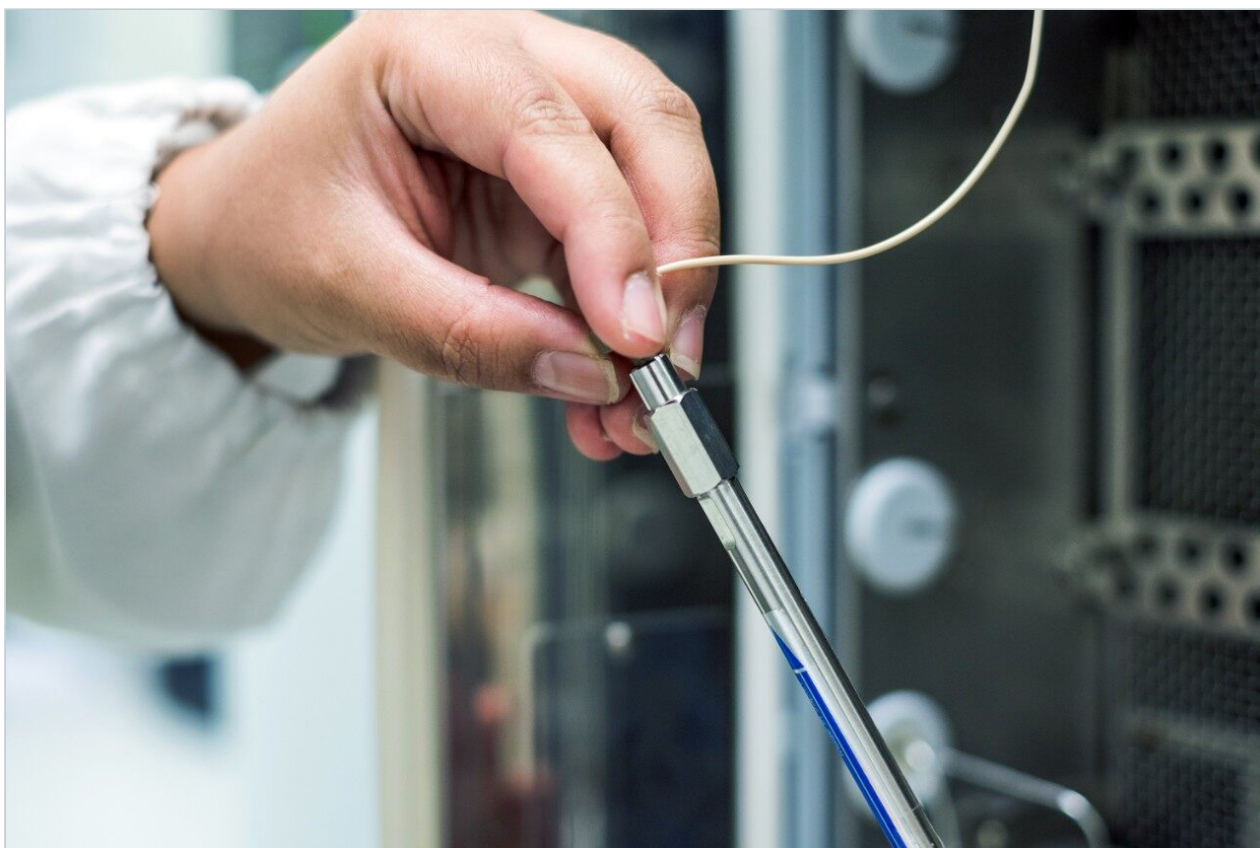


应用纪要

柱温箱恒温 and 预加热对液相色谱中温度敏感型分离的重要性

Zhimin Li, Paula Hong, Patricia R. McConville

Waters Corporation



摘要

在液相色谱中，了解柱温箱恒温以及流动相预加热对色谱分离的机理和影响非常重要。本应用纪要介绍了各种液相色谱仪器供应商之间的柱温箱设计差异对一对关键的温度敏感性化合物在分离度和选择性方面的影响。此外还提供了在方法开发和方法转换过程中针对柱温箱恒温设计和流动相预加热的常规考虑因素。

