

Avantor Korea | FOCUS: LIFE SCIENCE 2024 April

Email: customerservicekr@avantorsciences.com

Tel: 031-645-7250

Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography

HILIC 분석법 개발을 위한 지능형 솔루션

Matt James, Senior Research Scientist

Colin Pipe, Senior Research Scientist

Mark Fever, R&D Manager

Jen Field, Research Scientist

Seungho Chae, Application Researcher in Korea Innovation Center

Abstract

The document is a white paper on Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography (HILIC) analysis method development. HILIC is a type of chromatography that uses an organic/aqueous mobile phase and a polar stationary phase. In HILIC, water is a strong solvent, and unlike in Reversed Phase Liquid Chromatography (RPLC), increasing the proportion of water in the mobile phase reduces the retention time of the analyte.

The paper discusses when to consider HILIC analysis methods, the advantages of HILIC, and the challenges often encountered due to the lack of understanding of HILIC mechanisms compared to RPLC. It also provides a systematic flowchart for intelligent solutions for HILIC analysis method development, which includes a three-step approach for chromatography analysis method development.

The first step involves gathering as much information as possible about the analyte (e.g., pKa, log P, log D). The second step involves analyzing the sample under different pH conditions using three HILIC columns in either isocratic or gradient mode to identify the suitable column/pH combination for the analyte. The third step involves optimizing the separation by investigating other parameters such as temperature and ionic strength, and assessing the robustness of the method.

The paper emphasizes that the selection of the appropriate stationary/mobile phase combination, based on the differences between the HILIC stationary phases and the mobile phase pH, can provide high selectivity in the analysis. This step-by-step approach can help users develop an efficient analysis method.

Keywords

HILIC, Chromatography, Chromatography, Organic mobile phase, Aqueous mobile phase

HILIC 분석법 개발 백서

Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography

HILIC 분석법 개발을 위한 지능형 솔루션

HILIC에 대하여

HILIC(Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography)은 한글로 친수성 상호작용 액체 크로마토그래피라고 불립니다. 해당 크로마토그래피는 유기/수성 이동상[1]과 극성 고정상 이용하는데, 일반적으로는 유기 성분의 비율이 높습니다.(~>60% 아세토나이트릴). HILIC에서 물은 강한 용매이며, RPLC와 달리 이동상에 물의 비율을 높이면 분석물질의 머무름 시간이 감소합니다 (그림 1).



그림 1. HILIC 모드에서의 용출액 강도

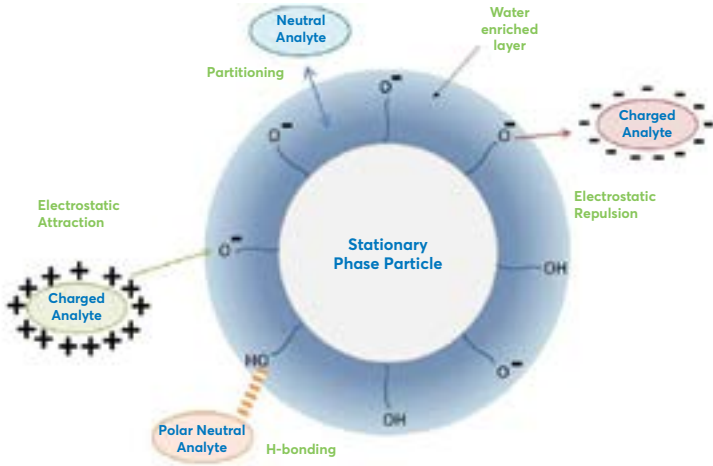
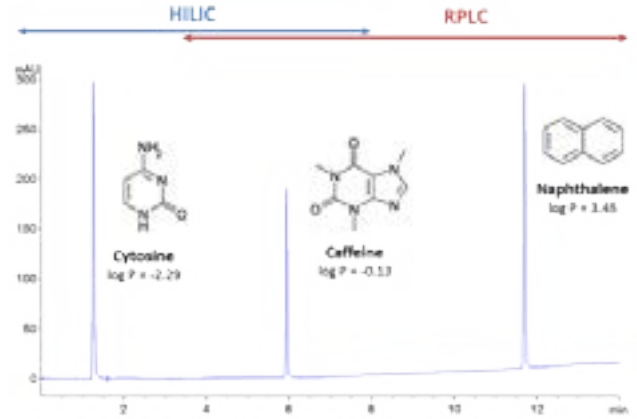


그림 2. HILIC의 retention 메커니즘의 도식화



Column:	ACE® Excel 2 C18, 100x3,0 mm
Mobile phase:	A: 10 mM ammonium formate pH 3,0 in H ₂ O B: 10 mM ammonium formate pH 3,0 in ACN/H ₂ O (90:10 v/v)
Gradient:	5 to 100% B in 10 minutes
Flow rate:	0,4 ml/min
Temperature:	30 °C
Detection:	UV, 254 nm

