

默克純水報 H₂O 教室



親愛的純水用戶：

您好。

上一期我們討論「純水對於實驗動物飲水的影響」，本期的內容將針對「純水對於液相層析質譜儀分析實驗的影響」進行探討。液相層析質譜儀 (LC-MS) 是分析物質成份非常普遍且重要的方法，如果要得到正確的結果，則用來做樣品稀釋、配製標準品或移動相等用途的超純水品質，則顯得非常重要。

再次感謝您的閱讀，也希望此篇文章對您的實驗有很大的幫助！

默克密理博事業體
純水技術處 敬上



第四期

「純水對於液相層析質譜儀分析實驗的影響」¹

2012. 7. 9

液相層析質譜儀 (LC-MS) 的原理概況

液相層析質譜儀 (LC-MS) 是一項極為被廣泛使用的技術，其結合了液相層析儀 (LC) 的物理分離特性、及質譜儀的質譜分析能力。液相層析質譜儀是一非常重要的分析技術，因為它同時具有高靈敏度及正確性；相對於氣相層析質譜儀 (GC-MS)，LC-MS 更具有可分析極廣大範圍物質的優點，只要是熱不穩定、具有高分子極性或有高分子量的物質，皆可以用 LC-MS 來進行分析。

LC-MS 主要可分成三個部份：離子源 (ionization source)、質量分析器 (mass analyzer) 及偵測器 (detector)。

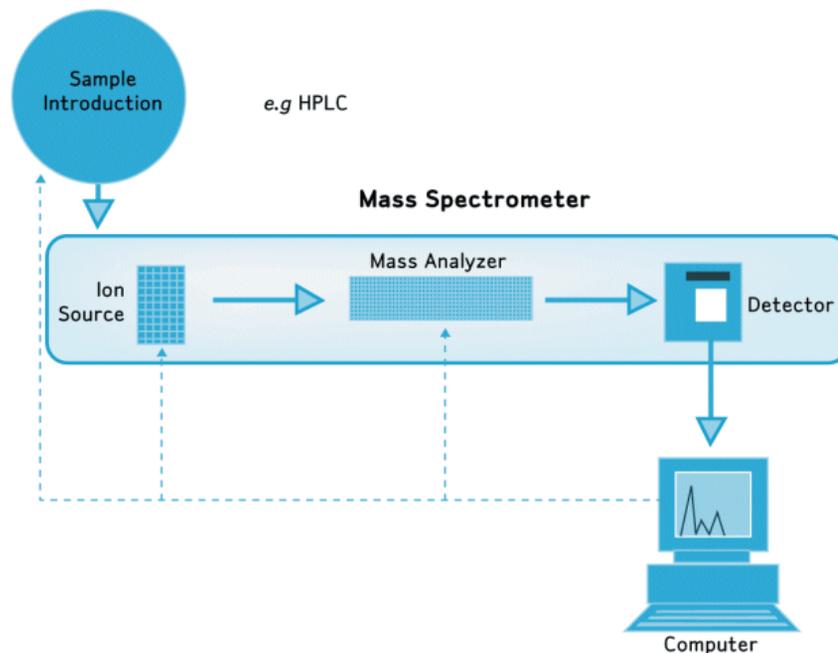


圖 1 液相層析質譜儀 (LC-MS) 示意圖

進入質譜儀的待分析物質，必須先經由離子源轉化成氣化的離子。兩種LC-MS最常見的離子化方法為：電噴灑離子化 (electrospray ionization, ESI) 及大氣壓化學游離法 (atmospheric pressure chemical ionization, APCI)。電灑法主要是利用將所欲分析的樣本溶液，由一個前端施以高電壓的毛細管噴灑而出，由於流經毛細管出口時受到電場作用，噴出的液滴會攜帶電荷。帶電荷液滴最終形成帶有電荷的氣相離子，便可送至質譜儀的質量分析系統加以偵測。後者則是將化學電離原理延伸到大氣壓下進行的電離方法。主要是分析中等極性以上的化合物，常用於分析藥物及代謝產物的分析等。

質譜儀中的質量分析器依照離子質量與電荷的比值 (mass-to-charge ratio, m/z) 來進行離子的

分離。最常見的質量分析器有：quadrupole, ion trap，及結合兩者之分析器 (如triple quadrupole, quadrupole time-of-flight, quadrupole linear ion trap)

