

极性分子的保留和分离 — 关于何时使用 HILIC 与反相液相色谱柱的详细研究

作者

Anne Mack
安捷伦科技有限公司

摘要

本研究考察了何时使用亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 以及何时使用反相液相色谱 (RPLC) 柱分析难以保留的极性小分子和离子化分子。所示数据表明了分析物/样品、流动相、检测模式和其他方法适用性要求（保留性、分离度、灵敏度和峰形）的影响。

前言

使用反相液相色谱法充分保留和分离极性小分子是一项具有挑战性的任务。烷基固定相液相色谱柱（例如 C18）通常是液相色谱方法开发的首选。然而，高极性分析物对非极性 C18 固定相的亲和力较低，保留性较差。我们可以探索几种能够在反相模式下保留这些化合物的技术，例如，向流动相添加离子对试剂或对分析物进行衍生化。离子对试剂会污染液相色谱柱和系统，一般不适用于 LC/MS。通常也不建议采取衍生化操作，因为这是一个繁琐的额外步骤，会增加样品的前处理时间，并可能导致错误和重现性问题。

要想成功地保留和分离极性分析物，一个更好的做法是探索各种固定键合相。部分键合相非常适合棘手的极性分析物。在反相模式下，存在极性更高的键合相，它们使极性分析物与固定相之间的相互作用变得更强。其中许多固定相也可用于非常弱的流动相，如 100% 水相，从而更好地保留极性化合物。除了反相键合相，市面上还有几种亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 柱固定相。HILIC 模式使用极性固定相保留极性化合物。在给定的分析中，哪一种色谱柱和哪一种液相色谱模式是最佳选择，可由其他方法因素决定，包括分析物溶解度、流动相和首选检测模式。

现代液相色谱柱通常填充表面多孔颗粒填料，这种填料以其在低反压下的高柱效而闻名。高柱效有助于分离相邻洗脱峰，而低反压使液相色谱仪更具灵活性。

本研究展示了一种合乎逻辑的逐步式方法，使化学家能够利用表面多孔颗粒填料液相色谱柱实现对极性分析物的最佳保留、分离和检测。

实验部分

本实验采用 Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统与 Agilent Ultivo LC/TQ。对标准配置的系统进行了改进，以减小系统体积和扩散。表 1 示出了配置详情。

表 1. 系统配置

Agilent 1290 Infinity II 液相色谱系统配置	
Agilent 1290 Infinity II 全能泵 (G7104A)	<ul style="list-style-type: none">· 脱气机· 密封垫清洗泵· 35 μL 溶剂混合器：Agilent Jet Weaver, 35 μL/100 μL (部件号 G4220-60006)· 固件：B.07.23 [0009]
Agilent 1290 Infinity II 样品瓶进样器 (G7129B)	<ul style="list-style-type: none">· 样品恒温器 (部件号 G7167-60101)· 流量计参数：针座组件，PEEK 0.12 mm，样品定量环，20 μL，分析头，20 μL· 自动进样器 → 加热器：不锈钢毛细管，0.12 × 105 mm, SL/SL (部件号 5500-1238)· 螺口样品瓶，棕色，带书写签，经认证，2 mL, 100/pk (部件号 5182-0716)· 螺口盖，蓝色，PTFE/红色硅橡胶隔垫，100/包 (部件号 5182-0717)· 样品瓶内插管，250 μL，带聚合物支脚的玻璃内插管，100/包 (部件号 5181-1270)· 固件：D.07.23 [0009]
Agilent InfinityLab 液相色谱系列集成式柱温箱 (G7130A)	<ul style="list-style-type: none">· 集成类型：G7129B· 3.0 μL 热交换器· 加热器 → 色谱柱：A-Line Quick Connect 快速连接组件，105 mm, 0.075 mm (部件号 5067-5961)· 色谱柱 → 流通池：不锈钢毛细管，0.075 × 220 mm, SV/SLV (部件号 5067-4784)· 固件：B.07.23 [0009]
Agilent Ultivo LC/TQ (G6465A)	<ul style="list-style-type: none">· 安捷伦喷射流 ESI 离子源
Agilent 1290 Infinity II 二极管阵列检测器 (G7117B)	<ul style="list-style-type: none">· 超低扩散最大光强卡套式流通池，10 mm, 0.60 μL (部件号 G4212-60038)· 紫外灯 (5190-0917)· 固件：D.07.23 [0009]
安捷伦液相色谱柱	<ul style="list-style-type: none">· Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 685775-924)· Agilent InfinityLab Poroshell 120 PFP, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695775-408)· Agilent InfinityLab Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 695775-912)· Agilent InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm (部件号 685775-601)· Agilent ZORBAX RRHD Eclipse Plus C18, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 959758-902)· Agilent ZORBAX RRHD HILIC Plus, 2.1 × 100 mm, 1.8 μm (部件号 959758-901)

图 1 是本研究所使用的安捷伦固定相。所有色谱柱均为 2.1×100 mm 形式。表 1 示出了具体的色谱柱部件号。

详细的液相色谱方法参数及相应数据均在本文中示出。

本研究中的所有分析物和流动相添加剂均购自 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)。乙腈购自 Honeywell (Burdick and Jackson, Muskegon, MI, USA)。水经 Milli-Q 系统 (Millipore, Burlington, MA, USA) 0.2 μm 滤膜过滤，分子量为 18。

