

Практическое руководство по влиянию чистоты воды на ВЭЖХ, ЖХ/МС и смежные методы

Maricar Tarun, PhD
Stéphane Mabic, PhD
Merck Millipore
Lab Water



Введение

Высокоэффективная жидкостная хроматография (далее по тексту – ВЭЖХ) в наши дни является одним из самых распространенных аналитических методов, применяемых в самых разных лабораториях для широкого спектра приложений: научные исследования, фармацевтика, пищевая промышленность, исследования окружающей среды, криминалистика, биомедицина, протеомика – вот далеко не полный список. Системы ВЭЖХ отличаются повышенной чувствительностью, высокой скоростью проведения исследований и высокой воспроизводимостью результатов. Для того чтобы в полной мере использовать потенциал ВЭЖХ, чистота реагентов и растворителей должна соответствовать самым высоким стандартам.

В последние десятилетия компания Merck Millipore была лидером по инновациям в процессе получения сверхчистой воды для хроматографов. Успех был обеспечен сочетанием нашего опыта в построении систем очистки воды и понимания требований жидкостной хроматографии и способов детектирования. Технологии и системы очистки воды разрабатывались с учетом двух основных факторов: (а) отсутствие влияния на исследуемые вещества и (б) оптимизация эффективности работы. Эти цели достигаются

путем снижения уровня содержания примесей в очищенной воде.

Стремясь лучше понять необходимость хроматографии в очищенной воде высокого качества и найти идеальное решение, мы провели множество экспериментов и исследований влияния качества воды на результаты метода жидкостной хроматографии (ВЭЖХ, нано- и ультра-ВЭЖХ) и метода детектирования – ультрафиолетовый (далее по тексту – УФ) и масс-спектрометрический (далее по тексту – МС). Результаты исследований представлены в Разделе 3 – Практические эксперименты для демонстрации преимущества использования свежеприготовленной сверхчистой воды.

Раздел, посвященный экспериментам, предваряют введение в жидкостную хроматографию и раздел, посвященный технологиям очистки воды. В последнем разделе приведены практические рекомендации о том, как избежать загрязнения растворителя в ВЭЖХ, начиная с выбора правильной системы очистки воды до поддержания оптимального качества сверхчистой воды.

После прочтения этого руководства вы поймете, что в аналитической лаборатории **вода является химическим реагентом**.

Содержание

1. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)	6
1.1 Составные части жидкостного хроматографа.....	6
1.2 Колонка для ВЭЖХ.....	8
1.2a Геометрия колонок.....	8
1.2b Наполнители	8
1.2c Химически модифицированная или привитая фаза	8
1.2d Размер пор.....	8
1.2e Размер частиц	8
1.2f Последние достижения в технологии изготовления колонок	9
1.3 Ультра-высокоэффективная жидкостная хроматография (УВЭЖХ).....	9
1.4 Детекторы.....	10
1.5 Подвижная фаза/растворитель/элюент.....	11
1.6 Качество растворителя критично для обращённо-фазовой ВЭЖХ.....	11
2. Производство сверхчистой воды для ВЭЖХ.....	12
2.1 Типы очищенной воды	12
2.2 Очистка воды – Введение.....	13
2.3 Подготовительный этап очистки (первая ступень).....	14
2.3a Обратный осмос.....	14
2.3b Электродеионизация	15
2.3c Бактерицидное УФ-облучение.....	16
2.4 Финишный этап очистки (вторая ступень).....	16
2.4a Ионообменные смолы	17
2.4b Синтетический активированный уголь	17
2.4c УФ-фотоокисление	17
2.5 Комбинация технологий	17
2.6 Финишные фильтры в точке отбора воды.....	18
2.7 Контроль качества производимой воды в режиме реального времени.....	19
2.7a Контроль удельного сопротивления.....	19
2.7b Контроль содержания общего органического углерода (ТОС)	20

3. Преимущества сверхчистой воды: Практические эксперименты.....	21
3.1 Важность низкого уровня ТОС в сверхчистой воде, используемой для приготовления элюента	21
3.1a Градиентный профиль сверхчистой воды с разным уровнем ТОС	22
3.1b Сравнение бутилированной воды для ВЭЖХ разных производителей: уровень ТОС и градиентный профиль (ВЭЖХ-УФ и ЖХ-МС)	23
3.1c Важность УФ-фотоокисления в производстве сверхчистой воды для ЖХ-МС	25
3.2 Долгосрочные эффекты влияния качества воды на разделение ВЭЖХ	26
3.2a Ложные пики и дрейф базовой линии	26
3.2b Срок службы колонки – эксперимент с денатурирующей ВЭЖХ (ДВЭЖХ)	28
3.3 Сравнение бутилированной воды для ЖХ-МС и свежеприготовленной сверхчистой воды	29
3.3a Тест градиентного элюирования	29
3.3b Тест пригодности для ЖХ-МС	30
3.3c Кофеиновый тест	31
3.3d Нитрофеноловый тест	33
3.4 Сравнение сверхчистой воды и очищенной 0.1 мкм фильтром воды для УВЭЖХ (вода марки «ULC/MS»)	34
3.4a Сравнение противодавления системы	34
3.4b Градиентный профиль	36
3.4c Электроспрей масс-спектры	37
3.5 Пригодность свежеприготовленной сверхчистой воды для нано ЖХ-МС	38
3.6 Влияние ионного загрязнения на масс-спектр (ESI+) пептида	40
3.7 Использование специального фильтра финишной очистки (LC-Pak) для удаления остатков органического загрязнения в сверхчистой воде	42
4. Предотвращение загрязнения растворителя в ВЭЖХ	44
4.1 Выбор оптимальной системы очистки воды для ВЭЖХ	45
4.1a Предлагаемые системы очистки воды	46
4.1b Важность использования правильной системы подготовки воды для Milli-Q	46
4.2 Поддержание оптимального качества сверхчистой воды	47
4.3 Случаи загрязнения сверхчистой воды	49
4.3a Проверка воды на наличие загрязнений	49
4.3b Установление причин появления загрязнений в сверхчистой воде и способы их устранения	49
Список литературы	50

1. Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

ВЭЖХ является краеугольным камнем аналитической химии. Она используется во всех типах лабораторий – химических, биохимических, фармацевтических и санитарно-гигиенических лабораториях. В зависимости от типа используемого детектора могут быть обнаружены и количественно определены компоненты в концентрации миллионных (ppm) и триллионных (ppt) долей.

В методе ВЭЖХ разделение достигается с помощью распределения анализируемого вещества между неподвижной фазой, упакованной в колонку, и жидкой подвижной фазой (также называемой элюентом или растворителем), которая

пропускается через колонку с помощью насоса. Изначально неподвижная фаза была полярной, например, силикагель, а используемые подвижные фазы были относительно неполярными. Такая ВЭЖХ называется нормально-фазовой хроматографией. Однако в наши дни наиболее распространена обращено-фазовая хроматография, на ее долю приходится до 75% исследований. В хроматографии с обращенной фазой колонка упакована гидрофобными частицами, а подвижной фазой служит любая смешиваемая комбинация воды (вода с кислотой или основанием или буфер) и органического растворителя, такого как метанол и ацетонитрил. Данное руководство посвящено обращено-фазовой хроматографии.

1.1 Составные части жидкостного хроматографа

Все системы ВЭЖХ имеют компоненты, представленные на Рисунке 1.

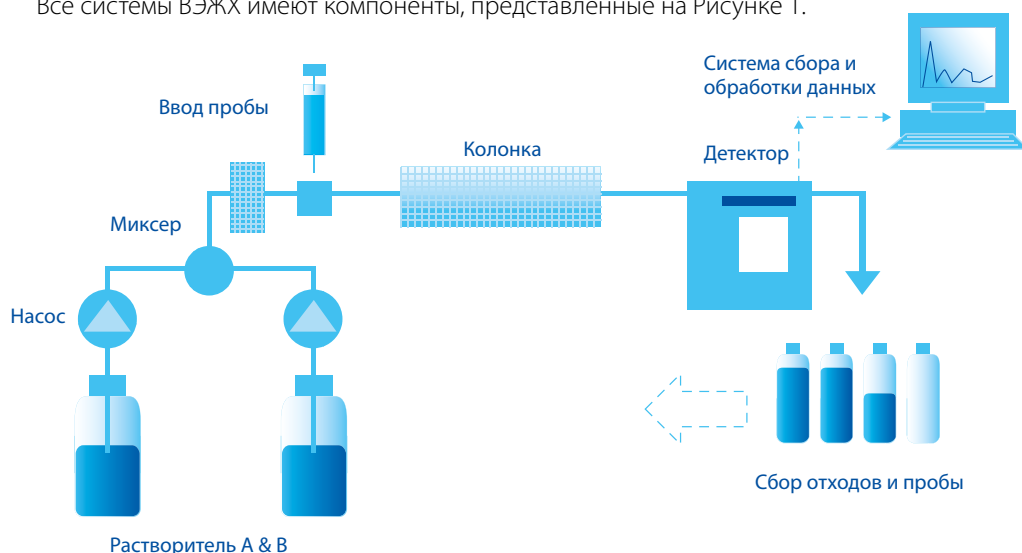


Рисунок 1. Схема системы для ВЭЖХ

- ▶ **Резервуар:** в нем содержится растворитель/элюент (также называется «подвижной фазой»).
 - ▶ **Насос:** насос высокого давления обеспечивает необходимую скорость потока подвижной фазы.
 - ▶ **Инжектор:** вводит пробу в непрерывный поток элюента, с которым проба попадает в колонку.
 - ▶ **Колонка:** сердце системы ВЭЖХ, содержит наполнитель (неподвижная фаза) необходимый для осуществления разделения. В следующем разделе дано более подробное описание колонки для ВЭЖХ.
- ▶ **Детектор:** детектирует разделенные компоненты при их элюировании из колонки.

Современные системы ВЭЖХ контролируются компьютером (система сбора и обработки данных), который также записывает сигнал, необходимый для создания хроматограммы. Хроматограмма – это графическое представление разделения, произошедшего в колонке, в виде набора пиков, поднимающихся над базовой линией с течением времени. Каждый пик соответствует отклику детектора на отдельный компонент. На Рисунке 2 приведен пример типичной хроматограммы.

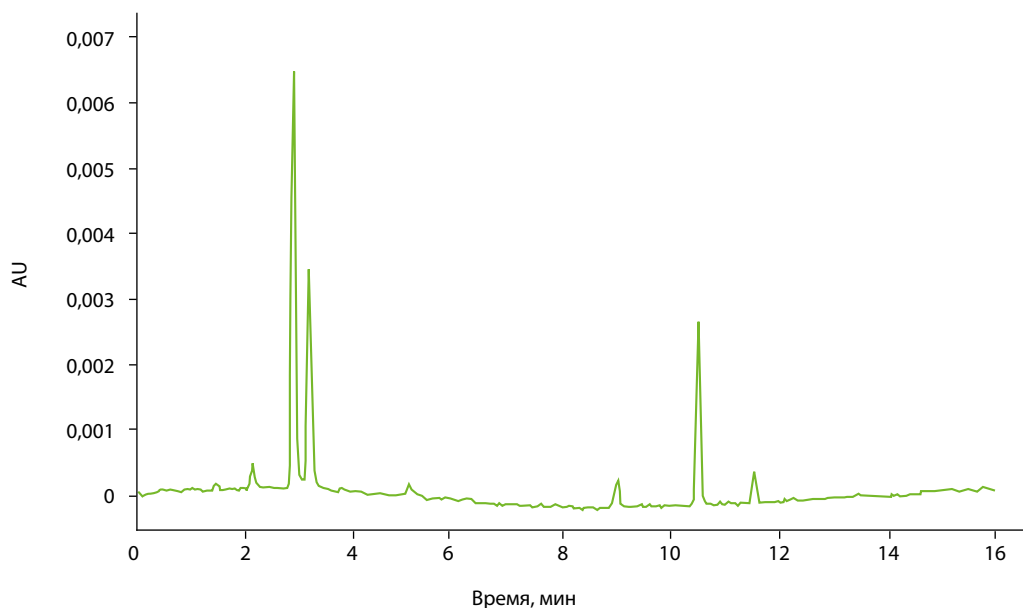


Рисунок 2. Пример хроматограммы. Каждый пик соответствует отдельному компоненту пробы.

На хроматограмме время выхода пика (компонента) называется временем удерживания, t_R . В оптимизированных методах ВЭЖХ t_R может использоваться для подтверждения наличия вещества в пробе.

Площадь пика соответствует отклику детектора на наличие соединения и, в оптимальных условиях, площадь пропорциональна концентрации компонента.

1.2 Колонка для ВЭЖХ

Колонка для ВЭЖХ представляет собой обычно трубку из нержавеющей стали с отверстиями на концах (могут также использоваться трубки из стекла или пластика, но они не обеспечивают необходимую механическую прочность). Трубка заполнена пористыми частицами, обычно силикагелем, покрытыми полимерными материалами, взаимодействующими с веществом пробы.

Существует множество типов колонок для ВЭЖХ. Ниже перечислены общие параметры, по которым различают колонки.

- ▶ Геометрия
- ▶ Наполнитель
- ▶ Химически модифицированная или привитая фаза

1.2a Геометрия колонок

Размеры колонки обычно имеют формат: внутренний диаметр × длина (например, 4,6 мм × 250 мм). Внутренний диаметр может быть от 0,3 мм до 100 мм. Чем меньше внутренний диаметр, тем выше чувствительность. Длина колонки может составлять от 5 мм до 500 мм. В общем случае более короткие колонки обеспечивают меньшее время исследования. Более длинные колонки обеспечивают лучшее разрешение. В Таблице 1 перечислены некоторые общие характеристики колонок для ВЭЖХ.

- ▶ Размер пор
- ▶ Размер частиц
- ▶ Последние достижения в технологии изготовления колонок

Таблица 1. Некоторые характеристики колонок для ВЭЖХ¹

Тип колонки	Внутренний диаметр	Обычная скорость потока	Комментарии
Препаративные	> 10 мм	> 20 мл/мин	Препаративные колонки для ВЭЖХ используются для очистки компонентов
Традиционные аналитические	2 – 5 мм	0,3–10 мл/мин	Наиболее широко используемый тип колонок в аналитических лабораториях
Капиллярные	100 мкм – 1 мм	0,4–200 мкл/мин	Капиллярные и нано колонки обычно используются в протеомике
Нанокolonки	25 мкм – 100 мкм	25–4000 нл/мин	

1.2b Наполнители

Наиболее широко используемый носитель или наполнитель – сферический пористый силикагель. Также используются носители на основе оксида циркония и различных полимеров.

1.2c Химически модифицированная или привитая фаза

Поверхность частиц силикагеля модифицирована, чтобы экранировать полярные силанольные группы и быть гидрофобной. Существует несколько типов привитой фазы: C18, C14, C8, C4, C1, гексилфенильная, фенильная, циано, NH₂ и несколько других специфических типов. Наиболее распространена привитая фаза C18.

1.2d Размер пор

Для разделения маленьких молекул необходимы частицы с небольшим размером пор (80 – 120 Å для молекулярного веса менее 10000 Да), в то время как для больших молекул требуются большие поры (150 – 1000 Å для молекулярного веса более 10000 Да).² Частицы с меньшим размером пор обладают большей площадью поверхности, что позволяет вводить больший объем пробы (большая ёмкость).

1.2e Размер частиц

Колонка для ВЭЖХ наполнена частицами диаметром от менее 2 мкм до 10 мкм. Меньший размер частиц обеспечивает большую эффективность, лучшее разрешение, но также даёт и большее давление в системе. Частицы удерживаются в колонке с помощью фриттов на входе и выходе из колонки.

1.2f Последние достижения в технологии изготовления колонок

Для повышения эффективности колонок в последние несколько лет в процесс изготовления были внедрены новые технологии.

- ▶ *Частицы диаметром менее 2 мкм* – Использование частиц размером до 2 мкм приводит к значительному увеличению эффективности и сверхбыстрому разделению, но требует очень высокого давления в системе. Так называемая ультра-высокоэффективная жидкостная хроматография (далее по тексту – УВЭЖХ) более подробно описана в следующем разделе.
- ▶ *Поверхностно-пористые частицы* (также известные как «fused core» и «shell» частицы) – эти частицы имеют твердое непористое ядро и пористую оболочку. Такое строение частиц обеспечивает большую эффективность, по сравнению с обычными частицами размером менее 2 мкм, без увеличения давления в системе.³ Таким образом, нет необходимости приобретать отдельный прибор для ВЭЖХ для обеспечения большей эффективности и быстреего разделения.
- ▶ *Монолиты* – монолитные колонки являются альтернативой колонкам, заполненным частицами.

Такие колонки состоят из одного куска монолитного кремния. Монолитные колонки имеют два типа пор: большие макропоры (2.0 мкм) обеспечивают высокую скорость потока с низким давлением, а меньшие мезопоры (13.0 нм) обеспечивают большую площадь поверхности для лучшей эффективности разделения. Используя монолитные колонки в традиционном приборе для ВЭЖХ, возможно проводить анализы с высокой скоростью без снижения эффективности разделения.⁴

- ▶ *Гидрофильная ВЭЖХ (HILIC)* – нормально-фазовый вид разделения (так как неподвижная фаза гидрофильная), но использует элюенты для ВЭЖХ из обращено-фазового режима. Элюент обычно состоит из высококонцентрированного смешиваемого с водой органического растворителя (обычно ацетонитрила) и небольшого количества воды или буфера.⁵

1.3 Ультра-высокоэффективная жидкостная хроматография (УВЭЖХ)

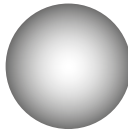



Скорость процесса во все времена была движущей силой развития ВЭЖХ. Известно, что пропускная способность и эффективность разделения в хроматографии увеличивается с уменьшением размера частиц, упакованных в колонку*.

Меньший размер частиц также означает увеличение давления в системе. С начала 70-х гг. и до 2004 г. работа большинства систем ВЭЖХ была ограничена давлением 6000 psi. Это не позволяло использовать частицы размером менее 3 мкм (в Таблице 2 приведена эволюция размера частиц), ограничивая тем самым скорость и эффективность разделения, которые могли бы

быть достигнуты. Инновационные исследования доктора Джеймса Йоргенсена и его коллег в середине 1990х показали, что значительно большая эффективность и сверхбыстрое разделение могут быть достигнуты при очень большом давлении в капиллярных колонках, заполненных частицами силикагеля с нанопорами диаметром менее 2 мкм.⁶ Эти исследования положили начало методу УВЭЖХ. В 2004 г. компания Waters® представила первую коммерческую систему для УВЭЖХ – Acquity Ultra Performance Liquid Chromatography (UPLC®) – с рабочим давлением до 15000 psi и колонкой, упакованной частицами размером менее 2 мкм.

