



УДК 544

30 лет гидрофильной хроматографии

© 2021 Яшин А.Я., Яшин Я.И.

Группа компаний «Сайтегра», Москва

Поступила в редакцию 30.04.2021 г.

DOI: 10.17308/sorpchrom.2021.21/3777

Гидрофильная хроматография (ГФХ) в течение 30 лет (1990-2020 г.г.) прошла большой путь развития, превратившись в один из самых востребованных методов хроматографии для разделения и анализа полярных соединений в разных областях. Она родилась на стыке нормально-фазовой (НФХ) и обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ), используя полярные сорбенты НФХ и полярные элюенты ОФХ. Механизм удерживания в ГФХ сложен, кроме полярных соединений ГФХ разделяет и ионные соединения, поэтому ГФХ – это, по-существу, комбинация трех методов НФХ, ОФХ и ИОХ. Из-за влияния многих параметров на удерживание ГФХ – гибкий метод, позволяющий подбирать оптимальные условия для разделения сложных полярных веществ. В удерживание вносят вклад: распределение между слоем воды на поверхности сорбента и органическим компонентом элюента, адсорбция и иные взаимодействия. Для ГФХ разработан большой ассортимент сорбентов: с нейтральными функциональными группами на поверхности, с заряженными группами и цвиттер-ионными. В обзоре приведен список сорбентов с разными функциональными группами на поверхности. Отличительная особенность ГФХ – это применение элюентов с большим содержанием органического компонента, чаще всего ацетонитрила от 60 до 95%. Кроме того применяют метанол, этанол, изопропанол, ацетон. Большие перспективы показала ГФХ в двумерных вариантах хроматографии, особенно в сочетании с ОФХ для разделения и анализа сложных смесей полярных соединений. Особенно чаще всего применяется комбинация ГФХ x ОФХ x МС в сложных анализах. Потрясающие успехи ГФХ показала в разнообразных применениях для разделения и анализа биологически активных соединений в медицине, биологии, фармацевтике, в частности аминокислот, пептидов, белков, нуклеотидов, нуклеозидов, карбогидратов, антител, производных ДНК, разных лекарств, метаболитов, маркеров болезней, пуриновых и пиримидиновых оснований, а также полифенольных соединений (флавоноидов, антоцианинов, проантоцианидинов и др.), особенно интересен их профиль в разных пищевых продуктах и напитках. Опубликованы обзоры по анализам пищевых продуктов, лекарств в фармацевтике, в метаболомике, протеомике, пептидомике и др. омиксах.

Ключевые слова: гидрофильная хроматография (ГФХ), механизм удерживания, сорбенты, элюенты, двумерная ГФХ, применения.

Введение

Гидрофильная хроматография стала прорывным методом, значительно расширившим аналитические возможности разделения и анализа сильнополярных соединений. Она появилась на стыке нормально-фазовой (НФХ) и обращенно-фазовой хроматографии (ОФХ), взяв у первой полярные сорбенты и полярные элюенты у второй. ОФХ – самый распространенный метод (около 70-80% всех применений) не удобен для разделения

сильнополярных соединений, т.к. они элюируют быстро и плохо разделяются. В НФХ наоборот удерживание сильное и выходят в виде несимметричных пиков. Основателем ГФХ считают Alpert [1], который в 1990 г предложил этот метод и показал его возможности при разделении аминокислот и пептидов. Однако, значительно раньше в двух работах этот режим был использован при разделении сахаров [2,3]. Однако авторы не поняли значение этого метода и не распространили его для разделения других полярных соединений. Наши специалисты Сапрыкин Л.В.,

Киселева Н.В. и др. определяли витамины в этих режимах [4,5]. Автор метода использовал его для разделения других полярных соединений и предложил механизм удерживания. Им было предложено словосочетание «Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC)». Сокращение HILIC широко используется в разных публикациях. Для решения недостатка ОФХ - плохое разделение полярных соединений были предложены альтернативы: ион-парная хроматография, мицеллярная хроматография, сорбенты embedded с полярными вставками в алкильную цепь, дериватизация, но все они имели недостатки и не получили широкого признания. По ГФХ вышли книги [6-11] и обзоры [12-23], в которых систематизированы сведения по ГФХ по состоянию времени выхода этих книг и обзоров. Название «гидрофильная хроматография» не точное, одно из предложений назвать этот метод полярной хроматографией, поскольку сорбент и элюент в этом методе полярные. На Комиссии по хроматографии надо обсудить этот вопрос официально.