结果与讨论

亲水相互作用液相色谱 (HILIC) 和反相液相色谱 (RPLC) 是互补性色谱技术。表 2 重点展示了两种液相色谱技术之间的几种关键特性。RPLC 色谱柱主要使用非极性固定相 (C18、C8 等)，而 HILIC 色谱柱则使用极性固定相 (二氧化硅、酰胺等)。两种技术采用的流动相通常由乙腈和水组成，这使得两种液相色谱模式之间可以实现轻松切换。HILIC 和 RPLC 流动相的主要区别在于溶剂洗脱强度。

对于 RPLC，乙腈是强洗脱溶剂。但对于 HILIC，水是强洗脱溶剂。对于 RPLC，得到的色谱图通常是极性分析物到非极性分析物，而 HILIC 则相反。这种相反的洗脱顺序使 HILIC 成为更常用的 RPLC 的一个很好的补充技术。对于极性分析物和离子化分析物尤其如此，它们在 HILIC 模式下的保留时间更长。

最佳产品	低 pH 值流动相的最佳选择	高 pH 值流动相的最佳选择	不同选择性分析的最佳选择	极性化合物的最佳选择	手性分离的最佳选择
InfinityLab Poroshell EC-C18 1.9 μm , 2.7 μm , 4 μm	InfinityLab Poroshell SB-C18 2.7 μm	InfinityLab Poroshell HPH-C18 1.9 μm , 2.7 μm , 4 μm	InfinityLab Poroshell Bonus-RP 2.7 μm	InfinityLab Poroshell HILIC 1.9 μm , 2.7 μm , 4 μm	InfinityLab Poroshell Chiral-V2.7 μm
InfinityLab Poroshell EC-C8 1.9 μm , 2.7 μm , 4 μm	InfinityLab Poroshell SB-C8 2.7 μm	InfinityLab Poroshell HPH-C8 2.7 μm , 4 μm	InfinityLab Poroshell PFP 1.9 μm , 2.7 μm , 4 μm	InfinityLab Poroshell HILIC-Z 2.7 μm	InfinityLab Poroshell Chiral-T 2.7 μm
			InfinityLab Poroshell Phenyl-Hexyl 1.9 μm , 2.7 μm , 4 μm	InfinityLab Poroshell HILIC-OH5 2.7 μm	InfinityLab Poroshell Chiral-CD 2.7 μm
			InfinityLab Poroshell SB-Aq 2.7 μm		InfinityLab Poroshell Chiral-CF 2.7 μm
			InfinityLab Poroshell EC-CN 2.7 μm		

用于极性化合物的 RPLC 键合相 → HILIC 键合相

图 1. 用于小分子分离的 Agilent InfinityLab Poroshell 120 产品组合

表 2. HILIC 与 RPLC 互补

反相液相色谱	亲水相互作用液相色谱
非极性固定相 (例如 C18)	极性固定相 (例如二氧化硅)
极性流动相 • 水/乙腈，水/甲醇	极性流动相 • 水/乙腈
通过减弱流动相的极性降低保留性 • 增加流动相中的乙腈以减小保留性	通过增强流动相的极性降低保留性 • 增加流动相中的水以减小保留性
洗脱顺序：极性到非极性	洗脱顺序：非极性到极性

确定使用哪种液相色谱技术分析极性化合物是一项挑战。我们应仔细考虑哪种方法能够满足分离要求，哪种方法对样品最有效，以及哪种检测方法是可行的。

色谱柱选择

分析极性化合物时，需要考虑各种固定键合相。为了简化本文，我们研究了一个液相色谱柱系列，其固定相如图 1 所示。Agilent InfinityLab Poroshell 120 系列液相色谱柱包含 18 种独特的色谱柱键合相，它们具有三种可扩展的表面多孔颗粒

填料粒径。对框中突出显示的固定相的极性化合物分析性能进行评估。HILIC 键合相通常被认为是极性化合物分析的默认选择。然而，有几种 RPLC 固定相也是不错的选择。图 1 中突出显示的 RPLC 固定相可以在 100% 水性流动相条件下运行，且没有脱湿风险，这有助于极性化合物或离子化合物的保留。

在大多数情况下，用于分析的最佳色谱柱应为目标化合物提供合适的保留性、分离度和峰形；此外还可能需要满足额外的

方法适用性标准。当使用非选择性检测器时，分离度尤为重要，如二极管阵列 (DAD)、荧光 (FLD)、蒸发光散射 (ELSD) 或示差折光检测器 (RID)。使用质谱仪 (MS) 时，若存在同质异位素，色谱分离仍必不可少。

查看图 2 中氨基酸分离的示例。HILIC 色谱柱提供了良好的分析物保留性和分离度，包括亮氨酸和异亮氨酸同分异构体对。然而，这些游离氨基酸中的大部分都无法在 RPLC 色谱柱上保留。使用 RPLC