그림 3. 역상 크로마토그래피 및 HILIC 적용 범위 관련 그래프

HILIC은 분석 물질, 고정상 및 용리액 사이의 여러 상호작용이 발생하여 원리적으로는 복잡합니다. HILIC에서 수분이 풍부한 층은 그림 2와 같이 고정상 표면에 존재합니다. 이동상에서 이 층의 형성을 위해 최소 3%의 물이 필요하며, 수소 결합 및 정전기 상호작용으로 인해 분석 물질이 수분이 풍부한 층에서 머무르기도 합니다.[2-5].

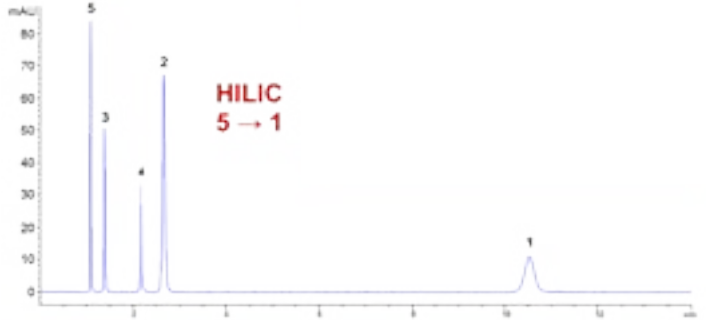
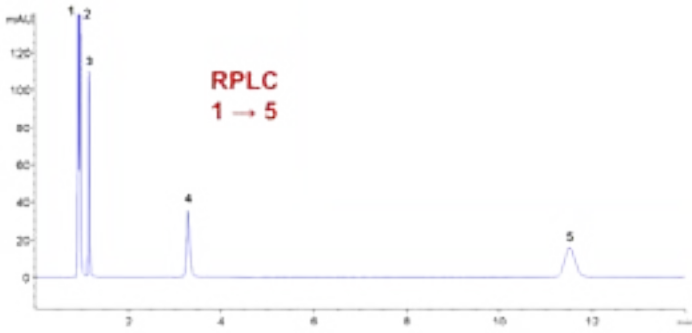
언제 HILIC 분석법을 고려해야 하는가?

HILIC는 RPLC로 분리하기 어려운 친수성 물질 분석에 적용됩니다. 분석 물질의 로그 P 및 로그 D 값은 해당물질의 HILIC를 통한 분석이 적합한지 여부를 나타냅니다. 일반적으로 RPLC(log P ~ 0)에서 카페인 전에 분석물이 용출되면 HILIC에 의한 분석에 적합할 수 있고, 반대로 나중에 용출되는 경우, RPLC에 더 적합할 수 있습니다. 아래 그림 3은 ACE® C18 컬럼에서 RP 구배를 사용하여 분리된 세 분석 물질의 크로마토그램을 보여줍니다. Cytosine은 친수성이 강하므로 C18 column에서의 머무름 시간이 짧아 HILIC에 적합한 후보인 반면 소수성 물질인 나프탈렌은 머무름 시간이 길어 RPLC에 적합합니다. 카페인은 RPLC와 HILIC 모드 모두에서 분석할 수 있습니다. RPLC와 HILIC가 중복되는 이 영역을 이용하여 어떤 분석법을 사용할 지에 대해서는 선택할 수 있으며, 해당 내용을 바탕으로 분석법이 결정됩니다.

HILIC 분석법의 장점

HILIC 분석법은 극성 분석물질의 머무름 시간 조절 외에 다른 장점도 있습니다. 그림 4는 어떻게 HILIC이 RPLC 대비 높은 선택성을 나타내는지 보여줍니다. 이 예시에서는 혼합물에서 분석물질에 대한 용출 순서가 RPLC와 HILIC 모드에서 반대라는 것을 확인 할 수 있습니다. 선택성은 크로마토그래피에서 분석 물질 분해능의 핵심이기 때문에 HILIC를 이용하여 극성 분석 물질들 간의 선택성을 극대화시킬 수 있으며, 샘플 내 모든 물질들의 분리능을 향상시킬 수 있습니다.

RPLC와 다르게, HILIC는 극성 화합물을 분리하기 위해 이온 페어링 시약과 같은 이동상 첨가제를 사용할 필요가 없습니다. 이동상 내 아세토나이트릴의 부피 비율이 높으면 배압이 낮아지고 확산성이 높아지기 때문에 유리합니다. 실제로 이를 통해 분석 전문가는 더 작고 효율적인 입자와 더 높은 유량을 사용하여 신속한 분리를 수행할 수 있습니다. 또한 HILIC 모드의 높은 유기용매 비율은 LC-MS 어플리케이션에서 보다 효과적인 에어로졸 물방울 형성으로 이온화 능력과 신호 및 응답을 향상시킵니다.



