

VYUŽITÍ KAPALINOVÉ CHROMATOGRAFIE ZALOŽENÉ NA HYDROFILNÍCH INTERAKCÍCH PRO SEPARACE POLÁRNÍCH LÁTEK

JAN VACEK, LUCIA ONOFREJOVÁ, BOŘIVOJ KLEJDUS a VLASTIMIL KUBÁŇ

Ústav chemie a biochemie, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita v Brně, Zemědělská 1, 613 00 Brno
kuban@mendelu.cz, jan.vacek@ibp.cz

Došlo 17.3.08, přepracováno 5.6.08, přijato 18.8.08.

Klíčová slova: HILIC, polární látky, separace, zwitterion, stacionární fáze, eluce, acetonitril, aminokyseliny, peptidy, DNA

Obsah

1. Úvod
2. Separace na polárních fázích a HILIC
3. Základní mechanismus separace HILIC
4. Aplikace HILIC
 - 4.1. Metabolity a farmakopreparáty
 - 4.2. Oligonukleotidy a složky nukleových kyselin
 - 4.3. Aminokyseliny a peptidy
 - 4.4. Proteiny
5. Závěry a perspektivy

1. Úvod

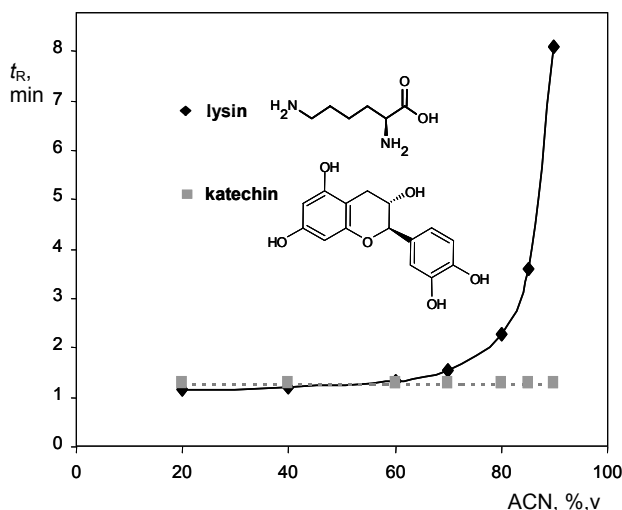
Kapalinová chromatografie byla použita pro separaci biologicky aktivních látek před více než 100 lety (cit.^{1,2}). V původně navržené kapalinové chromatografii na normální fázi (NPLC) se používá polární stacionární fáze a nevodná mobilní fáze, jako je aceton, chloroform, benzen atd. Uvedené chromatografické uspořádání bylo postupně nahrazeno separacemi na reverzních fázích (RPLC), u kterých je separační účinnost (při vhodně zvolených experimentálních podmínkách) výrazně vyšší, a to hlavně pro nepolární látky^{1–3}. V mnoha případech je značně komplikované separovat na klasických reverzních fázích (nejčastěji s vázanými alifatickými řetězci, oktadecyly C₁₈) polární analyty. V případech separace polárních i vysoce polárních látek dochází k jejich eluci v mrtvém retenčním čase. Separační instrumentace a experimentální uspořádání, které by řešilo problém separace polárních látek, bylo nalezeno až v roce 1990, kdy byla v odborném tisku prezentována metoda kapalinové chromatografie založená na hydrofilních interakcích mezi stacionární fází a separovanými látkami (HILIC: hydrophilic interaction liquid chromatography)^{4,5}. Nutno však podotknout, že A. Alpert, který termín „HILIC“ zavedl, nepoužil toto experimentální uspořádání jako první (detaily viz doktor-

ská práce P. Hemströma⁶).

O problematice separací HILIC nebylo v české literatuře doposud souborně referováno. Předpokládáme proto, že tento text bude vhodným úvodem do problematiky, která je dnes velmi aktuálním tématem řady bioanalytických laboratoří, o čemž svědčí enormní nárůst prací publikovaných o HILIC v minulém roce. Cílem práce je poskytnout základní informace o principech HILIC separace a poskytnout čtenáři přehled vybraných nejnovějších aplikací. Ucelené monografické zpracování⁷ a detailní studie⁸ byly publikovány dříve.

