溶剂-水溶液的溶剂系统,其与主流的 ESI-MS 检测器兼容性甚至超过了反向色谱,因而亲水作用色谱串联质谱技术 (HILIC-MS/MS) 在极性化合物的研究中的使用日益广泛^[13-14]。

亲水作用色谱 (HILIC) 为包括铂类抗癌药在内的大多数极性化合物的药代动力学研究提供了有力的研究手段^[12,14-15]。然而,亲水作用色谱与传统的反相色谱、正相色谱都不相同,而且许多从事药物分析和药代动力学的科学家对这项相对较新的色谱分离技术了解不多。亲水作用色谱的保留机制并非单一的液-液分配,还包括离子相互作用、吸附作用和亲水保留作用等。亲水作用色谱的保留很少有一种保留机制占主导,更多是几种保留机制的组合,这就形成了其独特的保留特性和选择性^[6,11]。综合以上内容可知,亲水作用色谱方法的方法开发策略十分重要^[16]。本文面向分析科学家和药代动力学研究人员,就亲水作用色谱方法开发中的固定相选择、流动相筛选、pH 值与梯度的优化等多个方面的开发策略进行了综述,并以铂类抗癌药为例,介绍亲水作用色谱法在铂类抗癌药分析中的应用进展。

1 固定相选择

尽管亲水作用色谱 (HILIC) 的固定相发展到现在已经拥有许多种类,但它们均为易于吸附水和其他极性溶剂的极性固定相,这些固定相可以使得极性溶质能够从流动相中分配到固定相的表面上的极性溶液层^[6,17]。常见的亲水作用色谱固定相可以分为几个大类,即未经衍生化的硅胶、杂化的颗粒、氨基基、两性离子、酰胺,此外还有不常用的琥珀酰亚胺键合物与环糊精类等^[2,13,18-19]。

在方法开发时,了解不同种类固定相的性质和适用范围对于固定相的筛选至关重要。为所需要研究的铂类抗癌药和强极性化合物选择适当的固定相是方法成功开发的第一步和关键一步,合适的固定相可以显著地提高方法开发效率。为了尽可能地降低开发成本,在决定为所需要研究的铂类抗癌药和强极性化合物采购亲水作用色谱柱时,应首先确定大致的固定相范围。尽管每种类型的固定相有其特别的适合范围,但在实践中并非是一成不变的,适当扩大固定相选择范围可以提高方法开发的成功率。许多文献已经证实,不同的流动相比、流动相 pH 值、颗粒的大小和柱长等因素都会显著地影响亲水作用色谱固定相的保留机制和最终的

保留行为^[6,13,19-20]。

1.1 未经衍生化的硅胶固定相 未经衍生化的硅胶是最常见的亲水作用色谱固定相,其在药物分析和药代动力学研究中最普遍。未经衍生化的硅胶的亲水保留机制很复杂,这也使得其可以实现对不同性质的铂类抗癌药和强极性化合物的分离^[21]。在极性化合物方法开发过程中,未衍生化硅胶固定相的亲水作用色谱柱可以作为常备的基础亲水作用色谱柱。除非有明确的文献参考或极性化合物性质特别复杂,不同内径和长度的该类色谱柱可以作为方法开发中固定相筛选的一个因素。此外,未经衍生化的硅胶固定相色谱柱对极性药物和代谢物进行分析时可获得比反向色谱更高的信号强度,且样品处理方法简单。尤其是在使用质谱检测器时,其因没有键合相的流失而带来相对更低的质谱背景信号,提高检测的灵敏度和信噪比。

1.2 杂化颗粒固定相 杂化颗粒固定相的代表是亚乙基桥杂化颗粒。亚乙基桥杂化颗粒属于无机-有机材料,其结构是在硅胶颗粒的内部与表面均嵌入桥式乙烷^[11]。亚乙基桥杂化颗粒的保留机制与未衍生化硅胶相类似,但也有区别。杂化颗粒的亲水性较硅胶颗粒弱,主要在于其颗粒的表面酸性不强而且表面的带电情况不同。在一些情况下,比如由于流动相的原因导致其表面的硅醇基未明显带电荷的情况下,杂化颗粒会表现出和硅胶颗粒相似的保留行为。杂化颗粒的优势在于其具有比硅胶颗粒更高的化学稳定性,这是由于杂化颗粒的表面因引入基团而具有一定的立体位阻。化学稳定性的优势在高 pH 的流动相条件下最为显著,而未衍生化的硅胶颗粒仅在低 pH 下较为稳定。因此,在所分离的化合物需要使用高 pH 流动相来获取好的保留的情况下,杂化颗粒固定相应当取代硅胶颗粒固定相而成为首选。