优势

- 扩展的柱温箱选择范围增强了ACQUITY Arc和ACQUITY Arc Bio系统的分析性能，使其成为常规分析和方法开发的理想平台
- ACQUITY Arc CMA提供主动预加热和扩展的色谱柱切换功能，可用于方法转换和方法开发

简介

分离温度在高效液相色谱(HPLC)中具有重要作用，它会影响保留时间、选择性和峰形。虽然温度是液相色谱方法开发和转换过程中需要控制的关键因素之一，但是业界在柱温箱恒温 and 流动相预加热及其对色谱性能的影响方面往往缺少全面了解。

在当今的分析仪器市场中，大多数液相色谱系统都包含一台专用柱温箱或各种类型的柱温箱选件。一般来说，常见的柱温箱有两种：模块加热器型和空气循环型^{1,2}。不同的恒温机理会导致传热效率、温度平衡功能有所不同，并使色谱柱中产生温度梯度。为实现足够的流动相预加热，大多数液相色谱供应商提供了预加热器，可以在将流动相溶剂引入色谱柱之前加热至设定的方法温度。流动相预加热可以是被动预加热，也可以是主动预加热。被动预加热器是指，将指定长度的毛细管直接牢固地接触柱温箱中的温控表面。主动预加热器采用内部加热元件来主动控制洗脱液温度。所有这些变量都会影响温度敏感型分离方法的可转移性。

为说明这一点，我们在装配ACQUITY色谱柱管理器(CMA)（用于ACQUITY Arc和ACQUITY Arc Bio系列的新款柱温箱）的ACQUITY Arc系统上进行温度敏感型分离³。还在来自不同供应商、采用不同色谱柱恒温 and 预加热器设计的液相色谱系统上开展了相同的实验。虽然许多仪器参数都可能影响液相色谱分离性能，但本应用纪要重点关注柱温箱特性和流动相预加热的影响。

实验

样品描述

用90%水/10%乙腈制备Waters镇痛药混标（部件号186006350 <
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/shop/standards--reagents/186006350-analgesic-mix-standard.html>>），浓度为50 µg/mL。

方法条件

液相色谱条件

液相色谱系统：	装配CMA的ACQUITY Arc
柱温：	35 °C、40 °C、45 °C、50 °C、55 °C、60 °C
各温度下的平衡时间：	30 min
主动预加热器：	采用预加热 – 启用预加热器 不采用预加热 – 禁用预加热器
检测器：	2998光电二极管阵列(PDA)检测器
波长：	245 nm
色谱柱：	XBridge BEH C ₁₈ 色谱柱, 130 Å, 3.5 µm, 4.6 mm × 150 mm（部件号186003034）
进样体积：	5 µL
流速：	1 mL/min
流动相A：	水/0.1%甲酸
流动相B：	乙腈/0.1%甲酸
梯度：	流动相B在7 min内从15%增加至30%

数据管理

色谱软件：

Empower FR3

结果与讨论

之前的研究表明，镇痛药混合物的分离对温度敏感⁴。图1比较了在配备CMA的ACQUITY Arc系统上启用或禁用主动预热器的条件下，镇痛药混合物在设定的柱温箱温度下的分离结果。在样品混合物中，组分6（表皮素）和7（水杨酸）是一对关键化合物，其分离度和选择性受温度的强烈影响。利用这对化合物作为探针来研究柱温箱恒温 and 预加热对液相色谱分离的影响。

预加热的影响

如图1所示，在采用和不采用流动相预加热的情况下，观察到这对关键化合物的选择性和分离度存在显著差异（柱温箱设置为图1所示的温度）。总体趋势是，在不采用预加热的情况下，较高温度下的分离谱图（见图1B中45 °C下的结果）与采用预加热时较低温度下的分离谱图（见图1A中35 °C下的结果）相似。如果不经预加热，进入色谱柱的流动相与柱温箱的设定温度未达到完全平衡，因此分离温度低于柱温箱的设定温度。尽管随着温度升高，所有镇痛药混合物峰的保留时间均向前偏移，但采用预加热时的保留时间偏移程度大于不采用预加热时的保留时间偏移程度。