Sample: 1: Cytosine 2: Uracil 3: Caffeine 4: Nortriptyline 5: Toluene

REVERSED PHASE

Column: ACE 5 C18, 150x4,6 mm
 Mobile phase: 10 mM NH₄COOH pH 4,7 in MeCN/H₂O (40:60 v/v)
 Flow rate: 1.5 ml/min
 Temperature: 30 °C
 Detection: UV, 254 nm

HILIC

Column: ACE 5 C18, 150x4,6 mm
 Mobile phase: 10 mM NH₄COOH pH 4,7 in MeCN/H₂O (92:8 v/v)
 Flow rate: 1.5 ml/min
 Temperature: 30 °C
 Detection: UV, 254 nm

그림 4. 극성 분석물질 3개, 염기성 분석물질 1개, 소수성 분석물질 1개 분리를 위한 RPLC와 HILIC의 비교.

수많은 장점에도 불구하고, HILIC의 메커니즘에 대한 이해도가 낮아 RPLC에 비해 HILIC에 대한 지식과 경험은 일반적으로 낮습니다. 이로 인해 분석법 개발 전략의 명확성이 떨어지는 경향이 나타납니다. ACE 브랜드의 HILIC 신제품군의 분석법 개발에 대한 체계적인 플로우차트는 분석법 개발에 대한 심플한 접근 방식을 제공하고 성공적인 분석법을 개발할 수 있는 기회를 극대화하도록 설계되었습니다.

분석법 개발을 위한 3단계

크로마토그래피 분석법을 개발하기 위해 분석 대상 물질에 적절한 고정상을 가진 컬럼을 사전에 조사하는 것이 중요합니다. 이를 통해 사용자는 분해능을 최적화하고 보다 강력한 분석법을 개발할 수 있습니다. 컬럼 고정상은 HILIC 분석법 개발 시에 선택성에 영향을 미치는 가장 강력한 변수 중 하나입니다 [6]. ACE HILIC 컬럼 신제품들은 비활성의 다공성 실리카를 사용하여 제작되었기에 뛰어난 피크 형태, 재현성 및 완전성을 제공합니다.

해당 컬럼 제품군은 서로 상이한 선택성을 가진 세 가지 고정상으로 구성되며, 분석법 개발을 위한 토탈 솔루션을 제공하도록 특별히 설계되었습니다. 해당 제품들은 단일 컬럼 단위로도 구입이 가능하고 특히 한 개의 컬럼 가격으로 세 가지 고정상이 포함된 비용적으로 효율이 높은 HILIC 분석법 개발 키트 별도 판매하고 있습니다.

HILIC-A: 염기성 물질의 분석을 위한 양이온을 띄는 산성 고정상.

HILIC-B: 산성 물질의 분석을 위한 음이온을 띄는 염기성 고정상.

HILIC-N: 음이온과 양이온 교환 능력이 낮은 중성 고정상. 머무름 시간은 주로 극성 상호작용, 흡착 및 분할에 의해 좌우됩니다.

Phase	USP listing	Functional group	Endcapped	Particle size (µm)	Pore size (Å)	Surface area (m ² /g)	Carbon load (%)	pH range
ACE HILIC-A	L3	Proprietary SIL	No	1,7; 3; 5	100	300	-	2-7
ACE HILIC-B	L8	Proprietary aminopropyl	No	1,7; 3; 5	100	300	4,0	2-7
ACE HILIC-N	Pending	Proprietary polyhydroxy	No	1,7; 3; 5	100	300	7,0	2-7

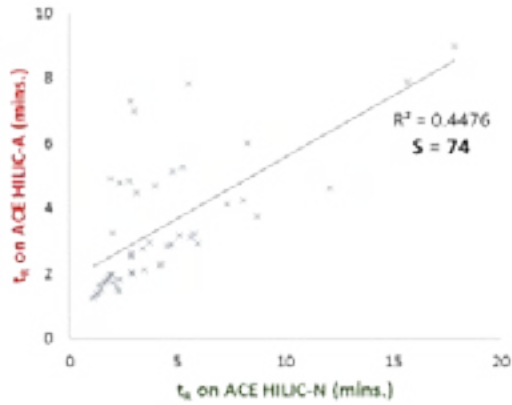


그림 5. HILIC-A 및 HILIC-N 상에서 48개 분석물의 머무름 시간 비교. 실험 조건에 대한 자세한 내용은 참조 6과 8을 확인.