2. Separace na polárních fázích a HILIC

Polární stacionární fáze byly dříve široce rozšířeny a využívány pro chromatografii na tenké vrstvě (v plošném uspořádání). Kromě normálního fázového systému lze však tyto stacionární fáze využít i pro separace v reverzním módu, o čemž svědčí nedávno publikované práce (např. HPLC separace naftodianthronů, floroglucinolů^{9–11}, fenolických kyselin a flavonoidů¹²). Pro detailní pochopení separace na polárních stacionárních fázích a jejich uplatnění v RP a NPLC lze doporučit studie^{13,14}. Autoři se zde zabývali separací derivátů fenolu, hydrochinonu, chinolinu a anilinu.

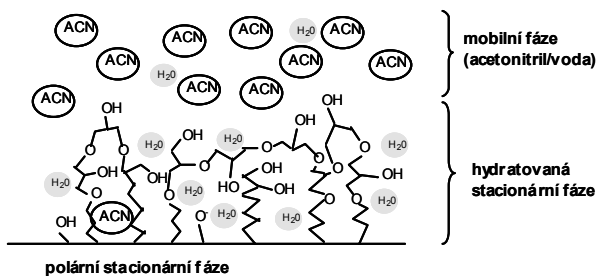


Obr. 1. Závislost retenčního času lysinu a (+)-katechinu na obsahu acetonitrilu (ACN) v mobilní fázi; experimentální podmínky: izokratická eluce, kolona Phenomenex, Luna HILIC, 5 μ m, 2,0 \times 100 mm, mobilní fáze: acetonitril/100 mmol dm⁻³ mravenčan amonný (vodný roztok); rychlost průtoku 0,3 ml min⁻¹, teplota kolony 25 °C; detektor negativní ESI/MS (SIM: lysin 145, katechin 289 *m/z*; koncentrace standardů 10 μ g/nástřík; \blacklozenge lysin, \blacksquare katechin

V jistém ohledu lze separaci HILIC označit za metodu, která vznikla spojením NPLC a RPLC. Avšak separace je zde zaměřena pouze na polární, ve vodě dobře rozpustné látky. K HILIC separacím se používají polární stacionární fáze a vodné mobilní fáze, které obsahují vysoký podíl organického rozpouštědla (více jak 60 %). Stacionární fáze musí být polárnější než fáze mobilní. Díky tomuto uspořádání je možné s vysokým rozlišením dělit polární analyty, přičemž nepolární látky, které nevykazují afinitu ke stacionární fázi, nejsou zadržovány. Uvedená situace je znázorněna na obr. 1, kde je aminokyselina lysin v závislosti na procentickém zastoupení acetonitrilu v mobilní fázi zadržována polární stacionární fázi tvořenou kovalentně propojenými diolovými skupinami (obr. 2). V případě ve vodě méně rozpustného (+)-katechinu není zadržována a dochází k jeho eluci při mrtvém retenčním objemu (obr. 1).

Běžně je možné se setkat s polárními chemicky vázanými fázemi na partikulárním nebo monolitickém nosiči. Nejčastěji se jedná o klasickou silikagelovou stacionární fázi nebo fáze modifikované diolovými ($-\text{CH}(\text{OH})-\text{CH}_2-\text{OH}$), kyanovými ($-\text{CN}$), aminovými ($-\text{NH}_2$), amidovými ($-\text{CONH}_2$) funkčními skupinami (obr. 3a). Další možností je použití silikagel modifikovaný hydrofilními polymery, jako jsou poly(hydroxyethyl) nebo poly(sulfoethyl) (obr. 3b). Mezi nejnovější stacionární fáze pro HILIC patří také tzv. zwitteriontové stacionární fáze (ZIC[®]-HILIC, pozn.: ZIC: zwitterionic), viz obr. 3c. V takovýchto případech jde o chemicky vázané funkční skupiny nesoucí pozitivní a negativní náboj, které se vyznačují vysokou polaritou a vysokou afinitou k vodě^{15,16}. Zavedeny byly také sorbenty s chemicky vázanými jednotkami oligosacharidů¹⁷.