Механизм удерживания в ГФХ

Исследованиям механизма удерживания в ГФХ посвящено много работ [24-44]: использовались разные модели удерживания [24-26], предложено уравнение удерживания [27], оценка роли слоя адсорбированной воды на удерживание на полярных стационарных фазах [28], удерживание и селективность [29], предсказание удерживания [30], общие представления [31], влияние разных параметров на удерживание [32-44]. Кроме сильнополярных соединений ГФХ позволяет разделять ионные и ионизируемые соединения [37], обычно разделяемые методами ионной или ионообменной хроматографии. Механизм удерживания в ГФХ сложен, принято считать, что он результат комбинации распределения аналита между водным слоем, находящемся на гидрофильной поверхности сорбента и органическим компонентом элюента в

сочетании с другими видами взаимодействий как водородная связь, диполь-дипольные взаимодействия, электростатические и даже гидрофобные взаимодействия [32]. Для получения полного понимания механизма удерживания в ГФХ нужно принимать во внимание состав подвижной фазы и структуру аналита. Первоначально удерживание в ГФХ, в основном, связывали с распределением на слое воды на поверхности сорбента, однако, затем стали принимать во внимание адсорбцию и электростатические взаимодействия. В работе [33] проведено важное фундаментальное исследование основных характеристик взаимодействия выбранными соединениями 22 стационарными фазами (коммерчески доступные) с разными функциональными группами (нейтральными, катионными, анионными и цвиттерионными). В результате этих исследований было показано, что распределение – доминирующий механизм в удерживании незаряженных аналитов. Однако, некоторые факты взаимодействия с функциональными группами указывают на то, что на удерживание влияет и адсорбция.

В следующей работе [42] изучено поведение удерживания 14 соединений (нейтральных, кислых и основных) на двух амидных и силикагелевых колонках разных производителей. Каждая колонка тестировалась с 6 разными подвижными фазами при разных pH. Результаты измерений подтвердили, что механизм удерживания сложен, что для правильной интерпретации результатов нужно учитывать состав подвижной фазы и химическую природу анализируемых соединений. Число исследований механизмов удерживания в ГФХ растет, однако, выявление разных взаимодействий все еще трудная задача. Вклад адсорбции больше, когда слой воды меньше. Адсорбция также выше на цвиттерионных сорбентах. В общем, в настоящее время механизм удерживания в ГФХ рассматривается как сложный, включая распределе-

ние, адсорбцию и ионные взаимодействия, поэтому ГФХ рассматривают как сочетание НФХ, ОФХ и ИХ. Этот механизм зависит от природы сорбента - сорбата и элюента. Этот сложный механизм дает возможность более гибкого регулирования условий для достижения нужного разделения. Но с другой стороны, это не позволяет предсказать порядок удерживания и селективность разделения, т.к. нет преобладающего вклада. Поэтому широкие дискуссии продолжают проходить о механизмах удерживания в ГФХ.

Сорбенты для ГФХ

Сорбенты в ГФХ разделяются на сорбенты с полярными нейтральными функциональными группами на поверхности, группы с зарядами и цвиттерионами. Как уже упоминалось ранее, в ГФХ используются только полярные сорбенты. По полярности сорбенты располагаются в такой ряд: силикагель > аминопропильный > диольный > цианопрпильный. Есть еще сорбенты амидные, алкиламидные и с другими привитыми группами. (таблица 1). В ГФХ нет наиболее универсального широко применяемого сорбента, такого как С18 в ОФХ. Применяемость разных сорбентов в аналитической практике следующая: силикагель – 35%, цвиттерионные – 25%, амидные – 14%, диольные –

12%, аминопропильные – 9%, цианопрпильные – 1% и прочие – 4%.

Подвижная фаза

Отличительная особенность ГФХ - это применение элюентов с большим содержанием органического компонента, в частности, ацетонитрила в пределах 60-98% [69-70]. Кроме ацетонитрила используют и другие органические растворители. По полярности они располагаются в таком порядке: вода > метанол > этанол > изопропанол > ацетонитрил > ацетон. За счет низкой вязкости ацетонитрила вязкость элюентов в ГФХ в общем в 2-3 раза меньше, чем в ОФХ. Поэтому, это позволяет использовать колонки большей длины (до 45 см) для увеличения общей эффективности. Считается, что это одно из преимуществ ГФХ. В элюент может добавляться буфер до 1% Вода – самый сильный элюент, поэтому увеличение ее доли в элюенте уменьшает удерживание полярных веществ.