超純水品質對於液相層析質譜儀分析實驗的影響

許多水中的污染物質可能會影響質譜儀分析結果及圖譜的品質。有些影響可以從HPLC部分找到原因，然而有些則會針對質譜部分造成不良的影響。

可能影響液相層析質譜儀分析之污染物質：

- 顆粒

顆粒可能影響HPLC幫浦和注射器，亦可能阻塞管柱，造成背壓增加。

- 有機物質

水中的有機物質污染物可能造成層析分離結果的數種影響：

- a. 有機物分子可能會堆積在層析管柱填充物的表面，減緩樣品和溶劑分子接觸管柱填充物孔洞裡可結合處的速度。此會導致質量變動問題，解析度降低，甚至降低管柱的壽命。
- b. 以超純水配製的沖提液中若含有機污染分子，可能會和樣品分子競爭結合在層析管柱填充物上面或裡面的可結合基團，造成注射樣品及結合階段中，可結合的樣品分子減少，使致沖提步驟較少的樣品分子可被沖洗下來。因此，配製層析分離溶液的超純水中，若含有有機污染物質，將會降低分析性層析法的靈敏度。
- c. 有機物質可能堆積在管柱上，並於分析中被沖提而形成圖譜上的污染峯 (contaminant/ghost peak)。
- d. 如果有機污染物質的含量很高，此污染物質可能會扮演新的固定相 (stationary phase)，造成滯留時間 (retention time) 的偏移和訊號峯的拖尾變形 (tailing)。
- e. 管柱中有機污染物質的累積，亦可能造成背壓的升高。
- f. 由以上的原因可知，準確監控用於 HPLC 應用的水中有機污染含量非常重要，此項工作可由線上TOC偵測器 (TOC monitor) 的測量而達成。

- 膠體

膠體可以利用不可逆的方式吸附在固定相上，而造成固定相在管柱中失去原本的分離效能。

- 細菌

細菌可能會堵塞管柱，並且釋放一些有機物質。

- 離子的污染

離子的污染亦可能影響層析分離效果，因溶液中離子強度的改變可能影響某些分離效果。離子污染可能產生的重大影響，是當某些金屬離子 (如鈉、鉀離子) 與樣品分子結合時，將造成圖譜判定更加困難。

由以上可知，用來做為樣品稀釋、配製標準品或移動相的超純水中若含有污染物質，皆可能影響實驗分析的結果。在這些污染物質中，特別以水中的有機性污染物質最應該被仔細地監控。

以 TOC 偵測器偵測數種 HPLC 等級瓶裝水中的有機物質含量，發現甚至有 TOC 大於 700 ppb 的情形 (表1)。以這些瓶裝水做為移動相A，並於 C18 管柱中以梯度方式進行沖提液沖提 (沒有任何樣品注射，移動相 B 為 acetonitrile)。高 TOC 所代表的高有機物質污染，將導致 LC-MS 圖譜結果中數個高背景峯的產生 (圖2)。

Water Source	TOC (ppb)
Bottled Water A	100
Bottled Water B	87.0
Bottled Water C	777
Bottled Water D	16.5
Bottled Water E	32.4
Bottled Water F	25.5
Fresh ultrapure water	7.0

