

液相色谱-串联质谱基质效应及其消除方法

苏 萌, 艾连峰*

(河北出入境检验检疫局, 石家庄 050051)

摘 要: 综合近年来国内外进行液相色谱-串联质谱方法开发中关于基质效应的相关报道, 重点介绍了液相色谱-串联质谱基质效应的消除方法, 主要包括: 选择合适的样品前处理方法; 选择最佳的色谱分离条件; 优化的质谱分析参数; 使用恰当的内标; 采用基质标准溶液校正。这些方法的应用, 可有效改善基质效应的影响, 优化液相色谱-串联质谱检测方法。

关键词: 液相色谱-串联质谱; 基质效应; 消除方法

Matrix effects and elimination methods of liquid chromatography-tandem mass spectrometry

SU Meng, AI Lian-Feng*

(Hebei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shijiazhuang 050051, China)

ABSTRACT: The related domestic and international reports on the matrix effects of liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method were reviewed. The elimination methods of LC-MS/MS matrix effects were introduced, such as selection of appropriate method for sample preparation, selection of suitable chromatographic separation conditions, optimization of conditions for mass spectrometry, usage of suitable internal standard, calibration by matrix matched standard solution. These methods can effectively improve the effect of matrix effect, optimize the method of liquid chromatography tandem mass spectrometry.

KEY WORDS: liquid chromatography-tandem mass spectrometry; matrix effect; elimination methods

大气压电离技术的发展使高效液相色谱与质谱的串联得以实现。液相色谱-串联质谱是将高效液相色谱的高分离度与质谱的高选择性、高灵敏度的完美结合, 近年来发展迅速, 现在已广泛应用于医药、食品安全等领域。但是, 由于液相色谱-串联质谱存在基质效应, 给复杂生物样品分析方法的建立带来了不少困扰。基质效应对方法的定量限(LOQ)、检出限(LOD)、线性、准确度和精密度产生严重的影响。

基质是样品中被测物以外的组分, 常对被测物分析有显著的干扰, 并影响测定结果的准确性, 这些干扰和影响被称为基质效应。基质效应表现为离子抑制或离子增强。

液相色谱-串联质谱中的基质效应产生的原因一般认为是由于基质中的非挥发性组分与待测物质, 在雾滴表面离子化的过程中产生竞争, 影响电喷雾接口处的离子化效率。这些非挥发性的基质组分将雾

基金项目: 河北出入境检验检疫局科技项目(HE2011K005)

Fund: Supported by the Hebei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau Technical Project (HE2011K005)

*通讯作者: 艾连峰, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。E-mail: ai_lianfeng@126.com

*Corresponding author: AI Lian-Feng, Senior Engineer, Hebei Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shijiazhuang 050051, China. E-mail: ai_lianfeng@126.com

滴吸引在一起,阻止其裂解成更小的微滴。根据接口处离子化和离子蒸发过程中的变化情况,这种竞争可能会增强(离子增强)或者妨碍(离子抑制)被分析物离子的形成效能,也就是说被分析物离子的形成效能与进入电喷雾离子源的基质密切相关。也有人认为基质效应是由于待测组分与基质中内源性物质共洗脱而引起的色谱柱超载所致^[1]。在 Antiganacet 等,的研究中指出,产生基质效应的干扰性物质分为两类。一类叫做“内源性物质”:它源自于被分析物本身,并保留在最终提取液中的物质,包括盐、强极性化合物、表面活性剂以及与目标化合物结构类似的脂类、胺类、肽类等。另一类叫做“外源性物质”:它并非来自基质本身,而是来源于方法建立过程中外部环境,包括塑料和聚合物残留、离子对试剂、有机酸、缓冲溶液等^[2]。

因此,在方法建立过程中,全面了解基质效应的消除(或最小化)方法至关重要。本文将对近年来报道的,有关液相色谱-串联质谱基质效应的消除方法做一综述。

目前,在液相色谱-串联质谱方法建立过程中详细说明基质效应消除方法的文章在国内还较少。消除基质效应的方法有^[1-12]:(1)选择合适的样品前处理方法;(2)选择合适的色谱分离条件;(3)优化质谱分析条件;(4)使用合适的内标;(5)采用基质标准溶液校正。

