

亲水相互作用色谱方法开发和 故障排除

前言

亲水相互作用色谱 (HILIC) 是高效液相色谱 (HPLC) 领域中一种快速发展的色谱技术。即使是强极性的化合物也能通过 HILIC 使用与反相 HPLC 相同的系统和溶剂实现分离。

相比传统技术（如衍生化、离子交换、离子对和正相 HPLC），HILIC 大大降低了极性分析的成本和工作量。然而，即便对经验丰富的色谱工作者来说，HILIC 的方法开发和故障排除仍然是一项挑战。直到最近，HILIC 色谱柱才有了和成熟的反相键合相媲美的性能和重现性。

本技术概述介绍了 HILIC 的基本原理和方法开发，并在最后对故障排除进行了总结。

了解 HILIC 和极性分析

HILIC 的色谱柱分析可保留中极性至高极性的化合物。此范围的化合物与反相 HPLC 中的 C18 柱略有重叠，后者可保留中极性至非极性的化合物。

HILIC 固定相具有强极性和亲水性，可吸收流动相中的水分，在其表面形成薄薄的水层。根据具体的固定相，形成该水膜需要大约 3% 的水。增加流动相的含水量会降低分配效应，当流动相含水量约为 50% 时，分配效应将完全消失。此时，HILIC 将不再保留化合物。

HILIC 的流动相为极性更强的溶剂，这与反相 HPLC 相反。其中水是极性最强的流动相，其次是甲醇。图 1 所示为极性强度递增的溶剂列表。缓冲盐也可增加溶剂强度，但并不明显。



THF < 丙酮 < 乙腈 < IPA < 乙醇 < 甲醇 < H₂O

图 1. 溶剂极性强度

请注意，与反相 HPLC 不同，对大多数 HILIC 分离来说，纯甲醇 (MeOH) 的溶剂极性太强。乙腈 (ACN) 是推荐常用的弱极性溶剂，加入醇类物质可以增加缓冲液溶解度或稍微改变选择性。

极性化合物技术 — HILIC 与其他方法的对比

极性化合物的分析方法有很多种。不同的方法有其各自的优点和缺点，如表 1 所示。

相比之下，HILIC 是一种强大且灵活的技术，如表 2 所示。

表 1. 传统技术的优缺点

技术	优点	缺点
离子对	快速分析 使用标准 HPLC 系统和反相色谱柱	系统污染频繁 可能造成离子抑制 限制运行为仅正离子或负离子模式 MS
离子色谱	机制简单，保留性强，可预测性分离 独有的检测模式	比现有 HPLC/UHPLC 耗时，系统和消耗品价格高 无法同时分离阳离子和阴离子 难以兼容 MS
离子交换	机制简单，保留性强，可预测性分离 填料廉价易得	比 HPLC 耗时 无法同时分离阳离子和阴离子 难以兼容 MS
正相	快速分析 使用标准 HPLC 系统和常用色谱柱	有机溶剂的安全性和兼容性 固定相选择范围窄 样品溶解度问题
衍生化	快速分析 量身定制选择性 增加发色团或荧光发色团	冗长的样品前处理过程 重复性问题 复杂的 MS 谱图 有毒的衍生化试剂

表 2. 亲水相互作用色谱的优缺点

技术	优点	缺点
HILIC	快速分析 使用与反相 HPLC 相同的系统和溶剂 可在单次运行中分离阳离子、阴离子和极性中性化合物 与 HPLC 相比，有可媲美或更好的 MS 性能	样品在高浓度有机溶剂中的溶解度 100% 甲醇不适合作为有机相 需要使用惰性硬件

HILIC 入门指南

HILIC 方法开发的第一步是选择色谱柱。与非极性反相固定相相比，HILIC 色谱柱使用极性固定相。未键合硅胶是最传统且最为常用的 HILIC 固定相。但是，未键合硅胶表面的多变性和酸性使其很难可靠地实现多种常见极性化合物的分析。目前已经开发出多种键合 HILIC 固定相可提供不同的选择性和更高的可靠性。新型 HILIC 固定相能展现可媲美反相键合相的分离度、峰形和可靠性。

除了选择合适的色谱柱之外，HILIC 还需要对反相色谱分离的运行参数进行修改。参数修改与极性和保留之间的反向关系相关：保留极性化合物，不保留非极性化合物，溶剂强极性，溶剂弱极性等。

起始参数

固定相：

- 不同固定相具有不同的选择性
- 新型键合相可提供优异的峰形，最大程度降低离子交换引起的次级相互作用
- Agilent InfinityLab Poroshell 120, 2.7 μm 粒径的三种固定相
 - **InfinityLab Poroshell HILIC-Z** — 采用专利化键合技术的两性离子键合相，可在较宽 pH 范围内提供强大的分离、稳定性和优异的峰形
 - **InfinityLab Poroshell HILIC-OH5** — 果聚糖键合相，具有不同的选择性和出色的峰形，适用于各种极性化合物
 - **InfinityLab Poroshell HILIC** — 传统的未键合硅胶固定相