1.3 氨基固定相 氨基固定相又称氨基键合固定相,一般认为其是碳水化合物的首选亲水作用色谱固定相。在药代动力学研究中,如果一个化合物的结构类似于或者是经改造的碳水化合物,氨基固定相应首先进行筛选。氨基固定相的特点是在其流动相的作用下易于质子化而带正电荷,其对阴离子化合物具有较好的保留而对碱性化合物保留较弱^[22]。

1.4 两性离子固定相 两性离子固定相色谱柱是商品化亲水作用色谱柱很常见的一大类,其中以默克公司的 SeQuant ZIC-HILIC 系列为代表。两性离子固定相以磺烷基三甲胺乙酯最为常见,其表面可同时提供带正电和负电荷的官能团^[21]。这些相反的电荷最终通过合成位置而使得两性离子固定相表面的总净电荷接近为零。因此,改变流动相 pH 对两性离子固定相的带电状态几乎没有任何影响。在两性离子固定相的方法开发中,流动相 pH 通过影响化合物的离子状态从而影响其保留。

1.5 酰胺基固定相 酰胺基固定相本身是更有利于酸性化合物的保留,因其既有氢受体又有供体的位点^[7]。在使用酰胺基固定相开发酸性化合物的方法时,酸性化合物处于游离状态时能与酰胺基具有良好的相互作用^[22]。在低到中的流动

相 pH 条件下,酰胺基固定相对碱性化合物的保留也是很理想的。尽管酰胺基固定相相对于氨基固定相来说其反应性弱,但其稳定性相对较好。

1.6 二醇固定相 二醇固定相相比于以上其他的固定相很少有人了解,但其代表性的色谱柱 Phenomenex Luna HILIC 也是商品化 HILIC 色谱柱中的一个系列。二醇固定相的结构是以丙二醇键合到未衍生化的硅胶上,但其极性与未衍生化的硅胶差距并不明显。二醇固定相的保留机制包括了分配、氢键作用等^[7]。二醇固定相对大多数的极性化合物而言是弱保留,因此其在复杂化合物的分离没有优势。在药代动力学研究中,单一极性化合物可以通过二醇固定相实现弱保留而快速出峰,缩短样品的分离时间。

2 亲水作用色谱的流动相筛选

正如之前所述,亲水作用色谱的流动相体系是与反向色谱相同的,即有机相-水相系统。然而亲水作用色谱的流动相并不是简单地照搬反向色谱,而且其流动相的洗脱性质也不相同^[4,11,23]。有机相比例提高时洗脱能力反而减弱,即有机相是亲水作用色谱的弱洗脱剂而水相是强洗脱剂。

亲水作用色谱的有机相以乙腈为主,部分极端情况下可以选择非极性要更强的丙酮^[18,23]。然而,丙酮自身的来源限制和性质导致其很少使用,而且使用丙酮应选择非 PEEK 的色谱柱。乙腈是目前 HILIC 分离中使用最广泛的,一般在 HILIC 中不会筛选有机相,直接采用乙腈作为有机相。乙腈在紫外检测器的背景基线较低,取决于其良好的紫外透过性。在质谱检测器中,由于乙腈的挥发能力强且亲水作用色谱中乙腈比例高,这些都有助于提高质谱检测的响应。

亲水作用色谱的水相体系选择范围比较大。除了反向色谱中常用的水之外,异丙醇、乙醇和甲醇都可以作为亲水作用色谱的水相体系^[8,18,23]。这几种洗脱剂的洗脱强度从大到小分别是:水、甲醇、乙醇、异丙醇。水是亲水作用色谱中最强的洗脱剂。水相体系的扩大也带来选择上的复杂,一般以水为最初的选择^[7]。在水作为水相并不理想时,可以逐步替换为甲醇、乙醇和异丙醇,这对增加铂类抗癌药和强极性化合物的保留很有益^[21,24]。

除上述外,亲水作用色谱的流动相选择还有一些基本原则。首先,在使用乙腈-水的流动相体系时,乙腈的含量至少在 30%到 40%以上。当水的比例高至 60%到 70%时,几乎任何亲水作用色谱柱都会失去对极性化合物的保留。其次,流动相应至少包含 3%的极性溶剂,如水、甲醇、乙醇或异丙醇。尽管高比例的乙腈可以提高极性化合物的保留且高比例的乙腈有助于质谱检测器的检测,但亲水作用色谱需要极性溶剂来维持固定相表面的亲水层。在分离较为复杂的混合物或者化合物的保留较弱时,95%左右的高比例乙腈可以尽可能的增大保留,改善分离效果。然而较强的保留作用也会导致保留时间延长,整个样本的分析时间增长。

