

默克純水報

H₂O 教室



親愛的純水用戶：

您好。

上一期我們進行**內分泌干擾素 (endocrine disrupting compounds, EDC)**分析實驗的用水進行探討。若與您的實驗有相關，希望已對您的研究很有助益。

本期的純水報，內容將針對一般分析實驗室極普遍的工具：**高效能液相層析儀 (HPLC)**進行討論，且著重在 HPLC 實驗用水的品質要求，及各種水中可能存在污染物會對實驗造成的影響。

再次感謝您的閱讀，也希望此篇文章對您的實驗或研究有很大的幫助！

默克密理博事業體
純水技術處 敬上



第十一期

「HPLC 實驗用水的品質需求及水中污染物質可能的影響」¹

2012. 11. 19

高效能液相層析儀 (HPLC) 概述

高效能液相層析儀 (High-performance liquid chromatography, HPLC) 是分析化學領域中最重要的工具之一。HPLC 為實驗室中非常普遍的儀器，而事實上，它的普遍性只低於天秤與酸鹼度計。只要待測樣品可以溶解在水溶液中，HPLC 即有能力分離、定性、定量極性範圍極廣的化合物。現今，只要有適當的偵測器，微量濃度化合物亦能輕易被偵測到，甚至靈敏度可以到 ppt 的程度。HPLC 可以分析各式各樣來源的樣品，諸如：製藥、環境、法醫、食品、保健食品及工業化學品等等。

HPLC 是利用待分析物於填充在管柱上的固定相 (stationary phase) 與加壓進入管柱的液態移動相 (mobile phase) 之間的分佈情形來進行分離的。傳統的 HPLC，其固定相通常是用極性的物質，如矽膠；移動相則選擇非極性的物質。這樣的模式稱為一般模式 (normal phase)。然而如今，逆相高效能液相層析儀 (reverse phase HPLC) 卻是較普遍的方式，有 75% 左右的實驗都選擇逆相高效能液相層析儀來做物質的分離。在逆相 HPLC 中，管柱裡填充的是疏水性的分子，例如：C-18。移動相則是水 (或酸鹼溶液、緩衝溶液) 與有機溶劑 (如甲醇) 的混和。其他 HPLC 的模式尚有：

- 離子交換層析法 (Ion-exchange chromatography)

此方法的固定相是陽離子或陰離子交換樹脂，其所攜帶的電荷可吸引帶相反電荷的離子。待測物質與樹脂之間的吸引力強度會影響分離的結果，而此吸引力的來源則與待測物質的電荷與大小有關。

- 尺寸排阻層析法 (Size exclusion chromatography)

管柱中填充具有特定孔隙大小的粒子，只有小分子可以從中穿越。樣品中的大分子會先到達偵測器，再來是較小的分子，最後是溶劑分子。

- 親和性層析法 (Affinity chromatography)

管柱中含有與待測物或是特定官能基具有專一性的親和性配合基。待測物質會辨認並與配合基以特殊的方式結合。另一種 HPLC 叫做降解性 HPLC (denaturing HPLC, DHPLC)，為專門用來偵測單一核苷酸多型性 (single nucleotide polymorphisms, SNPs，為最常見的遺傳性基因變異) 的方法。在 DHPLC 中，管柱裡的固定相對於單股及雙股 DNA 有不同程度的親和性。現今有兩種可供此法分析的管柱種類：原始的管柱填充的是 alkylated poly(styrene-divinylbenzene)，後來發展出來的是填充 alkylated silica 的管柱。

一套 HPLC 系統通常由六個基本模組組成，並與一些適當的管路或配件連結。此六個基本模組為：溶劑儲槽、幫浦、注射器、管柱、偵測器，及數據分析系統 (如圖一所示)。