**Из уравнения Ван Деемтера следует, что с уменьшением размера частиц эффективность разделения увеличивается даже при увеличении скорости потока. Уравнение соотносит высоту теоретической тарелки колонки, являющуюся мерой эффективности, с линейной скоростью подвижной фазы, учитывая физические, кинетические и термодинамические свойства разделения.*

Таблица 2. Эволюция размеров частиц в ВЭЖХ.⁷ Уменьшение размера частиц требует увеличения рабочего давления

1970	1980-ые	1990-ые	Наше время
			
10 мкм	5 мкм	3 мкм	< 2 мкм

Меньший размер частиц обеспечивает лучшее разрешение из-за большей эффективности разделения и чувствительности. Разделение с использованием частиц размерами менее 2 мкм обеспечивает на 70% большее разрешение и втрое большую эффективность по сравнению с частицами диаметром 5 мкм, что делает их использование идеальным для анализа сложных смесей. Маленькие частицы обеспечивают большую скорость проведения анализа при использовании большей скорости потока либо более короткой колонки. Фактически, используя

короткую колонку, можно добиться десятикратного увеличения скорости анализа без потери эффективности. Дополнительными преимуществами использования частиц размерами менее 2 мкм являются:

- ▶ Большая чувствительность, т.к. пики становятся выше и уже
- ▶ Стандартные методы ВЭЖХ могут использоваться для УВЭЖХ с тем же типом колонок
- ▶ Меньший расход элюента, т.к. время установления равновесия и время анализа уменьшаются

1.4 Детекторы

Исследуемые вещества имеют различные характеристики, поэтому используется множество различных детекторов, некоторые из которых описаны ниже:

- ▶ *Ультрафиолетовый детектор* (далее по тексту УФ-детектор) – очень широко распространенный тип детекторов. Используется для веществ, способных поглощать ультрафиолетовое излучение. Фотометрические детекторы в свою очередь подразделяются на детекторы с фиксированной длиной волны, детекторы со сменной длиной волны и детекторы с фотодиодной матрицей. Последние интересны тем, что дают спектр элюированных пиков, полезный для идентификации пика и мониторинга одновременно элюирующих с ним пиков.
- ▶ Для флуоресцирующих веществ используются *флуоресцентные детекторы*.
- ▶ Когда вещество не способно к флуоресценции и абсорбции УФ-излучения, используют более

универсальный детектор, например *испарительный детектор светорассеяния*.

- ▶ Идеальным детектором для ВЭЖХ является *масс-спектрометр* (далее по тексту МС-детектор), так как он дает количественную информацию, и, в большинстве случаев, качественную информацию по каждому компоненту. МС-детектор ионизирует пробу и использует анализатор массы для определения силы тока ионов. Наиболее распространенный источник ионов для МС-детектора – ионизация электроспреем (ESI). В зависимости от свойств анализируемые вещества могут быть детектированы в условиях положительного (ESI+) или отрицательного (ESI-) электроспрея.

Для сбора более подробной информации об анализируемом веществе могут быть последовательно применены детекторы разных типов.

1.5 Подвижная фаза/растворитель/элюент

Подвижная фаза в обращено-фазовой ВЭЖХ – это смесь воды (100% воды, вода с модификатором или буфер) с органическим растворителем. Элюирование растворителем может быть изократическим или градиентным. При изократическом элюировании состав подвижной фазы сохраняется постоянным на протяжении всего процесса разделения компонентов. При градиентном элюировании состав подвижной фазы

меняется во время разделения. В ходе разделения компонентов элюирующая сила подвижной фазы увеличивается (т.е. увеличивается количество органического растворителя), для того чтобы смогли элюироваться наиболее сильно удерживаемые компоненты пробы. Градиентное элюирование подходит для проб, содержащих компоненты, сильно различающиеся по полярности.

1.6 Качество растворителя критично для обращённо-фазовой ВЭЖХ

Для растворителей, используемых в ВЭЖХ, существует несколько различных типов или градаций по степени чистоты: HPLC, LC-MS, ULC/MS. Надежный источник воды – это сверхчистая вода из эффективной системы очистки. Вода различной степени очистки различается по уровню содержания примесей, потенциально влияющих на разделение компонентов.

- ▶ *Органические примеси.* Эти примеси должны содержаться в минимально возможной концентрации, так как органические молекулы накапливаются в колонке и позже элюируются в виде ложных пиков. Также они могут вызвать смещение базовой линии. Если примеси не элюируются и накапливаются в колонке, колонку следует заменить. Воду высокой степени очистки с низким уровнем содержания органики можно получить, используя комбинацию различных технологий очистки, описанных в следующем разделе.
- ▶ *Ионы.* С распространением использования масс-спектрометрии в качестве детектора для систем ВЭЖХ ионная чистота водной составляющей подвижной фазы становится особенно важной. Ионы металлов образуют аддукты с исследуемым веществом при использовании наиболее распространенного способа ионизации электроспреем (ESI+). Ионная чистота воды характеризуется ее удельным сопротивлением. При удельном сопротивлении

18.2 МОм·см сумма концентраций всех ионов не превышает 1 мкг/л. Получить такое значение и в данном случае можно лишь с использованием комбинации различных технологий очистки воды.

- ▶ *Частицы.* Наличие частиц в воде, используемой для приготовления элюента, может привести к засорению колонки. Это приведет к увеличению давления в системе. На выходе системы очистки воды находится мембрана с размером пор 0.22 мкм, поэтому вода, прошедшая через эту систему, не содержит частиц, влияющих на работу системы для ВЭЖХ.
- ▶ *Бактерии.* Мембрана с размером пор 0.22 мкм также позволяет снизить уровень содержания бактерий в очищенной воде. Бактерии влияют на работу колонки также как частицы. Помимо этого они служат источником побочных загрязнений (органика и ионы), которые, как было отмечено ранее, влияют на разделение компонентов.

2. Производство сверхчистой воды для ВЭЖХ

Идеальным источником очищенной воды для ВЭЖХ является свежеприготовленная сверхчистая вода из эффективной и надежной системы очистки. В этом разделе описаны различные технологии очистки воды и их комбинации для производства сверхчистой воды.

2.1 Типы очищенной воды

Производителями систем очистки воды предложена классификация очищенной воды для лабораторных нужд по трем типам.

- ▶ Тип 3: рекомендован для мытья посуды, водяных бань и автоклавов либо как источник воды для систем очистки производящих воду типа 1.
- ▶ Тип 2: также называемый «очищенная вода», используется в основных лабораторных приложениях, таких как приготовление буферов, pH растворов и микробиологических сред; как источник воды клинических анализаторов, инкубаторов клеточных культур, климатических камер и для систем очистки, производящих воду типа 1; а также для приготовления реагентов для химического анализа или синтеза.
- ▶ Тип 1: также называемый «сверхчистая вода», требуется в особо чувствительных приложениях, таких как ВЭЖХ, масс-спектрометрия с индуктивно связанной плазмой (ICP-MS), газовая хроматография и других смежных методах анализа. В ВЭЖХ используется для приготовления подвижной фазы, бланков и разведения пробы. Вода Типа 1 также требуется для приготовления буферов и культуральных сред для клеточных культур млекопитающих; производства реагентов для молекулярно-генетических задач (секвенирование ДНК, ПЦР); для приготовления растворов для электрофореза и иммуноблоттинга.

ASTM® предлагает спецификацию для воды высокой степени очистки для аналитической химии (D1193-06) как Тип 1 (Type 1). ISO® (3696) предлагает спецификацию для воды высокой степени очистки как Степень очистки 1 (Grade 1).^{8,9}

Производители систем очистки воды определили спецификации для каждого типа. В Таблице 3 приведены спецификации для различных типов воды, производимой системами Merck Millipore.

Таблица 3. Спецификации для различных типов воды, производимой системами очистки воды Merck Millipore.

Примеси	Параметры и единицы	Тип 3	Тип 2	Тип 1
Ионы	Сопротивление (МОм·см при 25°C)	>0.05	>5.0	>18.0
Органика	ТОС (ppb)	<200	<30	<5
Частицы	Частицы > 0.2 мкм (частиц/мл)	NA	<1*	<1*
Бактерии	Бактерии (КОЕ/мл)	<1000	<0.1*	<0.1*

*с фильтром Millipak® Express 0.22 мкм

2.2 Очистка воды – Введение

Для производства воды Типа 1 (также называемой сверхчистой водой) используется комбинация различных технологий очистки для эффективного удаления примесей. Очистка воды может быть разделена на два основных этапа: подготовительный этап, в ходе которого удаляется от 95 до 99% примесей, изначально пред-

ставленных в воде, и так называемый финишный этап очистки, в ходе которого удаляются оставшиеся примеси до получения сверхчистой воды. (Рисунок 3).

В следующем разделе описаны основные технологии каждого этапа в порядке их использования в системе очистки воды.

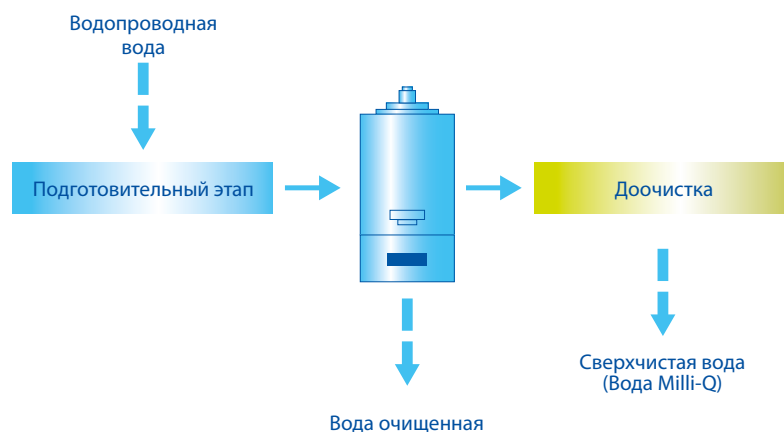


Рисунок 3. Схема очистки воды

2.3 Подготовительный этап очистки (первая ступень)

На подготовительном этапе удаляется основной объем примесей, присутствующих в воде. Используются три основных технологии: обратный осмос, электродеионизация и бактерицидное УФ-облучение.

- ▶ а. Обратный осмос
- ▶ б. Электродеионизация
- ▶ с. Бактерицидное УФ-облучение

2.3а Обратный осмос

Обратный осмос (далее по тексту – ОО) стал стандартной технологией начальной подготовки воды, используемой в лабораторных системах очистки. ОО мембрана позволяет удалить большинство самых разнообразных примесей и поэтому обычно именно с прохождения через ОО мембрану начинается процесс очистки. ОО мембрана состоит из двух слоев: первый, более толстый слой, придает мембране жесткость, в то время как второй, более тонкий, имеющий маленькие поры, фактически и является фильтром (Рисунок 4). Поток воды направлен тангенциально по отношению к мембране, что предотвращает закупоривание ее пор. Очищенная вода собирается в центре закрученной в спираль мембраны (Рисунок 5).

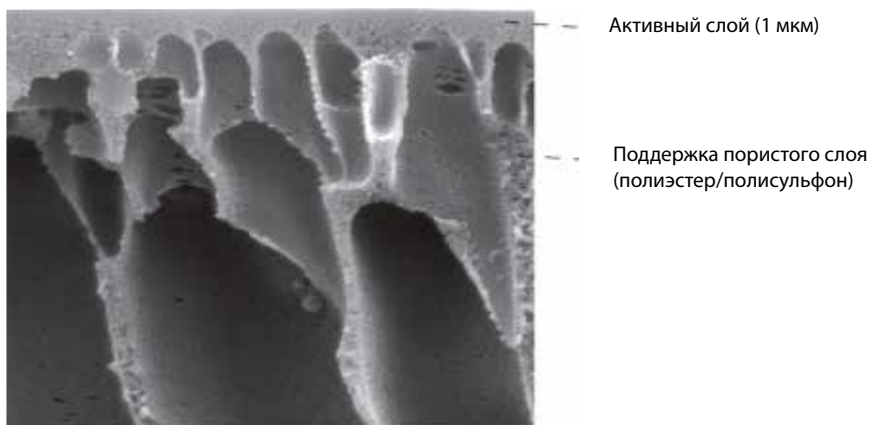


Рисунок 4. Обратноосмотическая мембрана

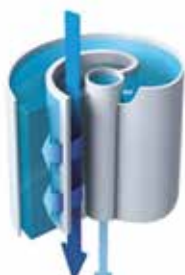


Рисунок 5. Схема потока воды в ОО мембране. Очищенная вода (светло-голубая) собирается в центре мембраны.

Ионы удаляются ОО мембраной в зависимости от заряда, размера и гидратации (Таблица 4). Бивалентные ионы удаляются в количестве >99%, в то время как моновалентные удаляются не так эффективно¹⁰. Общий процент режекции (удаления) ионов обычно составляет более 95% и используется как контрольное измерение для оценки эффективности работы ОО мембраны.

Таблица 4. Типичная режекция ионов. Концентрация приведена в единицах ppb (мкг/л).

Ионы	Водопроводная вода	ОО пермеат	% Режекции
Li ⁺	2.9	0.19	93.4
Na ⁺	14599	1868	87.2
K ⁺	3138	371	88.2
Mg ²⁺	6438	2	99.7
Ca ²⁺	106502	584	99.5
F ⁻	578	6	99.0
Cl ⁻	45477	831	98.2
NO ₃ ⁻	13843	1756	87.3
SO ₄ ²⁻	117546	232	99.8
Общая режекция			97.8

Высокомолекулярные органические соединения хорошо фильтруются ОО мембраной, в то время как низкомолекулярная и более гидрофильная органика имеет более высокое сродство к ОО мембране и может проходить через неё с лёгкостью.

Общая режекция органики зависит от состава водопроводной воды (Таблица 5). Режекция коллоидов и частиц составляет более 99%.

Таблица 5. Типичная эффективность ОО в удалении органики. Значения содержания ТОС представлены в единицах ppb (мкг/л).

Водопроводная вода	После ОО
1410	64
1180	38

Для защиты ОО мембраны перед ней устанавливают картридж предварительной очистки. Обычно картридж состоит из активированного угля, снижающего количество окислителей (хлор, хлорамин), повреждающих мембрану. Также картридж содержит фильтр грубой очистки, удаляющий большие частицы. Дополнительно часто используют полифосфаты для смягчения воды.

2.3b Электродеионизация

Вслед за ОО мембраной вода попадает в модуль электродеионизации (далее по тексту – EDI), удаляющий неорганические ионы и заряженные органические соединения. Технология EDI – это комбинация электродиализа, селективных полупроницаемых мембран и ионообменных (IEX) смол, позволяющая эффективно проводить деионизацию воды и непрерывно регенерировать ионообменные смолы электрическим током.

Электрохимическая регенерация заменяет традиционную химическую регенерацию ионообменных смол. EDI модуль состоит из ряда «ячеек», расположенных между двумя электродами. Каждая ячейка ограничена катион-проницаемой мембраной с одной стороны и анион-проницаемой мембраной с другой. Пространство между мембранами двух разных типов заполнено ионообменной смолой для увеличения массового переноса. Ионообменные смолы захватывают ионы из входящей воды. Электрический ток, направленный поперек модуля, направляет ионы к электроду через селективную мембрану. Катионы направляются через катион-проницаемую мембрану к катоду, а анионы через анион-проницаемую мембрану к аноду. Добравшись до мембраны с противоположным зарядом, ион не может двигаться дальше по направлению к электроду. Таким образом, ионы накапливаются в пространстве между ячейками – так называемых каналах с «концентратом». Содержимое этих каналов направляется в слив. По соседству с каналами с «концентратом» образуются каналы с водой, очищенной от ионов.

Чем дальше вода идет по этим каналам, тем большее количество ионов переходит в соседние каналы с «концентратом».

Под действием электрического поля происходит расщепление H_2O на ионы H^+ и OH^- , которые регенерируют ионообменные смолы, позволяя избежать химической регенерации.^{11,12}

Комбинация ОО и EDI является мощной подготовкой воды. Она обеспечивает стабильное производство воды Тип 2. Удельное сопротивление воды обычно более 10 МОм·см а содержание общего органического углерода (далее по тексту – ТОС) менее 30 ppb.¹³

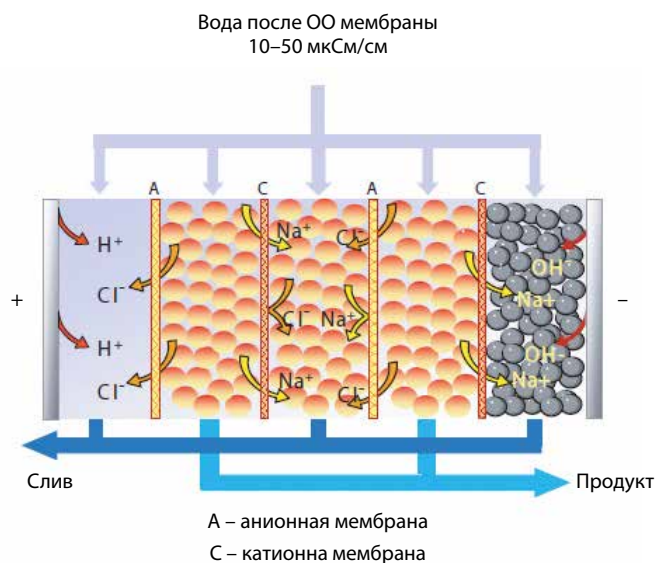


Рисунок 6. Схема модуля электродеионизации Merck Millipore (Elix®).

2.3с Бактерицидное УФ-облучение

Ртутные лампы низкого давления, излучающие на 254 нм, долгое время использовались в лабораторных системах очистки воды, а теперь также используются и в подготовке питьевой воды. УФ-лампы 254 нм деактивируют микроорганизмы и предотвращают бактериальный рост и загрязнение системы очистки воды.¹⁴ Наибольший биологический эффект достигается на генетическом уровне.

Максимальное поглощение бактериальной ДНК происходит на 265 нм, что приводит к изменению молекулы ДНК.¹⁵ Это приводит к снижению метаболизма бактерий и предотвращает их пролиферацию.

УФ-лампы используются в линии очистки воды, а также в резервуарах для снижения уровня содержания бактерий.

2.4 Финишный этап очистки (вторая ступень)

Вслед за подготовительным этапом вода временно хранится в специально подготовленном резервуаре перед финишной очисткой. Для уменьшения уровня загрязнения воды важно минимизировать время хранения воды. Однако хранение необходимо, так как подготовительные технологии (ОО, EDI) производят воду со скоростью несколько литров в час, в то время как отбор сверхчистой воды идет со скоростью несколько литров в минуту. Следовательно, для

быстрого отбора необходимо накапливать подготовленную воду.