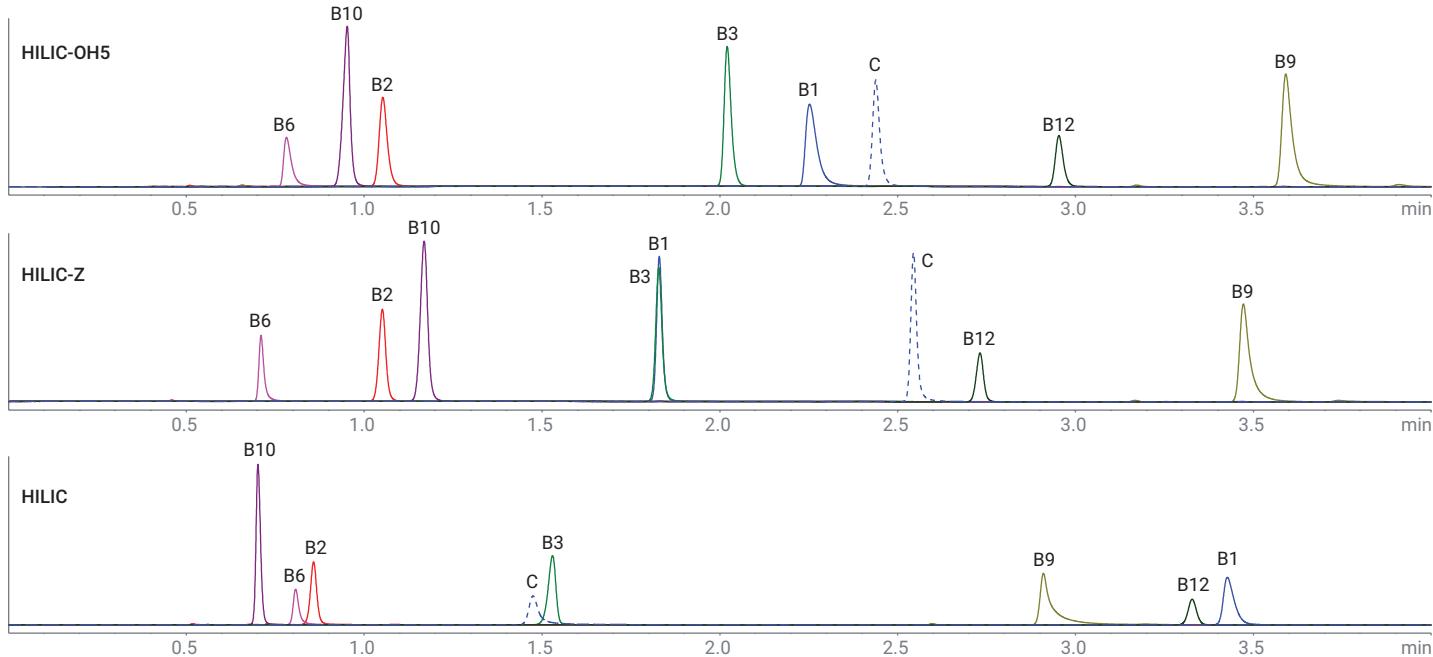


图 2. 水溶性维生素的分离。色谱柱：2.1 × 100 mm, 2.7 μm , 参见固定相的示意图。流动相 A: 100 mmol/L 乙酸铵 + 0.5% 乙酸 (pH 约 4.6) 水溶液。流动相 B: 乙腈。流速: 0.5 mL/min。梯度: 87% B 运行 1 min, 87% 至 50% B 运行 4 min。再平衡: 3 min。进样量: 1 μL 单个维生素标准品 (每种 0.1–0.4 mg/mL)。柱温: 40 °C。检测器: UV, 260 nm, 80 Hz

流动相组成：

- 水是强溶剂。降低水含量可增加保留性
- 极性较小的化合物保留需要高浓度有机溶剂

- 增大缓冲液浓度可降低保留性并改善峰形，但会影响检测器响应

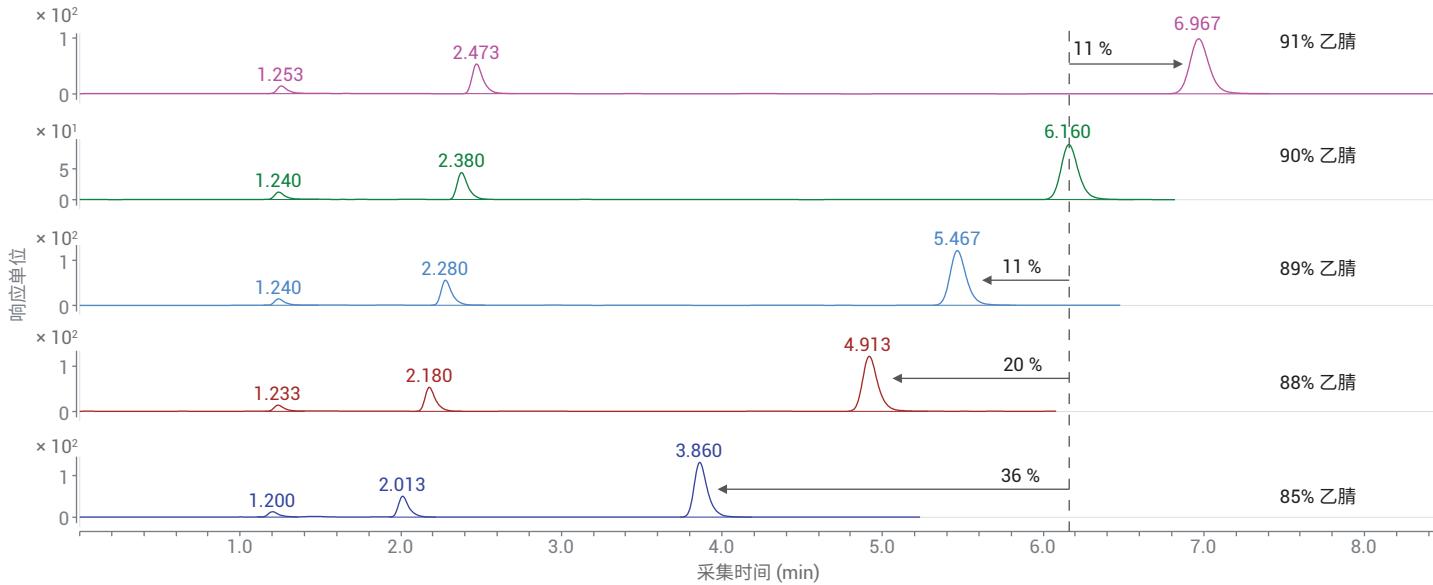


图3. HILIC分析对流动相组分的微小变化异常敏感。色谱柱：InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z（带 PEEK 内衬） 2.1×150 mm, $2.7 \mu\text{m}$ 。流动相 A: 100 mmol/L pH 3 甲酸铵水溶液, pH 3。流动相 B: 乙腈。等度洗脱：见 %B 的图。流速： 0.25 mL/min 。柱温： 30°C 。进样量： $1 \mu\text{L}$ 甲苯、胞嘧啶、尿嘧啶 QC 混合物。检测器：UV, 254 nm