Двумерная ГФХ

ГФХ очень перспективна для двумерных вариантов хроматографии, особенно в сочетании с обращенно-фазовой или ионообменной [71-78], особенно для разделения и анализа сложных смесей в метаболомике [74], пептидомике [76,78],

Таблица 1. Основные типы неподвижных фаз в ГФХ

Table 1. Types of HILIC stationary phases

		ссылки
1	Общие обзоры, характеристика свойств	45-53
2	Силикагели	54
3	Поверхностно-пористые сорбенты	55
4	Монолитные колонки	55
5	Амидные	57
6	Цвиттерионные	58, 59
7	Сульфированные циклофрукталы	60
8	Оксид титана	61
9	С привитой мальтозой	62
10	Неомицинпривитые	63
11	Сорбитол метакрилата	64
12	Ионные жидкости	65, 66
13	Бета-циклодекстрины	67
14	Перфторированные	68

для исследования полифенольного профиля.

Детекторы в ГФХ

В ГФХ применяются разные детекторы, практически все наиболее распространенные: масс-спектрометрические, флуориметрические, УФ, рефрактометрические, по светорассеиванию, электрохимические и др [79-81]. Наибольшие применения находят масс спектрометрические детекторы. В ГФХ они показывают чувствительность в 10 раз большую, чем в ОФХ. Это связано с тем, что с повышенным содержанием органического вещества в элюенте повышается летучесть и эффективность ионизации. Это важно при применениях ГФХ в комбинации с МС метаболомике, протеомике.

Электрохимические детекторы интересны при разделении и анализе полифенолов: флавоноидов, фенольных кислот, антоцианинов, проантоцианидинов, т.к. они селективно с высокой чувствительностью определяются этими детекторами.

Применение ГФХ

В таблице 2 приведены основные применения ГФХ для анализа биологически активных соединений в медицине, биологии, фармацевтике, а также в фундаментальных исследованиях в метаболомике, протеомике, пептидомике и пр. omics.

Интересны применения в судебной химии, контроле пищевых продуктов и загрязнений окружающей среды.

Таблица 2. Области применения ГФХ

Table 2. Fields of application of HPLC

		ссылки
1	Анализ пищевых продуктов	82, 83
2	Фармацевтика	84-86
3	Метаболомика	87-89
4	Протеомика	90-92
5	Пептидомика	92
6	Метаболомика в плазме	93
7	Тетрациклиновые антибиотики	94
8	Неомицин	95
9	Пептиды	96-98
10	Нуклеотиды	99
11	Гликопептиды	100
12	Белки	102
13	Моноклональные антитела	103
14	Аминокислоты	104
15	Производные ДНК	105
16	Нейротрансмиттеры	106
17	Нелегальные пептидные лекарства	107
18	Олигонуклеотиды	108
19	1,1 – диметилгидразин и его продукты превращения	109
20	Селен	110
21	Токсины	111, 112
22	Нуклеозиды и нуклеотиды	113
23	Пуриновые и пиримидиновые основания	114
24	Полифенолы	115-118
25	Антоцианины	119
26	Процианидины	120
27	Флавоноиды	121
28	Олигомерные проантоцианидины	122

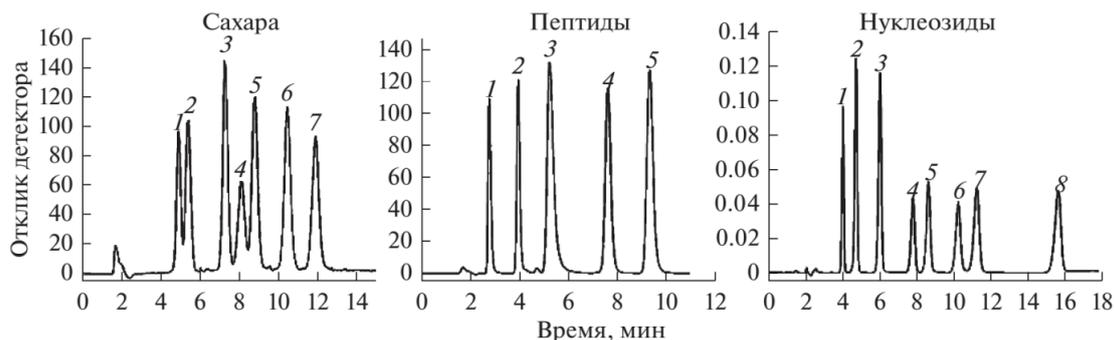


Рис. 1. Хроматограмма разделения сахаров [20]: 1 – сорбоза; 2 – глюкоза; 3 – тураноза; 4 – целобиоза; 5 – трегалоза; 6 – мелицитоза; 7 – раффиноза. Пептидов: 1 – FGGF; 2 – LGG; 3 – Angiotensin III; 4 – EE; 5 – GGH. Нуклеозидов: 1 – метилуридин; 2 – уридин; 3 – аденин; 4 – инозин; 5 – ксантозин; 6 – цитидин; 7 – гуанозин; 8 – 1-метиладенозин.