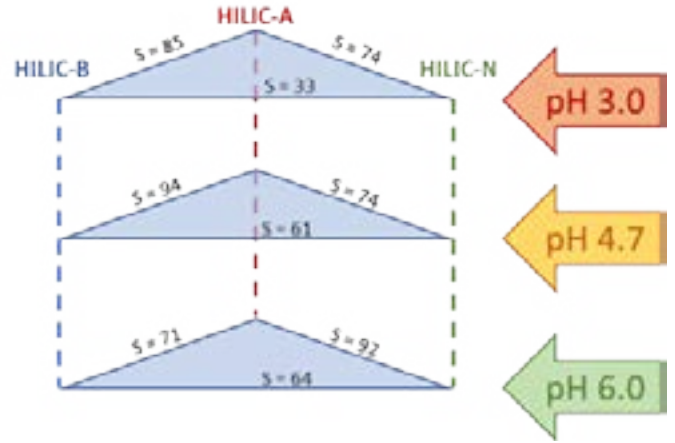


그림 6. 3가지의 각기 상이한 pH 상황 하에서 HILIC 컬럼 별 선택성 비교 장표

선택성 극대화를 통한 분석법 개발 개선 전략

HILIC 컬럼 제품군은 3가지 HILIC 컬럼으로 구성되어있으며, 다양한 이동상 구성, pH, 분석물질에 따라 적절히 적용할 수 있습니다. 동일한 조건에서 다양한 분석 물질을 크로마토그래피 분석하기 위해 두 고정상에서 각각의 분석물질의 머무름 시간의 차이를 비교함으로써 선택성 측면에서 서로 얼마나 다른지 정량적으로 평가할 수 있습니다.

두 컬럼에서 분석물질에 대해 얻은 머무름 시간을 도표(그림 5 참조)로 표시함으로써 결정계수(R^2)로 나타내는 산란도 선택성의 차이를 확인할 수 있습니다. 산란도(R^2 값이 작을수록 1.0에서 멀어짐)가 높다는 것은 두 컬럼이 다른 선택성을 제공한다는 것을 나타냅니다. 그런 다음 등식 1에 따라 S를 구할 수 있습니다 [7].

$$S = 100 \times \sqrt{1 - R^2} \quad \text{등식 1}$$

우리는 3개의 HILIC 컬럼이 제공하는 선택성 차이를 조사하기 위해 동일한 크로마토그래피 조건에서 총 48개의 화합물을 분석하였습니다. HILIC 컬럼에서 일반적으로 사용하는 pH 범위에서(3.0; 4.7 그리고 6.0) 실험을 반복했습니다.

그림 6은 각각의 pH에서 세 개의 HILIC 컬럼의 선택성을 비교하는 자료입니다. 얻어진 큰 S값은 세 개의 컬럼이 각 pH 값에서 서로 다른 선택성을 제공한다는 것을 보여주고 있습니다. 이러한 S값은 세 가지 컬럼이 분석법 개발 선별에 이상적인 주어진 pH에서 분석 물질 집합에 대해 서로 다른 머무름 시간 및 용출 순서를 제공할 가능성이 있음을 보여줍니다. S값이 100이면 완전 직교성을 나타내는 반면, 0에 가까우면 두 상이 동일한 선택성을 제공함을 나타냅니다.

HILIC 컬럼 간의 이러한 직교 및 선택성의 예는 그림 7에 나타나 있습니다. pH 4.7에서는 세 가지 컬럼에서 다양한 산성, 염기성 및 중성 분석물질이 분석되었습니다. 비록 2'-deoxyguanosine은 HILIC-B 및 HILIC-N 컬럼에서 더 긴 머무름 시간을 보여주지만 중성 분석물질은 3개의 컬럼에서 유사한 용출 순서를 보입니다. 음전하를 띠는 산성 분석물질은 HILIC-A, HILIC-N, HILIC-B 순으로 점점 머무름 시간이 증가하는 것을 확인할 수 있습니다. 이는 각 컬럼에서 제공하는 정전기 상호작용의 정도가 다르기 때문일 수 있습니다. 양전하를 띤 염기성 분석물질(Peaks 4, 7, 8 참조)들은 HILIC-B에서의 머무름 시간이 짧고 HILIC-A에서는 머무름 시간이 길어 정반대의 결과 값을 나타냈으며, 동일한 물질이라도 적용되는 컬럼의 종류에 따라 다른 용출 순서를 나타낼 수 있음을 의미합니다. 이를 통하여 사용자는 크로마토그래피 분석법 개발 과정 중 물질에 맞는 옵션을 적용하여 분석법을 개발할 수 있습니다.