Доочистка обычно сочетает три технологии: ионообменные смолы, синтетический активированный уголь и УФ-фотоокисление. Часто также в точке отбора воды устанавливается фильтр финишной очистки.

- ▶ Ионообменные смолы
- ▶ Синтетический активированный уголь
- ▶ УФ-фотоокисление

2.4a Ионообменные смолы

Ионообменные смолы – это маленькие (<1.2 мм) шарики на основе полистирола с активными центрами, ковалентно связанными с частицами на поверхности и внутри. Ионообменные смолы Merck Millipore марки Jetpore® характеризуются большой емкостью и кинетикой обмена для обеспечения высокого удельного сопротивления и низкого ТОС в производимой воде. Цель ионообменных смол – удаление ионов и производство воды с удельным сопротивлением 18.2 МОм·см.

2.4b Синтетический активированный уголь

Синтетический активированный уголь производится контролируемым пиролизом полистироловых шариков. Активированный уголь имеет большую площадь поверхности (>1000 м²/г) и связывает органические молекулы на стенках пор силами Ван-дер-Ваальса, П-П или гидрофобными взаимодействиями. Существует несколько типов активированного угля. При выборе материала для очистки воды проводится тщательный подбор наиболее эффективного и чистого активированного угля.

Ионообменные смолы и активированный уголь имеют определенный ограниченный ресурс

и объединены в картриджи, подлежащие регулярной замене.

2.4c УФ-фотоокисление

УФ-фотоокисление на длинах волн 185 и 254 нм в наши дни – это широко используемая технология для снижения уровня ТОС до значений нескольких ppb (мкг/л). УФ 185 нм излучают лампы из синтетического кварца. Это высокоэнергетическое излучение совместно с излучением на длине волны 254 нм индуцирует образование активных гидроксид-радикалов (-ОН). Также излучение на длине волны 185 нм вызывает распад воды с образованием тех же радикалов. Радикал имеет очень высокий окислительно-восстановительный потенциал (2.80 вольт) и является ключевым звеном в процессе окисления органической молекулы. Органика окисляется до органических кислот и, в конечном счете, до углекислоты в равновесии с карбонатом и бикарбонатом. Эти ионизированные соединения удаляются ионообменными смолами, расположенными вслед за УФ-лампой.^{16,17,18} Следует отметить, что в ходе этого процесса органический углерод в органических молекулах превращается в неорганический углерод в угольной кислоте. Таким образом, в ходе фотоокисления снижается уровень ТОС.

2.5 Комбинация технологий

Комбинация описанных выше технологий второй ступени очистки – ионообменные смолы, синтетический активированный уголь и УФ-фотоокисление – позволяет получить воду с низким содержанием ТОС (< 5 ppb). Три технологии

необходимы для поддержания низкого уровня ТОС. Как показано на Рисунке 7, комбинации двух технологий недостаточно для достижения такого низкого уровня ТОС.

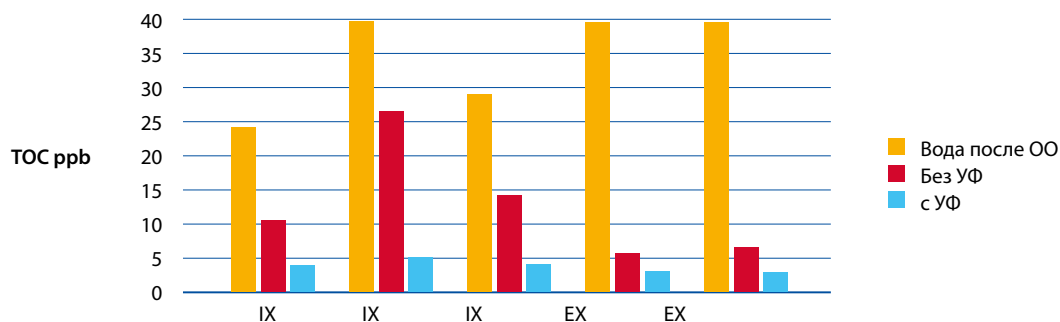


Рисунок 7. Данные, демонстрирующие важность комбинирования разных технологий для снижения уровня ТОС в сверхчистой воде. Оранжевый: уровень ТОС в воде после ОО; красный: уровень ТОС без УФ-фотоокисления; голубой: уровень ТОС с УФ-фотоокислением. IX: только ионообменные смолы; EX: ионообменные смолы + синтетический активированный уголь.

Когда УФ-фотоокисление «выключено» (красные столбики), небольшое количество органики удаляется ионообменными смолами (IX). Результат ожидаемый, так как смола удерживает только заряженные органические компоненты (аммоний, органические кислоты и т.д.). Использование активированного угля в сочетании с ионообменной смолой (EX на графике) снижает уровень органики в этом эксперименте до значений 5–10 ppb. Когда УФ-фотоокисление «включено» (синие столбики), органика распадается до угольной кислоты, и уровень ТОС снижается. Эксперимент подтверждает это. Комбинация УФ-фотоокисления и ионообменной смолы (IX) позволяет получить уровень ТОС 5 ppb. Наилучшей и наиболее надежной комбинацией технологий,

обеспечивающей уровень ТОС < 5 ppb, является комбинация синтетического активированного угля, УФ-фотоокисления и ионообменной смолы (EX). Эта комбинация выбрана для систем очистки воды для ВЭЖХ и связанных с ней работ.

Как показано на Рисунке 8, технологии очистки воды скомбинированы и организованы в оптимальной последовательности для обеспечения наилучшего результата. Периодическая рециркуляция позволяет поддерживать качество воды в период между её отборами. Материалы системы очистки, находящиеся в непосредственном контакте с водой, тщательно подобраны и гарантируют минимальное выделение органических и неорганических примесей.

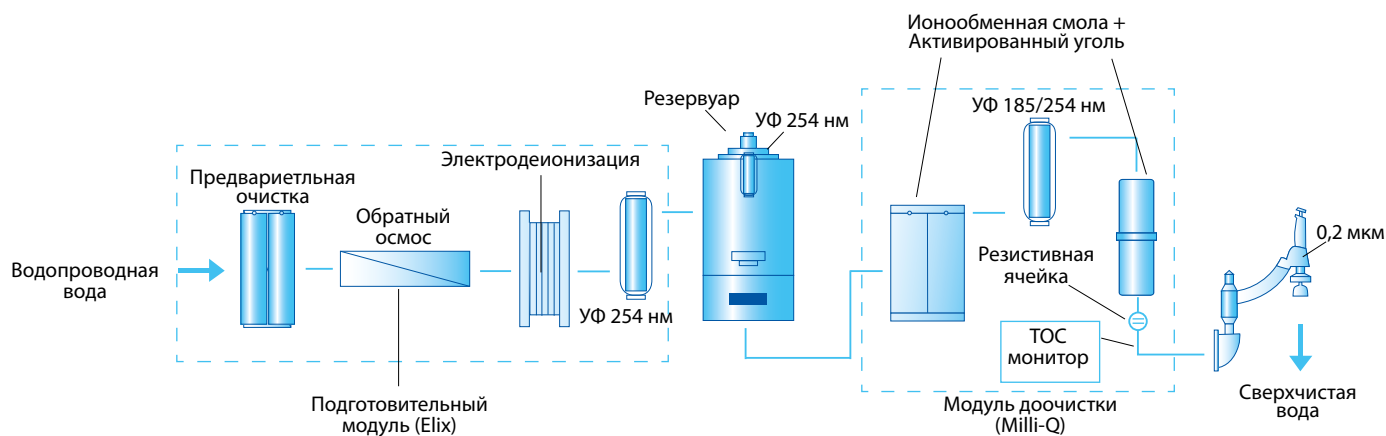


Рисунок 8. Схема линии очистки воды для получения сверхчистой воды для ВЭЖХ.

2.6 Финишные фильтры в точке отбора воды

В конце линии очистки воды находится фильтр финишной очистки, несущий две основные функции: (1) дополнительная очистка перед использованием и (2) предотвращение загрязнения системы из окружающей среды. Финишный фильтр выбирается в зависимости от приборов и исследований, проводимых в лаборатории. В случае с жидкостной хроматографией существуют два направления: фокус на низкое содержание частиц и бактерий и фокус на удаление остатков органики из сверхчистой воды. Выбор или комбинация типов фильтров зависят от необходимого уровня чувствительности, типа прибора и детектора.

Финишные фильтры, используемые для ВЭЖХ, ЖХ-МС и УВЭЖХ, бывают двух типов: фильтр 0,22 мкм и картридж на основе C18. Мембранный фильтр 0,22 мкм задерживает частицы размером более 0,22 мкм и бактерии. Мембранные фильтры Merck Millipore, например фильтр Millipak, валидированы для стерилизующей фильтрации и поставляются с сертификатом качества. Фильтр 0,22 мкм часто применяется для хроматографии. Реже, когда небольшие пики, вызванные примесями в воде, являются серьезной помехой, используется картридж на основе частиц C18 (смотри Раздел 3.7).

2.7 Контроль качества производимой воды в режиме реального времени

Контроль качества является неотъемлемой составляющей процесса очистки воды. Система контроля качества большинства лабораторий содержит проверку соответствия текущего качества воды заявленным спецификациям системы очистки и соответствующего приложения. Кроме того, гарантия качества воды позволяет при возникновении проблем быть уверенным, что проблема не исходит от воды, и исключить этот параметр из рассмотрения.

Для оперативной информации о качестве производимой воды системы Merck Millipore оборудованы двумя типами контрольных приборов:

- ▶ а. Контроль удельного сопротивления
- ▶ б. Контроль ТОС

2.7а Контроль удельного сопротивления

Сопротивление несет информацию о содержании ионов в воде. Так как никакой информации о специфичных ионах получить нельзя, сопротивление используется как ключевой показатель для определения качества воды Типа 1. Сопротивление является обратной величиной удельной проводимости (Уравнение 1, Таблица б) и выражается

в МОм•см. Проводимость – это вклад всех содержащихся в воде ионов (Уравнение 2), выраженный в мкСм/см. Проводимость и сопротивление зависят от температуры воды через коэффициент подвижности ионов. Для унификации измерений решено выражать сопротивление и проводимость в единицах, приведенных к 25°C.^{19,20}

В отсутствие ионов вода может диссоциировать на ион гидроксония и гидроксильный ион в концентрации близкой к 10^{-7} М (рН 6,998).²¹ Вклад H_3O^+ и OH^- в проводимость подсчитана и составляет 0,055 мкСм/см. Отметим, что это значение является минимальным теоретическим и соответствует ситуации, когда никакие ионы кроме H_3O^+ и OH^- не вносят вклад в проводимость. Соответствующее теоретическое максимальное сопротивление равно 18.2 МОм•см. Таким образом, когда система очистки воды показывает сопротивление 18.2 МОм•см, это гарантирует отсутствие ионов в сверхчистой воде (общая концентрация ионов < 1 ppb).

Сопротивление измеряется в режиме реального времени, а результаты измерения отображаются на дисплее системы очистки воды.

Таблица 6. Уравнения, связывающие сопротивление и проводимость

№	Уравнение	Комментарии
1	$R = \frac{1}{X}$	Связь сопротивления и проводимости. X – проводимость, R – сопротивление.
2	$x = F \sum C_i z_i \mu_i$	Уравнение, определяющее проводимость, где x – проводимость, F – постоянная Фарадея, C_i – концентрация каждого иона, z_i – валентность иона, а μ_i – подвижность иона.
3	$x = 0.055$ мкСм/см при 25 °C, $R = \frac{1}{X} = 18.2$ МОм•см	Значения проводимости и сопротивления в отсутствие ионов (сверхчистая вода).

2.7b Контроль содержания общего органического углерода (ТОС)

Контроль органических примесей осуществляется с помощью измерения ТОС. Значение ТОС говорит об общем содержании органических примесей в воде, не выделяя специфические вещества.¹⁸ Выражается в единицах ppb (ppb = частей на миллиард = мкг/л). В воде высокой степени очистки значение ТОС должно быть меньше 5 ppb. Измерение ТОС в сверхчистой воде требует свести к минимуму потенциальное загрязнение из окружающей среды, от реагентов, при хранении воды и из используемых контейнеров. Поэтому контроль ТОС в режиме реального времени с помощью фотоокисления является лучшим решением для сверхчистой воды. Этот метод не эффективен для воды с высоким содержанием органики, ионов и частиц. В системах очистки воды Merck Millipore небольшое ко-

личество воды (500мкл) отбирается в проточную ячейку, в которой происходит полное окисление присутствующих в данной аликвоте органических компонентов. Органика распадается на CO_2 , вступающий в реакцию с водой и производящий угольную кислоту в равновесии с бикарбонатом. Рост содержания бикарбоната может быть измерен, и это значение соотносится с начальной концентрацией органических примесей. Данный метод измерения ТОС валидирован, включая программное обеспечение.

Значения ТОС, измеренные системой и отображаемые на экране, полностью соответствуют измерениям внешнего прибора с использованием другой технологии (Рисунок 9).

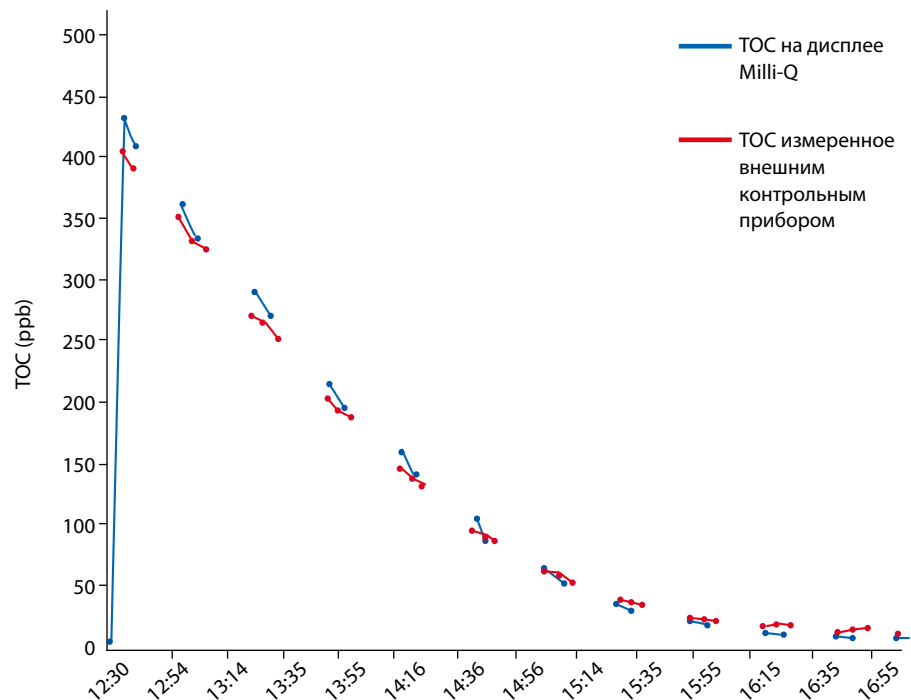



Рисунок 9. Сравнение измерений ТОС системой Milli-Q и внешним ТОС-метром (Shimadzu® TOC VWS) демонстрирует отличное соответствие двух измерений во времени для низких и высоких значений ТОС.



3. Преимущества сверхчистой воды: Практические эксперименты

В данном разделе описано несколько экспериментов, наглядно демонстрирующих преимущества использования свежеприготовленной сверхчистой воды для ВЭЖХ и/или специфических методов детектирования. Эксперименты проводились в разных лабораториях: Merck Millipore R&D, лабораториях производителей аналитических приборов, исследовательских лабораториях университетов. Сверхчистую воду во всех экспериментах получали из системы Milli-Q, источником воды для которой служила система Elix. Система Milli-Q оборудована ячейками измерения удельного сопротивления и ТОС-монитором, работающими в режиме реального времени. Если не указано иное, использовался фильтр финишной очистки 0.22 мкм (Millipak).

3.1 Важность низкого уровня ТОС в сверхчистой воде, используемой для приготовления элюента

Три серии экспериментов, описанных в этом разделе, демонстрируют преимущества использования сверхчистой воды с низким содержанием ТОС.

- ▶ а. Градиентный профиль сверхчистой воды с разным уровнем ТОС.
- ▶ б. Сравнение бутилированной воды для ВЭЖХ от разных производителей: уровень ТОС и градиентный профиль (ВЭЖХ-УФ и ЖХ-МС).
- ▶ с. Важность УФ-фотоокисления при производстве сверхчистой воды для ЖХ-МС.

3.1a Градиентный профиль сверхчистой воды с разным уровнем ТОС.²²

ТОС – это индикатор органических примесей в воде. Органические примеси из водной подвижной фазы накапливаются в колонке и выходят в виде пиков. Для демонстрации эффекта органического загрязнения сверхчистая вода с разным содержанием ТОС вводилась в колонку до градиентного элюирования. Сравнивались градиентные профили.

Результаты

На Рисунке 10 представлены хроматограммы (214 нм) сверхчистой воды с разным уровнем ТОС. При 2 ppb (мкг/л) присутствуют лишь незначительные пики. С ростом ТОС от 5 до 20 ppb наблюдается больше пиков с нарастающей интенсивностью.

Условия эксперимента

Прибор	Waters Alliance® 2695
Waters 2996 PDA	Symmetry® C18, 3.5 µm, 4.6 x 150 mm
Подвижная фаза A B	Вода (Milli-Q Gradient) Ацетонитрил (для ВЭЖХ J.T. Baker®)
Объем	60 мл
Градиентный профиль	95% – 0% A 30 мин 0% A 10 мин
Поток	0,25 мл/мин
Уровень ТОС исследованной воды	2,5,9,13,20 ppb (ТОС-измерение в режиме реального времени)

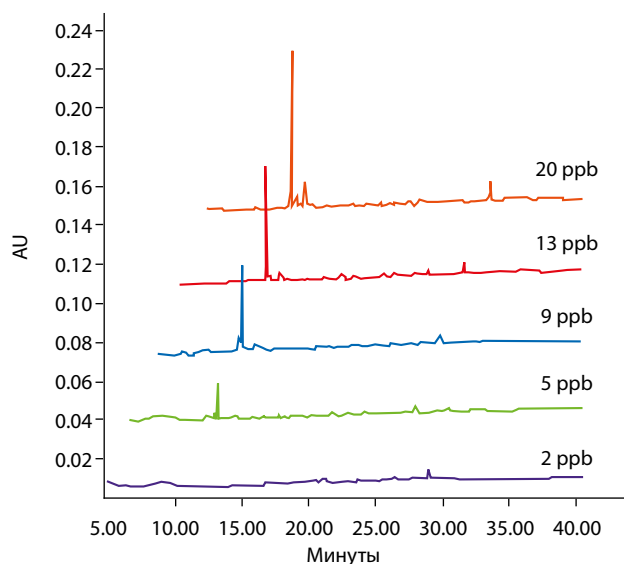


Рисунок 10. Хроматограммы (214 нм) сверхчистой воды с разным уровнем ТОС.