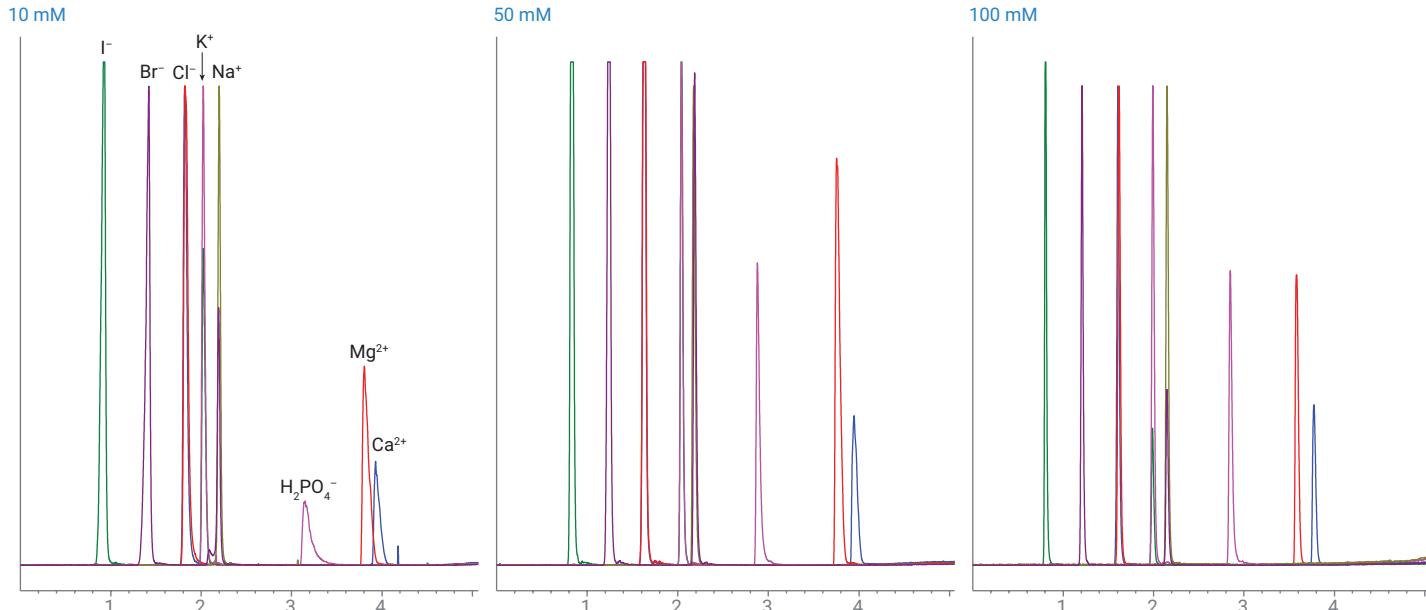


图4. 使用 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1×100 mm, $2.7 \mu\text{m}$ 色谱柱分离无机离子流动相 A: 10、50、100 mmol/L pH 3 甲酸铵。流动相 B: 乙腈。梯度: 5 min 内 B 从 80% 降至 20%。再平衡: 3 min。流速: 0.4 mL/min 。柱温: 30°C 。进样量: $2 \mu\text{L}$ 单标进样 ($0.3\text{--}0.5 \text{ mg/mL}$)。检测器: ELSD, 40°C , 3.5 psi, 30 Hz

流动相 pH:

- 控制样品的电离和填料表面电荷（二氧化硅、NH₂ 和传统键合 HILIC 相的次级机制）
- 与反相色谱相反，带电状态的化合物更易保留
 - 酸应使用高 pH，碱应使用低 pH

温度:

- 升高温度会降低保留性
- 升高温度会提高柱效
- 降低温度可提高选择性

流动相

常用流动相:

低 pH	流动相 A: 10–20 mmol/L 甲酸铵, 用甲酸调节 pH 2.8–4.8 流动相 B: 20 mmol/L 甲酸铵的乙腈:水 (90:10) 溶液, 用甲酸调节 pH 2.8–4.8
中等 pH	流动相 A: 10–20 mmol/L 乙酸胺, 用乙酸调节 pH 3.8–5.8 流动相 B: 10 mmol/L 乙酸铵的乙腈:水 (90:10) 溶液, 用乙酸调节 pH 4.8–7
高 pH	流动相 A: 0.3% 氢氧化铵水溶液 流动相 B: 0.3% 氢氧化铵乙腈溶液

起始条件:

等度条件	90% 乙腈 — 弱极性分析物 80% 乙腈 — 极性分析物, 混合物 70% 乙腈 — 强极性分析物 50% 乙腈 — 冲洗色谱柱 (无保留, 在等度模式下以 > 80% 乙腈运行时建议分析后冲洗色谱柱)
	90% 至 50% 乙腈 — 梯度筛选 对于关键物质对的分离, 建议采用等度保持或平缓梯度 (每分钟 1%–3%)

注:

- 不建议使用高浓度磷酸盐缓冲液。相关详细信息, 请参见“缓冲液溶解度”章节
- 有机溶剂浓度较高时, 保留性对溶剂中有机组分浓度的细微改变非常敏感。因此, 必须准确量取溶剂, 并用混合器充分混合
- 可以使用少量 (< 25%) 的甲醇和其他醇类与乙腈混合, 使选择性稍作改变
- 增加缓冲液浓度通常可以改善峰形, 但会降低 LC/MS 灵敏度, 同时在 ELSD 中产生基线噪音
- 建议在添加盐的缓冲范围内运行, 但这对分析来说并不十分重要, 特别是在低载样量情况下
 - 乙酸胺: pH 2.8–4.8, 8.2–10.2
 - 甲酸胺: pH 3.8–5.8, 8.2–10.2

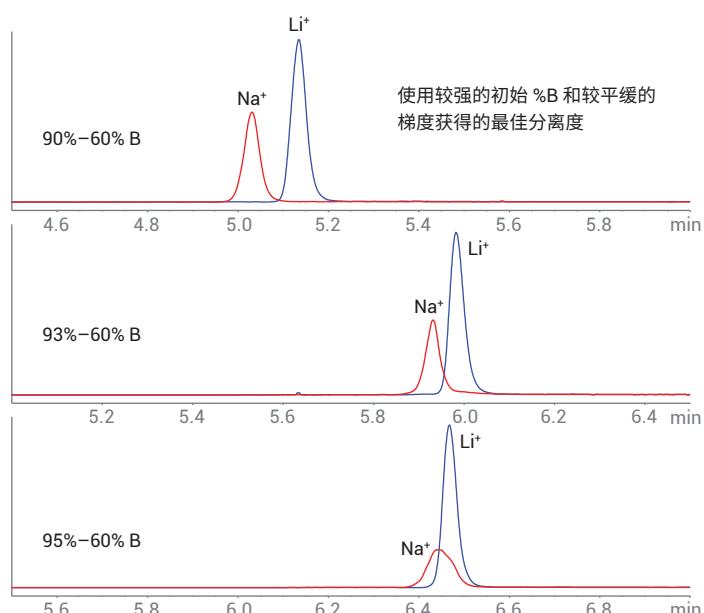
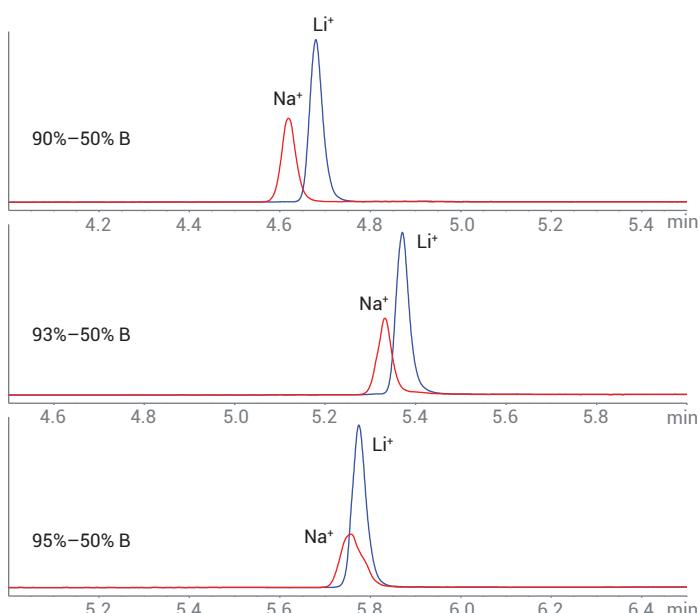