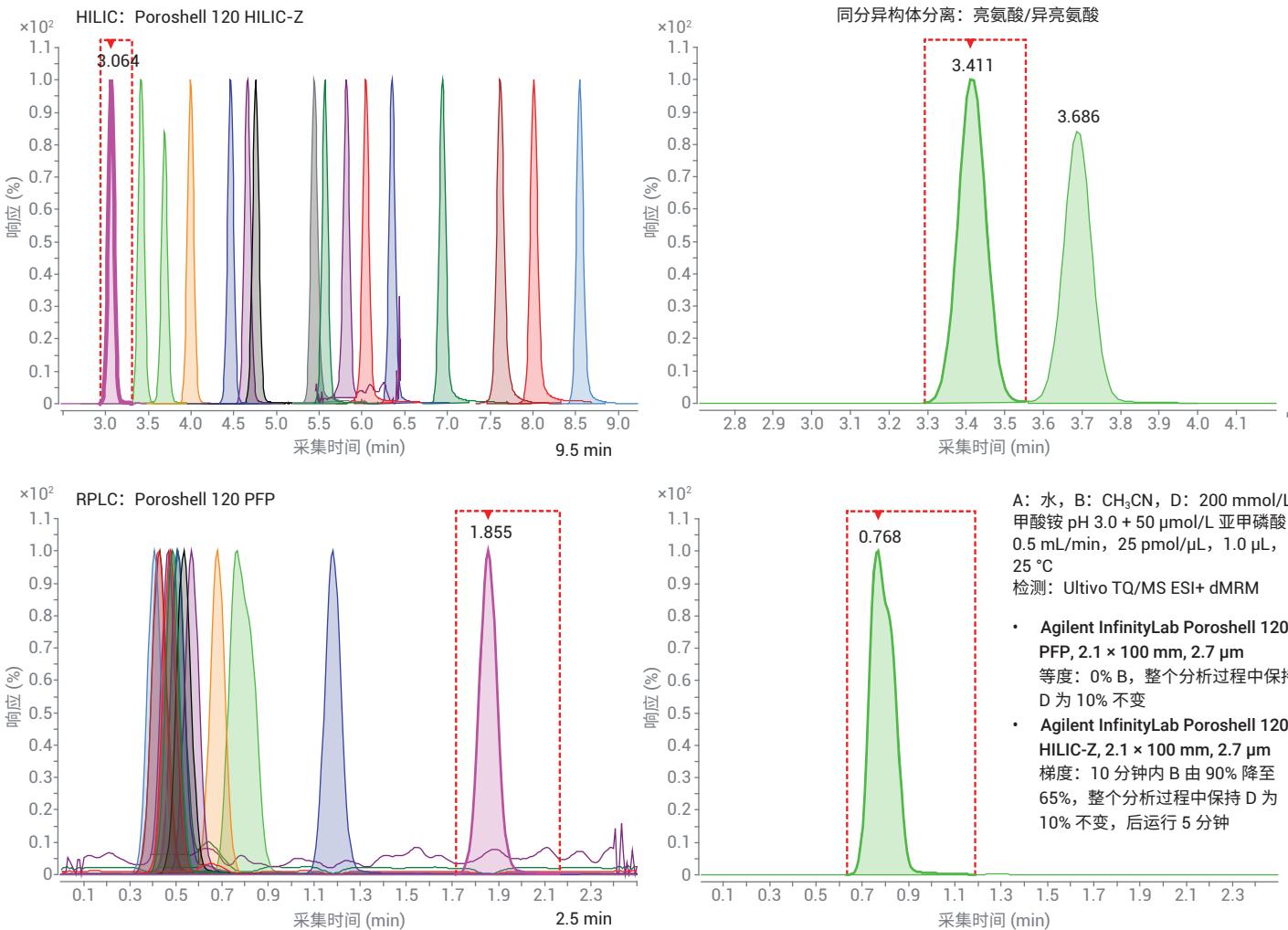


图 2. HILIC 可保留氨基酸并分离同分异构体，而 RPLC 却不能

时，大多数氨基酸在靠近死体积处被洗脱，未实现任何色谱分离。因为该分析采用质谱进行，所以这些化合物仍然可以被分离和积分；然而，所有共洗脱物质都可能发生离子抑制。此外，同分异构体亮氨酸和异亮氨酸未实现充分分离。对于这些游离氨基酸和其他 RPLC 无法保留分析物的样品，选择 HILIC 比 RPLC 更合适。

注：氨基酸在经 OPA/FMOC 衍生化后，可以通过 RPLC/UV 进行分析，请参见安捷伦出版物 5991-5571EN^[1]。

对于氨基酸等样品，选择哪种液相色谱模式可能显而易见。然而，对于某些样品，RPLC 或 HILIC 均可提供良好的分离效果。请参见图 3 示出的水溶性维生素

分析。所有 10 种维生素化合物均通过 RPLC 和 HILIC 色谱柱实现了基线分离。在这种情况下，两种技术都可以实现分离，我们可能需要考虑样品本身以及首选的检测模式，以帮助确定最佳选择是 RPLC 还是 HILIC。