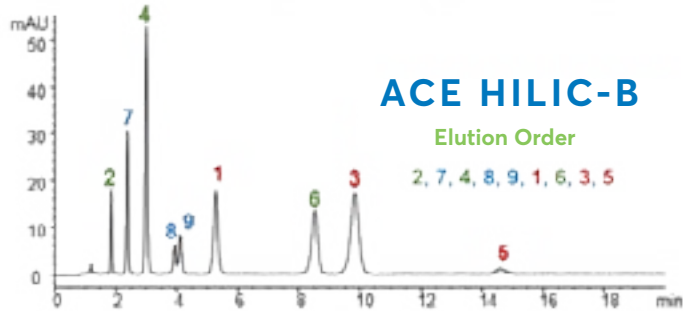
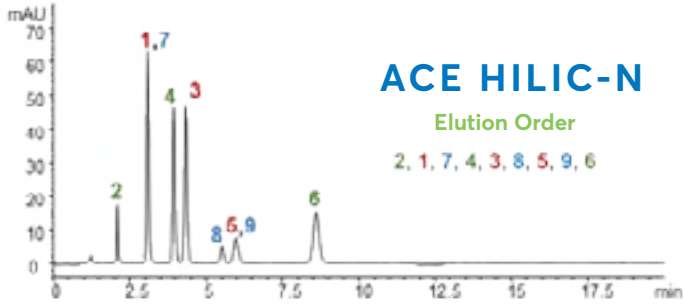
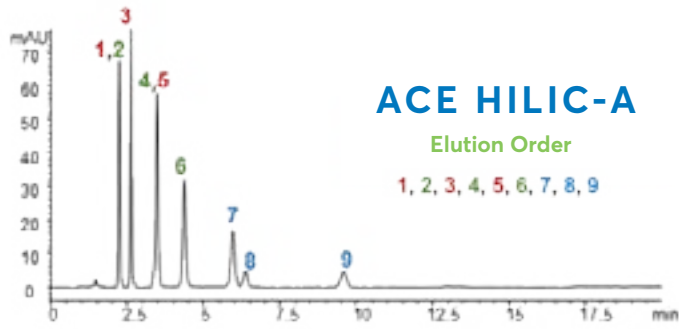


그림 7. HILIC 상에서 산성(빨간색), 염기성(파란색) 및 중성(녹색) 분석물의 혼합 비교 컬럼 형식 5 μm , 150x4.6 mm, 이동상: isocratic, 10 mM ammonium formate pH 4.7 in MeCN/H₂O (90:10 v/v), 1.5 ml/min, temperature: 25 °C, injection volume: 5 μl , detection: UV, 254 nm. : 1. 4-amino benzoic acid, 2. nicotinamide, 3. 4-hydroxybenzoic acid, 4. adenine, 5. mandelic acid, 6. 2'-deoxyguanosine, 7. acebutolol, 8. tyramine

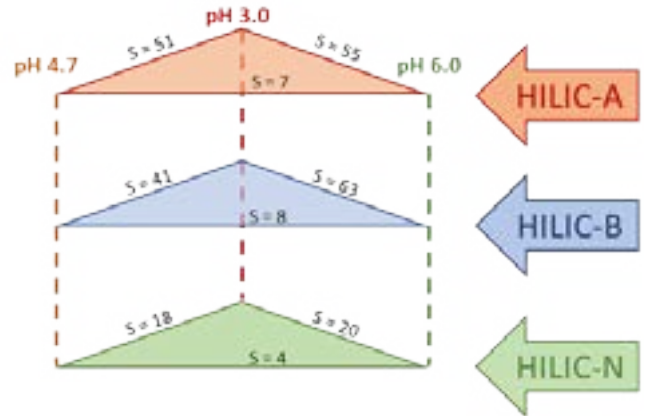


그림 8. 이동상 pH가 pH가 각각의 HILIC 컬럼에 미치는 영향을 보여주는 삼각형 도식

용리액 pH: 선택성에 대한 추가 제어

컬럼 고정상 외의 선택성에 영향을 미치는 파라미터는 용리액의 pH입니다. 샘플에 이온성 분석물질이 포함되어 있는 경우, 용리액의 pH를 변화시켜 이온화 정도를 제어할 수 있습니다. 산성 분석물질의 경우 용리액의 pH를 분석물질의 pK_a 이하로 하여 분리한다면 pH 변화에 따라 분석물질은 중성화 후 이온화가 됩니다. 따라서 산성 분석물질의 경우 용리액의 pH가 분석물질의 pK_a 보다 높아야 효율적으로 분석이 가능하며, 염기성 분석물질은 그 반대의 성격을 띕니다.