图 5. 使用 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱分离关键物质对 (Na⁺ 和 Li⁺)。流动相 A: 100 mmol/L 甲酸铵, pH 3。流动相 B: 乙腈。梯度: 参见 10 min 内 %B 的图。再平衡: 3 min。流速: 0.4 mL/min。柱温: 30 °C。进样量: 2 μL 单个标准品 (0.3–0.5 mg/mL)。检测器: ELSD, 40 °C, 3.5 psi, 30 Hz

平衡

色谱柱平衡和再平衡与流动相含水量直接相关。每次运行都需要用高含水量流动相更新水层，使流动相中的水浓度降低至下一次运行的起始条件。

无论在梯度还是在冲洗步骤，若色谱柱已经暴露于至少 20% 的水中，那么当色谱柱重新采用高有机物含量条件时，其将很快达到平衡。大多数梯度分析很容易达到此浓度，因此再平衡时间与反相分析相差不大。

等度条件下采用高有机物含量条件进行分析后，可能需要使用高含水量流动相进行简单冲洗，以去除强保留化合物，如无机盐和其他极性化合物。

缓冲液溶解度

纯乙腈不易溶解许多常见的缓冲液，即便是乙酸铵和甲酸铵。将乙腈:水以 90:10 混合可显著提高缓冲液的溶解度。一些常见的反相缓冲盐（如磷酸盐）难溶于大多数 HILIC 中使用的流动相。

高浓度水性缓冲液与足够高浓度的有机溶剂混合会导致缓冲液沉淀，从而引起严重堵塞，对系统造成潜在损害。当使用含有钠离子、钾离子、磷酸根离子或硼酸根离子的缓冲液时，这种情况很容易发生。

防止这种情况的最佳方案是将高浓度有机相与缓冲液在有机溶剂瓶中预混合，观察是否有混浊或结晶。对于含有任何含量钠离子、钾离子、磷酸根离子或硼酸根离子的缓冲液，以及对于含有 $> 10 \text{ mmol}$ 乙酸铵或甲酸铵的 90% 以上乙腈的缓冲液，都应该进行此操作。

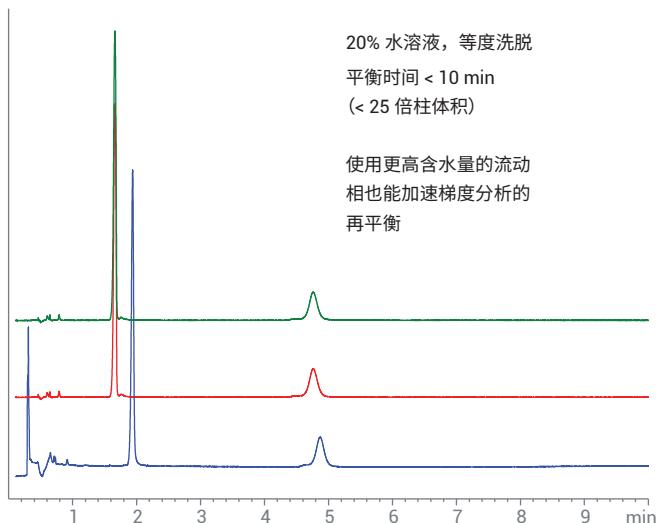
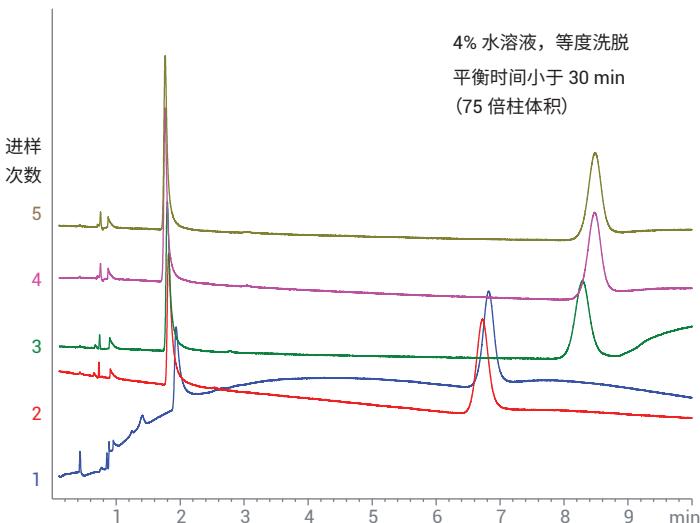


图 6. 使用 InfinityLab Poroshell 120 HILIC-OH5, 2.1 × 100 mm, 2.7 μm 色谱柱分离维生素 B。左图：分析前色谱柱保存在 100% 乙腈中。流动相 A: 100 mmol/L 甲酸铵, pH 3.0。流动相 B: 乙腈。等度条件: 96% B。流速: 0.5 mL/min。进样量: 1 μL B2 + B6。柱温: 25 °C。检测器: 260 nm, 80 Hz。右图：分析前色谱柱保存在 100% 乙腈中。流动相 A: 100 mmol/L 甲酸铵, pH 3.0, 流动相 B: 乙腈。等度条件: 80% B。流速: 0.5 mL/min。进样量: 1 μL B9 + B12。柱温: 25 °C。检测器: 260 nm, 80 Hz