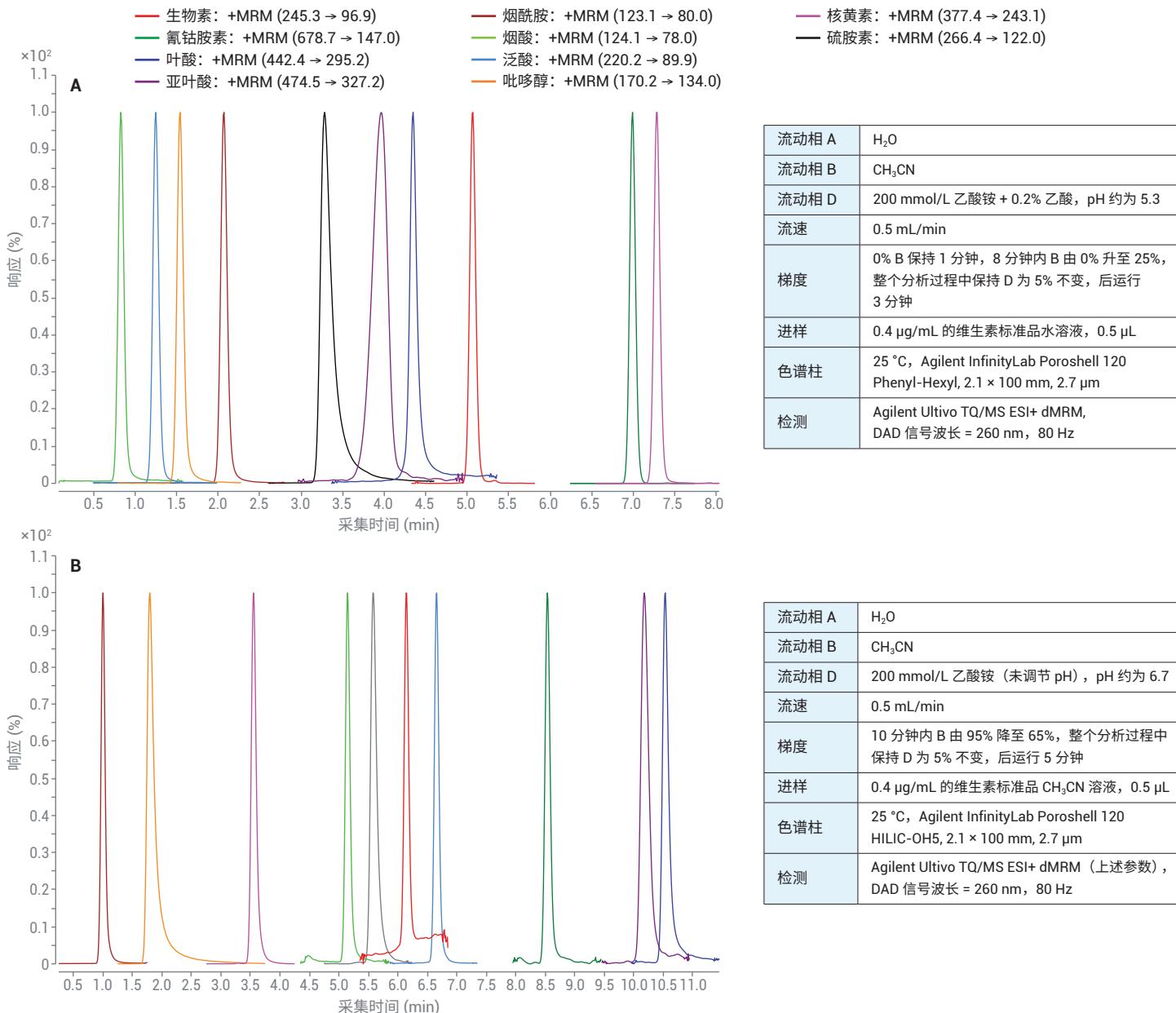


图 3. RPLC (A) 和 HILIC (B) 均可保留和分离水溶性维生素。RPLC: Agilent Poroshell 120 Phenyl-Hexyl, HILIC: Agilent Poroshell 120 HILIC-OH5

样品考虑因素

对于 RPLC 或 HILIC，不应将强溶剂进样至色谱柱。对于 RPLC，弱样品稀释剂的主要成分是水。对于 HILIC，弱样品稀释剂的主要成分是乙腈。图 4 表明，如果进样强溶剂，两种技术都会出现不佳的峰形。但是，进样相对较弱的样品溶剂将会得到清晰对称的峰形。

进样溶剂的强度对早洗脱化合物和等度分析的影响更为显著。进样量越大，强溶剂影响越大，如图 5 所示。如果使用较弱的样品溶剂，在进样量较大的情况下仍然可以保持性能。为了保持 HILIC 和 RPLC 的色谱性能，需要平衡样品溶剂强度和进样量。

在调节样品溶剂的强度时，需注意分析物溶解度。图 6 显示了三种维生素的 HILIC 分析。将每种维生素配制为 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的储备液浓度，然后按 9:1 的比例用水或乙腈进行稀释。因为这是 HILIC 分析，所以最好在富含乙腈的样品溶剂中进行样品前处理。首先考察烟酸，水样和乙腈样品的峰面积相似。这表明在每种情况下，进样至色谱柱上的烟酸量相同。然而，对于硫胺素和氰钴胺素，乙腈样品得到的峰面积约为用水配制的样品的一半。峰面积的损失是由于硫胺素和氰钴胺素在乙腈中的溶解度较差。