Při experimentální práci je nutné uvedené pravidlo týkající se vysokého zastoupení organického solventu v mobilní fázi striktně dodržet. Pokud není uvedena podmínka dodržena, nedochází již výhradně k hydrofilním interakcím mezi separovanými složkami a stacionární fází. V případě, že by mobilní fáze obsahovala pouze organické rozpouštědlo, jednalo by se o NPLC. Z těchto důvodů je HILIC také někdy označována jako chromatografie s vodnou normální fází nebo reverzní/reverzní kapalínová chromatografie. Výše uvedené bývá nesprávně interpretováno i v odborné literatuře a často dochází k chybnému označení a interpretaci metody HILIC.



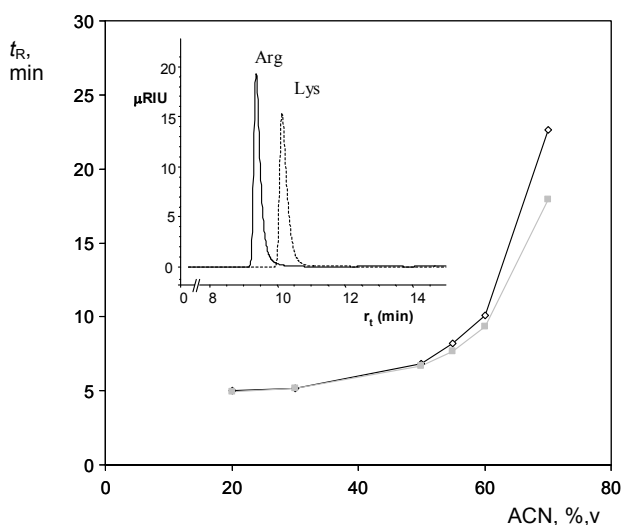
Obr. 2. Schéma dioly modifikované stacionární fáze

stacionární fáze	chemická struktura
a. silikagel	$-\text{OH}$
kyanopropyl	$-(\text{CH}_2)_3-\text{CN}$
aminopropyl	$-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}_2$
diol	$-\text{CH}_2-\underset{\text{OH}}{\text{CH}}-\text{CH}_2-\text{OH}$
b. PAC	$-(\text{CH}_2-\underset{\text{C=O}}{\underset{\text{OH}}{\text{CH}}})_n-$
c. ZIC	$-\text{CH}_2-\underset{\text{CH}_3}{\overset{\text{CH}_3}{\text{N}^{\oplus}}}(\text{CH}_2)_3-\text{SO}_3^{\ominus}$

Obr. 3. Stacionární fáze používané při HILIC; PAC – polymerní aniontová fáze, ZIC – zwitteriontová fáze

3. Základní mechanismus separace HILIC

Separace HILIC je v ideálním případě řízena hydrofilní interakcí mezi solutem a polární stacionární fází (tzv. primární interakce). V průběhu separace se ovšem uplatňují i druhotné interakce (např. elektrostatické interakce aj.), přičemž podmínkou je, aby zadrž solutu byla primárně řízena hydrofilními interakcemi. Předpokládá se, že k tomu, aby mohlo k hydrofilní interakci dojít, je potřeba, aby se na povrchu sorbentu stacionární fáze vytvořila hydratovaná vrstva (z angl. „water-rich layer“, viz též obr. 2). Mechanismus zadržení polárních látek v systému HILIC je dobře patrný při konstrukci retenčních map (závislostí retenčního času nebo faktoru na zastoupení organického solventu v mobilní fázi (viz obr. 1 a 4). Elektrostatické odpuzování separovaných složek (druhotné interakce) je možné omezit přidáním amonných solí organických kyselin, jako je např. mravenčan nebo octan amonný. Uvedené platí především pro negativně nabitou stacionární fázi na bázi silikagelu. Obvykle se amonné soli používají v milimolárních koncentracích, přičemž kation NH_4^+ je schopný kompenzovat negativní náboj stacionární fáze. Volba vhodné amonné soli je důležitá z hlediska její rozpustnosti v mobilní fázi (dosažení požadované iontové síly I) s vysokým obsahem organického rozpouštědla. V závislosti na vlastnostech, které od separačního média vyžadujeme, můžeme optimalizovat i další parametry, např. pro zvýšení ionizace při hmotnostně spektrometrické detekci je možné obohatit mobilní fázi přísadkou organické kyseliny (např. kyseliny mravenčí). Retence může být ovlivněna teplotou, aciditou mobilní fáze, koncentrací použité soli v mobilní fázi. Detailní informace o modelu retence doposud publikovány nebyly, nicméně původní práce A. Alperta⁵ upřednostňuje model rozdělovací (partition), oproti tomu v souhrnné práci P. Hemströma⁷ jsou prezentovány výsledky svědčící