3.1b Сравнение бутилированной воды для ВЭЖХ разных производителей: уровень ТОС и градиентный профиль (ВЭЖХ-УФ и ЖХ-МС)²³

Бутилированная вода для ВЭЖХ – распространенный источник воды для приготовления подвижной фазы, не имеющий спецификации уровня ТОС. В данном эксперименте были проведены автономные измерения ТОС воды некоторых известных производителей. Градиентные профили получали после предварительного концентрирования воды в колонке перед элюированием.

Результаты

Как показано в Таблице 7, уровень ТОС в бутилированной воде для ВЭЖХ может достигать 777 ppb. Наименьший уровень ТОС в бутилированной воде для ВЭЖХ оказался равным 25,5 ppb, что более чем в три раза выше, чем уровень ТОС в свежеприготовленной сверхчистой воде.

Условия эксперимента

ВЭЖХ-УФ

Прибор	Waters 510 ВЭЖХ Waters 411 УФ детектор
Колонка	μ-Bondapak™ C18, 3.9 x 300 мм
Подвижная фаза А В	Вода Ацетонитрил (J.T. Baker®)
Объем	50 мл
Градиентный профиль	100% – 0% А 16 мин
Поток	2 мл/мин

ТОС измерения: Sievers™ модель 800 ТОС Анализатор

ЖХ-МС

Прибор	Agilent® 1100 ВЭЖХ Applied Biosystems® Mariner® ESI-ToF-MS
Колонка	Primesphere™ C18, 2.1 x 50 мм
Подвижная фаза А В	98% вода, 2% ацетонитрил, 0.1% муравьиная кислота 98% ацетонитрил, 2% вода, 0.1% муравьиная кислота
Объем	40 мл
Градиентный профиль	100% – 0% А 10 мин
Поток	0.25 мл/мин

Когда вода накапливалась в колонке C18, органические примеси удерживались гидрофобными частицами. Позже примеси элюировались и были видны в виде пиков на хроматограмме.

Рисунки 11 и 12 соответственно представляют хроматограммы, полученные после УФ- (214 нм) и МС-детекторов, на которых видны несколько пиков, соответствующих органическим примесям в бутилированной воде для ВЭЖХ.

Таблица 7. Автономные измерения уровня ТОС в бутилированной воде для ВЭЖХ

Источник воды	ТОС (ppb)
Бутилированная вода А	100
Бутилированная вода В	87.0
Бутилированная вода С	777
Бутилированная вода D	16.5
Бутилированная вода Е	32.4
Бутилированная вода F	25.5
Свежеприготовленная сверхчистая вода	7.0*

*Он-лайн ТОС монитор показывал ТОС<5 ppb

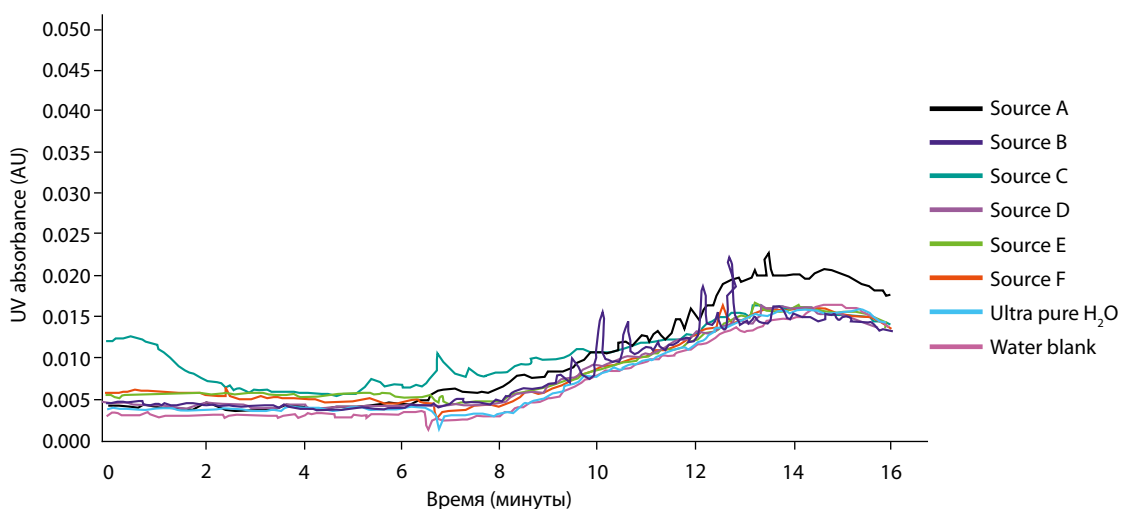


Рисунок 11. Хроматограммы (214 нм) бутилированной воды для ВЭЖХ и свежеприготовленной сверхчистой воды.

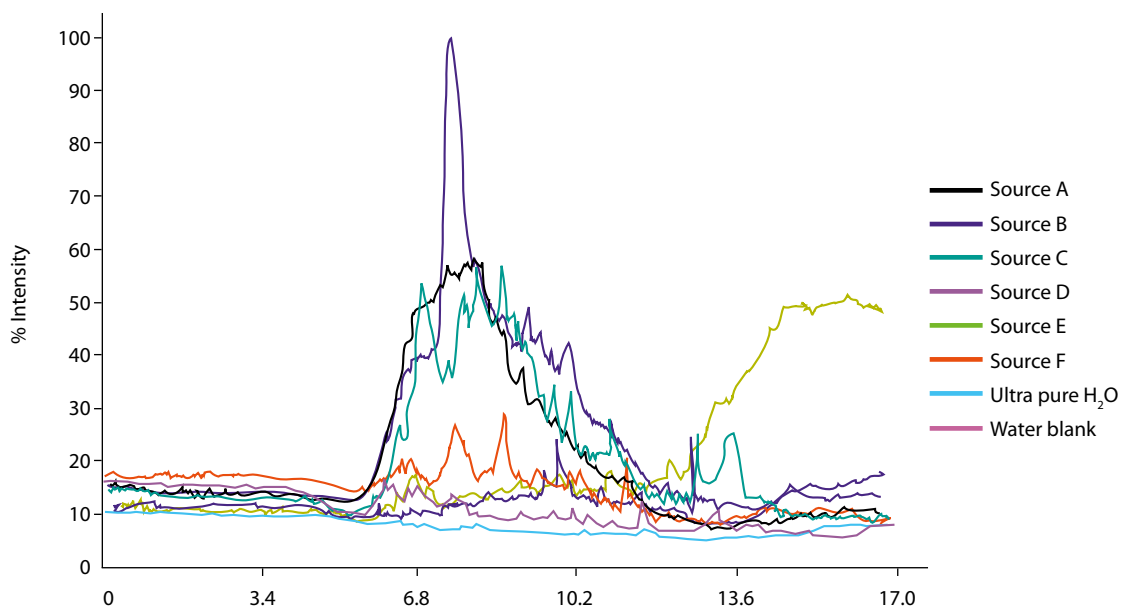


Рисунок 12. Хроматограмма (ESI+) бутилированной воды для ВЭЖХ и свежеприготовленной сверхчистой воды.

3.1с Важность УФ-фотоокисления в производстве сверхчистой воды для ЖХ-МС¹⁶

Низкий уровень ТОС в свежеприготовленной сверхчистой воде достигается с помощью фотоокисления УФ-лампой с длинами волн 185 и 254 нм в сочетании с другими технологиями, такими как обратный осмос, ионообменные смолы и активированный уголь. В процессе фотоокисления образуются активные гидроксильные радикалы, окисляющие органические молекулы.²² Продукты окисления имеют заряд и удерживаются ионообменными смолами. Проведенный эксперимент определил эффект влияния УФ-фотоокисления на содержание органических примесей в сверхчистой воде. Для проведения

эксперимента получали сверхчистую воду с применением УФ-фотоокисления и без него. Пробы воды вводились в колонку C18 перед элюированием.

Результаты

На Рисунке 13 показаны хроматограммы сверхчистой воды, полученной из системы очистки с включенной (голубая линия) и выключенной (красная линия) УФ-лампой. Красная линия имеет больше пиков с более высокой интенсивностью по сравнению с голубой линией. После включения УФ-лампы пики совсем исчезли или их интенсивность значительно снижалась.

Условия эксперимента

Прибор	Agilent 1100 ВЭЖХ Applied Biosystems Mariner ESI-ToF-MS
Колонка	Primesphere C18, 2.1 x 50 мм
Подвижная фаза А В	98% вода, 2% ацетонитрил, 0.1% муравьиная кислота 98% ацетонитрил, 2% вода, 0.1% муравьиная кислота
Объем	40 мл
Градиентный профиль	100% – 0% А 10 мин
Поток	0.25 мл/мин

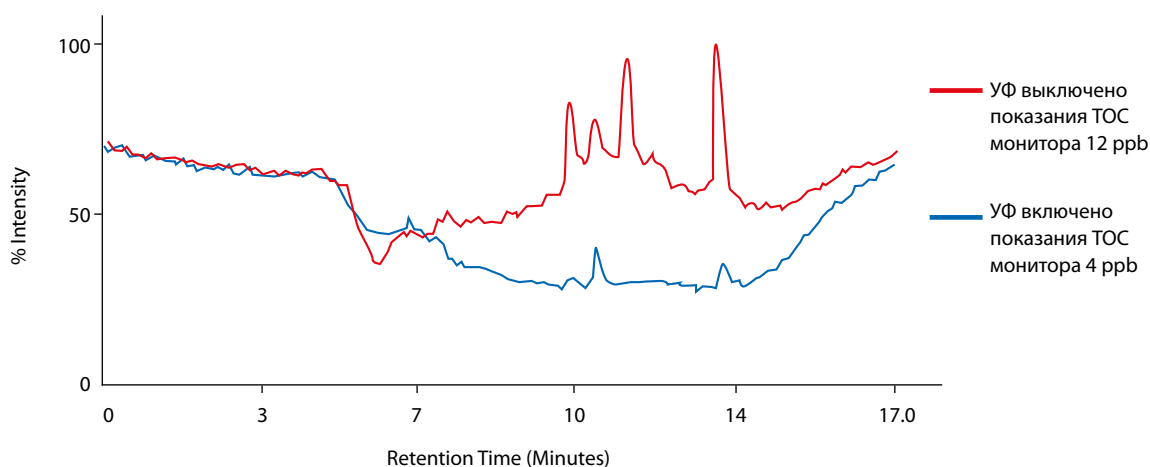


Рисунок 13. Хроматограммы (ESI+) свежеприготовленной сверхчистой воды с использованием УФ-фотоокисления и без него.

Использование свежеприготовленной сверхчистой воды с низким уровнем ТОС улучшает стабильность базовой линии для УФ- и МС-детекторов.

3.2 Долгосрочные эффекты влияния качества воды на разделение ВЭЖХ

Эффект от органических примесей в воде, используемой для приготовления водных растворителей, заметен только по прошествии значительного количества времени. Органика накапливается в колонке и позже проявляется в виде дополнительных пиков, дрейфа базовой линии или потери разрешения. Описанные в данном разделе эксперименты демонстрируют некоторые долгосрочные эффекты, вызванные качеством растворителя для ВЭЖХ.

- ▶ 3.2a Ложные пики и дрейф базовой линии
- ▶ 3.2b Срок службы колонки – эксперимент с денатурирующей ВЭЖХ (ДВЭЖХ)

3.2a Ложные пики и дрейф базовой линии²⁴

Бутилированная вода для ВЭЖХ не имеет спецификации по уровню ТОС. Как показано в Таблице 7, уровень ТОС меняется в зависимости от производителя и значительно превосходит уровень ТОС в свежеприготовленной сверхчистой воде. В данном эксперименте смесь из 7 лекарственных препаратов разделялась с помощью колонки С18 более 1000 раз; в качестве растворителя использовалась вода и ацетонитрил. Для определения долгосрочного эффекта на разделение использовалось два типа воды – свежеприготовленная сверхчистая вода и бутилированная вода для ВЭЖХ.

Результаты

Хроматограммы вводов проб 50, 290, 530, 770, 1010 и 1310 показаны на Рисунках 14А-В (214 нм)

и 14С-Д (254 нм). Ожидалось наблюдение дрейфа базовой линии, особенно на малых длинах волн. Однако сильный дрейф наблюдался при использовании бутилированной воды для ВЭЖХ (Рисунок 14А,С) что позволяет предположить накопление примесей в колонке с течением времени. Подобный дрейф не наблюдается при использовании сверхчистой воды (Рисунок 14В,Д). Еще одно отличие при использовании разных источников воды – появление посторонних пиков при использовании бутилированной воды. Посторонний пик появляется примерно на 5 минуте на хроматограмме 254 нм при вводе #770 (Рисунок 14С). Другой посторонний пик появляется примерно на 15 минуте на хроматограмме 214 нм при вводе #530 (Рисунок 14А). Появление посторонних пиков – другое проявление наличия примесей в подвижной фазе.

Условия эксперимента

Прибор	Waters 510 ВЭЖХ 996 фотодиодный детектор
Колонка	Waters SymmetryShield™ RP18, 3,5мкм 4,6 x 150 мм
Подвижная фаза А В	Вода Ацетонитрил
Градиентный профиль	80% – 30% А 15 мин 30% – 80% А 1 мин 80% А 4 мин
Поток	1 мл/мин
Смесь лекарственных препаратов	0.200 мкг/мл: ацетаминофен, ацетазоламид, фенобарбитал, карбамазепин, дифенин, секобарбитал, набуметон
Объем ввода	25 мкл

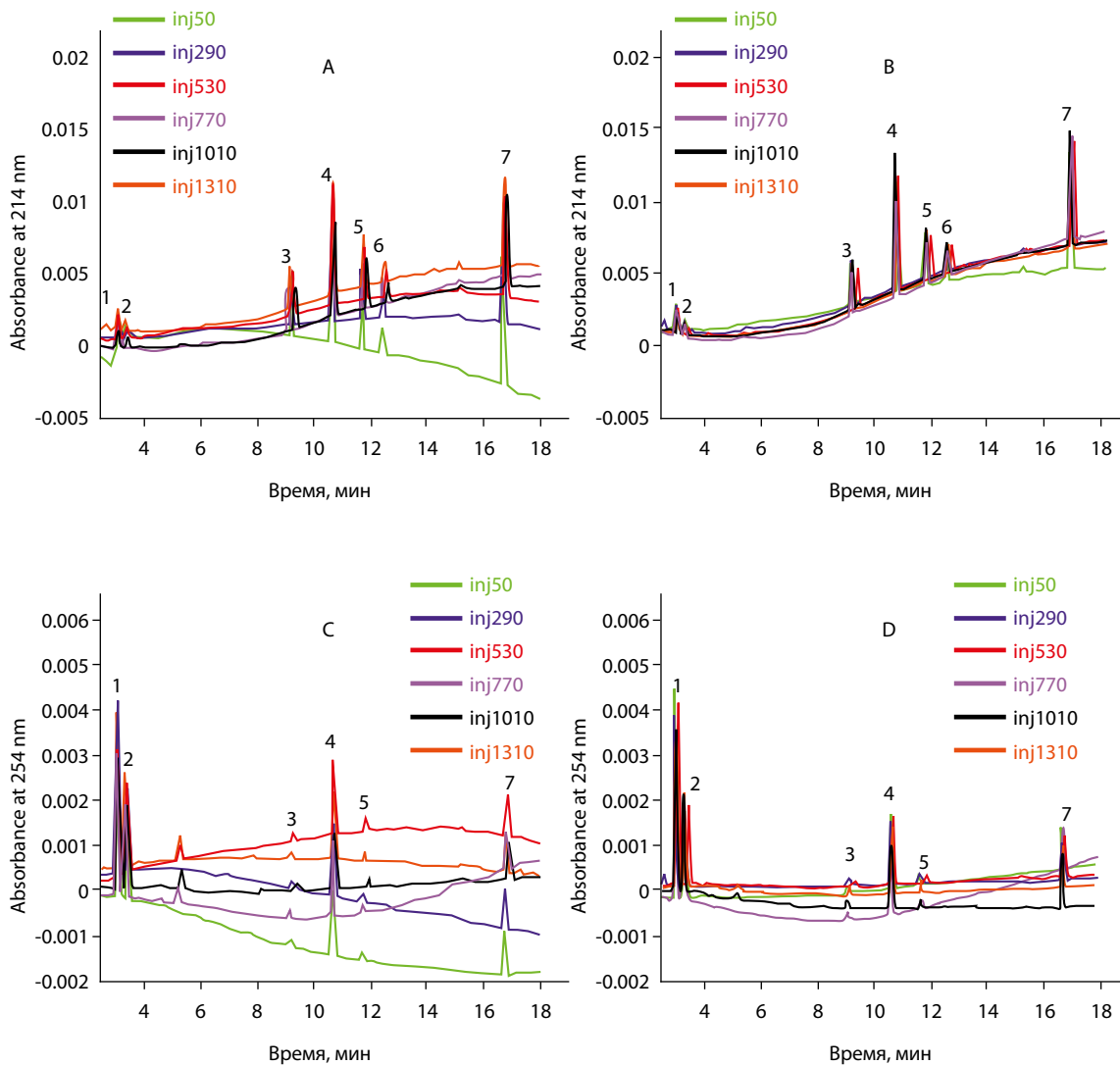


Рисунок 14. Хроматограммы смеси лекарственных препаратов, полученные с использованием двух разных источников очищенной воды в качестве элюента. А: бутилированная вода для ВЭЖХ (214 нм); В: свежеприготовленная сверхчистая вода (214 нм); С: бутилированная вода для ВЭЖХ (254 нм); В: свежеприготовленная сверхчистая вода (254 нм). Смесь лекарственных препаратов: 1-ацетаминофен, 2-ацетазоламид, 3-фенобарбитал, 4-карбамазепин, 5-дифенин, 6-секобарбитал, 7-набуметон

Низкое качество воды может привести к появлению ложных пиков и значительному дрейфу базовой линии.

3.2b Срок службы колонки – эксперимент с денатурирующей ВЭЖХ (ДВЭЖХ)²⁵

Денатурирующая ВЭЖХ (далее по тексту – ДВЭЖХ) – это метод определения мутаций ДНК (а именно, однонуклеотидного полиморфизма) и определения видов бактерий на основе анализа 16S рРНК. Колонки для ДВЭЖХ заполнены алкилированными непористыми частицами из полистирол-дивинилбензола диаметром 2–3 мкм. Данный метод чувствителен к наличию органических примесей, которые могут взаимодействовать с органическими группами, привитыми к частицам из полистирол-дивинилбензола. В конечном итоге, колонка окажется покрытой органикой, что приведет к снижению разрешающей способности.