1 选择合适的样品前处理方法

样品溶液上机前提取、净化的程度,决定了样品溶液中基质成分以及残留数量的不同,从而导致不同程度的基质效应。因此,样品前处理方法的选择直接影响基质效应的强度。传统的消除基质效应的前处理方法有:蛋白质沉淀(PPT)、液液萃取(LLE)、固相萃取(SPE)、样品稀释(或减少进样量)等。

Erin 等,对蛋白质沉淀、液液萃取、固相萃取(反相固相萃取柱、离子交换柱、混合型固相萃取柱)等几种常规的样品前处理方法进行了比较。结果显示,蛋白质沉淀方法的效果最差;其次是反相固相萃取和离子交换固相萃取;效果最好的是兼具反相和离子交换机理的混合型固相萃取柱;液液萃取也可以达到较好的净化效果,但是对于极性化合物的回收率较低^[13]。在 Vladimír 等的研究^[14]中,亦使用了混合型离子交换柱,使液相色谱-串联质谱方法检测人

体血液中的美沙特罗残留量的基质效应降到最低。在此两组实验中,对于这几种常规的前处理方法,混合型固相萃取柱的净化效果最佳。同时,固相萃取柱上样前的处理以及淋洗、洗脱条件的不同,都会导致最终基质效应的不同。Mathieu 等的研究中^[15],比较了硅胶基质和聚合物基质的反相固相萃取柱,结果表明,对于这两种固相萃取柱,以甲醇洗脱液,减少干扰物磷脂的洗脱,必须减小洗脱液中甲醇的比例,而对于硅胶基质反相固相萃取柱 100%的乙腈可以显著降低干扰物磷脂的洗脱,同时,使目标物得到最佳的回收率。因此,使用硅胶基质固相萃取柱,以乙腈洗脱,使实验达到最佳效果。

在上述研究中,固相萃取柱作为最有效的消除基质效应的方式应用于实验中。但是,对于不同分析物,还要通过实验来确定最优(基质效应影响最小)的前处理方法。Riet 等^[16]对尿液、口腔液、血浆中的违禁药进行检测,根据各种前处理方式对不同基质的净化效果、不同样品的预期浓度、最低检出限要求,确定不同的基质效应消除方法。尿液采用稀释的前处理方法,口腔液采用乙腈沉淀蛋白质的前处理方法,血浆采用固相萃取的前处理方法,均达到最佳效果。刘明艳等^[17]比较了两种前处理方法对 LC-MS/MS 测定家兔血清中淫羊藿黄酮类化合物基质效应的影响。以乙酸乙酯液-液萃取法进行样品前处理后,家兔血清中淫羊藿黄酮类化合物的绝对基质效应大于 100%,提取回收率和方法过程效率均较高且稳定;以 C₁₈ 小柱固相萃取法进行样品前处理后,家兔血清中淫羊藿黄酮类化合物的绝对基质效应低于 100%,提取回收率和方法过程效率均较低且不稳定。因此,采用乙酸乙酯液-液萃取法,适合作为样品前处理方法。

近年来,出现了许多新型的前处理方法,例如,在线前处理技术的发展,使得基质效应有新的、更高效的解决方式。在线固相萃取(SPE)、涡流色谱技术(turbulent flow, TFC),与传统的前处理方式相比具有速度快,回收率高,成本低的特点。这种方式在近年来文献中已有很多报道^[18-20]。

2 选择合适的色谱分离条件

由于 LC-MS/MS 分析中的基质效应是由被分析物的共流出组分影响电喷雾接口的离子化效率所致。因此,合理的色谱分离条件,使目标物与干扰物分离,

即可有效改善基质效应的影响。

Erin 等^[13]的研究指出, 流动相的 pH 值可改变目标物与杂质的保留行为, 且不同的 pH 值可改变离子源的电离行为, 因此合理调节流动相的 pH 值可改善基质效应的影响, 提高灵敏度。同时, 研究发现缩短流动相的梯度洗脱时间, 在不同 pH 值条件下, 不同程度的增加了阿米替林的基质效应。因此, 延长梯度时间, 使目标物与杂质有效分离, 可改善基质效应的影响。