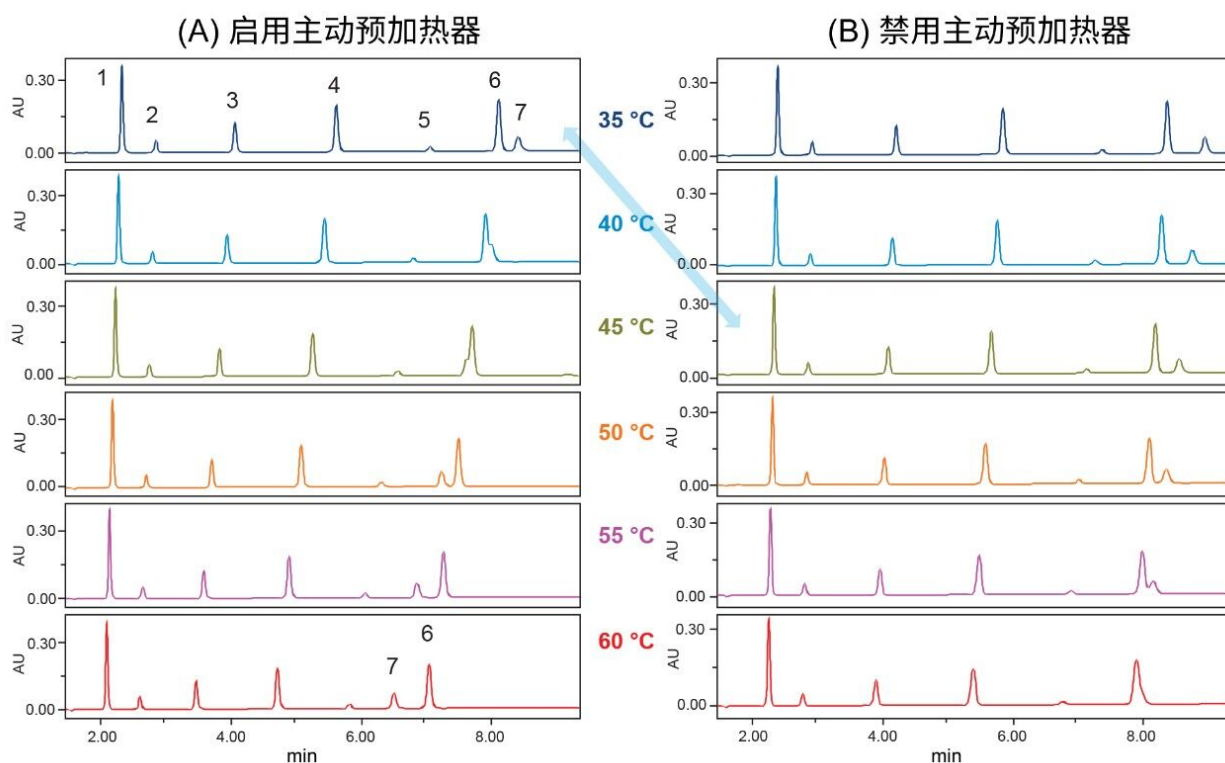


图1.在配备CMA的ACQUITY Arc系统上，温度对镇痛药混合物分离结果的影响。(A)启用主动预加热器（采用预加热）；(B)禁用主动预加热器（不采用预加热）。

图2展示了在启用主动预加热器（采用预加热）和禁用主动预加热器（不采用预加热）的条件下，峰6的保留时间随温度的变化。启用预加热器后，保留时间随温度变化的斜率大于不采用预加热时的斜率。这表明，与不采用预加热相比，采用预加热时，分析柱中的流动相更快与设定温度达到一致。在禁用预加热器的情况下，柱壁温度与色谱柱内流动的流动相温度可能不匹配，从而在色谱柱中形成温度梯度。