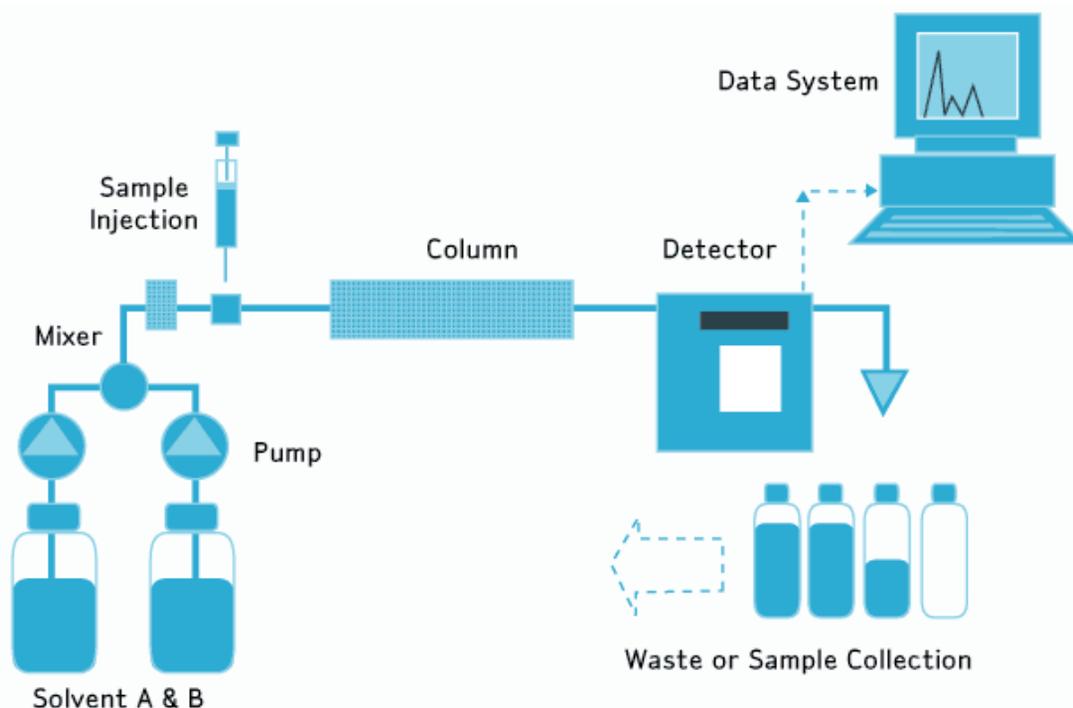


圖 1 HPLC 系統的示意圖

溶劑儲槽基本上裝載做為移動相使用的溶劑 (稱為移動相是因為它會移動) 的容器。高壓幫浦是用來以特定的流速推動移動相。注射器用來注射樣本進入持續移動的移動相中，移動相會將樣本帶進 HPLC 分析管柱。HPLC 分析管柱，如同 HPLC 的心臟，裡面填充有做為固定相之材質，是樣本分離的地方。偵測系統，用來偵測在 HPLC 管柱中分離出來的樣本。因為分析樣本種類之不同，偵測系統會有不同的偵測儀器。UV 光譜吸收偵測儀普遍地被使用，它可以應用於會吸收 UV 的樣本。如果樣本會發螢光，螢光偵測儀就會被使用。如果樣本沒有以上兩種特色，那就必須使用更普及的偵測儀，像是蒸發光散射檢測器 (evaporative-light-scattering detector (ELSD))。近來，HPLC 系統後端會連結質譜儀 (mass spectrometer)，合稱 LC/MS。移動相離開偵測儀器後可以被收集或是集中於廢液桶。

近來的 HPLC 系統都是經由電腦記錄其分析結果。電腦會記錄電子訊號並產生色譜 (chromatogram)。色譜可以呈現出樣本在管柱中分離的狀況。色譜中每一個峯 (peak) 都代表偵測儀測到一個不同的化合物。

HPLC 有等強度 (isocratic) 和梯度 (gradient) 兩種沖提 (elution) 方式。在等強度模式，移動相的成分是不變的。在梯度模式，移動相的成分則會改變。此模式是用在當樣品中成分的極性差異較大，故分離時，移動相的沖提強度會逐漸增強 (增加有機溶劑的量)，以將原先不易帶出的物質帶出。

HPLC 實驗用水的品質需求

HPLC 是一項完善建立且非常可信賴的技術，因此成為許多實驗室非常倚賴且使用率極高的工具。雖 HPLC 的運作很機械化，但仍會面臨一些問題，而對研究者造成時間及資源的浪費。其