HILIC-A 및 HILIC-B 컬럼의 이온화 상태 역시 pH에 의존하기 때문에 HILIC 컬럼군은 용리액의 pH의 영향을 더욱 강화합니다. 즉 HILIC-A는 음전하를 띤 물질을 분석할 수 있습니다. pH를 높임으로써 분석물질의 음전하 정도가 증가하여 이온화된 분석물질의 머무름 시간이 증가합니다. 이와 유사하게 용리액의 pH는 HILIC-B 컬럼에서도 분석물질의 이온화 정도에 영향을 미칠 수 있으며, 따라서 고정상과 분석물질 간의 결합력을 변화시킬 수 있습니다.

각 컬럼에 대해 서로 다른 용리액의 pH에 대한 영향을 확인 할 수 있었으며(그림 8 참조), 이 실험을 통해 S값을 얻었습니다.

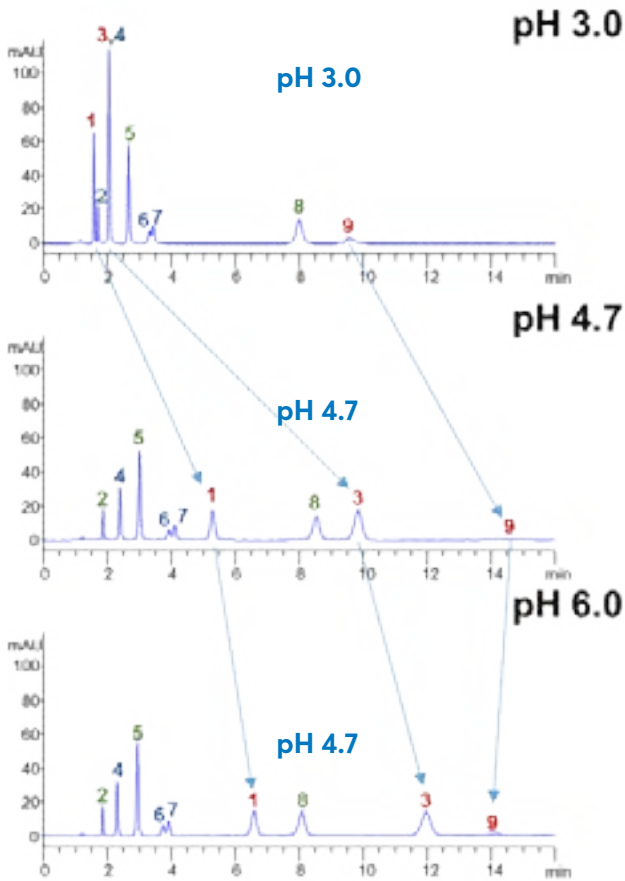


그림 9. 이동상의 서로다른 pH 조건 하에 HILIC-B 컬럼에서 산성(빨간색), 염기성(파란색) 및 중성(녹색) 혼합물의 크로마토그램 비교:
 5 μ m, 150x4.6 mm, mobile phase: Isocratic, 10 mM ammonium formate in MeCN/H₂O (90:10 v/v), flow rate: 1.5 ml/min, temperature: 25 °C, injection volume: 5 μ l, detection: UV, 254 nm. Sample: 1. 4-amino benzoic acid, 2. nicotinamide, 3. 4-hydroxybenzoic acid, 4. acebutolol, 5. adenine, 6. tyramine, 7. atenolol, 8. 2'-deoxyguanosine, 9. mandelic acid.

그런 다음 유기, 온도 및 버퍼 강도 %와 같은 파라미터를 최적화(3단계)하여 최종 HILIC 분리 조건을 확립합니다. 이와 같은 전략을 채택함으로써, 분석법 개발 과정에서 충분한 정보를 바탕으로 논리적 의사결정을 할 수 있으며, 적절한 컬럼/이동상 조합을 사용하여 효과적인 분석법을 개발할 수 있습니다.

그림 9는 동일한 분석 물질이 동일 컬럼에서 다른 pH 조건하에 분석될 때 크로마토그래피의 양상이 다른 것을 나타냅니다. 이동상 pH를 변경함으로써 산성 분석물질의 머무름을 제어할 수 있으며, 분리 선택성을 크게 변경할 수 있습니다. 이는 이동상의 pH가 선택성을 최적화할 수 있는 강력하고 실용적인 경로를 제공할 수 있음을 여실히 보여줍니다.

간소화된 HILIC 방법 개발 전략

본 백서에 제시된 데이터에서 HILIC 분석법 개발의 전략적인 접근법은 HILIC 고정상의 유형과 이동상 pH를 모두 검토하여 적절한 고정상/이동상 조합을 구성하는 것입니다. 그림 10은 이러한 파라미터에 기반한 논리적 단계별 분석법 개발 전략을 개략적으로 보여줍니다. 초기에는(1단계) 분석물질에 대해 가능한 많은 정보를 수집하는 것이 좋습니다. (예: pK_a, log P, log D 등) 이후 세가지의 HILIC 컬럼을 이용하여 샘플을 서로 다른 pH 조건 하에 isocratic mode(등용매 용리) 또는 gradient mode(농도구배 용리)로 분석하여 물질 분석에 적합한 컬럼/pH 조합을 확인 합니다(2단계).