同时, 由于不同种类色谱柱的分离效果不同, 也会对基质效应产生不同的影响^[21], 例如, 使用 HILIC 色谱柱与反相色谱柱相比可以有效的延长极性化合物的保留时间, 有效的除去杂质分子, 避免基质效应, 同时 HILIC 色谱柱使用的高比例挥发性有机相亦有助于质谱响应值的提高, 因此选择合适类型的色谱柱进行样品分析至关重要。

Jet 等^[22]通过实验比较了 HPLC 和 UPLC 分别串联质谱分析地表水中 9 种药物的基质效应。在 HPLC-MS/MS 分析中, 色谱分离效率低, 无法消除基质效应的影响, 使定量不准。UPLC-MS/MS 拥有更好的分离度和更窄的峰型, 使分析物与共流出物更好的分离, 以类似物为内标, 消除了基质效应的影响。另外, Eduard 等的研究亦表明, 基质效应的大小直接依赖于色谱分离性能^[23]。

Bernard 等^[24]运用二维色谱, 使目标物与杂质更有效的得到分离, 从而, 使基质效应得到明显改善。二维液相色谱是运用了柱反冲技术, 即第一根色谱柱将待测组分保留在色谱柱上, 基质组分不被保留而除去, 然后将第一根色谱柱上的待测组分反冲到第二根色谱柱进行分离。

3 优化质谱分析条件

实验表明, 多数化合物基质效应对 ESI 影响显著, 而对于 APCI、APPI 的影响很小或者没有影响。因此在仪器条件允许的情况下, 合理选择离子源, 是简便有效的消除基质效应的方法^[16,25]。

4 使用合适的内标

同位素内标是消除基质效应首选的内标物, 同位素内标与目标物具有相同的化学性质和相同的保留时间, 因此可以抵消质谱离子化过程中的基质效

应, 同时消除前处理过程中的差异。

但是, 一些同位素内标难以合成或价格昂贵, 使同位素内标的应用受到一定的限制。在 Villagrasa 等^[26]的研究中, 使用类似物做为内标, 在合理的试验条件下, 亦得到了满意的效果。

5 采用基质标准溶液校正

基质标准溶液, 即将空白样品经前处理后, 加入一定量待测物标准, 用以对检测结果进行校正。采用基质标准溶液校正, 是最常用的补偿基质效应的方法。在国内外液相色谱-串联质谱方法研究中应用十分广泛^[27-31]。

综上所述, 在具体的液相色谱-串联质谱方法开发过程中, 首先要根据目标化合物的性质、基质类型、检出限要求等对前处理方法进行优化, 比较多种前处理方法的净化效果, 兼顾基质效应和回收率, 尽可能多的消除可引起基质效应的内源性物质; 其次选择合适的离子源并对色谱条件进行优化, 以得到最优的分离效果, 避免共流出物的影响。选择合适的内标物、采用基质标准溶液校正是对产生的基质效应的补偿, 以抵消基质效应的影响, 是在前处理以及仪器条件无法消除基质效应的情况下的补偿措施, 以保证检测结果的准确性。

参考文献

- [1] Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration. Guidance for Industry on Bioanalytical Method Validation [J]. Fed Regist, 2001, 66(100): 28526(Docket No. 98D-1195).
- [2] Dipartimento DSG, Tecnologie CEA, Universita DSDU, *et al.* An Overview of matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Mass Spectr Rev, 2011, 30: 491-501.
- [3] Anneli KIL, Koit H. Combating Matrix Effects in LC/ESI/MS: The Extrapolative Dilution Approach [J]. Anal Chim Acta, 2009, 651: 75-80.
- [4] 齐美玲. 液相色谱-质谱法在生物样品药物定量分析中的基质效应[J]. 药物分析杂志, 2005, 25(4): 476-479.
Qi ML. Matrix effects in liquid chromatography-mass spectrometry determination of drugs in biological samples [J]. Chin J Pharm Anal, 2005, 25(4): 476-479.
- [5] 向平, 沈敏, 卓先义. 液相色谱-质谱分析中的基质效应[J]. 分析测试学报, 2009, 28(6): 753-756.
Xiang P, Shen M, Zhuo XY. Matrix effects in liquid chromatographic-mass spectrometric analysis [J]. J Instrum Anal, 2009,