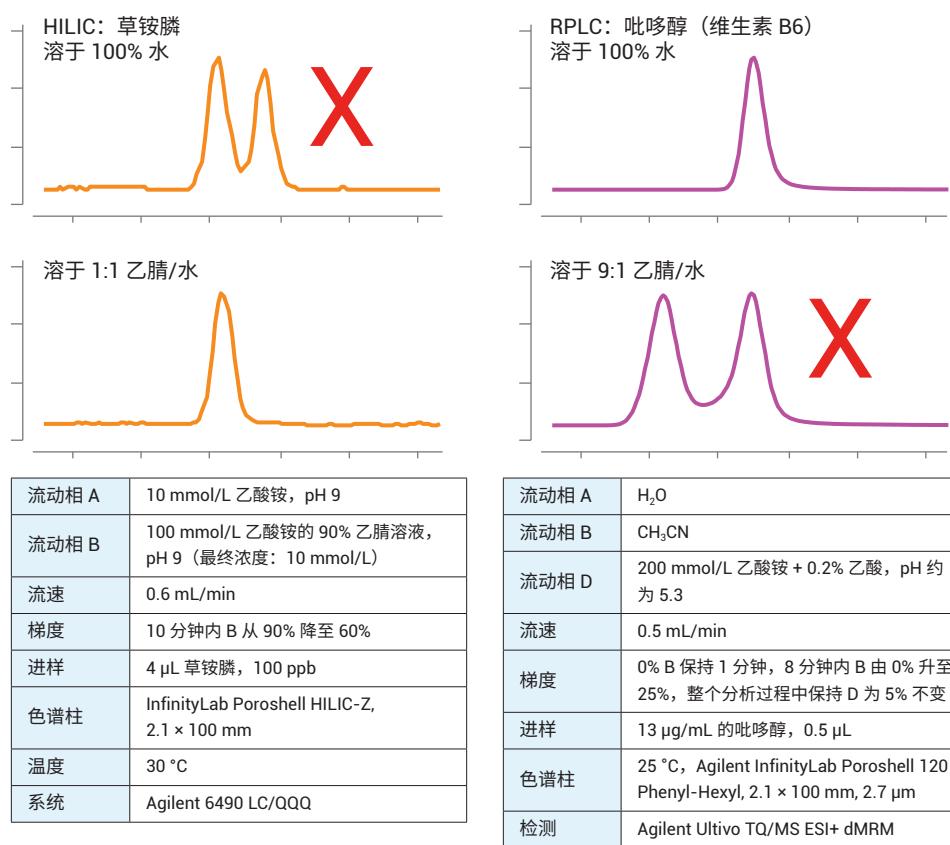


图 4. 强溶剂进样会使 HILIC 和 RPLC 的峰变形

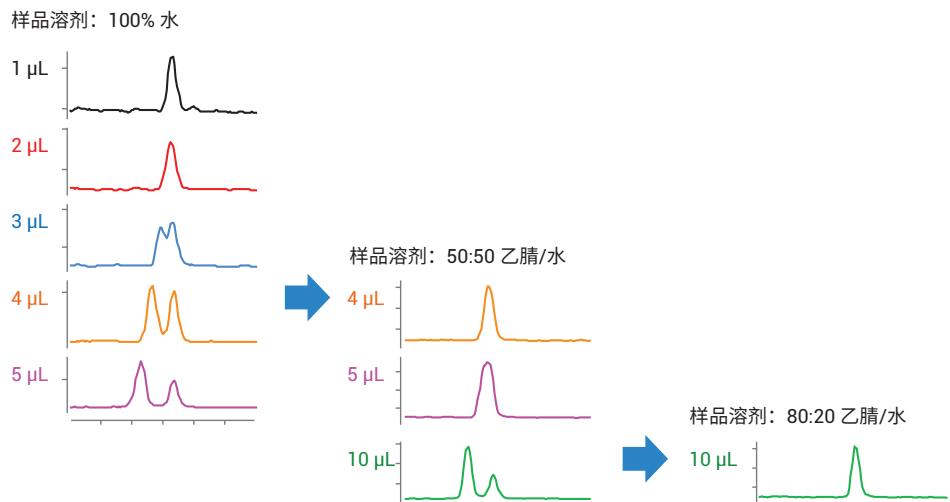


图 5. 随着进样量的增加，强溶剂影响更严重。方法参数与图 4 中相同

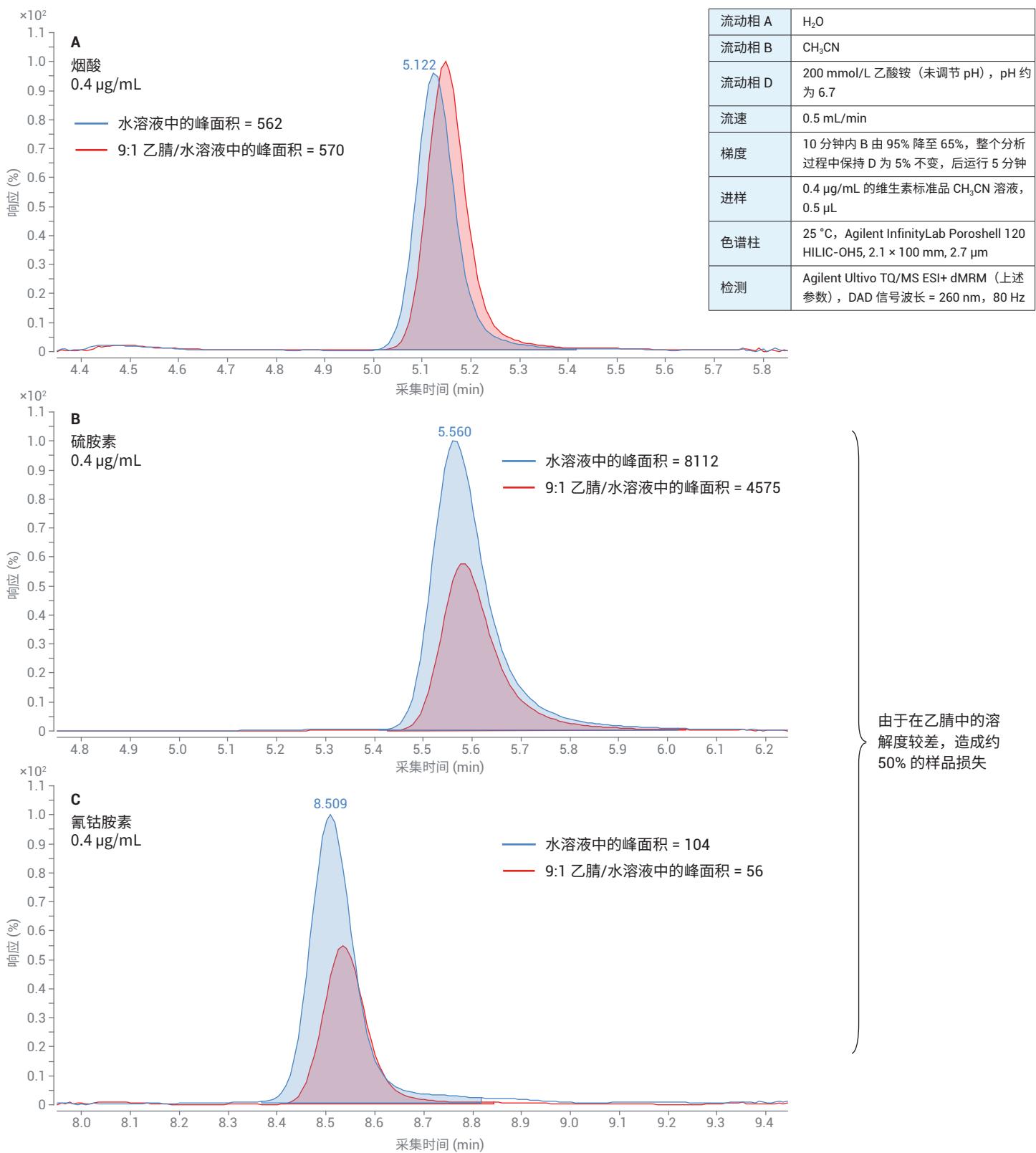


图 6. 确保样品完全溶解。三种维生素在 0.4 µg/mL (溶于水或 9:1 CH₃CN/H₂O) 下的 HILIC 分析

为了改进这一分析，可将硫胺素和氰钴胺素在富含乙腈的溶液中稀释至可溶浓度，或者，当灵敏度要求使用更高浓度的样品时，可优先选择对这些化合物进行 RPLC 分析。极性化合物通常更易溶于水。因此，如果需要高浓度样品，RPLC 可能是首选的液相色谱模式。

检测模式

HPLC 分析有几种检测器可供选择。表 3 列出了一些常见的检测器。选用哪种检测器可能取决于分析物特性以及分析的灵敏度要求。图 7 展示了一个可以通过质谱但不能通过紫外进行分析的化合物示例。

此情况下，在 260 nm 处无法检测维生素 B7 和 B5，但可以通过质谱对它们进行分析。因此，如果 B7 和 B5 对分析至关重要，则相比紫外更需要进行质谱检测。

表 3. 常用的 HPLC 检测器

检测器类型	
紫外-可见吸收	用于可吸收光的化合物
示差折光	通用型检测器，但灵敏度较差，只能进行等度分析
蒸发光散射	用于非挥发性分析物
质谱仪	基于分子量的低检测限
荧光	用于能发荧光或经衍生化后能发荧光的化合物