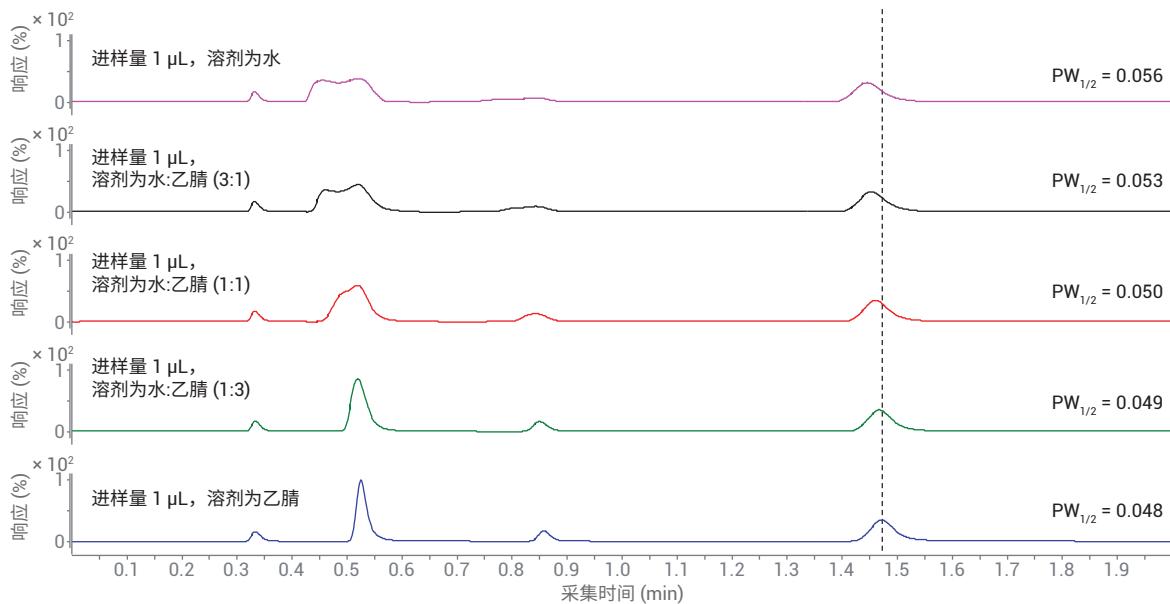


图 7. 使用等度洗脱在 HILIC 上分离维生素 B。Agilent ZORBAX RRHD HILIC Plus 2.1 × 50 mmol/L, 1.8 μm；流动相：乙腈/100 mmol/L 甲酸铵(9:1)水溶液，pH 3.2，等度洗脱：0.4 mL/min，浓度均为 5.7 μg/mL 的 4-氨基苯甲酸、烟酰胺、核黄素、烟酸各进样 1 μL；25 °C，MS 离子源：ESI+，200 °C，10 L/min，30 psi，4000 V；SIM：138、123、377、124

样品溶剂和进样体积

由于水在 HILIC 模式下是非常强的溶剂，因此溶解在 100% 水溶液中的样品很难在色谱柱上保留，且峰形很差。这与将溶解于 100% 氯仿或己烷的样品进样到反相色谱柱上相似。

对于仅溶于水的化合物，应尽可能保持足够少的进样体积以消除任何差异性。

峰分叉的确切起始点因分析方法不同而不同。下表给出了大多数方法的建议最大起始值：

样品溶剂	2.1 × 50 mm	3.0 × 50 mm	4.6 × 50 mm
100% H ₂ O	≤ 1 μL	≤ 2 μL	≤ 3 μL
50:50 乙腈:水	≤ 2 μL	≤ 4 μL	≤ 6 μL
80:20 乙腈:水	≤ 5 μL	≤ 10 μL	≤ 15 μL

更长的色谱柱可进行更大体积的进样，可用上述值乘以下倍数：

柱长	50 mm	100 mm	150 mm
进样量	1 倍	1.5 倍	2 倍

随着浓度的增加峰逐渐变宽，当影响到峰形和分离度时，则表明色谱柱已过载。浓度越高的样品进样体积应越少，或稀释后进样。

对 LC/MS 始终推荐使用稀释溶液，因为干扰化合物可以分离为窄峰，不会掩盖目标分析物。此方法非常有效，因为 HILIC 保留了无机离子，而采用此方法可以分离钠、钾和有机杂质。较高的载样量可能会导致这些干扰峰变宽，从而与关键化合物重叠或产生干扰。

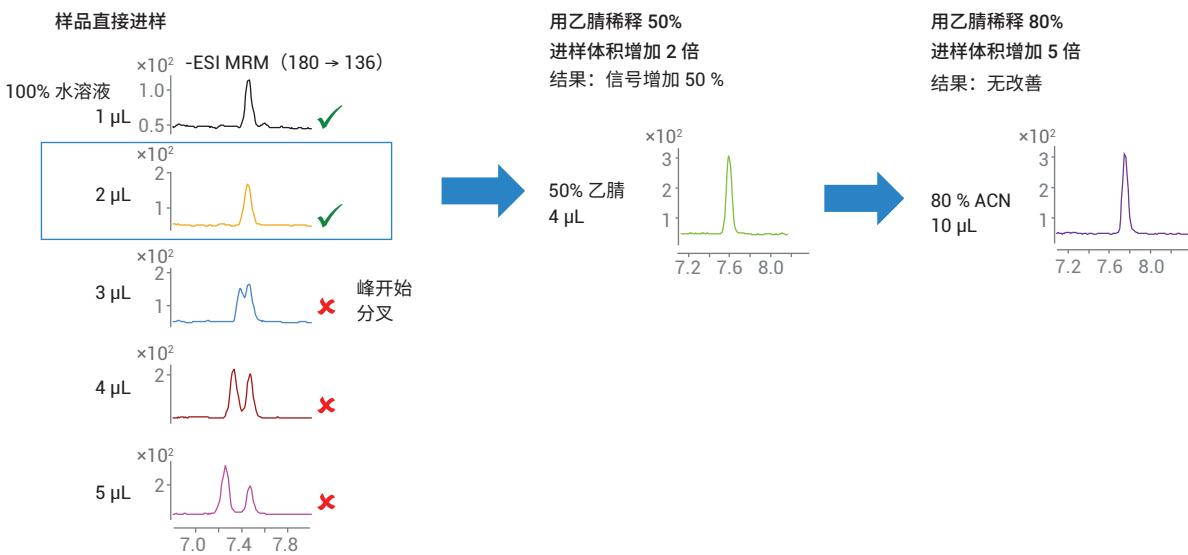


图8. 可通过乙腈稀释和增加进样体积保持并提高灵敏度。系统：Agilent 6490 三重四极杆液质联用系统。样品：草铵膦，100 ppb。色谱柱：InfinityLab Poroshell HILIC-Z, 2.1 × 100 mm。流动相A：10 mmol/L 乙酸胺，pH 9。流动相B：100 mmol/L 乙酸胺的90% 乙腈水溶液，pH 9（最终浓度：10 mmol/L）。流速：0.6 mL/min。梯度：10 min 内 B 从 90% 降至 60%。柱温：30 °C。注：需用 0.5% 磷酸冲洗系统以避免拖尾。通过减少进样体积和使用较弱极性的溶剂（如乙腈）稀释样品保持良好的峰形。稀释后的样品可以使用更大的进样体积以增加信号，这也是通用的首选方法

检测

HILIC 与传统反相色谱在检测器方面有所不同。质谱是 HILIC 的理想检测器，而紫外-可见 (UV-Vis) 检测器往往更适用于反相模式，通用检测器（如示差折光检测器 (RI) 和蒸发光散射检测器 (ELSD)）则在极性分析中更为常见。

质谱检测：

质谱检测具有较高的离子化效率和优异的灵敏度，对于极性分析物来说是一种出色的检测方法。此外，HILIC 在高浓度有机溶剂下运行，可以轻松处理挥发性缓冲液，使电喷雾离子化 (ESI) 的效率更高。

UV-Vis 检测：

许多极性化合物不含发色团：糖类物质、氨基酸和无机离子。这是因为许多 UV 活性基团（苯环、酯、酰胺、C=C 键）更倾向于非极性，而极性基团（-OH、-NH₂、C-O-C）的吸收与常用缓冲液和溶剂重叠。但是，UV 对于含有强紫外响应极性基团的化合物（如有机酸）来说，仍然是一种经济而灵敏的选择。