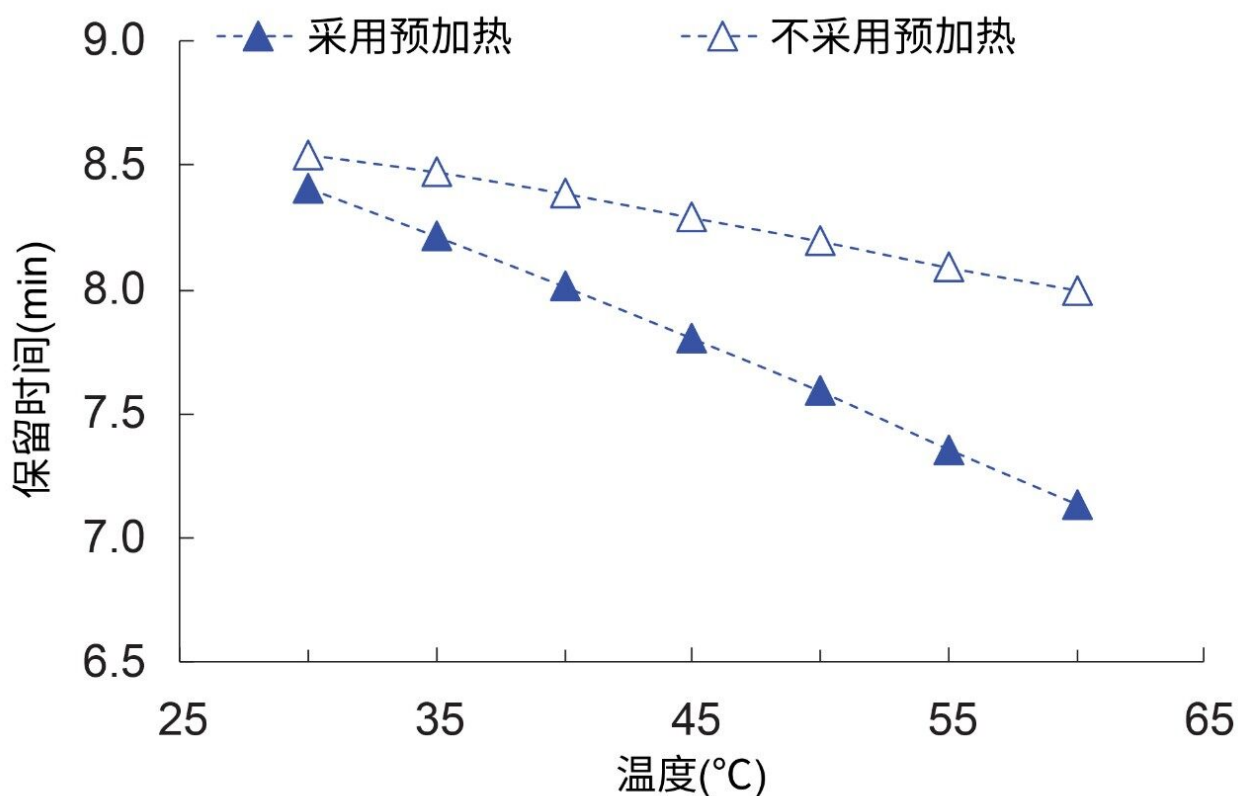


图2.在配备CMA的ACQUITY Arc系统上启用（采用预加热）和禁用（不采用预加热）主动预热器的条件下，峰6的保留时间随温度的变化

柱温箱恒温的影响

除溶剂预加热以外，色谱柱恒温设计也会影响分离。本研究选择四种采用不同类型柱温箱恒温机理的UHPLC系统（表1）。其中ACQUITY Arc系统（配备主动预加热器）和供应商X的系统（配备被动预加热器）属于模块加热器型。供应商Y的系统（配备被动预加热器）和供应商Z的系统（不配备预加热器）属于空气循环型。一般来说，模块加热器型具有高效实时柱壁加热的功能，因为色谱柱直接接触热源。空气循环型基于空气浴的概念。与金属相比，空气是一种较差的导热体，因此空气浴在实时控制柱温度方面的效果较差。但是，空气循环型柱温箱可以通过内部空气循环来增强色谱柱加热的效果²。