中一項常見的問題是所使用溶劑或移動相的品質。溶劑內所含的數種污染物質可能影響 HPLC 的運作及實驗結果：

- 顆粒

顆粒可能會造成幫浦跟注射器的破壞，亦可能阻塞管柱跟濾心，導致背壓增加。顆粒亦可能變成有固定相的功能進而與樣品中的成分結合。

- 有機物質

超純水中的有機污染物質可能對層析分離造成數種不同的影響：

- 有機物質分子可能在管柱填充物的表面堆積，而減緩樣品/溶劑分子和固定相結合處的結合速度。這可能造成圖譜上訊號的大幅平移問題，破壞圖譜解析度，甚至減低管柱的使用壽命。
- 配製沖提液 (elution buffer) 的水中所含的有機物污染分子可能與樣品分子競爭，而與層析管柱填充物的活性基團結合。結果將導致在樣品注射及結合步驟時僅有較少的樣品會結合在管柱填充物上，進而使得在沖提步驟被沖提出來的樣品分子亦會減少。因此，若配製層析法溶液的水中含有有機污染物，此分析性層析法的靈敏度便會降低。
- 有機物質可能會在管柱的上端堆積，隨後被沖提成污染峯。
- 若有機污染物質的含量很高，此污染物質可能甚至會變成一個新的固定相，導致滯留時間 (retention time) 的平移及訊號峯的拖尾 (tailing)。有機污染物質在管柱中的堆積亦可能造成背壓的增高。
- 因為這些原因，精確測量 HPLC 用水中的有機物質含量就顯得很重要了，而此測量可藉由線上 TOC 偵測器很簡易的達成。

- 膠體

膠體會以不可逆的狀態吸附在固定相上 (stationary phase)，因而失去管柱原本應有的分離效果。

- 細菌

細菌可能會阻塞管柱及濾心並釋放有機性的副產品 (請參考有機物質污染物的部分)。

- 離子

離子亦會影響層析分離的效果。溶液中離子強度的改變可能會影響某些分離，而若污染的離子會吸收紫外線 (如硝酸鹽離子)，可能會在最終被沖提出來形成圖譜的訊號，而使結果判讀更加困難。

使用在樣品稀釋、標準品或移動相的配製的純水中所含的污染物質裡，以有機物質污染物為最重要，以下將進一步探討。

圖 2 為一 HPLC 層析實驗的圖譜，而配製移動相 A 所使用的超純水中含有不同含量的有機物質 (移動相 B 為 acetonitrile)，採梯度沖提方式，以 C18 管柱進行分析，而且沒有任何注射樣品的動作。此圖顯示，TOC 含量的確會影響結果，造成數個高背景峯的產生。²

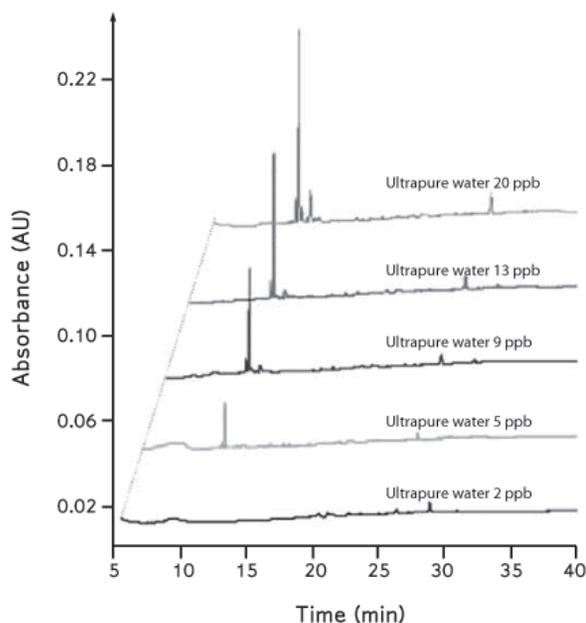


圖 2 含數種不同 TOC 含量的超純水層析圖譜。管柱為 C18 管柱，進行梯度沖提，移動相 A 為超純水，移動相 B 為 acetonitrile。

有些研究人員會選擇使用 HPLC 等級的瓶裝水來配製移動相。在這種情形下，可能會被忽略的是，大多數的瓶裝水皆沒有 TOC 含量的規格說明。有些品牌的 HPLC 等級瓶裝水經由離線 TOC 測量後，其有機物含量都可能超過 700 ppb (如表 1)³。圖 3 顯示，高濃度有機物質將對純水的圖譜造成不利的影響。大部分 HPLC 等級瓶裝水所產生的圖譜皆會有污染峰的存在。