蒸发光散射检测：

蒸发光散射检测器对非挥发性化合物（如糖类物质、金属和大分子化合物）有出色的灵敏度和响应性。ELSD 与 MS 一样需要挥发性缓冲液，但可耐受较高浓度的缓冲液以及糖类物质分析的挑战性条件（高 pH 或高温）。

挥发性化合物（如小分子有机酸或胺）分析对 ELSD 而言是一项挑战，可能需要用到其他检测器。

示差折光检测：

示差折光 (RI) 检测器也可用于几乎所有化合物的检测，但灵敏度不高，且不适用于梯度洗脱。

RI 可耐受高浓度缓冲液，并且可以检测在 ELSD 上容易丢失的挥发性化合物。这使其成为含有挥发性化合物的混合物（如醇或小分子有机酸）的首选检测器。

其他检测技术：

极性分析物也可使用其他目前安捷伦尚未涵盖的检测方法进行检测。其中包括：

- 用于无机离子的电导检测器
- 用于糖类物质和胺类的脉冲安培检测器 (PAD)
- 与 ELSD 一样可用于通用检测的电喷雾检测器 (CAD)

表 3. 检测技术汇总

检测器	优势	常见分析物	局限
紫外-可见光谱	通用且成本低 灵敏 低扩散	分析物必须具有发色团：芳香环、羧酸、酯等 核苷、核苷酸、有机酸	短波长（约 210 nm）下甲酸盐/乙酸盐缓冲液会产生高噪音 有限灵敏度
LC/MS — 正离子模式	最高灵敏度	胺类和有机酸	必须使用可兼容缓冲液并保持低浓度（约 10 mmol/L）
LC/MS — 负离子模式	高灵敏度 不同的检测范围	有机酸、磷酸盐化合物	必须使用可兼容缓冲液并保持低浓度（约 10 mmol/L）
示差折光	“通用” 检测 低成本 可兼容高浓度缓冲液	不含发色团的化合物和混合物 糖类物质、无机离子、氨基酸	灵敏度低 需要等度条件 启动时间长
蒸发光散射	“通用” 检测 灵敏（与 UV-Vis 相似）	不含发色团的化合物和混合物 糖类物质、无机离子、氨基酸	无法检测挥发性化合物（醇类、有机酸） 必须使用挥发性缓冲液 旧型号通常得到非线性校准曲线

粘性样品、去活化以及惰性硬件

所有等级和类型的钢组件表面都有一层金属氧化物，可避免腐蚀。这些金属氧化物还含有可与某些类型的粘性极性分子键合的位点。

大多数活性分子：

- 磷酸化代谢物和磷酸酯
- 有机磷酸酯和磷酸
- 二羧酸、三羧酸和螯合剂

常见于：

- 农药分析（草甘膦、AMPA、草铵膦）
- 发酵（柠檬酸循环、有机酸监测）
- 代谢组学（核苷酸、磷酸糖、柠檬酸循环）
- 无机分析（Fe 监测、EDTA 分析）

上述化合物与钢组件发生相互作用时，它们通常会在高浓度时产生拖尾，在低浓度时则完全消失。过去，分析方法通常借助衍生化、极端 pH 值、离子配对或竞争螯合剂来测量上述类型的化合物。

一种简单的替代方法是使用温和磷酸（0.5% 磷酸的 90:10 乙腈:水溶液）清洗，从而降低钢组件表面金属位点的活性。磷酸与系统中的活性位点紧密结合，从而使粘性化合物分析获得令人满意的结果。通常，泵送有机溶剂的泵头（泵 B）去活化的频率需要比泵送水溶液的泵头（泵 A）更高。

在 B 相溶剂瓶中换用 90:10 乙腈:水溶液，并用塑料（如 HDPE）溶剂瓶代替玻璃瓶和样品瓶，可以进一步提高灵敏度。

最后，用 PEEK 或带 PEEK 内衬的不锈钢代替钢组件可进一步改善色谱性能。安捷伦系统和色谱柱均采用带 PEEK 内衬的色谱柱和毛细管。

选项	详细信息
1. 使用含水 10% 的乙腈溶液	100% 乙腈可与钢组件发生相互作用并引入杂质，添加 10% 水可避免该问题。
2. 使用 0.5% 磷酸清洗	使用温和磷酸溶液清洗可暂时使钢组件上的活性位点失活。
4. 更换为塑料溶剂瓶和样品瓶	消除实验室玻璃器皿中浸出的 Na、K、Ca、BO ₃ 和 SiO ₄ 所造成的信号抑制。
3. 更换为带 PEEK 内衬的硬件	用带 PEEK 内衬的硬件代替钢组件可减少键合位点的数量（但很难将其完全消除，因此有时仍需要清洗）。

步进式系统清洗程序

操作时间：30 min

总等待时间：三小时加过夜（约 15 小时）

1. 设置 MS，以便可以安全地处理离子源。通常与清洁离子源的设置相同（请参见下方的备注）
2. 将流速改为 0 mL/min，并将溶剂换为纯水
3. 将系统设置为“开启吹扫”，直接排入废液，或从 HPLC 色谱柱中取出入口毛细管，并将其放入合适的废液容器中（请参见下方的备注）
4. 用 5 mL/min 的水冲洗 HPLC 泵 5 min
5. 将系统设置为“关闭吹扫”或停止液流，然后重新连接 HILIC 色谱柱
6. 对于 4.6 和 3.0 mm 直径的色谱柱，将水流速设置为 0.5 mL/min，对于 2.1 mm 直径的色谱柱，将水流速设置为 0.25 mL/min。将系统和色谱柱运行 30 min
7. 将流速更改为 0 mL/min，并将溶剂转换为 0.5% 磷酸的 9:1 乙腈:水溶液
8. 如果使用的是 MS 或其他带雾化器的检测器，请拆卸并取下电喷雾针，并将其喷雾端向下放入合适的废液容器中，然后重新连接入口毛细管（请参见下方的备注）
9. 将系统设置为“开启吹扫”，直接排入废液，或从 HPLC 色谱柱中取出入口毛细管，并将其放入合适的废液容器中
10. 用 0.5% 的磷酸以 5 mL/min 的流速冲洗 HPLC 泵 5 min
11. 将系统设置为“关闭吹扫”或停止液流，然后重新连接 HILIC 色谱柱
12. 将 0.5% 磷酸的流速设为 0.1 mL/min，然后过夜运行（最少 12 h）
13. 将流速更改为 0 mL/min，并将溶剂换为纯水
14. 将系统设置为“开启吹扫”，直接排入废液，或从 HPLC 色谱柱中取出入口毛细管，并将其放入合适的废液容器中