Obr. 4. Separace lysinu a argininu na silikagelové stacionární fázi; závislost retenčních časů aminokyselin na procentickém zastoupení acetonitrilu (ACN) v mobilní fázi. Vložený obrázek: chromatogram argininu (Arg) a lysinu (Lys); izokratická eluce: ACN/vodný roztok mravenčanu amonného (100 mmol dm^{-3}), 60/40 (% v/v). Experimentální podmínky: kolona Atlantis HILIC silica $3 \mu\text{m}$, $4,6 \times 150 \text{ mm}$, rychlost průtoku mobilní fáze $0,5 \text{ ml min}^{-1}$, teplota kolony $30 \text{ }^\circ\text{C}$; refraktometrický detektor (teplota optické jednotky $30 \text{ }^\circ\text{C}$); koncentrace aminokyselin $10 \mu\text{g/nástřik}$; ■ Arg, ◇ Lys

spíše ve prospěch adsorpčního modelu. Model retence byl mnohokrát diskutován v případě RPLC¹⁸, avšak podobně jako u HILIC nebyl mechanismus retence detailně objasněn.

4. Aplikace HILIC

Na základě publikací, které se věnují využití HILIC, lze předpokládat, že přednostně bude metoda uplatňována pro separaci aminokyselin¹⁹ a peptidů²⁰. Pro tyto účely byly nalezeny vhodné podmínky v různých systémech izokratické a gradientové eluce. V případě gradientové eluce lze měnit zastoupení organického solventu nebo soli v mobilní fázi. Svě uplatnění nalézá HILIC i v separaci oligonukleotidů^{21,22}, složek nukleových kyselin a cukrů (oligo- a polysacharidů). Kromě možností, které HILIC poskytuje v analýzách ve vodě dobře rozpustných biopolymerů, byly uveřejněny práce zaměřené na separaci nízkomolekulárních organických látek. Mnohé z těchto sloučenin nacházejí uplatnění v biomedicíně a farmakochemii.

4.1. Metabolity a farmakopreparáty

Pomocí HILIC bylo separováno celé spektrum farmaceuticky využívaných látek v komplexních maticích vzorků krve, moči, plasmu a ve vybraných homogenátech tkání. Jednalo se o separaci kyseliny listové a jejich solí²³,

dále separace kokainu a dalších derivátů alkaloidů (např. morfinu)²⁴. Byly také separovány aminoglykosidové farmakopreparáty (amikacin, gentamicin, kanamycin, neomycin, paromomycin, tobramycin)²⁵, cholin a acetylcholin²⁶, uridin, uracyl²⁷ a další organické sloučeniny. Uvedený výčet představuje komplexní skupinu polárních metabolitů a léčiv²⁸. Detailně byla retence polárních sloučenin s malou molekulovou hmotností studována na klasické silikagelové stacionární fázi a na fázích s vázanými amidovými, aminovými a sulfobetainovými skupinami. Za různých experimentálních podmínek a různého složení mobilní fáze byla separována kyselina salicylová, aspirin a cytosin⁸. U uvedených stacionárních fází byly hledány fyzikální i chemické podmínky, které ovlivňují retenci separovaných složek. Vliv teploty byl studován podobně jako u RPLC pomocí van't Hoffovy rovnice a ve většině experimentů byl pozorován pokles retence se vzrůstající teplotou kolony v průběhu separace. Jak bylo prokázáno, je vliv pH mobilní fáze na retenci analytů řízen primárně disociačními konstantami jednotlivých protonizovaných funkčních skupin (pK_a), které jsou typické pro danou látku. Různý stupeň protonizace separovaných složek tedy určuje jejich afinitu ke stacionární fázi.