3 流动相 pH 值的选择

流动相的 pH 值优化在反向色谱中的作用就已被广泛重视。在亲水作用色谱中,流动相 pH 值的优化与固定相选择

一样重要。即使是合适的固定相,不恰当的 pH 值也会让之前的努力前功尽弃,可以说直接关系到方法开发的成败^[21]。pH 值对亲水作用色谱的影响主要体现在两个方面,即影响化合物的电离状态和改变固定相表面的电荷^[21,25]。当 pH 值较高时,酸性化合物和弱碱性化合物都会出现比较完全的电离。电离化的增强会使固定相对化合物的吸附和保留增加,从而使得化合物的保留时间增加^[22,26]。

此外,pH 值的改变对固定相的保留性能和选择性也有很大的影响。当流动相 pH 逐渐上升时,固定相的硅醇活性发生变化,例如当流动相 pH 在酸性的范围逐渐往上增加时,硅醇的表面会带上负电荷。带负电的硅醇会使其极性增加,促进流动相中的极性溶剂吸附于固定相表面的亲水层,而增加表面亲水层的厚度。固定相的亲水层厚度越厚,极性化合物与固定相的作用时间就越长,保留作用也就越强。在方法开发实践中,流动相 pH 值的改变会对酸性化合物的保留有比较显著的影响。酸性化合物在高 pH 的条件下,其保留时间一般会延长,这是化合物自身电离和固定相的电荷改变共同作用的。对于碱性化合物来说,流动相的 pH 值改变似乎对其保留时间影响较小。不同 pH 值的流动相下碱性化合物保留基本是相似的,这可能是碱性化合物自身改变与固定相变化的相互作用下的结果。

事实上,由于极性化合物的酸碱性本身就会有细微的差别且其会在流动相中变化,保留趋势是很难仅凭理论就可以准确预测的。流动相 pH 值的筛选和优化的重要性不言而喻。在流动相 pH 值的初筛中,一般选择低 pH (pH 3)、中等 pH (约 pH 7 左右)、高 pH 值 (pH 9) 3 个水平,这是考虑到绝大多数的亲水作用色谱柱的 pH 耐受范围。为了 pH 值调节的方便性和兼容性, pH 值调整的多数是在水相中进行的。考虑到亲水作用色谱中的流动相中乙腈含量比较高,流动相 pH 值会在水相 pH 值的基础上往中性靠拢约 1 到 1.5 个 pH 单位。考虑到 pH 值调整的烦琐与复杂,一般建议使用四元泵,设置好不同的酸碱流动相进行调配。自动化的 pH 调整系统可以精确到 0.1 个 pH 单位。以沃特世 Auto · Blend Plus 技术为代表,该技术通过软件自动在线配制所需要的不同 pH 值和离子强度的流动相。在经过这步筛选获取大概的 pH 值范围后可以根据需要再细化 pH 值的范围。

4 等度洗脱与梯度洗脱的优化

亲水作用色谱的方法开发优先选择等度洗脱的方法。等度洗脱可以保持流动相稳定的 pH 值和固定相表面恒定的微环境,这会使得色谱分离重现性更好。亲水作用色谱在样品的进样之间也需要进行充分的柱平衡,以免出现保留时间漂移的现象,这比反向色谱的要求更为严格。由于等度洗脱可以比梯度洗脱更快地完成柱平衡,在缩短平衡时间的同时带来更好的保留稳定性。在方法开发中,首先使用等度进行流动相比例的筛选,从 40%到 95%的范围设计几个比例筛选。考虑到水相有不同的选择,也应尝试不同的水相来进行筛选^[16]。在筛选时,由于水相的含量和水相的类型均应考察,应对这两个参数进行正交试验设计或者拉丁方的

设计^[16]。

梯度洗脱在亲水作用色谱(HILIC)中的方法开发尽管复杂烦琐,但其却是文献报道中最常用的方法^[12,15,24]。梯度洗脱可以满足一些复杂的分离需要或者得到足以满足文献发表优分离效果^[21]。梯度洗脱的方法开发应建立在等度洗脱开发的基础上,一般在等度洗脱得到相对合适的流动相后进行,这样不仅更有目的性且可以节省大量的时间。典型的亲水作用色谱的梯度洗脱与反向色谱是相反的。亲水作用色谱的梯度设置是起始阶段应该是高比例的乙腈,增加极性化合物的保留,然后乙腈的比例逐渐下降,流动相的洗脱能力增加,样品被洗脱出峰。考虑到亲水作用色谱的固定相的状态对保留的影响,在样品进样前其所需要的平衡时间更长。亲水作用色谱的每一针的运行时间会相对长很多,在进样之间还需要进行再平衡。为了加快样本的分析速度,已经有柱效更高且分析速度更快的超高效液相色谱(UPLC)类型的HILIC色谱柱可供选择^[18]。