Результаты

Для приготовления подвижной фазы использовалась бутилированная вода для ВЭЖХ (автономно измеренное содержание ТОС 777 ppb) и сверхчистая вода из системы Milli-Q, оборудованной УФ-лампой 185/254 нм (ТОС 4 ppb). Хроматограмма первого ввода сравнивалась с 2100-ым вводом с использованием воды для ВЭЖХ и с 6400-ым вводом с использованием воды Milli-Q (Рисунок 15). При использовании бутилированной воды наблюдалось значительное ухудшение разрешения, колонку необходимо менять после 2100 вводов. При использовании воды Milli-Q хроматограмма не менялась даже после 6400 вводов.

Условия эксперимента

Прибор	HPLC WAVE® система анализа нуклеиновых кислот (Transgenomics®)
Колонка	DNASep® (Transgenomics®)
Подвижная фаза А В	0.1 М триэтиламмоний ацетат (TEAA) 0.1 М триэтиламмоний ацетат буфер + 25% ацетонитрил
Градиентный профиль	60% –28% А 16 мин
Поток	1 мл/мин
Проба	Фрагменты ДНК отличающиеся на 100 пар оснований (п.о.), от 100 п.о. до 1500 п.о.

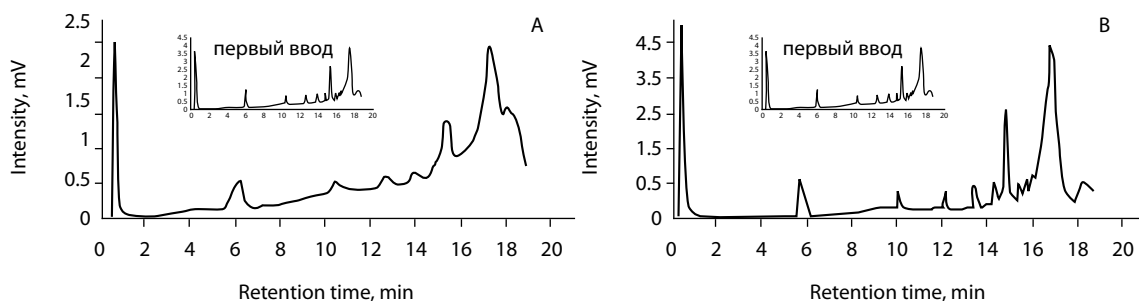


Рисунок 15. Сравнение срока службы колонок для ДВЭЖХ при использовании для приготовления подвижной фазы бутилированной воды для ВЭЖХ и воды Milli-Q. Вставки: первый ввод. (А) Результат, полученный колонкой DNASep после 2100 вводов. (В) Результат, полученный колонкой DNASep после 6400 вводов. Проба состояла из фрагментов ДНК, отличающихся на 100 пар оснований (п.о.), от 100 п.о. до 1500 п.о.

Использование свежеприготовленной сверхчистой воды продлевает срок службы колонки.

3.3 Сравнение бутилированной воды для ЖХ-МС и свежеприготовленной сверхчистой воды

Характеристики бутилированной воды для ЖХ-МС меняются в зависимости от производителя, однако по трем параметрам спецификации всегда совпадают: тест градиентного элюирования, тест пригодности для ЖХ-МС (резерпин-тест) и концентрация металлов/ионов. Эффект концентрации металлов/ионов описан в разделе 3.6. Градиентное элюирование, начинающееся со 100% воды, без каких-либо вводов, является очень хорошим способом определения количества органических примесей в растворителях. Растворители высокой степени чистоты должны давать очень чистые хроматограммы. Тест пригодности для ЖХ-МС – это адаптированный стандартный тест производителей масс-спектрометров для проверки работы прибора. Вместе с кофеиновым и нитрофеноловым тестом он позволяет произвести оценку потенциальных органических примесей, способных внести помехи в МС-анализ как в условиях положительного (резерпин, кофеин), так и в условиях отрицательного (нитрофенол) электроспрея.

В данном эксперименте сверхчистая вода сравнивалась с водой для ЖХ-МС из трех разных источников (производители В, S и F).

- ▶ а. Тест градиентного элюирования
- ▶ б. Тест пригодности для ЖХ-МС
- ▶ с. Кофеиновый тест
- ▶ д. Нитрофеноловый тест

3.3а Тест градиентного элюирования

В тесте градиентного элюирования через колонку проходят только растворители. В идеальном случае на хроматограмме не должно быть никаких пиков.

Условия эксперимента

Прибор	Agilent 1100 HPLC with photodiode array detector
Колонка	Waters Atlantis® d C18, 3 μm, 2.1 x 150 mm
Подвижная фаза А В	Вода Ацетонитрил (Fisher Optima™ для ЖХ-МС)
Градиентный профиль	5 мин равновесие (100% А) 100% до 0% А 30 мин 0% до 100% А 1 мин
Поток	0.25 мл/мин
Объем ввода	0 мкл

Результаты

На Рисунке 16 представлены хроматограммы бутилированной воды для ЖХ-МС разных производителей и свежеприготовленной сверхчистой воды.

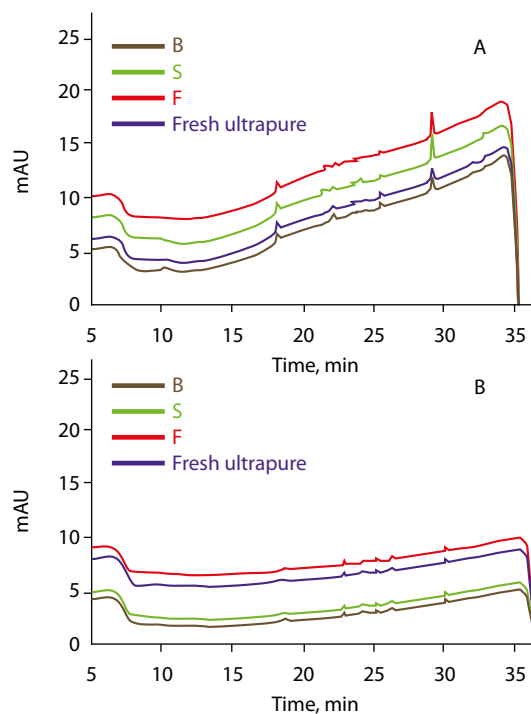


Рисунок 16. Хроматограммы теста градиентного элюирования бутилированной воды для ЖХ-МС (B,S,F) и свежеприготовленной сверхчистой воды. (A) 210 нм, (B) 254 нм.

Разные производители устанавливают разные пороговые значения для градиентного теста. Например, производитель F дает спецификацию 0.5 mAU на 254 нм (это значит, что ни один из пиков не должен иметь абсорбцию более 0.5 mAU), и 5 mAU на 210 нм. В то же время производитель S дает спецификацию 1 mAU и 5 mAU соответственно. Результаты эксперимента показывают, что свежеприготовленная сверхчистая вода сравнима с бутилированной водой для ЖХ-МС при проведении теста градиентного элюирования.

3.3b Тест пригодности для ЖХ-МС

Резерпиновый тест используется для демонстрации пригодности растворителя для МС (ESI положительный режим) в широком диапазоне молекулярных весов.

Результаты

Для прохождения теста ни один из пиков на спектре не должен быть выше пика M+N (m/z 609). На Рисунке 17 представлены спектры резерпина, растворенного в воде, из четырех разных источников. Интенсивность пиков приведена в Таблице 8.

Условия эксперимента

Прибор	Applied Biosystems API2000 – ионизация электроспреем (ESI)
Ввод	Прямая инфузия
Поток	10 мкл/мин
Молекулярный вес	608 (резерпин)
Режим ионизации	ESI +
Концентрация, ppb	50
растворитель	50:50 вода/ацетонитрил

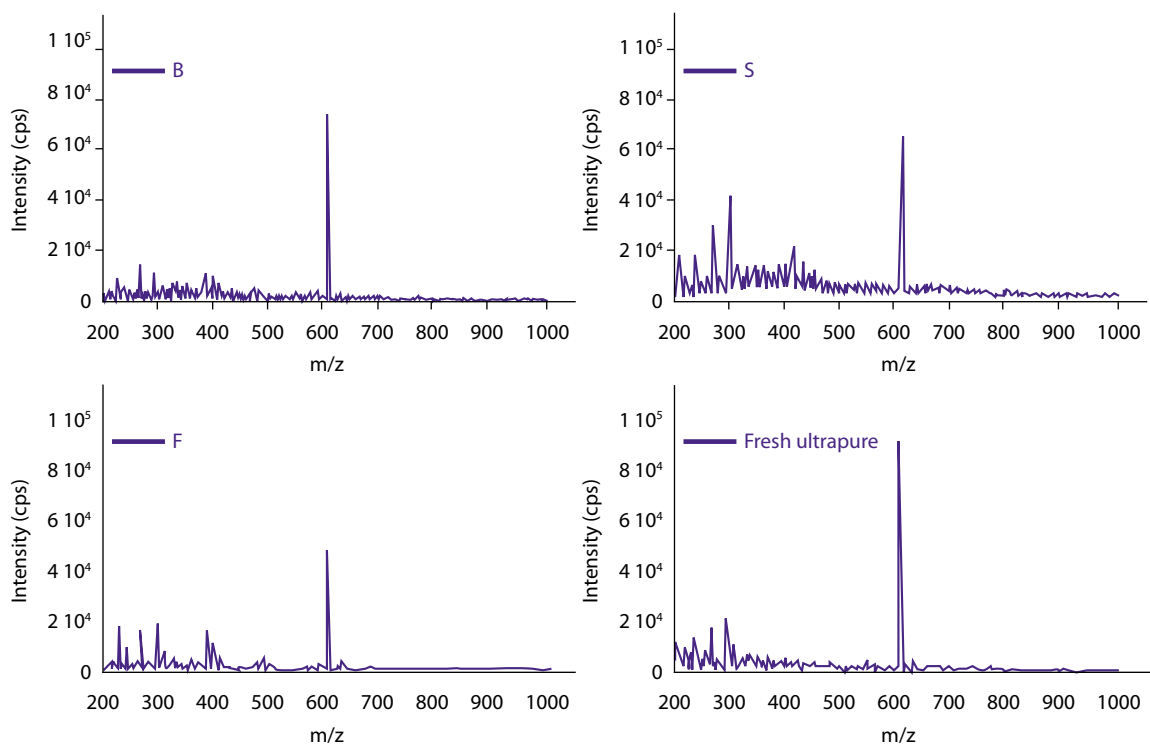


Рисунок 17. Масс-спектр (ESI+) 50 ppb резерпина в растворе 50:50 вода/ацетонитрил. B, S и F – бутилированная вода для ЖХ-МС трех разных производителей. «Fresh ultrapure» – свежеприготовленная сверхчистая вода Milli-Q.

Таблица 8. Сравнение интенсивностей пика резерпина в растворе 50:50 вода/ацетонитрил (ESI+). Сравнение трех разных типов воды.

Вода	Интенсивность резерпина, cps
Бутилированная вода для ЖХ-МС В	7.97×10^4
Бутилированная вода для ЖХ-МС S	6.40×10^4
Бутилированная вода для ЖХ-МС F	4.69×10^4
Свежеприготовленная сверхчистая вода	8.86×10^4

Все испытываемые образцы прошли тест, но наблюдались значительные различия в интенсивности пика. Резерпин в свежеприготовленной сверхчистой воде давал наибольшую интенсивность сигнала. Чистота растворителя, используемого в ЖХ-МС, влияет на качество сигнала исследуемого вещества, и всегда должна приниматься во внимание.

3.3с Кофеиновый тест

Кофеиновый тест используется для демонстрации пригодности растворителя для МС (ESI положительный режим), особенно для веществ с небольшим молекулярным весом.

Результаты

Для прохождения теста ни один из пиков на спектре не должен быть выше М+Н пика кофеина (m/z 194). На Рисунке 18 представлены спектры 100 ppb стандарта кофеина, растворенного в воде из четырех разных источников. Интенсивность пиков кофеина и его натриевых аддуктов приведена в Таблице 9.

Условия эксперимента

Прибор	Applied Biosystems API2000 – ионизация электроспреем (ESI)
Ввод	Прямая инфузия
Поток	10 мкл/мин
Молекулярный вес	194
Режим ионизации	ESI +
Концентрация, ppb	100
Растворитель	Вода

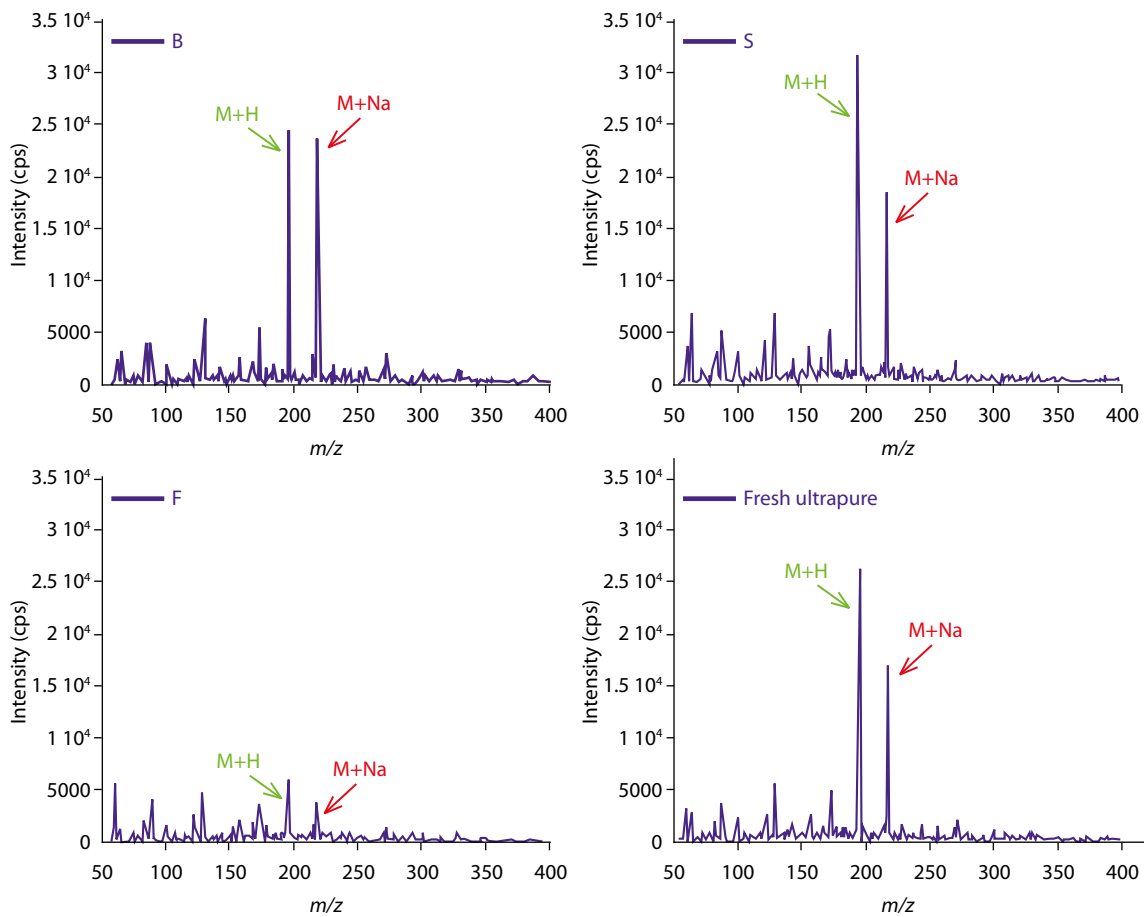


Рисунок 18. Масс-спектр (ESI+) 100 ppb кофеина в воде. B, S и F – бутилированная вода для ЖХ-МС трех разных производителей. «Fresh ultrapure» - свежеприготовленная сверхчистая вода Milli-Q.

Таблица 9. Сравнение интенсивностей пиков (M+H и M+Na) кофеина в воде (ESI+). Сравнение трех разных типов воды.

Вода	Интенсивность M+H	Интенсивность M+Na
B	2.46×10^4	2.36×10^4
S	3.15×10^4	1.87×10^4
F	0.63×10^4	3.99×10^3
Fresh ultrapure	2.61×10^4	1.68×10^4

Спектр свежей сверхчистой воды и воды S оказался лучше спектра воды B и F. Вода B имеет натриевый аддукт (пик M+Na), имеющий ту же интенсивность, что и пик M+H.

Интенсивность пика M+H воды F слишком низкая. Наличие пиков ионов металлов делает спектр более сложным для проведения анализа.

3.3d Нитрофеноловый тест

Нитрофеноловый тест используется для демонстрации пригодности растворителя для МС (ESI отрицательный режим) особенно для веществ с небольшим молекулярным весом.

Результаты

Нитрофеноловый тест проводится в ESI отрицательном режиме. Для прохождения теста ни один из пиков на спектре не должен быть выше М-Н пика нитрофенола (m/z 138). На Рисунке 19 представлены спектры 100 ppb стандарта нитрофенола, растворенного в воде из четырех разных источников. Интенсивность пиков нитрофенола приведена в Таблице 10.