液相色谱系统	柱温箱类型		预加热
	模块加热器	空气循环	
ACQUITY Arc	√		主动
供应商X	√		被动
供应商Y		√	被动
供应商Z		√	不采用

表1.四种UHPLC系统的柱温箱类型和预加热功能的列表

ACQUITY Arc系统和供应商X的系统皆采用相似的U形模块加热器设计，关键化合物对分别在采用预加热（图3 A）和不采用预加热（图3B）的条件下获得了相似的选择性和分离度。预加热器类型（主动与被动）对关键化合物对的分离谱图无显著影响。

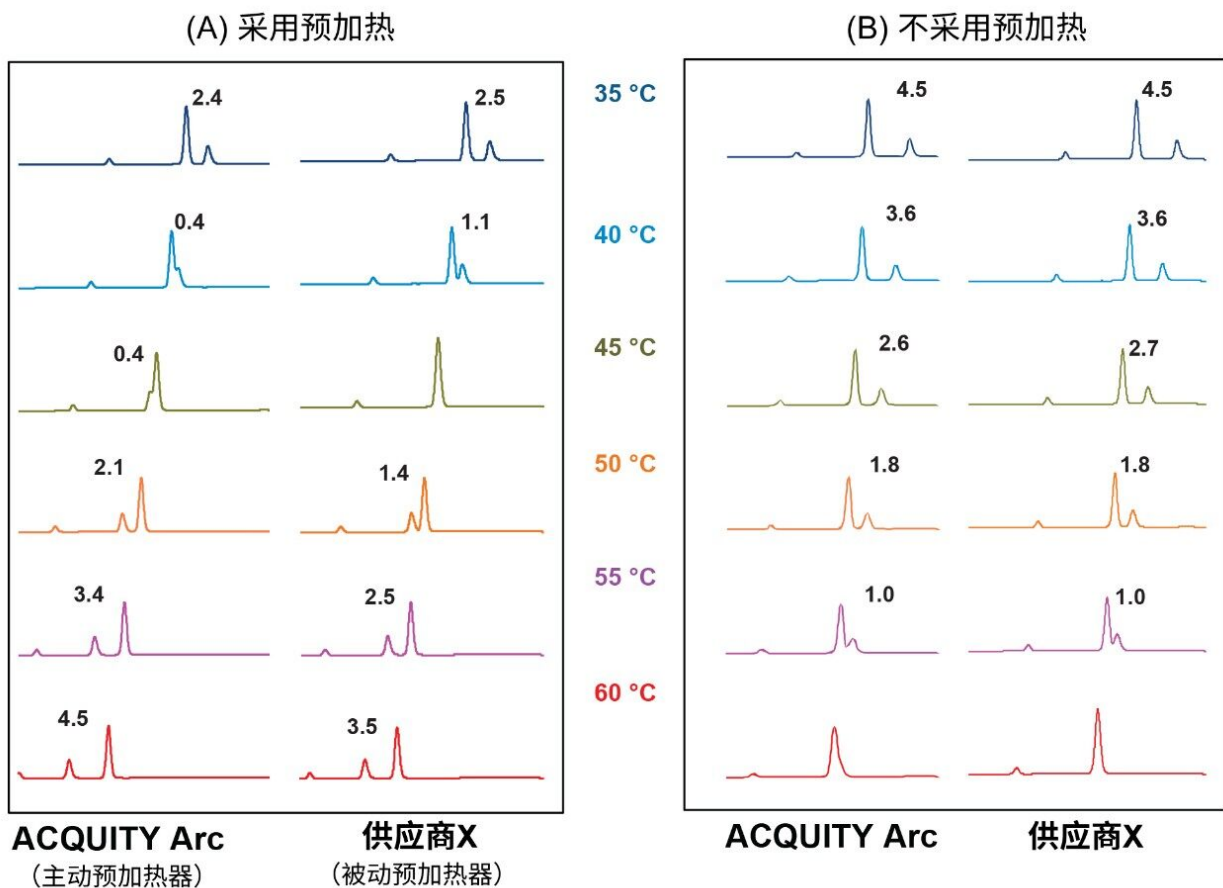


图3.采用模块加热器型系统（ACQUITY Arc和供应商X的系统）时，镇痛药混合物中的关键化合物对在高温下的分离谱图（标出分离度值）。

(A)采用预加热，对于ACQUITY Arc，启用主动预加热器。对于供应商X的系统，将被动预加热器置于流路中。
 (B)不采用预加热。对于ACQUITY Arc，禁用主动预加热器。对于供应商X的系统，将被动预加热器从流路中取出。

另一方面，在流动相不经预加热的情况下，利用模块加热器型系统（图4A，ACQUITY Arc和供应商X的系统）分析关键化合物对得到的选择性和分离度与利用空气循环型系统（图4B，供应商Y和供应商Z的系统）得到的结果显著不同。对于模块加热器型系统，关键化合物对在较高温度下（见图4A，45 °C）的分离谱图与采用空气循环型系统在较低温度下得到的分离结果（见图4B，35 °C）相似。