Parameter	Comments												
Column	ACE HILIC-A, ACE HILIC-B and ACE HILIC-N, 150x4,6 mm												
Gradient mobile phase	A: 10 mM ammonium formate in MeCN/H ₂ O (96:6 v/v) B: 10 mM ammonium formate in MeCN/H ₂ O (50:50 v/v) Ammonium formate is at pH 3,0; 4,7 or 6,0												
Gradient screen	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Time (mins.)</th> <th>%B</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>0</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>15</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>20</td> <td>100</td> </tr> <tr> <td>21</td> <td>0</td> </tr> <tr> <td>41</td> <td>0</td> </tr> </tbody> </table>	Time (mins.)	%B	0	0	15	100	20	100	21	0	41	0
Time (mins.)	%B												
0	0												
15	100												
20	100												
21	0												
41	0												
Isocratic mobile phase	10 mM ammonium formate in MeCN/H ₂ O (90:10 v/v) Ammonium formate is at pH 3,0; 4,7 or 6,0												
Flow rate	1,5 ml/min												
Temperature	25 °C												
Detection	Dependent on sample												

표 1. HILIC 선별 실험을 위한 조건 제한

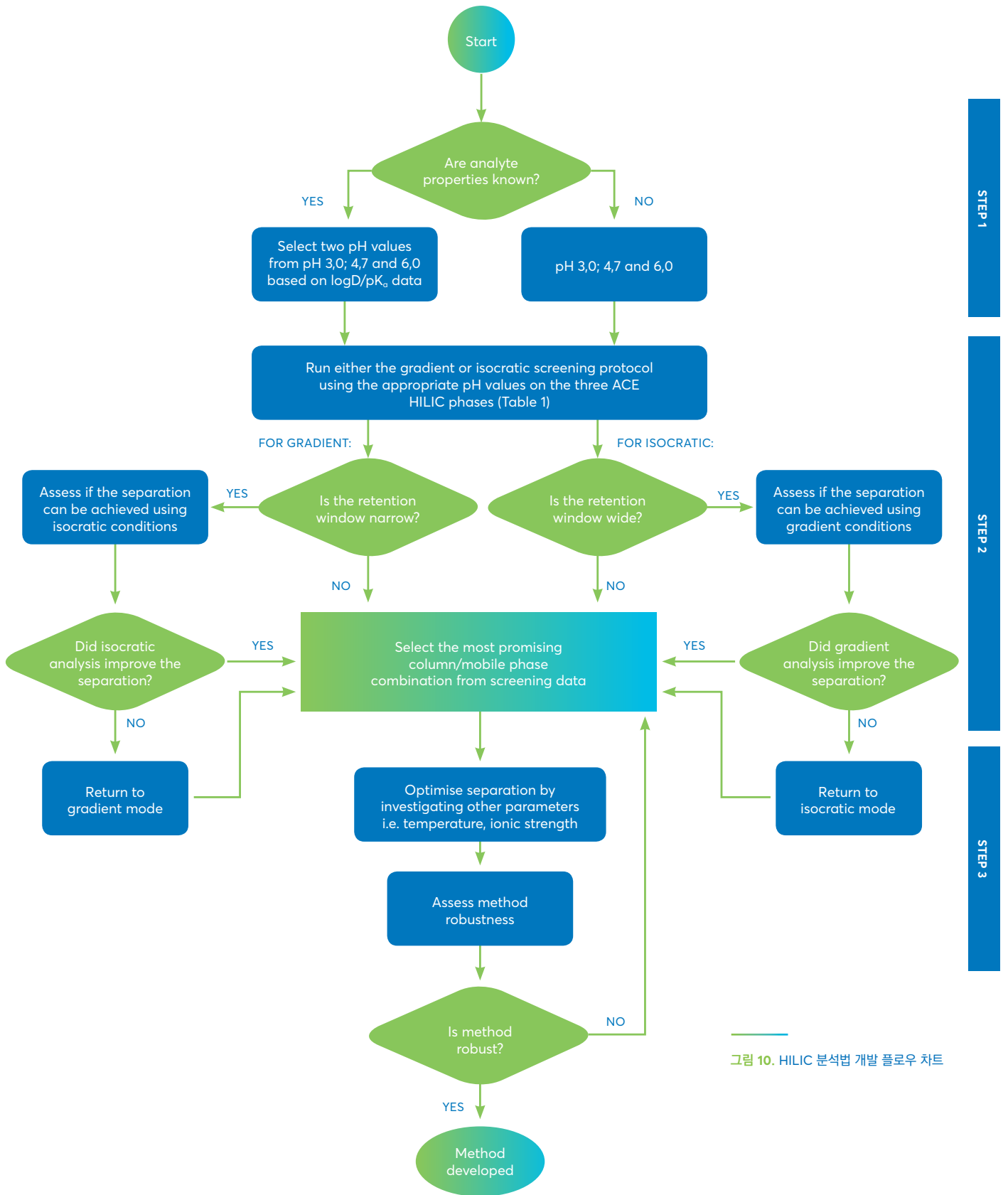


그림 10. HILIC 분석법 개발 플로우 차트

HILIC 분석의 성공을 위한 실용적인 팁 - 평형화 및 샘플 희석 조건

HILIC을 이용한 분석법의 성능 저하와 재현성 저하를 초래하는 두 가지 가장 일반적인 원인은 샘플 희석 조건과 컬럼 평형화입니다. 일반적으로 샘플 희석액은 가능한 경우 이동상과 구성이 유사하여야 하며, 높은 비율의 물(HILIC 모드의 강한 용매)은 피해야 합니다. HILIC 분리 시에 불분명한 피크 모양이 관찰되면 샘플 희석액을 먼저 평가해야 합니다.