Fig. 1. Chromatogram of separation of sugars [20]: 1 – sorbose; 2 – glucose; 3 – turanose; 4 – cellobiose; 5 – trehalose; 6 – melicitose; 7 – raffinose. Separation of peptides: 1 – FGGF; 2 – LGG; 3 – Angiotensin III; 4 – EE; 5 – GGH. Separation of nucleosides: 1 – methyluridine; 2 – uridine; 3 – adenosine; 4 – inosine; 5 – xanthosine; 6 – cytidine; 7 – guanosine; 8 – 1-methyladenosine.

В последние годы актуально анализировать полифенольные соединения, обладающих антиоксидантной активностью.

Нужно отметить, что ГФХ позволяет разделять многие соединения быстрее, чем другие методы и с большой чувствительностью, однако с применением масс-спектрометрических и электрохимических детекторов. Для иллюстрации аналитических возможностей ГФХ на рисунке 1 приведены хроматограммы разделения сахаров, пептидов и нуклеотидов [20].

Заключение

Гидрофильная хроматография в течение 30 лет (1990-2020 гг.) оформилась в совершенный широко востребованный

метод хроматографии для анализа полярных соединений. Число публикаций с 2000 непрерывно росло, в последние годы достигло более 300 публикаций в год (всего публикаций не менее 3000). Исследован механизм удерживания, разработан большой ассортимент сорбентов, показаны перспективы двумерной ГФХ. Потрясающие успехи применения ГФХ в анализе биологически активных соединений в биологии, медицине, фармацевтике, в пищевых продуктах. Много публикаций по определению метаболитов, маркеров заболеваний, вершина этих достижений - это анализы в метабомике, протеомике, пептидомике и др.ОМІС. ГФХ продолжает развиваться и можно ожидать новых достижений.

Список литературы/References

1. Alpert A.J., *J. Chromat.*, 1990, Vol. 499, pp. 177-196.
2. Linden J.C., Lanhead C.L., *J. Chromat.*, 1975, Vol. 105, pp. 125-133.
3. Palmer J.K., *Anal. Lett.*, 1975, Vol. 8, pp. 215-224.
4. Caprykin L.V., Kiseleva N.V., Vasil'ev V.N., *Zav. Lab.*, 1990, Vol. 56, pp. 49-54.
5. Gusarov A.A., Saprykin L.V., Kiseleva N.V., *Zav. Lab.*, 1992, No 11, pp. 7-9.
6. Appelblad P., *Practical guide to HILIC*, 1 st

edition Publishes by Merck, 2008, 320 p.

7. Guo Y., Wang P.G., *Hydrophilic interaction chromatography (HILIC) and advanced applications* CRC Press, New York, USA, 2011, 401 p.

8. Perry G., Wang P., He W., *HILIC and advanced applications*, 1 st edition Boca Raton, 2011, 350 p.

9. Vitha M. *Hydrophilic interaction chromatography*, New Jersey, John Wiley and Sons, 2013, 313 p.

10. Olsen B.A., Pack B.W., *Hydrophilic inter-*

action chromatography – a Guide for Practitioners Hoboken, N.Y., Wiley, 2013, 336 p.

11. Eds. Wang P.G., He W., Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) and advanced applications, CRC Press, 2017, 610 p.