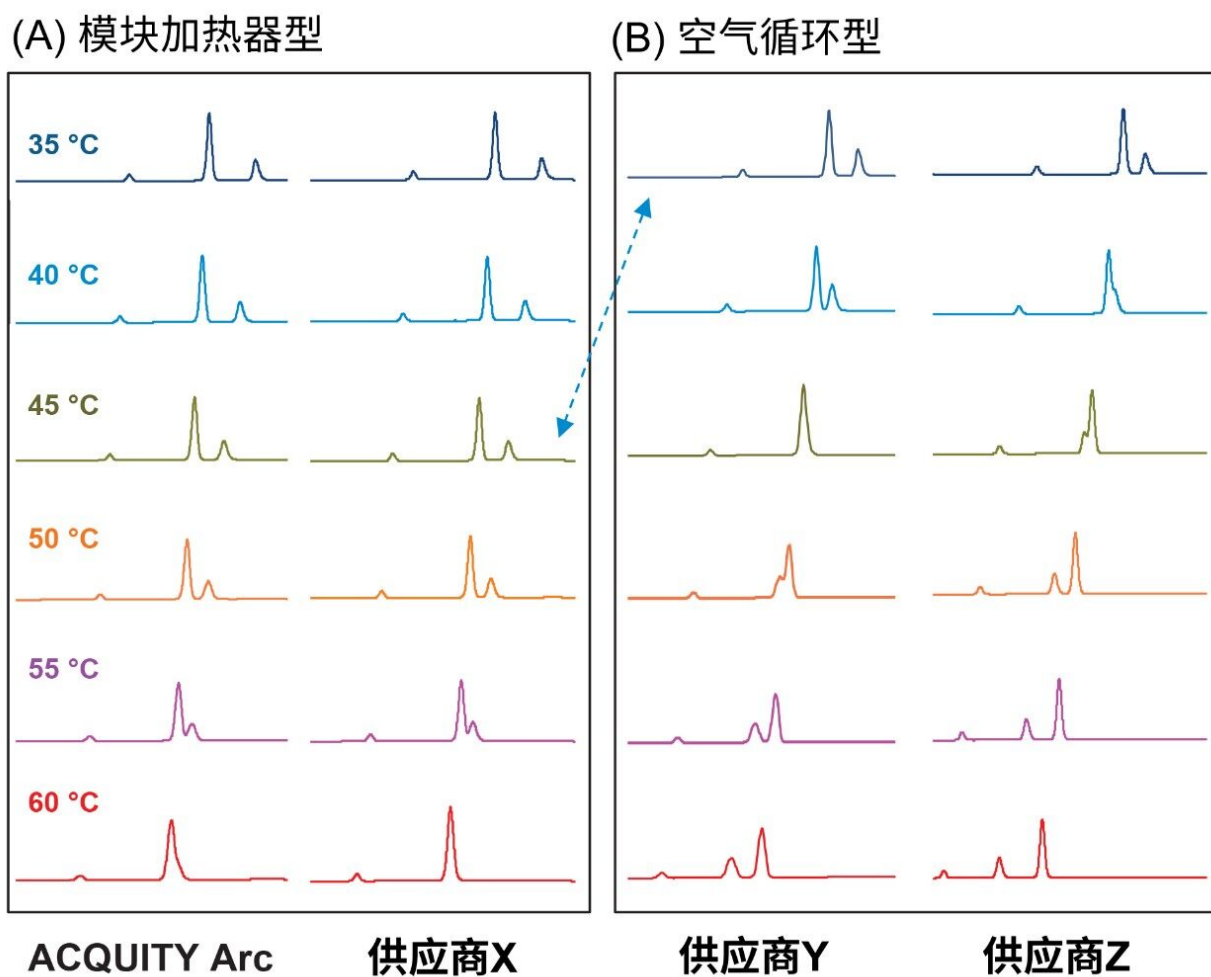


图4.在流动相不经预加热的情况下，镇痛药混合物中的关键化合物对在高温下的分离谱图：(A)采用模块加热器型系统（ACQUITY Arc和供应商X的系统）；(B)采用空气循环型系统（供应商Y和Z的系统）。

但是，当对流动相进行预加热时，采用模块加热器型系统（ACQUITY Arc系统）和空气循环型系统（供应商Y的系统）得到的关键化合物对的分离谱图相似（图5）。这一观察结果表明，可以通过流动相预加热尽量减小由不同的恒温设计所引起的柱内温度平衡差异。