4.2. Oligonukleotidy a složky nukleových kyselin

Separace nukleových kyselin na polárních stacionárních fázích byla zmíněna již v původních publikacích o HILIC⁵. Mezi nejnovější aplikace v této oblasti separace HILIC patří práce^{21,22,29}. Monolitická kapilární kolona modifikovaná polárním polymerem kyseliny akrylové byla použita pro separaci nukleosidů (uridinu, guanosinu a adenosinu) elucí mobilní fázi složenou z acetonitrilu a 0,2% vodného roztoku kyseliny mravenčí v poměru 90/10 (% v/v)²⁹. Monolitické kolony byly také použity pro gradientovou separaci oligonukleotidů²¹. Separován byl homooligomer a heteropolymerní sekvence 19-ti a 20-ti merů v mobilní fázi acetonitrilu, vody a octanu triethylaminu. Vysoké separační účinnosti bylo dosaženo také při separacích thyminu, uracilu, uridinu, adenosinu, adeninu, guanosinu a dalších na speciální polymerní stacionární fázi²². V případě retence nukleových kyselin na polárních stacionárních fázích je nutné rozlišit, zda se jedná o nukleosid, nukleotid nebo zda je báze součástí oligo- nebo polynukleotidového řetězce.

4.3. Aminokyseliny a peptidy

Pomocí HILIC je možné separovat všechny proteingenní aminokyseliny a mnohé z jejich derivátů. Obecně nejvyšší zádrž mají polární aminokyseliny (Ser, Thr, Cys, Tyr, Asn, Glu). Separacím ve vodě dobře rozpustného cysteinu se většina autorů vyhýbá, jelikož tato aminokyselina podléhá v přítomnosti kyslíku a v závislosti na pH mobilní fáze oxidaci na méně rozpustný cystin. Komplexní separaci proteingenních aminokyselin se ve své práci věnoval Langrock a spol.¹⁹. Pomocí gradientové eluce acetonitrilu a vodného roztoku octanu amonného byly

aminokyseliny rozděleny v pořadí Trp, Phe, Leu, Ile, Met, Tyr, Val, Pro, Ala, Thr, Gly, Glu, Asp, Ser, Gln a Asn. Během gradientové eluce byl postupně zvyšován podíl vody v mobilní fázi, přičemž polární asparagin vykazoval nejvyšší afinitu k amidové stacionární fázi. Pomocí HILIC byl také analyzován ornitin³⁰. Rozdělení aminokyselin lysinu a argininu je naznačeno na obr. 4, kde za uvedených podmínek arginin vyazuje nižší afinitu k silikagelové stacionární fázi než lysin. Jak z obrázku vyplývá, k dobrému rozdělení aminokyselin je potřeba, aby mobilní fáze obsahovala více než 60 % acetonitrilu.

V případě separace peptidů byla studována rozsáhlá skupina oligopeptidů s různou primární strukturou a různým zastoupením polárních aminokyselinových zbytků²⁰. Mezi polární a ve vodě dobře rozpustné peptidy patří glutathion (γ -Glu-Cys-Gly), který zastává řadu fyziologických homeostatických a detoxikačních funkcí³¹. Tento tripeptid byl separován na silikagelové stacionární fázi³² a pomocí HILIC bylo možné studovat jeho postupnou oxidaci na glutathion disulfid³³. Peptidy obsahující zbytky kyseliny glutamové (γ -Glu-Leu, γ -Glu-Val, γ -Glu-Cys- β -Ala, γ -Glu-Cys-Gly)³⁴ byly separovány na HILIC semipreparativních a preparativních kolonách.