12. Zanner G., Deedler A.M., Nuhner M., *Electrophoresis*, 2011, Vol. 32, pp. 3456-3466.

13. Cubbon S., Bradbury T., Wilson J. et al., *Anal. Chem.*, 2007, Vol. 79, pp. 8911-8918.

14. Buszewski B., Noga S., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, Vol. 402, No 1, pp. 231-247.

15. Hemstrom P., Irgum K., *J. Sep. Sci.*, 2006, Vol. 29, No 12, pp. 1784-1821.

16. Gama M.R., Silva R.G. da C., Collins C.H., Bottoli C.B.G., *Trends Anal. Chem.*, 2012, Vol. 37, pp. 48-60.

17. Guo Y., *Analyst*, 2015, Vol. 140, pp. 551-559.

18. McCalley D.V., *LC GC Europe*, 2019, Vol. 32, pp. 114-125.

19. Chernobrovkina A.V., Smolenkov A.D., SHpigun O.A., *Laboratoriya i proizvodstvo*, 2018, No 4, pp. 76-92.

20. Kartsova L.A., Bessonova V.A., Somova V.D., *ZHurnal analit. khimii*, 2019, Vol. 74, pp. 323-334.

21. Horshitha S., Surya S.R., Baba H.S.U. et al., *J. Drug metabolism technology*, 2020, Vol. 11, pp. 252-263.

22. Torayo M., Haddad P.R., Amos. I.J. et al., *Anal. Chim. Acta*, 2018, Vol. 1000, pp. 20-40.

23. McCalley D.V., *LC GC North Amer.*, 2020, Vol. 38, pp. 1-12.

24. Pirok B.W.J., Molenaar S.R.A., van Outerstarp R.E., Shoenmakers R.J., *J. Chrom. A*, 2017, Vol. 1530, pp. 104-111.

25. Jovanovic M., Rakic T., Jancic-Stojanovic B., *Instrumentation Science Technology*, 2014, Vol. 42, pp. 230-266.

26. Enerby M.R., Hulse J., Peterson P. et al., *Anal Bioanal Chem.*, 2015, Vol. 407, pp. 9135-9152.

27. Jin G., Guo Z., Zhang F. et al., *Talanta*, 2008, Vol. 76, pp. 522-527.

28. Guo Y., Bhalodia N., Fattal B., Serris I., *Separations*, 2019, Vol. 6, pp. 19-25.

29. Guo Y., Gaiki S., *J. Chromat A*, 2011, Vol. 1218, pp. 5920-5938.

30. Toraji M., Haddad P.R., Amos R.J. et al., *J. Chromat A*, 2016, Vol. 1486, pp. 59-67.

31. McCalley D.V., *J. Chrom. A*, 2018, Vol. 1523, pp. 49-71.

32. Jandera P., Janás P., *Anal. Chim. Acta*, 2017, Vol. 967, pp. 12-32.

33. McCalley D.V., *J. Chrom. A*, 2018, Vol. 1554, pp. 61-70.

34. Alvares-Segura T., *Anal. Chim. Acta*, 2019, Vol. 1050, pp. 176-181.

35. Alpert A.J., *J. Chrom A*, 2018, Vol. 1538, pp. 45-48.

36. Ikegami T., Tomomatsu K., Takubo H., Horie K. et al., *J. Chromatogr. A*, 2008, Vol. 1184, pp. 474-481.

37. Greco G., Letzel T., *J. Chromatogr. Sci.*, 2013, Vol. 51, pp. 684-693.

38. Jandera P., Stankova M., *Chromatographia*, 2015, Vol. 79, No 13-14, pp. 853-859.

39. McCalley D.V., *J. Chromatogr. A*, 2010, Vol. 1217, No 20, pp. 3408-3412.

40. Fountain K.J., Xu J., Diehl D.M., Morrison D., *J. Sep. Sci.*, 2010, Vol. 33, No 6-7, pp. 740-746.

41. Karatapanis A.E., Fiamegos Y.C., Stalikas C.D., *J. Chromatogr. A*, 2011, Vol. 1218, No 20, pp. 2871-2877.

42. Dinch N.P., Jonson T., Irgum K., *J. Chrom A*, 2011, Vol. 1218, pp. 5880-5891.

43. Kumar A., Heaton J.C., McCalley D.V., *J. Chromatogr. A*, 2013, Vol. 1276, pp. 33-43.

44. Alpert A.J., *Anal. Chem.*, 2008, Vol. 80, No 1, pp. 62-68.

45. Hanai T., *Cur. Chrom.*, 2018, Vol. 5, pp. 43-52.

46. Berthort A., Ruiz-Angel M.J., Carda-Broach C., *J. Chrom A*, 2008, Vol. 1184, pp. 6-10.

47. Jandera P., *J. Sep. Sci.*, 2008, Vol. 31, No 9, pp. 1421-1430.

48. Oiao L., Shi X., Xu G., *Trends Anal. Chem.*, 2016, Vol. 81, pp. 23-29.

49. Hou Y., Zhang F., Lin X. et al., *Talanta*, 2017, Vol. 164, pp. 159-163.

50. Ponten E., *LC GC North Am.*, 2012, Vol. 30, pp. 36-42.

51. Wu J., Bicker W., Lindner W., *J. Sep. Sci.*, 2008, Vol. 31, pp. 1492-1503.

52. Ibrahim M.E.A., Lucy C.A., In HILIC. A Guide for practitioners. Olsen B.A., Pack B.W., Vitha M.F. Eds., Wiley Hoboken, N.Y., Chapter 2, 2013, pp. 43-85.