5 其他条件的优化

当亲水作用色谱的固定相、流动相组成、pH值甚至梯度都已经确定的情况下,更进一步的优化仍有很大的空间。色谱柱柱温对一些化合物的保留具有很大的影响,尝试不同的色谱柱柱温可以获得不同的分离效果^[23]。此外,流动相中的添加剂和缓冲剂带来的离子强度的改变也是不容忽视的^[2,20,25]。在相同的pH条件下,不同的添加剂或者缓冲剂可能会带来不一样的保留行为。不同的样品处理方法也很重要,适当的样品溶解剂以及对样品的稀释都改变保留的结果^[13,18,26]。此外,包括色谱柱的长度以及流动相的流速也应纳入优化的范围。在方法开发中,每进行一个参数的调整都要评估和对比,一般得到满意的分离结果即可停止进一步的优化。

6 亲水作用色谱法在铂类抗癌药分析中的应用

以顺铂、卡铂、奥沙利铂为代表的铂类抗癌药均属于典型的高水溶性的极性化合物,其在反向色谱柱上的保留不佳,检测灵敏度比较差。铂类抗癌药在亲水作用色谱柱上有着很强的保留,即使是生物样本中的铂类抗癌药也能获得良好的分离。Xie等^[27]使用亲水色谱法完成了人血浆中顺铂原型药物的UHPLC-MS/MS法的优化。该方法摒弃了顺铂测定中常用的衍生化步骤,直接色谱分离并检测顺铂原型药物。方法的定量下限达到了 $20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,并进行了完善的方法学验证。Ren等^[24]建立了人血浆中卡铂的UPLC-MS/MS检测方法。借助亲水作用色谱分离技术,卡铂的定量下限达到了 $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,可以满足临床上对卡铂人体药代动力学研究的检测要求。笔者也使用亲水作用色谱法对奥沙利铂的分析检测进行了研究。通过合理的方法开发策略,笔者首次开发出细胞基质中奥沙利铂原型药物的测定方法,并以此方法为基础开展了奥沙利铂的细胞内摄取特性研究。该方法使用Xbridge HILIC(2.1 mm × 150 mm, 3.5 μm, Waters, MA, USA)色谱柱对处理后的细胞基质中奥沙利铂进行检测,定量下限达到了 $2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$,满足了细胞基质中

奥沙利铂的定量检测^[28]。

7 结语

亲水作用色谱(HILIC)的方法开发过程中涉及的色谱分析参数较多且相互影响。如果仅凭反向色谱积累的经验来进行亲水作用色谱的方法开发会误入歧途,更有甚者会导致错误的判断而中断方法的开发。在药代动力学研究中,为铂类抗癌药等强极性化合物制定合适的亲水作用色谱开发策略尤为重要,在方法开发前期就进行各个参数的评估判断,在方法开发过程中逐个条件的尝试优化,最终将所有条件作为系统进行优化。通过这些策略的实施,不仅实现亲水作用色谱方法的开发效率,也会提高方法开发的质量和成功率。

参考文献:

- [1] HEMSTRÖM P, IRGUM K. Hydrophilic interaction chromatography[J]. J Sep Sci, 2006, 29(12): 1784-1821.
- [2] CHIRITA R I, WEST C, ZUBRZYCKI S, et al. Investigations on the chromatographic behaviour of zwitterionic stationary phases used in hydrophilic interaction chromatography[J]. J Chromatogr A, 2011, 1218(35): 5939-5963.
- [3] JIAN W, EDOM R W, XU Y, et al. Recent advances in application of hydrophilic interaction chromatography for quantitative bioanalysis[J]. J Sep Sci, 2010, 33(6-7): 681-697.
- [4] JANDERA P, HAJEK T, SROMOVA Z. Mobile phase effects in reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography revisited[J]. J Chromatogr A, 2018(1543): 48-57.
- [5] TARAJI M, HADDAD P R, AMOS R I J, et al. Chemometric-assisted method development in hydrophilic interaction liquid chromatography: A review[J]. Anal Chim Acta, 2018(1000): 20-40.
- [6] IBRAHIM M E, LIU Y, LUCY C A. A simple graphical representation of selectivity in hydrophilic interaction liquid chromatography[J]. J Chromatogr A, 2012(1260): 126-131.
- [7] JANDERA P, JANAS P, SKERIKOVA V, et al. Effect of water on the retention on diol and amide columns in hydrophilic interaction liquid chromatography[J]. J Sep Sci, 2017, 40(7): 1434-1448.
- [8] JANDERA P, HAJEK T. Mobile phase effects on the retention on polar columns with special attention to the dual hydrophilic interaction-reversed-phase liquid chromatography mechanism, a review[J]. J Sep Sci, 2018, 41(1): 145-162.
- [9] WANG H, ZHANG L, MA T, et al. Imidazolium-embedded iodoacetamide-functionalized silica-based stationary phase for hydrophilic interaction/reversed-phase mixed-mode chromatography[J]. J Sep Sci, 2016, 39(18): 3498-3504.
- [10] HEATON J, GRAY N, COWAN D A, et al. Comparison of