- 28(6): 753–756.
- [6] Paul JT. Matrix effects: The Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry [J]. *Clin Biochem*, 2005, 38: 328–334.
- [7] King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C, *et al.* Mechanistic Investigation of Ionization Suppression in Electrospray Ionization [J]. *J Am Soc Mass Spectr*, 2000, 11: 942–950.
- [8] Shah VP, Midha KK, Findlay J, *et al.* Bioanalytical Method Validation—a Revisit with a Decade of Progress [J]. *Pharm Res*, 2000, 17(12): 1551.
- [9] 王立琦, 贺利民, 曾振灵, 等. 液相色谱 - 串联质谱检测兽药残留中的基质效应研究进展 [J]. *质谱学报*, 2011, 32(6): 321–332.
- Wang LQ, He LM, Zeng ZL, *et al.* Progress in matrix effect of veterinary drug residues analysis by high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. *J Chin Mass Spec Soc*, 2011, 32(6): 321–332.
- [10] 谢家树, 葛庆华. LC/MS 测定中生物样品的基质效应问题 [J]. *药物分析杂志*, 2008, (8): 1386–1389.
- Xie JS, Ge QH. Matrix effects in bioanalysis by LC/MS [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2008, (8): 1386–1389.
- [11] 姚梦侃, 马秉亮, 马越鸣. 生物样品液质联用分析中的基质效应研究概况 [J]. *药物分析杂志*, 2010, 30(12): 2436–2440.
- Yao MK, Ma BL, Ma YM. Overview of the matrix effect in quantitative liquid chromatography/mass spectrometry analyses of biological samples [J]. *Chin J Pharm Anal*, 2010, 30(12): 2436–2440.
- [12] 贾彦波, 王清清, 宋海峰. 高效液相色谱-串联质谱法 (HPLC-MS-*n*) 分析生物样品时的基质效应研究 [J]. *军事医学*, 2011, 35(2): 149–152.
- Jia YB, Wang QQ, Song HF. Matrix effects derived from using high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry in biosamples [J]. *Mil Med Sci*, 2011, 35(2): 149–152.
- [13] Erin C, Diane MWD, Ziling L, *et al.* Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 852: 22–34.
- [14] Vladimír Č, Spencer JC. Minimizing matrix effects in the development of a method for the determination of salmeterol in human plasma by LC/MS/MS at low pg/mL concentration levels [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 856: 285–293.
- [15] Mathieu L, Jean-Nicholas M, Milton F, *et al.* Elimination of LC-MS/MS matrix effect due to phospholipids using specific solid-phase extraction elution conditions [J]. *Bioanalysis*, 2010, 6: 1011–1021.
- [16] Riet D, Marilyn AH, Willy EL, *et al.* Matrix effect in bioanalysis of illicit drugs with LC-MS/MS: influence of ionization type, sample preparation, and biofluid [J]. *Am Soc for Mass Spec*, 2003, 14: 1290–1294.
- [17] 刘明艳, 姚志红, 张依, 等. 两种前处理方法对 LC-MS/MS 测定家兔血清中淫羊藿黄酮类化合物基质效应的影响 [J]. *分析测试学报*, 2011, 30(9): 1006–1012.
- Liu MY, Yao ZH, Zhang Y, *et al.* Impact of two pretreatment methods on the matrix effect of epimedium-derived flavonoid compounds in rabbit serum by LC-MS/MS [J]. *J Instrum Anal*, 2011, 30(9): 1006–1012.
- [18] Jane K, Elie F. Strategies for the elimination of matrix effects in the liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis of the lipophilic toxins okadaic acid and azaspiracid-1 in molluscan shellfish [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217: 7123–7130.
- [19] Amdt A, Jurgen E, Therese K, *et al.* Trace determination of priority pesticides in water by means of high-speed on-line solid-phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry using turbulent-flow chromatography columns for enrichment and a short monolithic column for fast liquid chromatographic separation [J]. *J Chromatogr A*, 2002, 960: 109–119.
- [20] Haymond NX, Leimin FMJ, Rieser TA, *et al.* Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2007, 44: 342–355.
- [21] Weng ND. Bioanalytical liquid chromatography tandem mass spectrometry methods on underivatized silica columns with aqueous/organic mobile phases [J]. *J Chromatogr B*, 2003, 796: 209–224.
- [22] Jet CVDS, Kjell AM, Willy EL. Tling matrix effects during development of a liquid chromatographic-electrospray ionisation tandem mass spectrometric analysis of nine basic pharmaceuticals in aqueous environmental samples [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1123: 71–78.
- [23] Eduard R, Daniel S. Evaluation of matrix effect and chromatography efficiency: new parameters for validation of method development [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005, 16: 1757–1759.
- [24] Bernard KC, David MH, Arkady IG. Effect of liquid chromatography separation of complex matrices on liquid chromatography-tandem mass spectrometry signal [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 907: 337–342.
- [25] Ivano Marchi, Véronique V, Flavia B, *et al.* Characterization and classification of matrix effects in biological samples analyses [J]. *J Chromatogr B*, 2010, 1217: 4071–4078.
- [26] Villagrasa M, Guillamón M, Eljarraat E, *et al.* Matrix effect in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry analysis of benzoxazinoid derivatives in plant material [J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1157: 108–114.