表 1 數品牌 HPLC 等級瓶裝水的 TOC 值

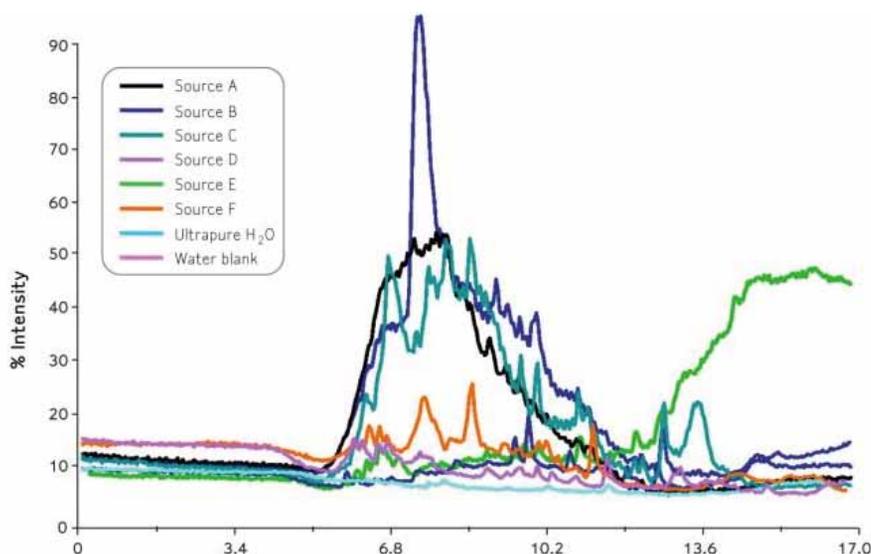


圖 2 不同來源瓶裝水以電噴灑式質譜儀分析的結果。這些瓶裝水用做移動相 A，並在 C18 管柱中以梯度沖提液沖提 (沒有任何樣品注射，移動相 B 為 acetonitrile)

具有雙波長 (254/185 nm) 紫外燈的 Milli-Q 系統，可將表 1 及圖 2 結果的高 TOC 值有效降低至 5 ppb。由圖 3 可知，若將 Milli-Q Gradient 系統的雙波長紫外燈打開 (粉紅曲線) 再關閉 (藍色曲線)，其純化所得的超純水於質譜圖譜中可得明顯不同的總離子數值 (total ion count, TIC)，由此可知雙波長紫外燈對降低有機物質的效果很大。當紫外燈關閉時產生的數個波峯及其強度，在紫外燈打開時皆明顯的降低了。

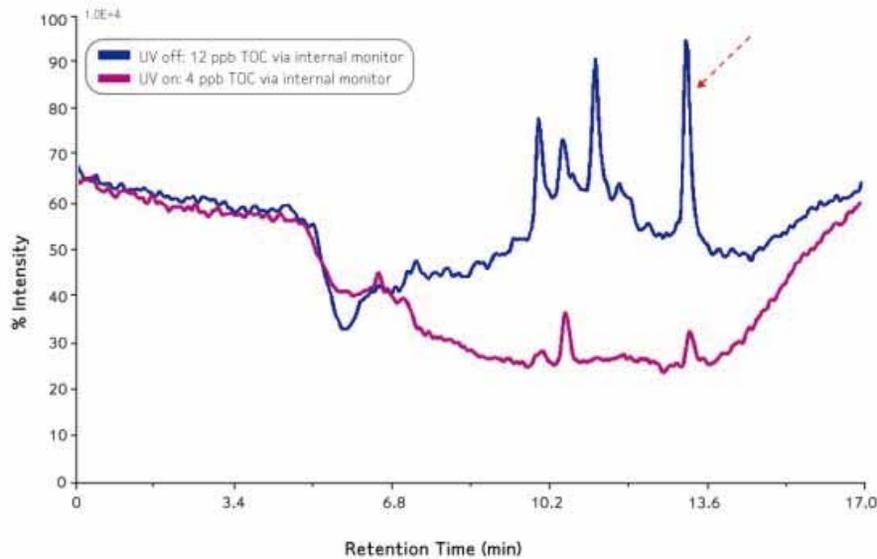


圖 3 電噴灑式質譜分析結果：Milli-Q Gradient 系統純化之超純水。粉紅色為雙波長紫外燈打開，藍色為雙波長紫外燈關閉。

其他種類的污染物質

● 超純水的貯存

超純水的貯存可能造成物質釋出於水中。塑膠的容器一般會釋出有機物質和某些離子。玻璃容器不會釋出如此多的有機物質，但會有離子釋出於水中。超純水的貯存亦會造成細菌的生長。

● 溶劑的添加物

配製緩衝液的添加物如鹽類、酸及鹼，很普遍被使用，故亦可能影響質譜分析。

選擇適當的超純水系統做為 LC-MS 質譜分析用水

如何選擇適當的超純水系統做為 LC-MS 的分析應用? 有幾個因素需要考量：

- 分析方法
- 實驗室分析方法所需用水量
- 分析方法的偵測極限 (detection limits)
- 純水系統需做確效與否
- 實驗室純水系統的供水來源
- 實驗室日常所需純水及超純水用量
- 實驗室可擺放純水機台的空間
- 線上即時監控系統: 確保純水品質保持在正常規格範圍內
- 實驗室中是否有其他需要用超純水進行分析的實驗
- 實驗室將來可能的擴展或升級

1. 資料來源: http://www.millipore.com/lab_water



默克密理博事業體
純水技術處
www.merck-millipore.com

Merck Millipore is a division of 