53. Bell D.S., Majors R.E., *LC GC Europe*, 2016, pp. 102-109.

54. Qian K., Yang Z., Zhang F. et al., *Anal. Chem.*, 2018, Vol. 90, pp. 8750-8755.

55. McCalley D.V., *J. Chromat A*, 2008, Vol. 1193, pp. 85-91.

56. Jiang Z., Smith N.W., Ferguson P.P. D., Taylor M.R., *Anal. Chem.*, 2007, Vol. 79, pp. 1243-1250.

57. Oiao L., Lv W., Chang M. et al., *J. Chrom A*, 2018, Vol. 1559, pp. 141-147.

58. Chirita R.I., West C., Zubrzycki S. et al., *J. Chromat.*, 2011, Vol. 1218, pp. 5939-5963.
59. Arase G., Kimura S., Inegami T., *J. Pharm Biomed. Anal.*, 2018, Vol. 158, pp. 307-316.
60. Padivitage N.L., Armstrong D.W., *J. Sepp. Sci.*, 2011, Vol. 34, pp. 1636-1647.
61. Zhou T., Lucy C.A., *J. Chrom.*, 2010, Vol. 1217, pp. 82-88.
62. Fu Q., Guo Z., Liang T., Zhang X., Xu Q. et al., *Anal. Methods*, 2010, Vol. 2, pp. 217-222.
63. Peng X., Feng Y., Hu X., *Chromatographia*, 2013, Vol. 76, No 9-10, pp. 459-465.
64. Persson J., Hemstrom PP., Irgum K., *J. Sepp. Sci.*, 2008, Vol. 31, No 9, pp. 1504-1509.
65. Somova V.D., Bessonova E.A., Karczova L.A., *Analitika i kontrol'*, 2017, Vol. 21, No 3, pp. 241-245.
66. Qiao L.Z., Li H., Shan Y.H., Wang S.Y. et al., *J. Chromatogr. A*, 2014, Vol. 1330, No 21, pp. 40-45.
67. Feng J., Guo Z., Shi H., Gu J. et al., *Talanta*, 2010, Vol. 81, No 4-5, pp. 1870-1876.
68. Jacob C.C., Gallart-Agala H., da Costa G.G. Chapter 5. HILIC and perfluorinated stationary phases, Fast Liquid Chromatography-Mass spectrometry methods in Food and Environmental analysis, 2015, pp. 149-184.
69. McCalley D.V., *J. Chromatogr. A*, 2017, Vol. 1483, pp. 71-79.
70. Liu M., Ostovic J., Chen E.X., Cauchon N., *J. Chromatogr. A*, 2009, Vol. 1216, No 12, pp. 2362-2370.
71. Jandera P.P., Hájek T., Škeřiková V., Soukop J., *J. Sepp. Sci.*, 2010, Vol. 33, pp. 841-852.
72. Jandera P.P., Hájek T., Staňkova M., Vyňuchalova K. et al., *J. Chromatogr. A*, 2012, Vol. 1268, pp. 91-101.
73. Willemse C.M., Stander M.A., Vestner J., Tredoux A.G.J. et al., *Anal. Chem.*, 2015, Vol. 87, No 24, pp. 12006-12015.
74. Zhong L., Cheng F., Lu X., Duan Y., Wang X., *Talanta*, 2016, Vol. 158, pp. 351-357.
75. Strega M.A., Stevenson S., Lawrence S.M., *Anal. Chem.*, 2000, Vol. 72, No 19, pp. 4629-4633.
76. Somella E., Salviati E, Musella S et al., *Separation*, 2020, Vol. 7, pp. 25-34.
77. Stoll D.R., Harnes D.C., Sfoples G.O. et al., *Anal. Chem.*, 2018, Vol. 90, pp. 5923-5929.
78. Somella E., Salviati E., Merciani F. et al., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2019, Vol. 175, pp. 1-9.
79. Nguyen H.P.P., Schug K.A., *J. Sepp. Sci.*, 2008, Vol. 31, No 9, pp. 1465-1471.
80. Hanai T., *Mass spectromet. purif. Tech.*, 2017, Vol. 4, pp. 123-131.
81. Socia A., Foley J., *J. Chrom A*, 2016, Vol. 1446, pp. 41-49.
82. Bernal J., Ares A.M., Pal J., Wiedmer S.K., *J. Chrom.*, 2011, Vol. 1218, pp. 7438-7452.
83. Pyrzynska K., Sentkowska A., *Crit.ReVol. Anal.Chem.*, 2015, Vol. 45, pp. 41-51.
84. Dejaegher B., Heyden Y.V., *J. Sepp. Sci.*, 2010, Vol. 33, No 6-7, pp. 698-707.
85. Erkmén C., Gebrehiwat W.H., Usla B., *Current Pharm analysis*, 2021, Vol. 17, pp. 315-345.
86. Zhang Q., Yang F.Q., Hu Y.J., Xia Z.N., *J. Sepp. Sci.*, 2017, Vol. 40, pp. 49-80.
87. Spagou K., Tsoukali H., Raikos N., Gika H. et al., *J. Sepp. Sci.*, 2010, Vol. 33, pp. 716-722.
88. Zhong L., Cheng F., Lu X., Duan Y. et al., *Talanta*, 2016, Vol. 158, pp. 351-357.
89. Wu X., Huang Y., Sun J., Wen Y. et al., *J. Chromatogr. B*, 2018, Vol. 1072, pp. 40-46.
90. Cai X., Zou L., Dong J., Zhao L. et al., *Anal. Chim. Acta*, 2009, Vol. 650, pp. 10-17.
91. Di Palma S., Mohammed Sh., Heck Albert J.R., *Nature Protocols*, 2012, Vol. 7, No 11, pp. 2041-2044.
92. Boersema PP.J., Mohammed S., Heck A.J.R., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, Vol. 391, pp. 151-158.
93. Hsieh Y., *J. Sepp. Sci.*, 2008, Vol. 31, No 9, pp. 1481-1487.
94. Valette J.C., Demesmay C., Rocca J.L., Verdon E., *Chromatographia*, 2004, Vol. 59, No 1-2, pp. 55-58.
95. Oertel R., Renner U., Kirch W., *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2004, Vol. 35, No 3, pp. 633-636.
96. Jiang W., Fischer G., Girmay Y., Irgum K., *J. Chromatogr. A*, 2006, Vol. 1127, No 1-2, pp. 82-86.
97. Yoshida T., *J. Biochem. Biophys. Methods*, 2004, Vol. 60, No 3, pp. 265-274.
98. Wujcik C.E., Tweed J., Kadar E.P.P., *J. Sepp. Sci.*, 2010, Vol. 33, pp. 826-831.
99. Padivitage N.L.T., Dissanayake M.K., Armstrong D.W., *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, Vol. 405, No 27, pp. 8837-8841.
100. Zacharias L.G., Hartmann A.K., Song E.H., Zhao J.F. et al., *J. Proteome Res.*, 2016, Vol. 15, No 10, pp. 3624-3628.
101. Alpert A.J., Shukla M., Shukla A.K., Zieske L.R. et al., *J. Chromatogr. A*, 1994, Vol. 676, No 1, pp. 191-198.