Условия эксперимента

Прибор	Applied Biosystems API2000 – ионизация электроспреем (ESI)
Ввод	Прямая инфузия
Поток	10 мкл/мин
Молекулярный вес	139
Режим ионизации	ESI -
Концентрация, ppb	100
Растворитель	80:20 Вода/ацетонитрил

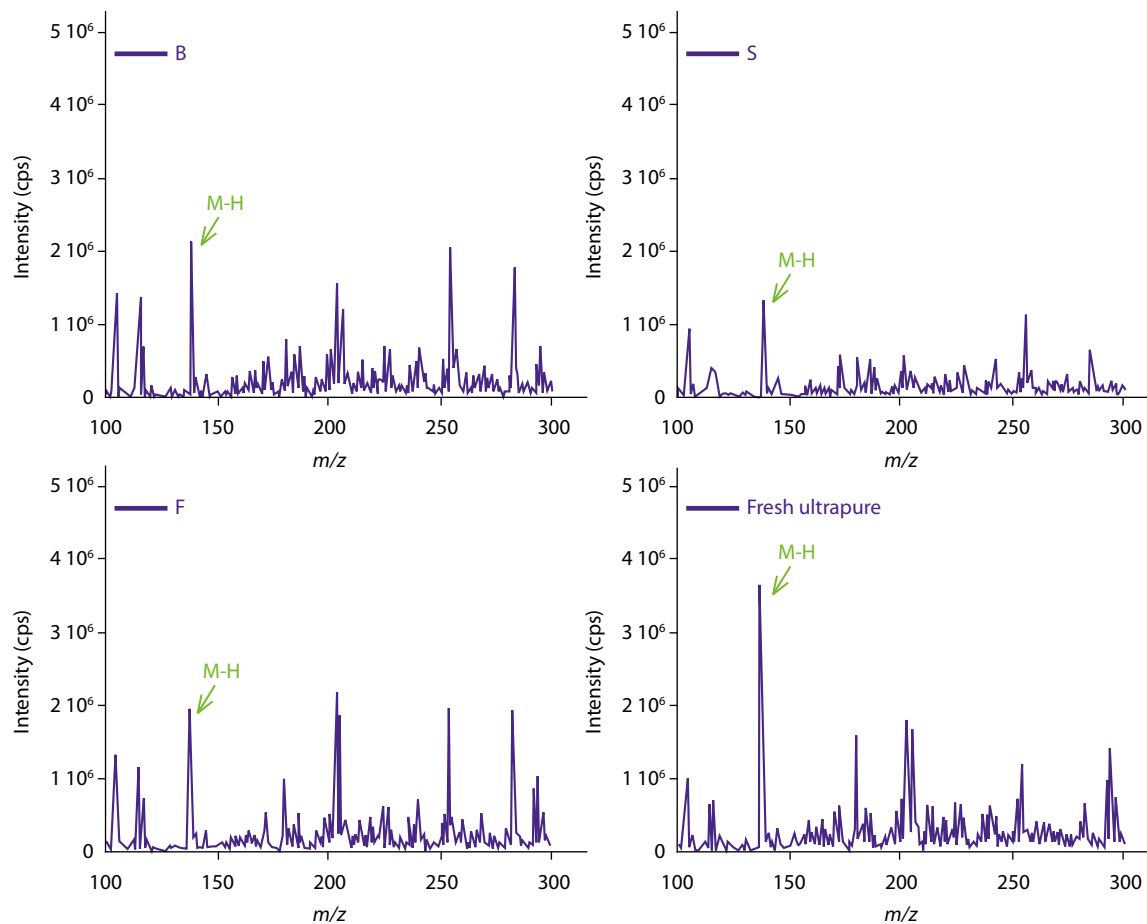


Рисунок 19. Масс-спектр (ESI-) 100 ppb нитрофенола в растворе 80:20 вода/ацетонитрил. B, S и F – бутилированная вода для ЖХ-МС трех разных производителей. «Fresh ultrapure» - свежеприготовленная сверхчистая вода Milli-Q.

Таблица 10. Сравнение интенсивностей пика нитрофенола в растворе 80:20 вода/ацетонитрил (ESI-). Сравнение трех разных типов воды.

Вода	Интенсивность М+Н
B	2.14×10^6
S	1.31×10^6
F	1.98×10^6
Свежая сверхчистая	3.65×10^6

Один производитель бутилированной воды для ЖХ-МС не прошел нитрофеноловый тест, т.к. один пик оказался выше пика нитрофенола (F на Рис.19). Среди трех прошедших тест типов воды свежеприготовленная сверхчистая вода дала самый высокий пик. При работе в режиме ESI- сверхчистая вода является лучшим выбором для приготовления водного элюента, т.к. вносит минимальные помехи, влияющие на качество ESI- сигнала.

Свежеприготовленная сверхчистая вода проходит все тесты и дает лучшие результаты по сравнению с бутилированной водой для ЖХ-МС.

3.4 Сравнение сверхчистой воды и очищенной 0.1 мкм фильтром воды для УВЭЖХ (вода марки «ULC/MS»)

УВЭЖХ использует колонки с частицами малого размера (< 2мкм), что приводит к более высокой эффективности разделения и более быстрому разделению, но также означает большее давление в системе. Из-за меньшего размера частиц, меньшего пустого пространства между частицами и меньшего диаметра колонки УВЭЖХ очень чувствительна к примесям в подвижной фазе. Некоторые производители выпускают бутилированную воду специально для УВЭЖХ (например, вода марки «ULC/MS»).

- ▶ а. Сравнение противодействия системы
- ▶ б. Градиентный профиль
- ▶ с. Электроспрей масс-спектры

3.4а Сравнение противодействия системы

Достаточно мелкие частицы могут попадать внутрь колонки и застревать в ней. Это приводит к росту противодействия в системе. Если давление становится слишком высоким, насос и вся система останавливаются. Серьезно забитую колонку необходимо заменить. Вода для УВЭЖХ фильтруется через 0.1 мкм мембрану. Считается, что такая вода лучше, чем вода из систем очистки, в которых обычно используется фильтр 0.2 мкм. Хорошим индикатором наличия частиц в растворителе служит величина противодействия в системе при пропускании через колонку только растворителя.

Результаты

Бутилированная вода для УВЭЖХ прошла через мембрану 0.1 мкм. По сравнению с водой из системы очистки, прошедшей через мембрану 0.2 мкм, бутилированная вода должна лучше подходить для УВЭЖХ, позволяя избежать роста противодействия в системе. В эксперименте в течение 10 часов через колонку для УВЭЖХ пропускали смесь 50:50 вода/ацетонитрил и следили за противодействием в системе. Результаты показаны на Рисунке 20.

Условия эксперимента*

Прибор	Waters Acquity® UPLC
Колонка	Acquity UPLC BEH C18 1.7 мкм, 2.1 x 50 мм
Подвижная фаза (изократичная)	50:50 Вода/Ацетонитрил с 0.1% муравьиной кислоты
Поток	0.45 мл/мин
Объем ввода	0 мкл
Время	10 часов

*Данные любезно предоставлены доктором Marijn Van Hulle (Waters, Бельгия).

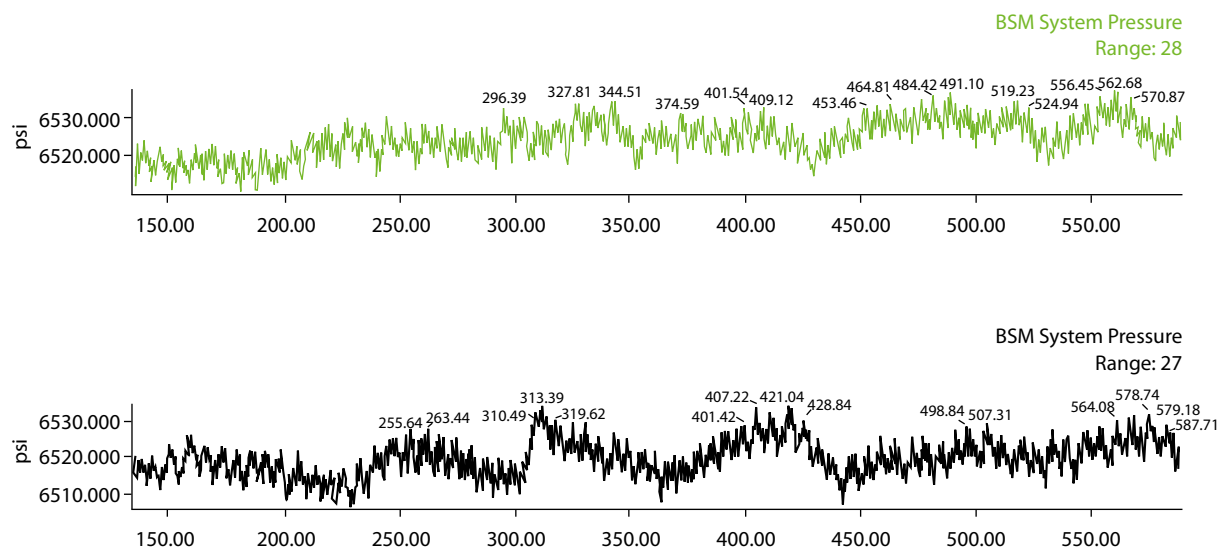


Рисунок 20. Обратное давление системы в течении 10 часов. Подвижная фаза из воды, прошедшей 0.2 мкм фильтр (низ, $\Delta P = 24-27$), прошедшей 0.1 мкм фильтр (верх, $\Delta P = 26-37$).

Противодавление системы оставалось стабильным при использовании воды, прошедшей через 0.2 мкм мембрану, и воды марки «ULC/MS». Это говорит о том, что 0.2 мкм мембрана, ис-

пользуемая в качестве финишного фильтра, эффективно удерживает частицы, производя воду, пригодную для УВЭЖХ.

3.4b Градиентный профиль

Прямым следствием большей чувствительности УВЭЖХ является чувствительность к наличию органических примесей в подвижной фазе. Количество органических примесей в воде, используемой для УВЭЖХ, можно оценить, наблюдая за УФ-градиентным профилем и масс-спектром при прямом вводе.

Градиентный профиль растворителя получают, проводя градиентное элюирование от высокого содержания воды до 100% органики без ввода пробы. Хроматограмма покажет наличие органических примесей в виде пиков. С увеличением времени уравнивания перед получением градиента больше органических примесей из водной фазы накапливается в колонке и позже элюируется, когда доля органической фазы в ходе получения градиента начинает возрастать.

Результаты

На Рисунке 21 показаны хроматограммы УВЭЖХ для бутилированной и свежеприготовленной сверхчистой воды после 5 минут накопления. В ходе накопления 100% очищенную воду пропустили через колонку. Органические примеси накапливались в колонке и позже элюировались, когда количество органического растворителя (ацетонитрил) начинало возрастать.

Условия эксперимента*

Прибор	Waters Acquity® UPLC (фотодиодный детектор)
Колонка	Acquity UPLC BEH C18 1.7 мкм, 2.1 x 50 мм
Градиентное элюирование	5 мин равновесие (100% А) 100% до 0% А 5 мин 0 до 100% А 0.5 мин
Поток	0.70 мл/мин
Объем ввода	0 мкл

*Данные любезно предоставлены доктором Jean-Michel Plankele (Waters, Франция).

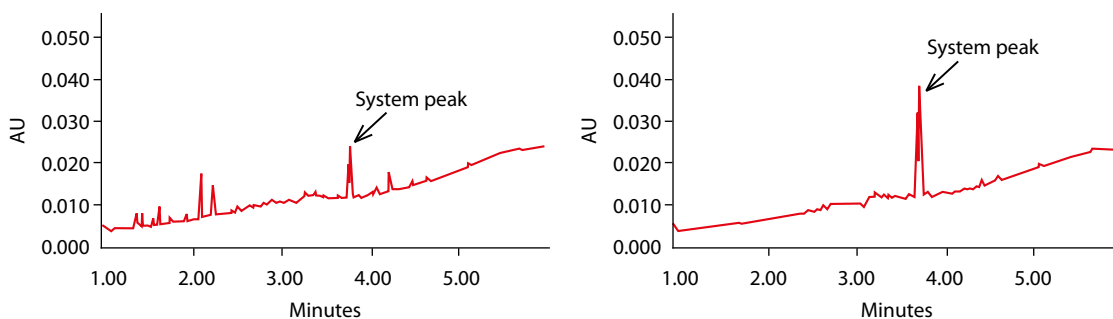


Рисунок 21. Хроматограммы УВЭЖХ (210 нм) бутилированной воды марки «ULC/MS» (слева) и свежеприготовленной сверхчистой воды (справа).

Бутилированная вода демонстрирует множество пиков с большой интенсивностью, что говорит о наличии большего числа органических примесей.

3.4с Электроспрей масс-спектры

Прямой ввод растворителя в МС-детектор может выявить наличие органических примесей. Чистый растворитель должен давать очень низкий фоновый спектр.

Результаты

Прямой ввод растворителя в масс-спектрометр выявляет наличие органических примесей. На Рисунке 22 показан спектр, полученный после ввода смеси 98:2 вода/ацетонитрил.

Условия эксперимента*

Прибор	Waters Acquity UPLC Waters Xevo® TQ MS
Режим ионизации	ESI+
Подвижная фаза (изократичная)	98:2 вода/ацетонитрил с 0.1% муравьиной кислоты
Поток	0.45 мл/мин

*Данные любезно предоставлены доктором Marcus Winkler (Waters, Германия).

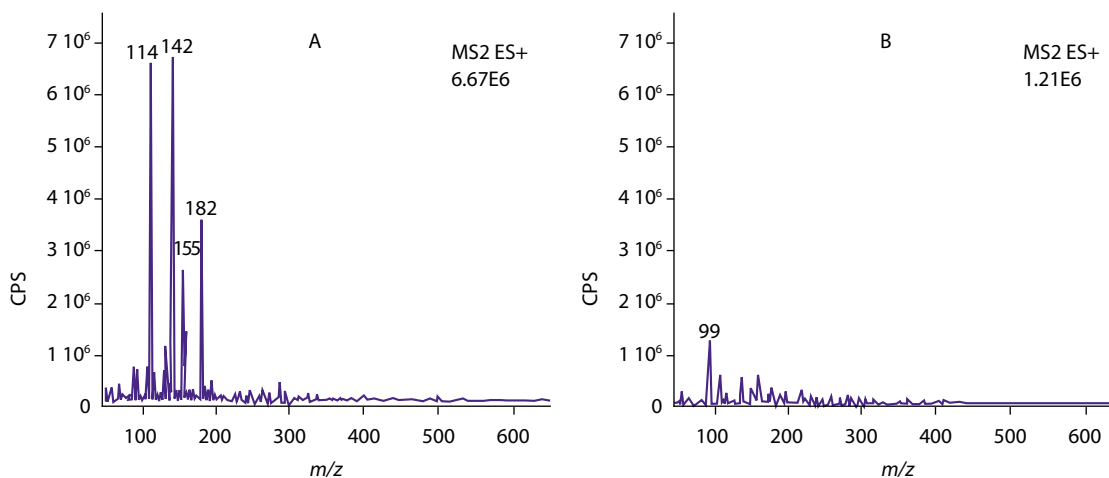


Рисунок 22. Масс-спектр воды марки «ULC/MS» (А) и свежеприготовленной сверхчистой воды (В). Прямой ввод, ESI+.

Спектры воды марки «ULC/MS» (Рисунок 22А) и свежеприготовленной сверхчистой воды (Рисунок 22В) сильно различаются. Интенсивные пики, демонстрируемые водой марки «ULC/MS», свидетельствуют о наличии органических при-

месей, ионизируемых в условиях эксперимента. Растворители, используемые для ЖХ-МС, должны содержать минимум органических примесей, чтобы не оказывать влияния на результаты эксперимента.

Свежеприготовленная сверхчистая вода не вызывает роста противодавления в системах УВЭЖХ, и содержит меньше органических примесей по сравнению с бутилированной водой специального назначения.

3.5 Пригодность свежеприготовленной сверхчистой воды для нано ЖХ-МС^{26,27}

Нано ЖХ работает на скоростях потока порядка нл/мин. Нано ЖХ системы в комбинации с масс-спектрометрией (нано ЖХ-МС) в основном используются для исследования биологических проб, имеющих очень малый объем, малую концентрацию и потенциальный риск интерференции со стороны матрицы проб. Поток порядка нл/мин означает высокую чувствительность МС, а, следовательно, более низкий предел обнаружения. Метод требует меньшего объема пробы и менее чувствителен к химической интерференции по сравнению с традиционными ЖХ системами. Системы нано ЖХ используют распылители с наконечником диаметром 1-30 мкм. Эти предельно маленькие распыляющие отверстия подвержены засорению. Поэтому очень важно использовать в нано ЖХ растворители самой высокой степени очистки.

Результаты

В данном эксперименте в систему для нано ЖХ-МС более 100 раз вводили смесь нейропептидов. Засорение распылителя и/или колонки приведет к изменению вида хроматограммы (например, увеличение времени удерживания, изменение площади пиков, изменение формы пиков) и к видимому засорению распылителя. Хроматограмма на Рисунке 23 показывает, что значительных изменений площади пика, времени удерживания и формы пика, означающих ухудшение сигнала и вызванных засорением колонки и/или распылителя, не произошло. Аналогичные выводы были сделаны и при исследовании ангиотензина (хроматограмма не показана).

Условия эксперимента*

Прибор	Waters Acquity ВЭЖХ Quattro Premiere™ XE с нано распылителем	
Колонка	Waters Atlantis® dC18 3 мкм, 75мм x 100 мм	
Распылитель	New Objective® PicoTip® силиконовый наконечник (360 мкм внеш. диаметр, 10 мкм внутр. диаметр)	
Подвижная фаза	A	Сверхчистая вода содержащая 0.2% муравьиной кислоты (Ultraprace, BDH®) и 1% ацетонитрил (тип УФ, Burdick and Jackson®)
	B	100% ацетонитрил (тип УФ, Burdick and Jackson®)
Градиентный профиль	90% A	0.5 мин
	90% до 50% A	2.0 мин
	50% A	0.1 мин
	50% до 10% A	0.4 мин
	10% до 0% A	0.01 мин
	0% A	0.49 мин
	0% до 90% A	0.01 мин
	90% A	1.49 мин
Поток	900 нл/мин (достигается разделением потока)	
Стандарты	Ангиотензин, Leu-энкефалин, Met-энкефалин	
Объем ввода	1 мкл	

* Данные любезно предоставлены доктором David Budac (Lundbeck Research USA Inc., Paramus, NJ, USA)

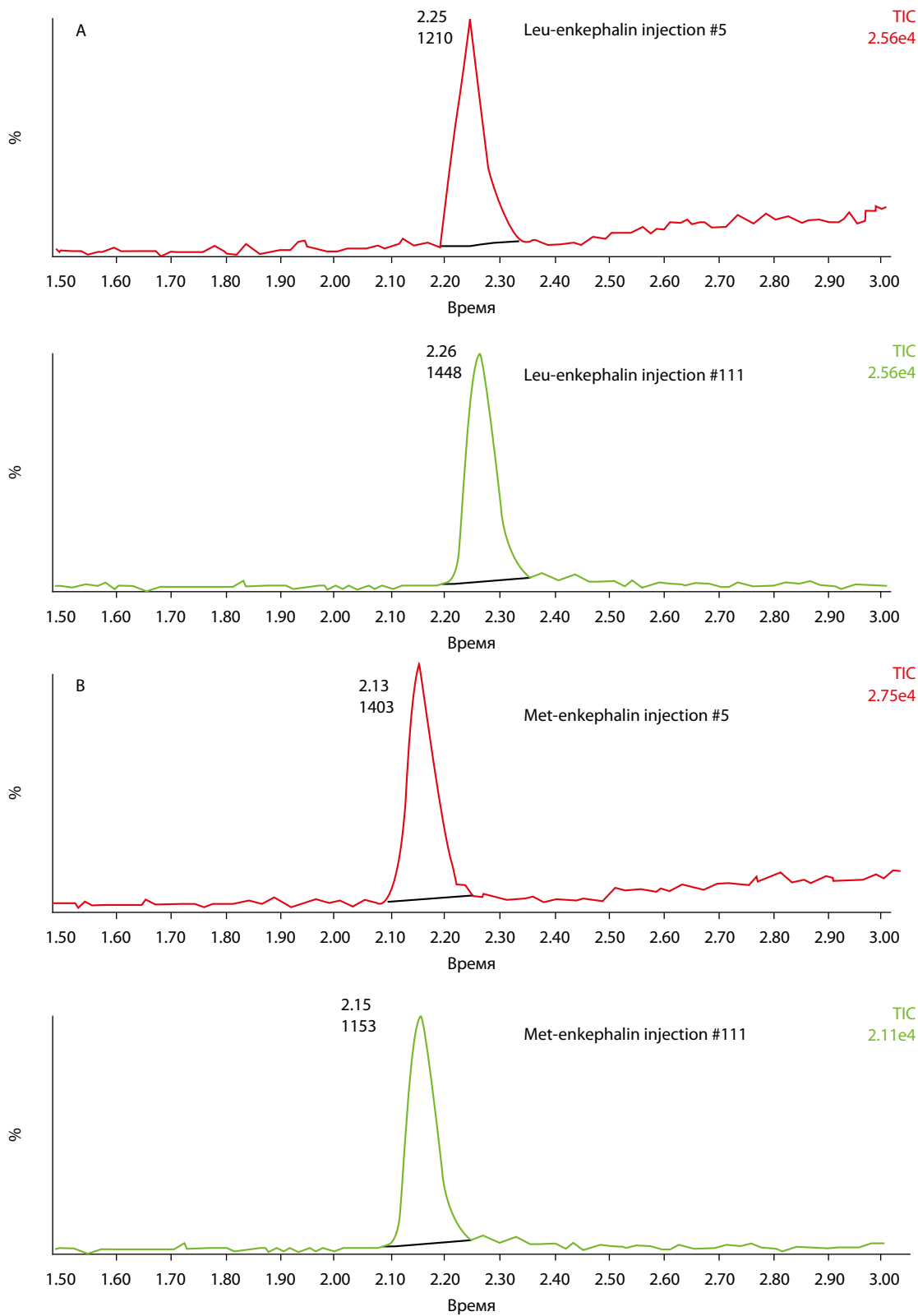


Рисунок 23. Хроматограмма Леу-энкефалин (А) и Мет-энкефалин (В) в концентрации 60 пг/мл. Красная линия соответствует вводу №5, зеленая линия вводу №111.