15. 用 5 mL/min 的水冲洗 5 min

16. 将系统设置为“关闭吹扫”或停止液流，然后重新连接 HILIC 色谱柱

17. 对于 4.6 和 3.0 mm 直径的色谱柱，将水流速设置为 0.5 mL/min，对于 2.1 mm 直径的色谱柱，将水流速设置为 0.25 mL/min。将系统和色谱柱运行 1 h

18. 将流速改为 0 mL/min，并将溶剂转换为所需的流动相

19. 将系统设置为“开启吹扫”，直接排入废液，或从 HPLC 色谱柱中取出入口毛细管，并将其放入合适的废液容器中

20. 用 5 mL/min 的流动相冲洗 5 min

21. 将系统设置为“关闭吹扫”或停止液流，然后重新连接 HILIC 色谱柱

22. 对于 4.6 和 3.0 mm 直径的色谱柱，将流动相流速设置为 0.5 mL/min，对于 2.1 mm 直径的色谱柱，将流动相流速设置为 0.25 mL/min。将系统和色谱柱运行 1 h

23. 重新将雾化器接入 MS，继续分析

注：

- 若对如何正确处理离子源有任何疑问，请联系 MS 生产商的技术支持
- 理想的废液容器应该是洁净、清空的，能兼容溶剂，并且大小足以容纳废液而不会溢出。一般建议使用大玻璃烧杯或溶剂瓶
- ESI 喷针毛细管和其他任何组件不应浸入溶剂或废液中。容器应定期清空
- 如果很难取下雾化器针头，则可以取下连接 MS 系统的毛细管端。但是，针内可能会发生一些相互作用
- 尽量在流路中钝化：HPLC 系统、毛细管、色谱柱和检测器
- 操作所有溶剂和 HPLC 组件时应采取适当的安全措施
- 不要让磷酸盐进入到 MS 中

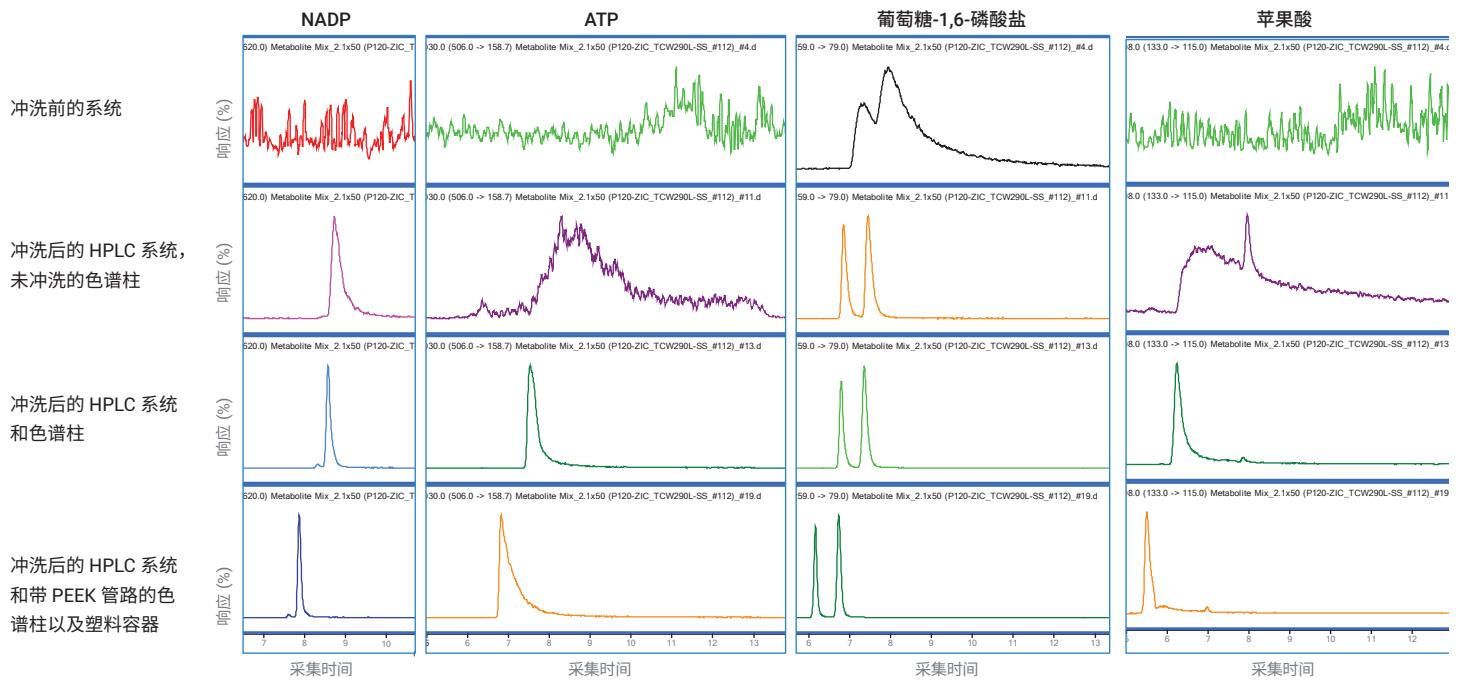


图 9. 磷酸化代谢物与不锈钢之间的相互作用：清洗前和清洗后。色谱柱：InfinityLab Poroshell 120 HILIC-Z（带 PEEK 内衬的不锈钢）， $2.1 \times 100 \text{ mm}$, $2.7 \mu\text{m}$ 。流动相 A： 10 mmol/L 甲酸铵水溶液，pH 6.8。流动相 B：乙腈 + 10 mmol/L 乙酸铵，pH 6.8。梯度：10 min 内 B 从 95% 降至 30%。流速： 0.25 mL/min 。进样量： $0.2 \mu\text{L}$ （各进样 5 ng 至色谱柱）。检测器：MS，ESI 离子源，负离子模式