102. Periat A., Fekete S., Cusumano A., Veuthy J.-L. et al., *J. Chromatogr. A*, 2016, Vol. 1448, pp. 81-86.
103. d'Atri VOL., Fekete S., Beck A., Lauber M. et al., *Anal. Chem.*, 2017, Vol. 89, pp. 2086-2091.
104. Peritat A., Krull I.S., Guillarme D., *J. Sepp. Sci.*, 2015, Vol. 38, pp. 357-367.
105. Murakami H., Horiba R., Iwata T., Miki Y. et al., *Talanta*, 2018, Vol. 177, pp. 12-19.
106. Chirita R.-I., West C., Finaru A.-L., Elfakir C., *J. Chromatogr. A*, 2010, Vol. 1217, pp. 3091-3096.
107. Janvier S., De Sutter E., Wynendaele E., De Spiegeleer B. et al., *Talanta*, 2017, Vol. 174, pp. 562-567.
108. Li Q., Lynen F., Wang J. et al., *J. Chrom. A*, 2012, Vol. 1255, pp. 237-243.
109. Ulyanowakii N.V., Kosaykov D.S., Pikovskoi I.I., Shavrina I.S. et al., *Chromatographia*, 2018, Vol. 8, pp. 891-900.
110. Sentkowska A., Pyrzynska K., *J. Chrom. B*, 2018, Vol. 1074-1075, pp. 8-15.
111. Salome R., Corinne L.B., Gael C. et al., *J. Mass. Spectr.*, 2015, Vol. 50, pp. 175-181.
112. Rossignoli A.E., Marino C., Martin H., Blanco J., *J. Agric. Marine Biology*, 2015, Vol. 2 (2), pp. 20-25.
113. Garcia-Gomez D., Rodriguez-Gonsalo E., Carabias-Martinez R., *Trends Anal. Chem.*, 2013, Vol. 47, pp. 111-128.
114. Marrubini G., Mendoza B.E.C., Massolini Q., *J. Sepp. Sci.*, 2010, Vol. 33, pp. 803-816.
115. Dejneka V.I., Saenko I.I., Blinova I.P., *Zh. analit.khim.*, 2016, Vol. 71, pp. 310-314.
116. Sy'chev K.S., Sty'skin I.E., *Analitika*, 2012, No 4, pp. 56-61.
117. Sommella E., Pepe G., Pagano F. et al., *Food Res. Int.*, 2015, Vol. 76, pp. 466-477.
118. Kalili K.M., de Villiers A., *J. Sepp. Sci.*, 2010, Vol. 33, pp. 853-863.
119. Willemse C.M., Stenden M.A., de Villiers A., *J. Chrom. A*, 2013, Vol. 1319, pp. 127-140.
120. Kalili K.M., de Villiers A., *J. Chrom.*, 2009, Vol. 1216, pp. 6274-6284.
121. Zhang H., Guo Z., Zhang F., Xu Q. et al., *J. Sepp. Sci.*, 2008, Vol. 32, pp. 1623-1627.
122. Yanagida A, Murao H, Ohnishi-Kameyama M, Yamakawa Y. et al., *J Chromatogr A.*, 2007, Vol. 1143(1-2), pp. 153-161.