컬럼은 항상 사용 전에 이동상을 이용한 평형화 과정이 필요합니다. 고정상 표면에서 안정적으로 수분이 풍부한 환경(영역)이 조성되어야 하기 때문에 HILIC의 평형화 시간은 RPLC보다 더 길 수 있습니다. 일반적으로 새 컬럼은 처음 사용하기 전, 이동상을 60에서 80CV(컬럼 볼륨) 정도 흘려주는 평형화 과정이 필요합니다. 사용한 후에는 잔류 버퍼 성분을 제거하기 위해 컬럼을 세척하고 동봉된 테스트 크로마토그램에 명시된 조건대로 보관해야 합니다. 차후 isocratic mode(등용매 용리)을 이용한 분석의 경우, 샘플을 주입하기 전에 평형화를 위해 20CV(컬럼 볼륨)만큼의 충분한 이동상이 필요합니다. 다음 방정식을 사용하여 1CV(컬럼 볼륨)을 계산할 수 있습니다.

$$V_M = \frac{0.5c \times L \times d_c^2}{1000}$$

여기서 V_M 은 컬럼 볼륨(ml), L 은 길이(mm), d_c 는 내경(mm)입니다. 이동상의 1CV(컬럼 볼륨)을 분 단위로 용출하는 데 걸리는 시간은 다음과 같습니다 (여기서 F 는 유속(ml/min)).

$$t_{1V_M} = \frac{V_M}{F}$$

Gradient mode를 사용해 분석하는 경우, 각 10CV(컬럼 볼륨)만큼 gradient run을 진행하고, 다시 초기 조건으로 HILIC 컬럼을 평형화해야 합니다. 일반적으로 완건성과 재현성을 확보하기 위해 Gradient HILIC 분석법 개발의 파라미터로 평형화 시간을 조절하고 정확하게 문서화하는 것이 좋습니다. 이 두 가지 주제에 대한 더 자세한 내용은 [VWR 교육 정보 링크](#)에서 확인할 수 있습니다.

맺음말

이 백서는 세 가지의 신제품 ACE HILIC 컬럼들이 상호 보완적인 선택성을 제공한다는 것을 보여줍니다. 고정상 간의 차이와 이동상 pH와 함께 활용할 수 있으며, 분석에 있어 높은 선택성을 가지도록 적절한 고정상/이동상 조합을 선택할 수 있습니다. 이러한 단계별 접근법은 사용자가 효율적으로 분석법을 개발 할 수 있도록 도움을 줄 수 있습니다.

References

- 1 A. J. Alpert, J. Chromatogr., 499 (1990) 177-196.
- 2 B. Buszewski, S. Noda, Anal. Bioanal. Chem. 402 (2012) 231-247.
- 3 D. V. McCalley, J. Chromatogr. A 1171 (2007) 46-55.
- 4 D. V. McCalley, J. Chromatogr. A 1217 (2010) 3408-3417.
- 5 N. P. Dinh, T. Jonsson, K. Irgum, J. Chromatogr. A 1218 (2011) 5880-5891.
- 6 A. P. McKeown, Chromatography Today, 8 (2015) 8-12.
- 7 U. D. Neue, J.E. O'Gara, A. Mendez, J. Chromatogr. A, 1127 (2006) 161-174.