- reversed-phase and hydrophilic interaction liquid chromatography for the separation of ephedrine[J]. *J Chromatogr A*, 2012(1228):329-337.
- [11] GRITTI F, GUIOCHON G. Hydrophilic interaction chromatography: A promising alternative to reversed-phase liquid chromatography systems for the purification of small protonated bases[J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(10):1633-1641.
- [12] PERIAT A, KRULL I S, GUILLARME D. Applications of hydrophilic interaction chromatography to amino acids, peptides, and proteins[J]. *J Sep Sci*, 2015, 8(3):357-367.
- [13] MCCALLEY D V. Understanding and manipulating the separation in hydrophilic interaction liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2017(1523):49-71.
- [14] ZHANG Q, YANG F Q, GE L, et al. Recent applications of hydrophilic interaction liquid chromatography in pharmaceutical analysis[J]. *J Sep Sci*, 2017, 40(1):49-80.
- [15] BADGETT M J, BOYES B, ORLANDO R. Peptide retention prediction using hydrophilic interaction liquid chromatography coupled to mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2018(1537):58-65.
- [16] TUMPA A, STAJIC A, JANCIC-STOJANOVIC B, et al. Quality by Design in the development of hydrophilic interaction liquid chromatography method with gradient elution for the analysis of olanzapine[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017(134):18-26.
- [17] NOGA S, BOCIAN S, BUSZEWSKI B. Hydrophilic interaction liquid chromatography columns classification by effect of solvation and chemometric methods[J]. *J Chromatogr A*, 2013(1278):89-97.
- [18] NOVÁKOVÁ L, HAVLÍKOVÁ L, VLČKOVÁ H. Hydrophilic interaction chromatography of polar and ionizable compounds by UHPLC[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2014(63):55-64.
- [19] ERIC S, GRUMBACH, KENNETH J. *Fountain Comprehensive Guide to HILIC-Hydrophilic Interaction Chromatography*[M]. USA: Waters, 2010:8-21.
- [20] ALPERT A J. Effect of salts on retention in hydrophilic interaction chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2018(1538):45-53.
- [21] SENTKOWSKA A, PYRZYNSKA K. Hydrophilic interaction liquid chromatography in the speciation analysis of selenium[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018(1074-1075):8-15.
- [22] MCCALLEY D V. A study of the analysis of acidic solutes by hydrophilic interaction chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2018(1534):64-74.
- [23] BOHACOVA I, HALKO R, JANDERA P. The effects of temperature and mobile phase on the retention of aliphatic carboxylic acids in hydrophilic interaction chromatography on zwitterionic stationary phases[J]. *J Sep Sci*, 2016, 39(24):4732-4739.
- [24] REN G, QIN Z, FAN A, et al. A novel and fully validated hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry method for the determination of intact carboplatin in human plasma[J]. *Sep Sci Plus*, 2018, 1(4):270-279.
- [25] MCCALLEY D V. Effect of mobile phase additives on solute retention at low aqueous pH in hydrophilic interaction liquid chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2016(1483):71-79.
- [26] JAFFUEL G, CHAPPUIS L, GUILLARME D, et al. Improved separation by at-column dilution in preparative hydrophilic interaction chromatography[J]. *J Chromatogr A*, 2018(1253):136-143.
- [27] XIE F, COLIN P, VAN BOCXLAER J. Zwitterionic hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry with HybridSPE-precipitation for the determination of intact cisplatin in human plasma[J]. *Talanta*, 2017(174):171-178.
- [28] QIN Z, REN G, LIU Q, et al. Hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the determination of intact oxaliplatin in cells: validated and applied in colon cancer HCT-116 cell line[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2018(155):7-14.