30th anniversary of hydrophilic interaction chromatography

© 2021 Yashin A.Ya., Yashin Ya.I.

Scietegra group, Moscow

Over the past 30 years (1990-2020), hydrophilic interaction chromatography (HILIC) has come a long way and is now one of the most popular chromatographic methods used in various fields to separate and analyse polar compounds. It originated at the junction of normal phase liquid chromatography (NP-HPLC) and reversed phase chromatography (RP-HPLC) and employs polar sorbents used in NP-HPLC and polar eluents used in (RP-HPLC). HILIC has a complex retention mechanism, since, besides polar compounds, it can also separate ionic compounds. Therefore, HILIC is, in fact, a combination of three methods: NP-HPLC, RP-HPLC, and ion exchange chromatography (IC). Due to several parameters affecting the degree of retention, HILIC presents a flexible method, which can be used to set optimal conditions for the separation of complex polar compounds. The retention is influenced by the following parameters: distribution between the water-rich layer on the surface of the sorbent and the organic component of the eluent, adsorption, and other interactions. There is a wide range of sorbents developed specifically for HILIC: sorbents with neutral functional groups on the surface, sorbents with charged groups, and sorbents with zwitterionic groups. The article presents an overview of sorbents with various functional groups on the surface. A specific feature of HILIC is the use of eluents with high concentrations of organic components, most commonly acetonitrile (60-95%). Methanol, ethanol, isopropanol, and acetone are also used. HILIC proved to be a very promising two-dimensional chromatographic technique (especially when combined with RP-HPLC) for separation and analysis of complex mixtures of polar compounds. In complex analysis, the most common combination is HILIC x RP-HPLC x MS. HILIC variations also proved to be highly effective in medicine, biology, and pharmaceuticals, where they are used for the sepa-

ration and analysis of biologically active compounds, namely amino acids, peptides, proteins, nucleotides, nucleosides, carbohydrates, antibodies, DNA derivatives, drugs, metabolites, disease markers, purine and pyrimidine bases, and polyphenolic compounds (flavonoids, anthocyanins, proanthocyanidins, etc.), especially in food and drinks. Reviews of the analyses of food and drugs have been published in pharmaceuticals, metabolomics, proteomics, peptidomics, and other omics.

Keywords: hydrophilic interaction chromatography (HILIC), retention mechanism, sorbents, eluents, two-dimensional HILIC, applications.

Яшин Яков Иванович – д.х.н., профессор, научный консультант компании «Интерлаб», группа компаний «Сайтегра», Москва

Яшин Александр Яковлевич – к.х.н., старший научный сотрудник ООО «Институт аналитической токсикологии», группа компаний «Сайтегра», Москва

Yashin Yakov I. – Dr.Sci. (chemistry) professor, Scientific Consultant of Interlab, Moscow, E-mail: yashin@scietegra.com

Yashin Alexander Ya. – Dr.Sci. (chemistry), Senior Researcher, Institute of Analytical Toxicology LLC, Moscow