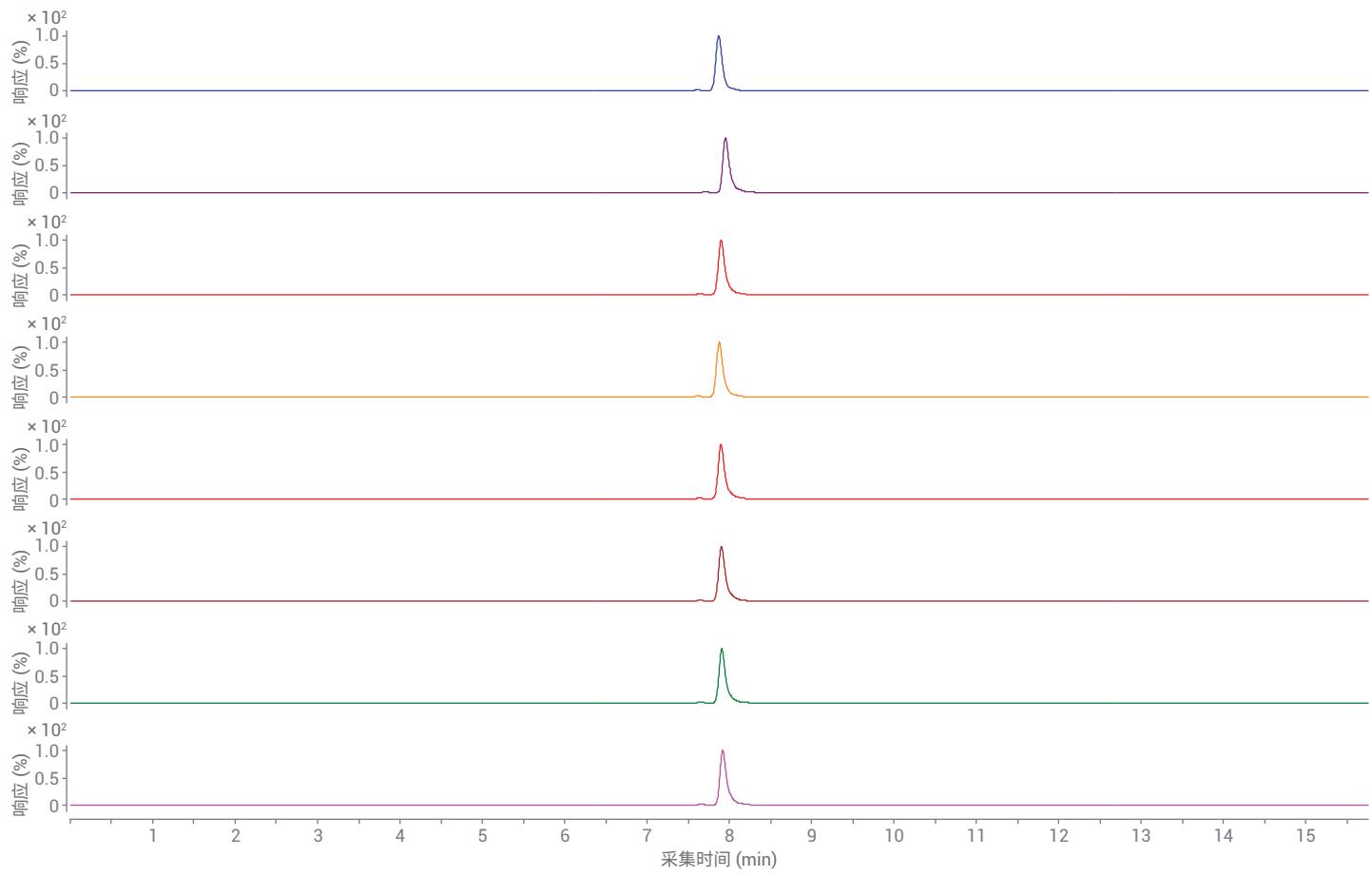


图 10. 通过 8 个小时钝化后，采用连续进样展示 NADP 清洗后的重现性

故障排除

某些问题（如重现性和平衡）有时被认为是 HILIC 的固有缺陷。事实上，这些问题可以通过适当的故障排除来消除。

再平衡过程慢 — 最常见的问题

根本原因	流动相中缺少水
解决方案	请查看“HILIC 入门指南”章节。每次运行时，流动相必须含有足够的水来更新表面水层。为实现快速再平衡，应使用至少 20% 的水来运行色谱柱，推荐使用 50%。

重现性 — 第二大常见问题

根本原因	下一次运行前未实现再平衡。 样品溶剂极性太强，影响色谱柱平衡。 与系统中不锈钢上的活性位点发生相互作用。
解决方案	色谱柱没有完全再平衡。请查看“HILIC 入门指南”章节。流动相应含有足够的水以便在每次运行中快速更新表面水层，否则必须延长再平衡时间。 样品溶剂影响保留性能。请查看“HILIC 入门指南”章节。增加样品溶剂中有机物的含量和/或减少进样体积。 目标分析物吸附在系统的钢组件上。请查看“粘性样品、去活化以及惰性硬件”章节。如果样品属于“粘性”化合物，建议使用磷酸清洗和使用惰性硬件。

样品溶解度 — 特定样品问题

根本原因	高浓度有机溶剂是理想的样品溶剂，但并不适用盐类和其他极性分析物。
解决方案	请查看“HILIC 入门指南”章节。在溶解度允许的范围内用乙腈尽量稀释样品，然后减少进样体积以获得可接受的峰形和重现性。

峰形 — 特定样品问题

根本原因	如果将大量强极性溶剂进样到系统，则峰可能发生分叉或拖尾。 当样品与系统钢组件上的活性位点结合时，样品可能会产生拖尾。 一些 HILIC 固定相（如二氧化硅）可能具有次级离子交换相互作用，引起阴离子或阳离子的过度保留和拖尾。
解决方案	使用极性较弱的溶剂（乙腈）稀释样品。请查看“HILIC 入门指南”章节。 如果样品属于“粘性”化合物，请查看“粘性样品、去活化以及惰性硬件”章节。建议进行系统冲洗，并使用惰性硬件。 更换键合相。请查看“HILIC 入门指南”章节。次级保留在传统 HILIC 固定相中很常见。 增加缓冲溶液浓度。请查看“HILIC 入门指南”章节。加入缓冲液可改善峰形，但会影响 MS 的灵敏度和 ELSD 及 UV 的基线稳定性。

缓冲液溶解度

根本原因	高浓度有机溶剂对 HILIC 模式下保留较低极性的分析物十分必要，但许多缓冲液在高浓度有机溶剂中溶解度很差。
解决方案	加入少量水可显著增加缓冲液在乙腈中的溶解度。请查看“HILIC 入门指南”章节。向乙腈中加入 10% 的水以提高溶解度，并不断测试含有高浓度缓冲液和高浓度有机物的混合物的溶解度。

结论

即使是对强极性的化合物，HILIC 也是一种稳定且可靠的分析方法。HILIC 可在任何目前使用反相色谱的实验室中轻松应用，但在开发或采用 HILIC 方法前需要充分了解二者的差异。

关键知识点包括：

- HILIC 中溶剂（洗脱液和样品溶剂）的强度相反。即便是经验丰富的色谱工作者，最初也容易对此产生混淆
- 含有高比例有机物的混合物可能是极性化合物的不良溶剂。检查样品和缓冲盐在高浓度乙腈中的溶解度，以避免样品损失或发生堵塞
- 使用合适的方法条件可实现快速平衡并获得出色的重现性。用户必须了解填料上的水层与平衡速度之间的关系
- 极性化合物更易与不锈钢发生相互作用，与传统反相分析相比，HILIC 更容易出现“粘结”问题。在低浓度时，峰拖尾严重和信号丢失是常见问题。使用温和磷酸清洗可使不锈钢上的许多活性位点失活，而更换为惰性硬件则能完全消除这些问题

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。