4.4. Proteiny

Mezi první práce, které se věnovaly problematice HILIC separace proteinů, byla publikace Lindnera a spol.³⁵, kteří studovali acetylaci lysinů v *N*-koncev doméně histonů. Histony byly před nástřikem na kolonu HILIC izolovány metodou RPLC. K tomuto účelu autoři použili kolonu SynChropak CM 300 a gradientovou eluci směsnými rozpouštědly složenými z acetonitrilu a vodného roztoku fosforečnanu triethylaminu a NaClO₄. Ve frakcích RPLC byly pomocí HILIC identifikovány jednotlivé modifikace histonů H2A a H4. Tyto vysoce polární, hydrofilní a na svém povrchu převážně kladně nabitě bílkoviny jsou součástí chromatinového komplexu a podílejí se na expresi genů a řízení buněčného cyklu. K identifikaci jednotlivých histonů byla použita fotometrická detekce při 210 nm, při kterých absorbují peptidické vazby. ZIC/HILIC mikrokolonová separace byla také použita pro analýzy glykosylovaných proteinů a ke studiu jejich deglykosylace³⁶. K identifikaci proteinů byla použita tandemová hmotnostní spektrometrie (MS/MS). Dá se předpokládat, že HILIC nalezne uplatnění v separaci vybraných proteinů podléhajících post-translačním modifikacím, které jsou dobře rozpustné ve vodě.

5. Závěry a perspektivy

Byly navrženy různé strategie pro separaci polárních látek. V případě RPLC je běžně využíván mechanismus tvorby iontových párů³⁷. Iontově-párové činidlo (např. kyselina trifluoroctová, TFA) interaguje v mobilní fázi se separovanými molekulami a zvyšuje jejich afinitu k povrchu reverzní fáze. Na druhou stranu, přítomnost TFA

v mobilní fázi rapidně snižuje citlivost MS detekce při použití ionizace elektrosprejem. Další možností je použít jinou stacionární fázi, což je i případ HILIC. Jak je patrné z předchozího textu, není HILIC doposud dostatečně prozkoumanou oblastí a samotné vymezení pojmu hydrofilní interakce přináší pro chromatografickou separaci řadu nových nevyřešených problémů. Důvodem je komplexnost separačních dějů a různý podíl jednotlivých interakcí a v neposlední řadě i faktorů, které se uplatňují v závislosti na složení mobilní fáze. I přesto lze použitím HILIC velmi efektivně separovat řadu polárních látek a dá se předpokládat její další vývoj a zvyšující se počet aplikací, včetně jejího využití ve spojení s jinými chromatografickými technikami v 2-D systémech. Perspektivní využití je zřejmě i v kombinaci s hmotnostními detektory³⁸ a nukleární magnetickou rezonancí³⁹.

Již na základě stávajícího vývoje HILIC lze předpokládat její širší uplatnění pro separace na monolitických nosičích, a také se začínají objevovat nové modifikace a materiály¹⁷ vhodné pro HILIC stacionární fáze. V tomto roce byla také zveřejněna práce zaměřená na separaci peptidů, která je založena na hydrofilních interakcích, ale také na elektrostatickém odpuzováním separovaných složek se stacionární fázi (iontové interakce). Byla tak navržena hybridní separace vycházející z HILIC a iontově výměnné chromatografie⁴⁰. Autor práce metodu označil jako ERLIC (electrostatic repulsion-hydrophilic interaction chromatography).

LITERATURA

1. Abraham M. H.: *J. Chromatogr., A* 1061, 113 (2004).
2. Engelhardt H.: *J. Chromatogr., B* 800, 3 (2004).
3. Sýkora D., Tesařová E., Vosmanská M., Zvolánková M.: *Chem. Listy* 101, 190 (2007).
4. Alpert A. J.: *J. Chromatogr.* 444, 269 (1988).
5. Alpert A. J.: *J. Chromatogr.* 499, 177 (1990).
6. Hemström P.: *PhD. disertace*. Umeå University, Švédsko, s. 24, Umeå 2007.
7. Hemström P., Irgum K.: *J. Sep. Sci.* 29, 1784 (2006).
8. Guo Y., Gaiki S.: *J. Chromatogr., A* 1074, 71 (2005).
9. Pavlík M., Vacek J., Klejdus B., Kubáň V.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 6147 (2007).
10. Vacek J., Klejdus B., Kubáň V.: *Čes. Slov. Farm.* 56, 62 (2007).
11. Pavlík M., Vacek J., Klejdus B., Kubáň V.: *Chem. Listy* 101, 556 (2007).
12. Vacek J., Klejdus B., Lojková L., Kubáň V.: *J. Sep. Sci.* 31, 2054 (2008).
13. Petruczynnik A., Waksmundzka-Hajnos M., Hawryl A., Ziolkowska A.: *Chem. Anal. (Warsaw)* 48, 881 (2003).
14. Waksmundzka-Hajnos M., Petruczynnik A., Soczewiński E., Hawryl A.: *Chem. Anal. (Warsaw)* 47, 483 (2002).
15. Idborg H., Zamani L., Edlund P. O., Schuppe-Koistinen I., Jacobsson S. P.: *J. Chromatogr., B* 828, 9 (2005).