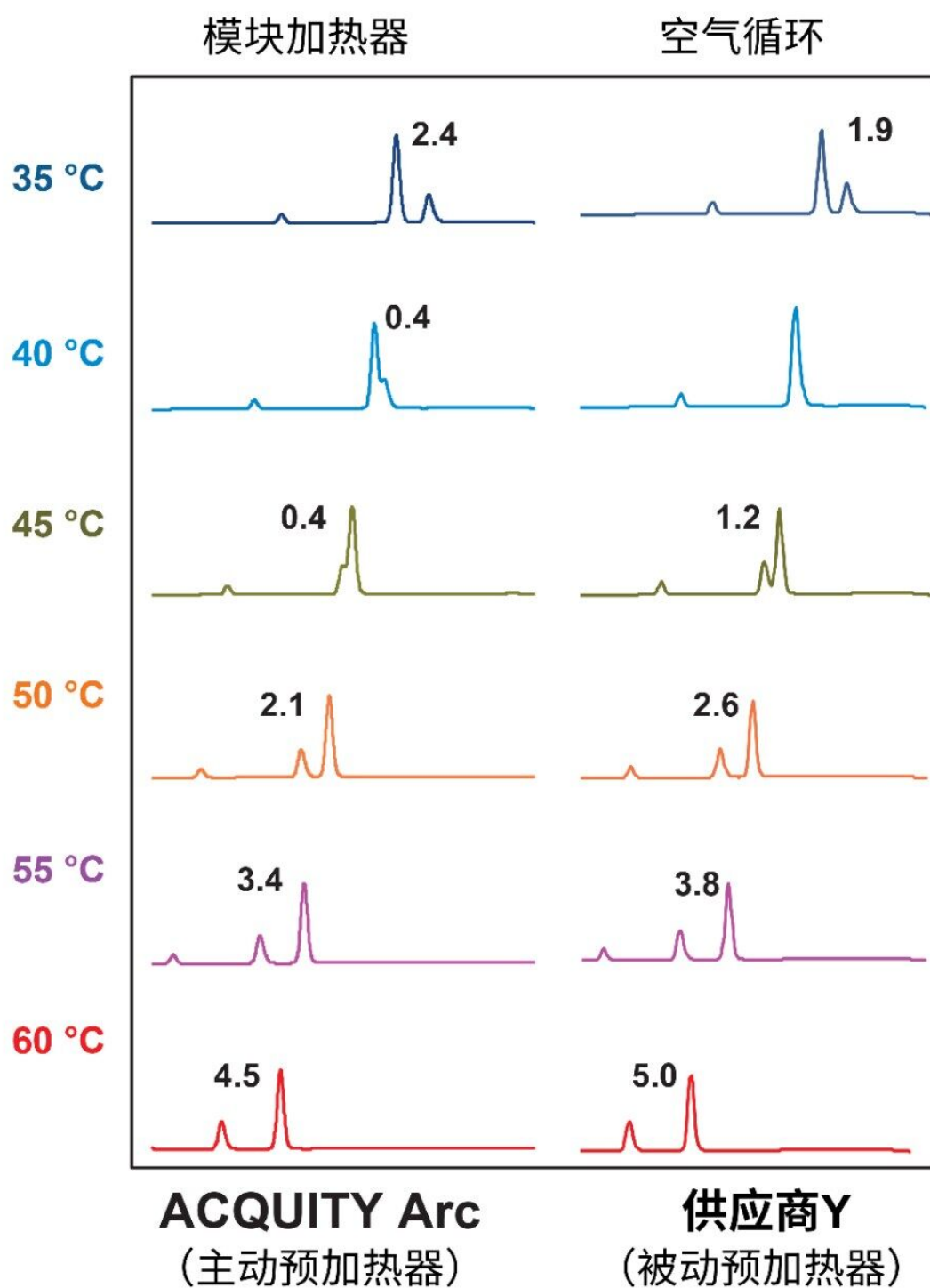


图5.采用模块加热器型系统(ACQUITY Arc)和空气循环型系统(供应商Y的系统)时,在预加热的条件下,镇痛药混合物中的关键化合物对在高温下的分离谱图(标出分离度)

结论

在本应用纪要中，我们采用配备CMA的ACQUITY Arc系统以及来自不同供应商、采用不同恒温设计的液相色谱系统开展了温度敏感性化合物的分离研究。研究表明，柱温箱特性（包括恒温类型和流动相预加热）对温度敏感型分离有很大影响。在不同的液相色谱系统之间开发和/或转换方法时，一些常规考虑因素如下：

- 开发新方法时，请务必使用预加热器
- 如果现有方法在不采用预加热器的情况下开发得出，建议使用相同类型的柱温箱恒温设置

参考资料

1. Zhu PL, Dolan J. What is the True Temperature, *LCGC*, Volume 14, Number 11, Nov 1996.
2. Heidorn M. The Role of Temperature and Column Thermostatting in Liquid Chromatography, Thermo Fisher Scientific, Germany, White Paper 71499, 2016.
3. ACQUITY Arc系统仪器规格,
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005400en.pdf> <
<https://www.waters.com/webassets/cms/library/docs/720005400en.pdf>> .
4. Hong P, McConville P. Method Transfer from Vendor X 1100 Series LC System to the ACQUITY UPLC H-Class System: The Effect of Temperature, Waters Tech Brief, Nov. 2014, [720005204en](https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2014/method-transfer-from-agilent-1100-series-lc-system-to-acquity-uplc-h-class-system-effect-of-temperature.html) <
<https://www.waters.com/nextgen/us/en/library/application-notes/2014/method-transfer-from-agilent-1100-series-lc-system-to-acquity-uplc-h-class-system-effect-of-temperature.html>> .

特色产品

ACQUITY Arc系统 <<https://www.waters.com/134844390>>

Empower色谱数据系统 <<https://www.waters.com/10190669>>

720007137ZH, 2021年2月

© 2021 Waters Corporation. All Rights Reserved.