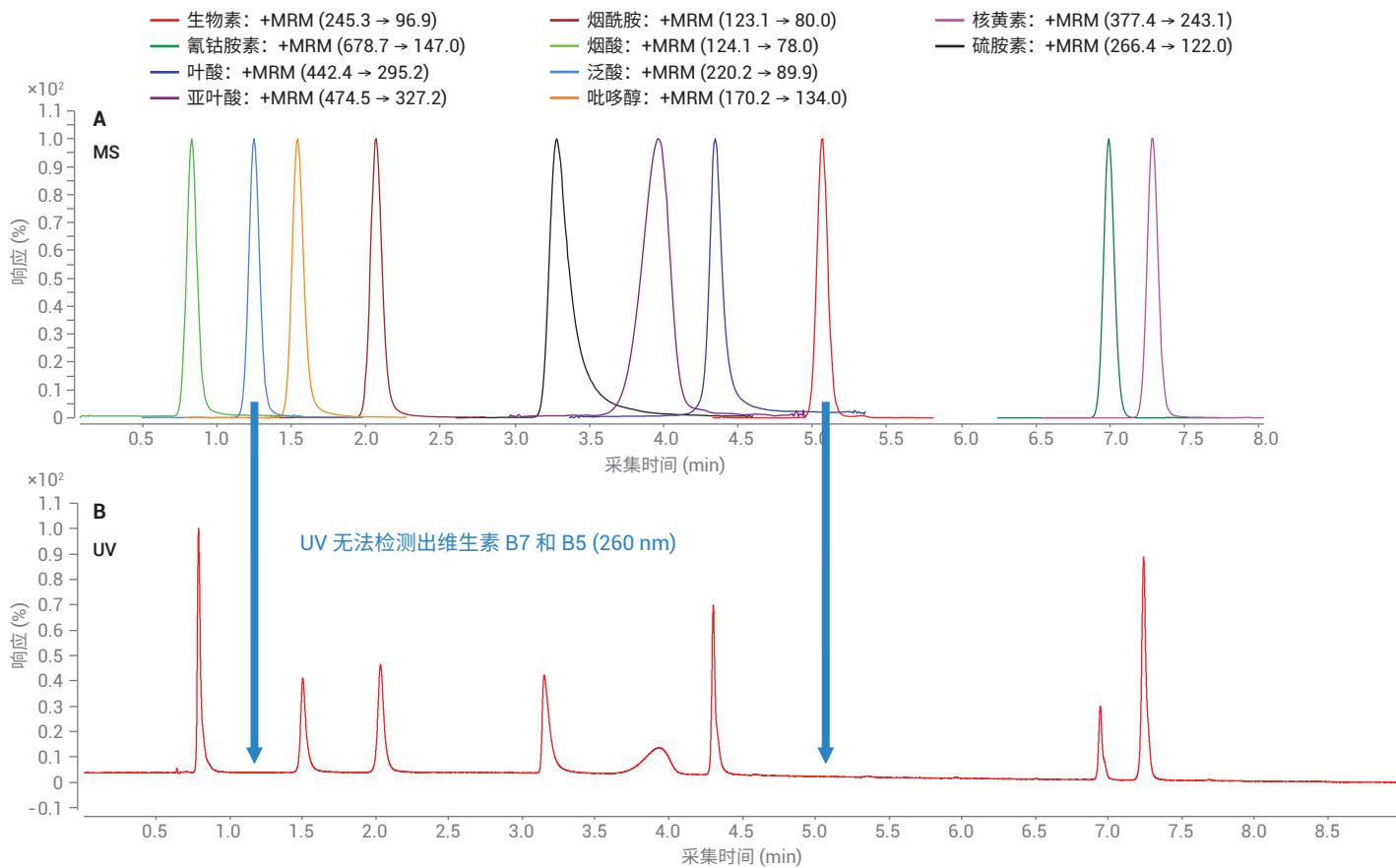


图 7. 选择一种能分析目标化合物的检测器。方法参数与图 3 中相同

如果分析物决定了需要哪一种类型的检测，则可以据此决定使用 HILIC 还是 RPLC 进行分析。HILIC 与质谱的联用效果良好，如图 8 所示。HILIC 模式中使用的缓冲液必须在乙腈中具有相当的可

溶性。这些缓冲液通常是甲酸盐或乙酸盐，它们也恰好具有挥发性，这一点对于 LC/MS 来说是必须的。如图 8 所示，挥发性 HILIC 缓冲液之间的协同作用，加

上大部分为乙腈的流动相的高挥发性，使 LC/MS 分析得以实现更好的离子化。在图 8 中，HILIC 分析的基线噪音较小，吗啡代谢物 M6G 的峰较高。

流动相 A	10 mmol/L 甲酸铵水溶液, pH 3.2
流动相 B	乙腈/100 mmol/L 甲酸铵水溶液 pH 3.2 (9:1)
流速	0.4 mL/min
洗脱	等度
进样	吗啡-3-β-D-葡萄糖苷和吗啡-6-β-D-葡萄糖苷各 1 µg/mL, 2 µL
色谱柱	2.1 × 100 mm, 1.8 µm
温度	25 °C
质谱离子源	ESI+, 200 V, 250 °C, 11 L/min, 30 psi, 4000 V
SIM	462, 碎裂电压 170 V
	安捷伦出版号 5991-0245