Рисунок 23. Хроматограмма Leu-энкефалин (А) и Met-энкефалин (В) в концентрации 60 пг/мл. Красная линия соответствует вводу №5, зеленая линия вводу №111.

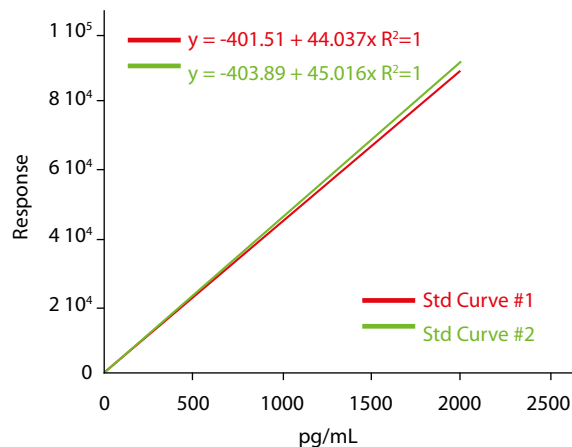


Рисунок 24. Стандартные калибровочные кривые для Leu-энкефалина. Между кривыми №1 и №2 было проведено 110 вводов. Кривые остались неизменными.

Хроматограммы, калибровочные кривые и фотографии распылителя после более сотни вводов стандарта нейропептида, - все эти факты говорят о пригодности свежей сверхчистой воды для нано ЖХ-МС.

Визуальная проверка распылителя под микроскопом не выявила следов засорения (Рисунок 25).



Рисунок 25. Фотография нового (слева) и использованного (справа) наконечника распылителя с внутренним диаметром 0.10 мкм. Следов засорения не обнаружено.

Использование свежеприготовленной сверхчистой воды для нано ЖХ-МС дает воспроизводимые хроматограммы и позволяет предотвратить засорение колонки/распылителя.

3.6 Влияние ионного загрязнения на масс-спектр (ESI+) пептида

Ионизация электроспреем (ESI) – наиболее распространенный метод ионизации. В идеальном случае в режиме ESI+ в спектре появляются только пики протонированных молекул (M+H) и/или их фрагментов (ионов). Наличие пиков аддуктов (M+Na) осложняет анализ данных. Растворители, используемые в ЖХ-МС, могут содержать ионы металлов, способные формировать аддукты с анализируемыми молекулами. Поэтому для приготовления растворителя для ЖХ-МС важно использовать свежеприготовленную сверхчистую воду, не содержащую ионов (сопротивление 18.2 МОм·см). В Таблице 11 приведена спецификация содержания ионов металлов в бутилированной воде для ЖХ-МС некоторых производителей.

Результаты

Для демонстрации эффекта ионного загрязнения воды, используемой для приготовления растворителя для ЖХ-МС, пептид (брадикинин) растворяли в смеси свежеприготовленной сверхчистой воды с ацетонитрилом (96% и 4% соответственно) и напрямую вводили в масс-спектрометр. Полученный спектр (Рисунок 26А) содержит только протонированные пики нашей молекулы. При наличии в воде ионов натрия (Рисунок 26В) спектр становится более сложным из-за наличия пиков натриевых аддуктов.

Таблица 11. Спецификация содержания ионов металлов в бутилированной воде для ЖХ-МС и в свежеприготовленной сверхчистой воде.

Ионы металла	Максимальная концентрация, ppb			
	Производитель В	Производитель F	Производитель S	Сверхчистая вода
Алюминий	20	50	500	<1
Кальций	100	50	100	<1
Железо	30	10	100	<1
Калий	50	100	100	<1
Магний	20	10	100	<1
Натрий	100	10	100	<1

Условия эксперимента

Прибор	Applied Biosystems API2000 – ионизация электроспреем (ESI)
Ввод	Прямая инфузия
Поток	10 мкл/мин
Исследуемое вещество	Брадикинин фрагмент 1-7
Молекулярный вес	756
Режим ионизации	ESI +
Концентрация	1 мкМоль
Растворитель	96:4 свежая сверхчистая вода/ацетонитрил

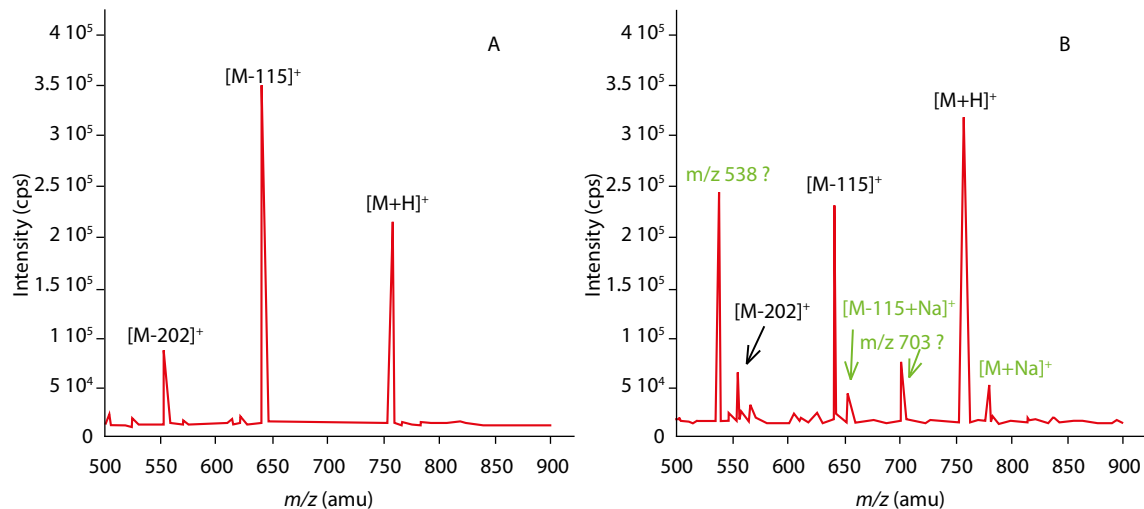


Рисунок 26. ESI+ спектр брадикинина с использованием (А) свежеприготовленной сверхчистой воды и (В) сверхчистой воды с добавлением ионов Na⁺.

Свежеприготовленная сверхчистая вода, не содержащая ионов (сопротивление 18.2 МОм·см), позволяет получить чистый масс-спектр.

3.7 Использование специального фильтра финишной очистки (LC-Pak) для удаления остатков органического загрязнения в сверхчистой воде

В некоторых очень редких случаях в сверхчистой воде могут содержаться остатки органических примесей. Одно из решений данной проблемы – использование специального фильтра финишной очистки LC-Pak (Liquid Chromatography Pak). Фильтр заполнен частицами C18, удерживающими остатки органических примесей.

Результаты

В исключительных случаях на хроматограмме может появляться постоянный дополнительный пик. В приведенном примере сверхчистая вода, прошедшая через фильтр 0.2 мкм, пропусклась через колонку для ВЭЖХ в течении 60 минут, затем следовало градиентное элюирование. На Рисунке 27 первые 60 минут хроматограммы соответствуют периоду накопления/уравновешивания. В течение следующих 40 минут произошло градиентное элюирование.

Условия эксперимента*

Прибор	Agilent LCMS 6520 QTOF
Колонка	ZORBAXR Eclipse Plus C18, 3.5 мкм, 2.1 x 150 мм
Подвижная фаза A B	Вода с 0.1% муравьиной кислоты Ацетонитрил с 0.1% муравьиной кислоты
Градиентный профиль	Накопление/равновесие: 100% A в течении 60 мин 100% – 0% A 30 мин 0% A 10 мин
Поток	0,40 мл/мин
Объем ввода	0 мкл

*Данные любезно предоставлены Hirokazu Sawada and Hiroki Kumagai из компании Agilent Technologies (Япония)

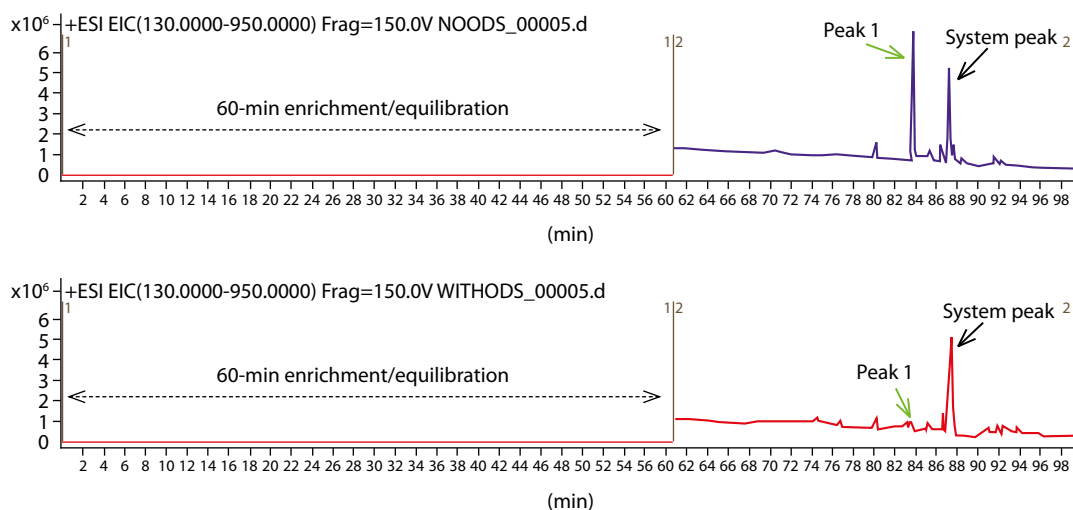


Рисунок 27. Хроматограмма ESI+ сверхчистой воды (после 60 минут накопления/уравновешивания) после 0.2 мкм фильтра (голубая линия) и после фильтра LC-Pak (красная линия).

На хроматограмме воды, прошедшей через фильтр 0.2 мкм (голубая линия на Рисунке 27), на 84-ой минуте присутствует интенсивный пик. При использовании фильтра LC-Pak (красная линия на Рисунке 27) этот пик почти полностью исчезает.

На Рисунке 28А показан масс-спектр Пика 1. Протонированная молекула имеет $m/z = 279$. Для определения молекулы была проведена тандемная масс-спектрометрия (LC-MSMS) с $m/z = 279$ в качестве иона-предшественника. Спектр MSMS показан на Рисунке 28В.

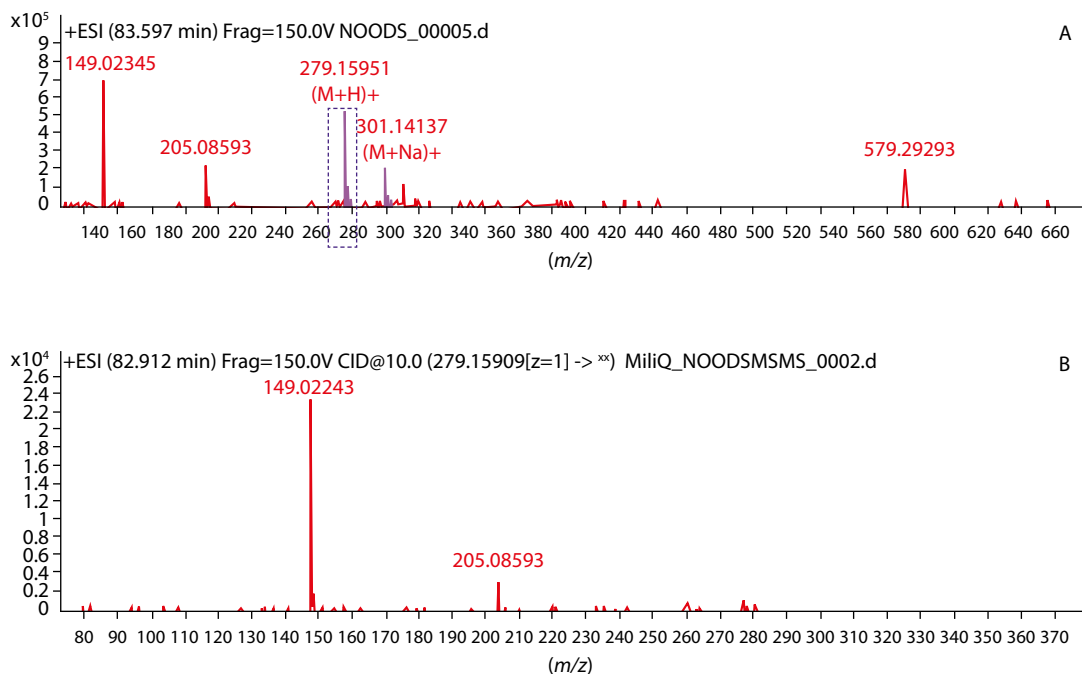


Рисунок 28. (А) Масс-спектр Пика 1 на Рисунке 27. Протонированная молекула (M+H), дающая Пик 1 на Рисунке 27, имеет $m/z = 279$. (В) Спектр MSMS с $m/z = 279$ в качестве иона-предшественника. Фрагментация показывает, что причиной Пика 1 является соединение дибутилфталат (молекулярный вес 278).

Схема фрагментации в тандемной масс-спектрометрии уникальна для каждой конкретной молекулы. Рисунок 28В показывает, что ион-предшественник с $m/z = 279$ дает два фрагмента: один имеет $m/z = 149$, второй $m/z = 205$. Данная

схема фрагментации позволяет предположить, что Пик 1 соответствует дибутилфталату (молекулярный вес 278). Пик полностью исчезает при использовании в качестве фильтра финишной очистки картриджа на основе C18 (LC-Pak).

В редких случаях, когда остатки органических примесей постоянно присутствуют в сверхчистой воде, в качестве фильтра финишной очистки может быть использован фильтр LC-Pak.

4. Предотвращение загрязнения растворителя в ВЭЖХ

Большинство проблем, возникающих при проведении ВЭЖХ, вызваны проблемами с колонкой, а загрязненная вода часто является главной причиной этих проблем.²⁸ Это подтверждается в предыдущем разделе, в котором описано множество экспериментов, демонстрирующих важность использования воды высокой степени очистки для разных типов ВЭЖХ – ВЭЖХ с УФ- и МС-детектором (ЖХ-МС), УВЭЖХ, нано-ЖХ, денатурирующая ВЭЖХ.

Загрязнение растворителя может влиять на чувствительность, точность и воспроизводимость результатов ВЭЖХ из-за перечисленных ниже явлений:

- ▶ Появление дополнительных/ложных пиков на хроматограмме (органические примеси, бактерии, т.к. бактерии производят органические примеси)
- ▶ Слишком сильный фоновый шум на хроматограмме (органика и бактерии)
- ▶ Шум на масс-спектре (органика и бактерии; ионы металлов – формирование пиков аддуктов)
- ▶ ЗАМЕЧАНИЕ: существует множество других причин появления ложных пиков, такие как наличие газа в растворителе, насосе, модификаторе (например, TFA), и т.д.
- ▶ Смещение базовой линии
- ▶ Изменение времени удерживания

В настоящее время для ВЭЖХ, ЖХ-МС и УВЭЖХ доступна бутилированная вода, которая, однако, после вскрытия бутылки немедленно начинает загрязняться. Как показано в экспериментах, описанных в предыдущем разделе, свежеприготовленная сверхчистая вода имеет ряд преимуществ перед бутилированной водой. Помимо всего прочего, сверхчистая вода всегда доступна в свежем виде по мере необходимости, поэтому она не нуждается в хранении, а качество такой воды можно отслеживать по показаниям ячеек сопротивления и ТОС-монитора в режиме реального времени.

4.1 Выбор оптимальной системы очистки воды для ВЭЖХ

Вода высокой степени очистки, пригодная для ВЭЖХ, не должна содержать органических примесей, ионов, частиц и бактерий. Система должна в правильной последовательности сочетать разные технологии очистки воды для эффективного удаления этих примесей.

Технологии очистки подробно описаны в Разделе 2 этого руководства. В Таблице 12 приведен обзор всех примесей, критичных для ВЭЖХ, эффектов их влияния на приборы для ВЭЖХ и результаты, а также технологий очистки воды для наиболее эффективного удаления той или ионной примеси.