- [27] 蒋施, 赵颖, 金雁, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定动物组织 19 种兽药残留量[J]. 理化检验: 化学分册, 2010, 46(11): 1319-1322.

Jiang S, Zhao Y, Jin Y, *et al.* UHPLC-MS/MS Determination of residual amounts of 19 veterinary drugs in animal tissues [J]. PTCA (Part B: Chem Anal), 2010, 46(11): 1319-1322.

- [28] 陈红平, 刘新, 王川丕, 等. 超高压液相色谱-串联质谱测定茶叶中 10 种极性农药残留[J]. 分析试验室, 2011, 30(8): 48-53.

Chen HP, Liu X, Wang CP, *et al.* Determination of 10 polar pesticide residues in tea using ultra performance liquid chromatography and tandem mass [J]. Chin J Anal Lab, 2011, 30(8): 48-53.

- [29] 刘洪斌, 于洪侠, 刘佳佳, 等. 高效液相色谱-串联质谱法检测牛奶中多种苯并咪唑兽药残留[J]. 分析试验室, 2011, 30(3): 13-17.

Liu HB, Yu HX, Liu JJ, *et al.* Simultaneous determination of benzimidazoles in milk by liquid chromatography tandem mass spectrometry [J]. Chin J Anal Lab, 2011, 30(3): 13-17.

- [30] 刘华良, 阮丽萍, 刘德晔, 等. 高压液相色谱-串联质谱法检测食物中毒样品中的乌头碱[J]. 食品安全质量检测学报, 2013, 4(4): 1141-1145.

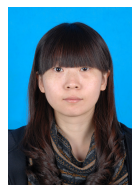
Liu HL, Ruan LP, Liu DH, *et al.* Determination of aconitine in

food poisoning samples by high pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Food Safe Qual, 2013, 4(4): 1141-1145.

- [31] Mei H, Hsieh Y, Nardo C, *et al.* Investigation of matrix effects in bioanalytical high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometric assays: application to drug discovery [J]. Rapid Commun Mass Spectr, 2003, 17: 97-103.

(责任编辑: 赵静)

作者简介



苏萌, 硕士研究生, 主要研究方向为食品安全检测技术。

E-mail: sumeng0113@126.com



艾连峰, 高级工程师, 主要研究方向为食品安全检测。

E-mail: ai_lianfeng@126.com