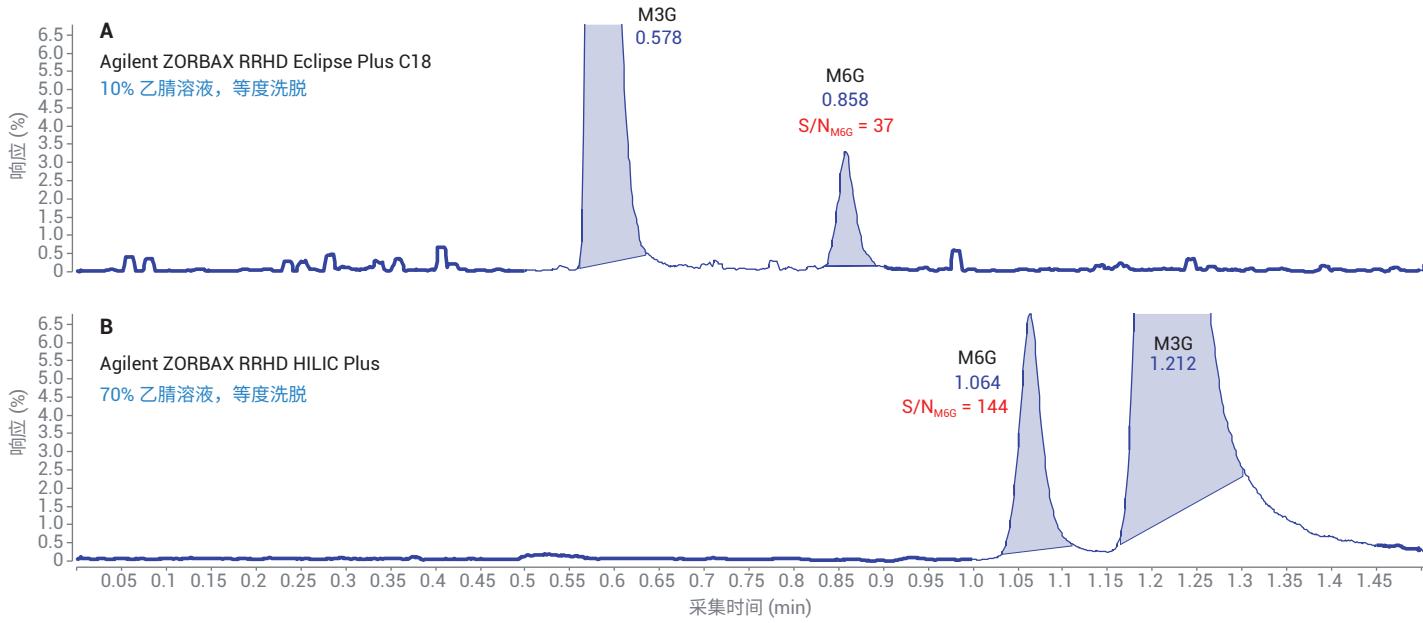


图 8. HILIC 与 LC/MS 联用效果良好，与 RPLC 相比，可提高阿片类药物代谢物的灵敏度

如果方法开发很困难，且需要更大的流动相灵活性，则可能需要采用 RPLC 和 UV 检测。表 4 中列出的所有常用缓冲液都与 RPLC 和 UV 检测兼容。相反，对于 HILIC 和质谱分析，大多数低 pH 缓冲液和磷酸盐缺乏兼容性。如果分析需要非常低的 pH 值，例如对于酸性化合物，那么 RPLC 可能是首选的方法。

结论

找到能保留和分离所有分析物的最佳色谱柱。

- RPLC 不能保留所有极性/离子化分析物；HILIC 可能适用于这些分析物
- 某些分析物在这两种液相色谱模式下均可实现同样出色的保留和分离

考虑样品：分析物溶解度和样品溶剂。

- 在 RPLC 和 HILIC 中进样强溶剂，均会对色谱分析质量产生不利影响
- 随着进样量的增加，强溶剂影响更严重
- 相比乙腈，极性化合物通常更易溶于水，这对 RPLC 是有利的

表 4. 反相液相色谱和 UV 检测可与更多流动相兼容，特别是在低 pH 条件下

流动相	可使用的 pH/范围	是否推荐用于 HILIC?	是否推荐用于质谱?	是否推荐用于 RPLC 和 UV?
TFA	< 1.5	否	否	是
磷酸盐	1.1–3.1	否	否	是
甲酸	< 2.8	否	是	是
乙酸	< 3.8	否	是	是
甲酸盐	2.8–4.8	是	是	是
乙酸盐	3.8–5.8	是	是	是
碳酸盐	5.4–7.4	是	是	是
磷酸盐	6.2–8.2	否	否	是
碳酸氢盐	6.6–8.6	是	是	是
氨	8.2–10.2	是	是	是
磷酸盐	11.3–13.3	否	否	是

可使用哪种检测器？

- 确保分析物与所选检测器兼容，并且满足灵敏度要求
- HILIC 可以改善 LC/MS 分析，因为流动相更易挥发
- UV 和 RPLC 与多种流动相兼容，这可以改善分析物的保留和分离特性

选择 HILIC 还是 RPLC 是一种平衡考量，需要仔细考虑色谱分离要求、分析物极性和溶解度、样品溶剂的性质以及可用的检测方式。

参考文献

1. Long, W. Automated Amino Acid Analysis Using an Agilent Poroshell HPH-C18 Column (使用 Agilent Poroshell HPH-C18 色谱柱进行自动氨基酸分析)，安捷伦科技公司应用简报，出版号 5991-5571EN, 2017

查找当地的安捷伦客户中心：

www.agilent.com/chem/contactus-cn

免费专线：

800-820-3278, 400-820-3278 (手机用户)

联系我们：

LSCA-China_800@agilent.com

在线询价：

www.agilent.com/chem/erfq-cn

www.agilent.com

本文中的信息、说明和指标如有变更，恕不另行通知。