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 數種 HPLC 等及瓶裝水的 TOC 含量³

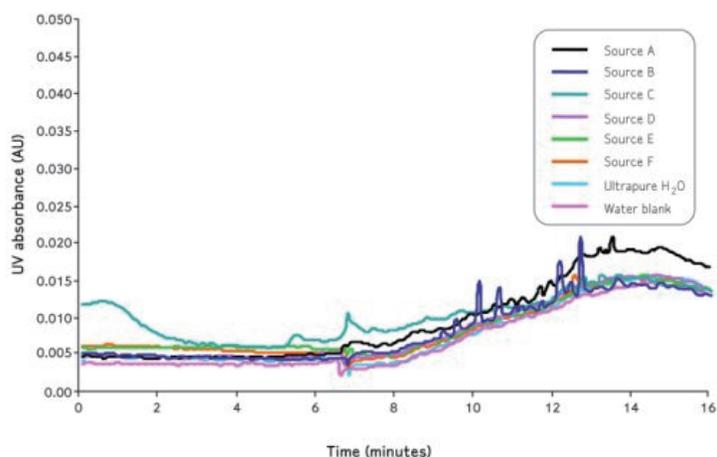


圖 3 不同來源 HPLC 等級瓶裝水及超純水之紫外線吸收光譜 (波長 210 nm)

- 其他污染物質的來源

- 超純水的儲存

超純水的儲存可能會造成溶出物釋放至水中。塑膠的容器會釋放有機物質及某些離子。玻璃容器不會釋出這麼多有機物質，但可能會釋出離子。超純水的儲存亦可能助長細菌的繁衍。

- 溶劑添加物

緩衝液通常會添加鹽類、酸、鹼等添加物。因此研究者應選擇使用最高等級的試劑。

選擇適當的純水做為 HPLC 分析實驗用水

默克密理博研發出許多滿足 HPLC 分析實驗者所需的純水製造機。例如：Milli-Q Integral、Milli-Q Advantage、Milli-Q Reference、Synergy UV、Simplicity UV 等機型。

在選擇實驗室 HPLC 分析實驗所需超純水時，可根據以下各項因素綜合考量之後，選擇最適當的系統：

- 分析方法
- 研究方法所需的水用量
- 實驗結果的偵測方法
- 方法的偵測極限 (detection limits)
- 純水系統的確效 (validation) 需求
- 實驗室純水系統的供水來源
- 實驗室日常所需純水/超純水用量
- 實驗室的空間配置
- 線上即時監控系統: 確保純水品質保持在正常規格範圍內
- 實驗室中其他需要使用純水的分析儀器或應用
- 實驗室的分析儀器或實驗應用的未來規劃

備註：

1. 資料來源: http://www.millipore.com/lab_water
2. S.Mabic, C. Regnault, J. Krol, LCGC North America, (Jan 2005). The misunderstood laboratory solvent: Reagent water for HPLC (LCGC North America, Jan 2005).
3. B.M. Stewart and B.L. Williamson, Am Biotechnol, 19 (2001), 16. Evaluation of HPLC reagent water purity via LC-MS and total organic carbon analysis.



LC-Pak 技術資訊

Parameter	Specification of LC-Pak ultrapure water	Comments
HPLC Gradient Test - Absorbance of highest eluted peak	At 210 nm < 0.006 AU At 254 nm < 0.002 AU	Concentration of 60 mL water at 1 mL/min prior to elution
HPLC Gradient Test - Absorbance of highest eluted peak	At 210 nm < 0.003 AU At 254 nm < 0.001 AU	No water pre-concentration
Optical properties: absorbance in UV range	UV 200 nm < 0.05 AU UV 205 nm < 0.01 AU UV 210 nm < 0.01 AU UV 254 nm < 0.005 AU	
Fluorescence as quinine	At 254 nm < 1 ppb At 365 nm < 1 ppb	
Compliance with suitability for LC/MS: Reserpine test	No peak higher than 10 ppb Reserpine at 609 m/z in ESI +	
Residue after evaporation	< 0.0001 % w/w	Test performed as specified in ISO 3696 procedure



默克密理博事業體
純水技術處

www.merck-millipore.com

Merck Millipore is a division of  MERCK