- ▶ а. Предлагаемые системы очистки воды
- ▶ б. Важность использования правильной системы подготовки воды для Milli-Q

Таблица 12. Примеси в воде, критичные для ВЭЖХ

Примеси	Эффект	Технология очистки
Органика	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Появление дополнительных пиков</i> – трудности с идентификацией пиков • <i>Нестабильность базовой линии</i> – трудности при количественном анализе • <i>Меньший срок службы</i> колонки 	<ul style="list-style-type: none"> • Обратный осмос • Синтетический активированный уголь • УФ-фотоокисление • Фильтр финишной очистки на основе частиц C18
Ионы	<ul style="list-style-type: none"> • Некоторые ионы (нитраты, нитриты) <i>поглощают в УФ диапазоне</i> • <i>Формирование аддуктов</i> (особенно Na⁺, K⁺) при использовании МС-детектора 	<ul style="list-style-type: none"> • Обратный осмос • Электродеионизация • Ионообменные смолы
Частицы	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Засорение колонки</i> – меньший срок службы колонки • <i>Повреждение насоса и инжектора</i> – замена дорогостоящих частей • <i>Засорение распылительной иглы</i> источника ионизации в масс-спектрометре 	<ul style="list-style-type: none"> • Обратный осмос • Мембранный фильтр финишной очистки 0.22 мкм
Бактерии	<ul style="list-style-type: none"> • <i>Засорение колонки</i> – меньший срок службы колонки • <i>Побочные органические примеси</i> – появление дополнительных пиков, нестабильность базовой линии 	<ul style="list-style-type: none"> • Обратный осмос • УФ-облучение 254 нм • Мембранный фильтр финишной очистки 0.22 мкм

4.1a Предлагаемые системы очистки воды

Ученые, использующие системы ВЭЖХ, обычно выбирают полную систему очистки воды, состоящую из модулей обратного осмоса и электродеионизации на подготовительном этапе (Elix), и ионообменных смол, синтетического активированного угля и УФ-фотоокисления на этапе доочистки (Milli-Q). На сегодняшний день существуют две конфигурации, удовлетворяющие данным требованиям и производящие сверхчистую воду из водопроводной:

▶ **Две отдельные системы:** Elix + Milli-Q. Elix производит воду Типа 2 из водопроводной воды. Система Milli-Q производит сверхчистую воду (Тип 1) из воды Типа 2. В последние годы компания Merck Millipore разработала множество разных систем Milli-Q для удовлетворения потребностей различных типов лабораторий в сверхчистой воде. Последняя модель системы Milli-Q называется Milli-Q Advantage A10. Перед этим Merck Millipore предлагал ряд систем Milli-Q, ориентированных на разные приложения. Например, для систем ВЭЖХ была рекомендована система Milli-Q Gradient A10.

▶ **Одна система, сочетающая Elix и Milli-Q.** Первая система подобного типа была выпущена в 2008 году и получила название Milli-Q Integral.

Системы Milli-Q оборудованы датчиками, позволяющими пользователю следить за качеством воды в режиме реального времени:

- ▶ Ячейка измерения сопротивления: сопротивление 18.2 МОм·см означает отсутствие в воде ионов кроме ионов диссоциированной воды
- ▶ ТОС-монитор: значение <5 ppb означает очень низкий уровень органических примесей

В качестве фильтра финишной очистки обычно используется мембрана 0.22 мкм (Millipak). В редких случаях наличия постоянных примесей в сверхчистой воде могут использоваться фильтры финишной очистки других типов, направленные на удаление определенного типа примесей, например, фильтр на основе C18 или

активированного угля. Однако картриджи ультрафильтрации не рекомендованы в качестве фильтров финишной очистки для ВЭЖХ.

Наконец, при выборе системы очистки воды для лаборатории необходимо учитывать необходимость валидации и квалификации системы. Системы Merck Millipore могут быть валидированы и квалифицированы для соответствия требованиям систем менеджмента качества и контролирующих органов. Для проведения квалификации оборудования были разработаны специальные рабочие журналы (валидационные книги). Также недавно компания Merck Millipore выпустила на рынок валидируемое программное обеспечение для удаленного администрирования работы систем водоподготовки.

4.1b Важность использования правильной системы подготовки воды для Milli-Q

Спецификации сверхчистой воды, пригодной для ВЭЖХ (отсутствие частиц, ионов, бактерий и низкое содержание органики), могут быть соблюдены только в том случае, если в систему Milli-Q подается очищенная вода Типа 2 хорошего качества. Рекомендованная система подготовки воды для системы Milli-Q – система Elix, сочетающая технологии обратного осмоса (ОО) и электродеионизации (EDI). Эти технологии описаны в Разделе 2 данного руководства. Другие источники очищенной воды, такие как регенерируемые системы деионизации и дистилляторы или их комбинация, не способны производить воду того же качества, что системы ОО+EDI.

Регенерируемые системы деионизации состоят из ионообменных смол, в которых происходит замещение ионов водорода на катионы или гидроксид-ионов на анионы. Эти смолы могут быть упакованы в разные модули для отдельного замещения анионов и катионов, либо смолы разных типов могут быть смешаны в одном модуле. После того как все ионы водорода и/или гидроксильные ионы замещены на заряженные примеси из воды, смолы могут быть регенерированы сильной кислотой или основанием.

Этот агрессивный химический процесс может повредить содержащуюся в смоле полимерную цепочку, приводя к загрязнению смолы органикой и частицами, вызывая трудности при производстве сверхчистой воды.

Кроме того, ионообменные смолы удерживают только заряженные частицы, т.е. органические и неорганические ионы. Поэтому нейтральные органические молекулы не удаляются ионообменными смолами и остаются в воде. Частицы также не удаляются, а незаменимое долгое время смолы становятся хорошим субстратом для бактерий, растущих в емкости со смолой.

Дистилляция является, возможно, самым древним способом очистки воды. Она позволяет удалить широкий спектр загрязнений – кипящую при высоких температурах органику, ионы и бактерии, – но не позволяет получить воду с низким содержанием ионов. Дистиллят обычно имеет сопротивление около 1 МОм·см (эквивалентно примерно 400 ppb NaCl) во многом из-за растворения CO₂ при сборе воды и генерации бикарбонатов. Также дистиллят содержит избыток органики. Наконец, дистиллированная вода не может быть приготовлена немедленно – ее необходимо хранить, что приводит к появлению дополнительных примесей.

4.2 Поддержание оптимального качества сверхчистой воды

Сверхчистую воду очень легко загрязнить. Ниже приведены рекомендации по поддержанию качества воды, производимой системой Milli-Q:

▶ Проведение регулярного технического обслуживания системы очистки воды.

- ▶ Картриджи, УФ-лампы и фильтры финишной очистки (Millipak) необходимо менять строго по расписанию. Система Milli-Q выдает сообщение о необходимости замены того или иного элемента.
- ▶ Не игнорируйте предупреждающие сообщения и световые сигналы

▶ Для приготовления водной подвижной фазы всегда используйте свежеприготовленную сверхчистую воду

- ▶ Перед отбором воды для ВЭЖХ слейте 1–2 литра воды из системы

▶ Используйте подходящую посуду

- ▶ Мойте посуду только чистым растворителем. Не используйте детергент.³⁰
- ▶ Не сушите посуду на подставке и не допускайте соприкосновения внутренней поверхности ни с чем, кроме растворителя.
- ▶ Не используйте наклейки на посуду, так как они служат хорошим источником фталатов.
- ▶ При замене емкости для растворителя используйте новую чистую емкость. Не пополняйте старую емкость.

▶ **Не храните сверхчистую воду/водные растворители**

- ▶ Вследствие своей «агрессивной» природы сверхчистая вода абсорбирует примеси из воздуха и стенок контейнера и больше не является сверхчистой.
- ▶ При соприкосновении с воздухом растворитель загрязняется бактериями и питательными веществами для бактерий. Начинается рост и размножение бактерий, растворитель загрязняется живыми и мертвыми бактериями и побочными продуктами: фрагментами клеточных стенок и компонентами цитозоля бактерий (органика, ионы).

▶ **Используйте самые качественные органические растворители.** Качество органического растворителя зависит от производителя.³¹

▶ **Используйте самые качественные модификаторы растворителя** (например, муравьиная кислота, уксусная кислота, аммиак и т.д.).

▶ **Не надевайте пластиковую трубку (например, трубку Tygon®) на точку отбора системы Milli-Q.**

▶ **Не допускайте попадания примесей в процессе приготовления пробы.** Например, при фильтрации пробы перед вводом используйте мембранный фильтр, материал которого обладает низкой экстрагируемостью. На Рисунке 29 показаны две хроматограммы смеси лекарственных препаратов, отфильтрованной нейлоновой мембраной (A) и тефлоновой мембраной (B). Нейлоновый фильтр дает два дополнительных пика.

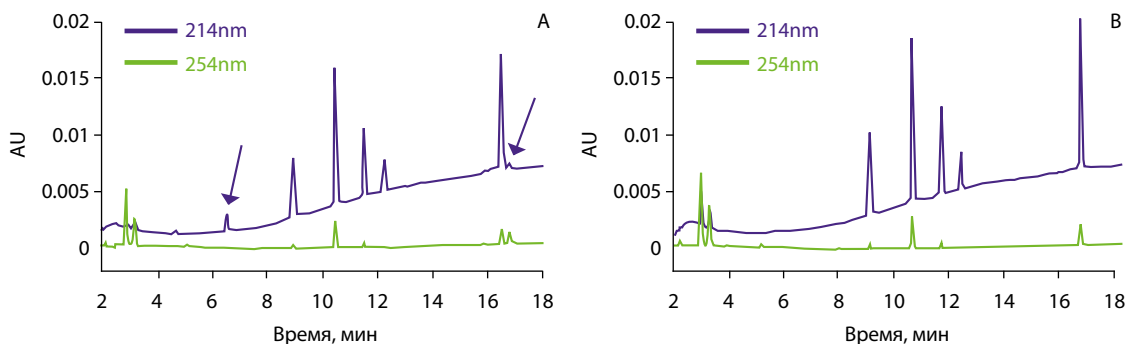


Рисунок 29. УФ-хроматограммы смеси лекарственных препаратов, отфильтрованной нейлоновой мембраной (A) и тефлоновой мембраной (B). Стрелками показаны пики, порождаемые материалом мембраны.

4.3 Случаи загрязнения сверхчистой воды

Данный раздел содержит рекомендованные действия в случае возможного загрязнения сверхчистой воды и её влияния на исследования ВЭЖХ.

- ▶ **а Проверка воды на наличие загрязнений**
- ▶ **б Установление причин появления загрязнений в сверхчистой воде и способы их устранения**

4.3а Проверка воды на наличие загрязнений

Если вы подозреваете, что очищенная вода загрязнена, проведите следующие тесты:

Прямая инфузия в масс-спектрометр: Растворитель должен давать очень низкий фоновый МС-сигнал. На Рисунке 22 приведен пример масс-спектров сверхчистой воды из разных источников. (На Рисунке 22 свежеприготовленная сверхчистая вода дает намного меньший фоновый шум по сравнению с бутилированной водой для УВЭЖХ).

Градиентный тест: Получите градиент воды и органического растворителя (ацетонитрила или метанола) от 100% до 0% воды; подобный эксперимент описан в разделе 3.3а (ВЭЖХ) или 3.4b (УВЭЖХ). Чистый растворитель не дает пиков. Для того чтобы проверить, что источником посторонних пиков является вода, сделайте следующее:

- ▶ Проведите градиентное элюирование несколько раз, изменяя время уравнивания. Например, в первый раз 5 минут равновесного состояния, во второй раз – 10 минут.
- ▶ Если посторонние пики увеличиваются пропорционально времени уравнивания, их источник – примеси в воде.

4.3б Установление причин появления загрязнений в сверхчистой воде и способы их устранения

Если вы установили, что сверхчистая вода загрязнена, описанные ниже действия помогут установить причину загрязнения:

- ▶ Какой фильтр финишной очистки вы используете? Проверьте, что установлен фильтр Millipak Express, а не BioPak®.
- ▶ Проводите ли вы регулярное техническое обслуживание системы? (Отсутствие предупреждающих сообщений, регулярная замена картриджей и ламп, замена фильтра Millipak каждые 6 месяцев и т.д.)
- ▶ Проводите ли вы регулярное техническое обслуживание системы Elix, питающей систему Milli-Q? Качество сверхчистой воды, производимой системой Milli-Q, отчасти зависит от качества входящей воды.
- ▶ Не подсоединена ли к фильтру Millipak пластиковая трубка (например, Tugon)? Никогда не используйте трубку на конце фильтра.
- ▶ Не хранилась ли вода Milli-Q? Используйте только свежеприготовленную сверхчистую воду. Перед отбором воды слейте первые 1–2 литра.

Список литературы

1. Rozing, G. "Trends in HPLC Column Formats – Microbore, Nanobore and Smaller." LCGC Europe, June, 2-7, (2003).
2. Snyder, L.R.; Kirkland, J.J.; Dolan, J.W. Introduction to Modern Liquid Chromatography," 3rd Ed, John Wiley and Sons, New Jersey, (2010).
3. Yu, Z.; Wang, X.; Mukherjee, P.; Petersson, P. "Critical comparison of performances of superficially porous particles and sub-2 μm particles under optimized ultra-high pressure conditions," J. Chromatogr. A, 1216, 4597-4605, (2009).
4. Cabrera, K. "Applications of silica-based monolithic HPLC columns," Journal of Separation Science, 27, 843–852, (2004).
5. Dejaegher, B.; Mangelings, D.; Vander Heyden, Y. "Method development for HILIC assays," Journal of Separation Science, 31, 1438–1448, (2008).
6. Henry, C. M. "Kicking Separation Up a Notch: Ultra-high-pressure chromatography improves speed, resolution, and sensitivity of HPLC," Chemical and Engineering News, 82, 70-71, (2004).
7. Henry, R.A. "The Early Days of HPLC at DuPont," LCGC North America, February, (2009).
8. ASTM Standard D1193–06, "Standard Specification for Reagent Water," March, (2006)
9. ISO 3696, "Laboratory water for analytical purpose – Specification and test methods," (1987).
10. Kano I.; Castillo E.; Darbouret D.; Mabic, S. "Using ultrapure water in ion chromatography to run analyses at the ng/L level" J. Chromatogr. A, 1039, 27-31, (2004).
11. De Los Reyes, G.; Yacteen, W.; Bejtlich, C.L.; Sarioglu T. in E.U. Patent No. 1466656, "Electrodeionization Process," (2004).
12. De Los Reyes, G.; Denoncourt, L.M. and Garcia, B. in U.S. Patent No. 6,365,023, "Electrodeionization Process," (2002).
13. Dimitrakopoulos, T.; Feuillas, E.; Darbouret, D.; Mabic, S. "Electrodeionization: technology and applications," R&D Notebook, 10, Millipore Corporation, (2006)
14. Kano, I.; Darbouret, D.; Mabic, S. "UV technologies in water purification systems," R&D Notebook, 9, Millipore Corporation, (2003).

15. Durbeej, B.; Eriksson, L.A. "Reaction mechanism of thymine dimer formation in DNA induced by UV light," *J. Photochem. Photobiol. A. Chemistry*, 152, 95-101, (2002).
16. Regnault, C.; Kano, I.; Darbouret, D.; Mabic, S. "Ultrapure water for liquid chromatography-massspectrometry studies," *J. Chromatogr. A*, 1030, 289-295, (2004).
17. Srikanth, B. "Recent advancements in UV technology yield enhanced TOC reduction performance," *Ultrapure Water*, 40-46, (1998).
18. Clark, K.; Retzik, M.; Darbouret, D. "Measuring TOC to maintain high-purity water," *Ultrapure Water*, 21- 24, (1997).
19. Light, T.S.; Licht, S. "Conductivity and Resistivity of Water from the Melting to Critical Points," *Anal. Chem.*, 59, 2227-2230, (1987)
20. Light, T.S. "Temperature Dependence and Measurement of Resistivity of Pure Water," *Anal. Chem.*, 56, 1138-1142, (1984).
21. Nora, C.; Mabic, S.; Darbouret, D. "A theoretical approach to measuring pH and conductivity in high-purity water," *Ultrapure Water*, October, 56-60, (2002).
22. Mabic, S.; Regnault, C.; Krol, J. "The Misunderstood Laboratory Solvent: Reagent Water for HPLC," *LCGC*, January, (2005).
23. Stewart, B.; Williamson, B. L. "Evaluation of HPLC reagent water purity via LC-MS and total organic carbon analysis," *Am. Laboratory*, December, 19, 16-18, (2001).
24. Tarun, M.; Monferran, C.; Devaux, C.; Mabic, S. "Improving chromatographic performance by using freshly delivered ultrapure water in the mobile phase," *LCGC The Peak*, June, 7-17, (2009).
25. Mabic, S.; Kano, I. "Impact of purified water quality on molecular biology experiments," *Clin. Chem. Lab. Med.*, 41, 486-491, (2003).
26. Tarun, M.; Budac, D.; Hayward, M.; Mabic, S. "Ultrapure water for Nano LC/MS analyses," Poster presented at HPLC 2008, May 12-16, Baltimore, (2008).
27. Tarun, M.; Mabic, S. "Minimizing clogging problem in nanoLC-MS by using ultrapure water," Paper in preparation.
28. McMaster, M.C. *LC/MS a Practical Users Guide*. John Wiley and Sons, New Jersey, (2005).
29. Regnault, C.; Mabic, S. "Benefits of the pretreatment step in purifying water for LC-MS analyses," *LCGC The column*, September, 12-15, (2005).
30. Classon, R. in the presentation "Practical Techniques for LC/MS Analysis," March, (2005).
31. Liu, S. "Quality Evaluation of HPLC-Grade Acetonitrile," *Am. Laboratory*, 40, 22-29, (2008).

Milli-Q, Elix, BioPak, Jetpore, Millipak, Q-POD, Express и Millipore являются зарегистрированными торговыми марками Millipore Corporation.

ASTM, ISO, DNASep, UPLC, Xevo, Waters, Acquity, JT Baker, Shimadzu, Alliance, Agilent, WAVE, Transgenomics, Applied Biosystems, Acquity BEH, Atlantis, Symmetry, Pico Tip, BDH, Zorbax, Tygon, Burdick and Jackson и New Objective являются зарегистрированными торговыми марками соответствующих организаций.

iBondapak, Mariner, Primesphere, Optima, Quattro Premier, SymmetryShield, API 2000 и Sievers являются торговыми марками соответствующих организаций.

LC-Pak является торговой маркой Millipore Corporation.

Merck Millipore и марка M являются торговыми марками Merck KGaA.

Все права защищены.

Lit. No. PB1042EN00

ООО «МЕРК»

115054, г. Москва, ул. Валовая, д. 35

Тел.: +7 (495) 937-33-04

E-mail: mm.russia@merckgroup.com

www.merckmillipore.com