16. Idborg H., Zamani L., Edlund P. O., Schuppe-Koistinen I., Jacobsson S. P.: *J. Chromatogr.*, B 828, 14 (2005).
17. Guo Z. M., Lei A. W., Zhang Y. P., Xu Q., Xue X. Y., Zhang F. F., Liang X. M.: *Chem. Commun.* 2007, 2491.
18. Vailaya A., Horváth C.: *J. Chromatogr.*, A 829, 1 (1998).
19. Langrock T., Czihal P., Hoffmann R.: *Amino Acids* 30, 291 (2006).
20. Yoshida T.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 60, 265 (2004).
21. Holdšvendová P., Suchánková J., Bunček M., Bačkovská V., Coufal P.: *J. Biochem. Biophys. Methods* 70, 23 (2007).
22. Hosoya K., Hira N., Yamamoto K., Nishimura M., Tanaka N.: *Anal. Chem.* 78, 5729 (2006).
23. Garbis S. D., Melse-Boonstra A., West C. E., van Breemen R. B.: *Anal. Chem.* 73, 5358 (2001).
24. Giroud C., Michaud K., Sporkert F., Eap C., Augsburg M., Cardinal P., Mangin P.: *J. Anal. Toxicol.* 28, 464 (2004).
25. Oertel R., Neumeister V., Kirch W.: *J. Chromatogr.*, A 1058, 197 (2004).
26. Uutela P., Reinila R., Piepponen P., Ketola R. A., Kostiaainen R.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 19, 2950 (2005).
27. Beumer J. H., Joseph E., Egorin M. J., Covey J. M., Eiseman J. L.: *J. Chromatogr.*, B 831, 147 (2006).
28. Iwasaki Y., Ishii Y., Ito R., Saito K., Nakazawa H.: *J. Liq. Chromatogr. Rel. Technol.* 30, 2117 (2007).
29. Horie K., Ikegami T., Hosoya K., Saad N., Fiehn O., Tanaka N.: *J. Chromatogr.*, A 1164, 198 (2007).
30. Martens-Lobenhoffer J., Postel S., Troger U., Bode-Boger S. M.: *J. Chromatogr.*, B 855, 271 (2007).
31. Vacek J., Havel L.: *Biol. Listy* 70, 169 (2005).
32. Vacek J., Klejdus B., Petrlová J., Lojtková L., Kubáň V.: *Analyst* 131, 1167 (2006).
33. Iwasaki Y., Hoshi M., Ito R., Saito K., Nakazawa H.: *J. Chromatogr.*, B 839, 74 (2006).
34. Dunkel A., Koster J., Hofmann T.: *J. Agric. Food Chem.* 55, 6712 (2007).
35. Lindner H., Sarg B., Meraner C., Helliger W.: *J. Chromatogr.*, A 743, 137 (1996).
36. Hagglund P., Bunkenborg J., Elortza F., Jensen O. N., Roepstorff P.: *J. Proteome Res.* 3, 556 (2004).
37. Shibue M., Mant C. T., Hodges R. S.: *J. Chromatogr.*, A 1080, 68 (2005).
38. Weng N. D.: *J. Chromatogr.*, B 796, 209 (2003).
39. Godejohann M.: *J. Chromatogr.*, A 1156, 87 (2007).
40. Alpert A. J.: *Anal. Chem.* 80, 62 (2008).

J. Vacek, L. Onofrejevá, B. Klejdus, and V. Kubáň
(Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University of Agriculture and Forestry, Brno): Application of Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography in Separation of Polar Compounds

Applicability of classical procedures based on reverse-phase liquid chromatography in separation of water-soluble polar substances is generally limited. In many cases, hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) is able to separate highly polar substances using polar stationary phases and aqueous mobile phases containing increased amounts of organic solvents. Separation of amino acids, peptides, nucleic acids and other organic substances with special emphasis on explanation of basic principles are discussed in the present review.