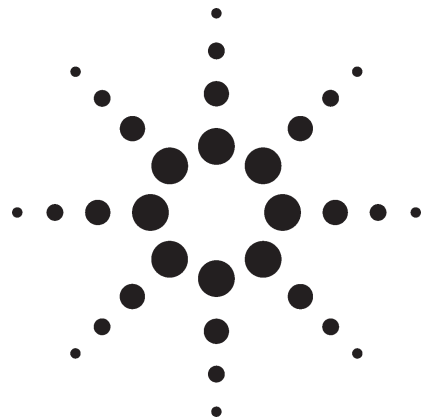


液相色谱—电喷雾质谱联用仪分析水样品时样品基质对电离抑制的影响



作者

Neil Cullum
Anglian Water Services Laboratories
Hinchingsbrooke Business Park
Kingfisher Way, Huntingdon, PE29 6FL
UK

Chin-Kai Meng and Paul Zavitsanos
Agilent Technologies, Inc.
2850 Centerville Road
Wilmington, DE 19808-1610
USA

摘要

液相色谱-电喷雾质谱是功能非常强大的技术,它结合了液相色谱的分离功能和质谱检测的高选择性和高灵敏度,但电离过程容易受到基质信号的影响。因此,信号抑制是液相色谱/质谱定量分析中的一个富有挑战性的问题。本文应用安捷伦科技公司的1100系列四极杆质谱系统与1100液相色谱系统联用,揭示了离子抑制现象的主要是由萃取步骤中带入到萃取物样品中化合物引起的。

前言

液相色谱(LC)电喷雾质谱(ESI-MS)是用于有机化合物分析的功能强大的工具。该技术结合了液相色谱的分离功能和质谱的高选择性和高灵敏度。尽管如此,ESI-

MS的一个缺点是电离过程容易受到基质信号抑制的影响。在不同的基质条件下,一个标准样品的液相色谱/质谱(LC/MS)响应值会有显著的差异。因此,信号抑制是LC/MS用于定量分析时的一个挑战性课题。

早期研究表明信号抑制效应主要是由基质组分和被测物之间电荷竞争、或者从液滴表面到气相的竞争而引起的[1]。其他因素包括,表面张力[2,3]、样品pH值[4]和化合物极性[5]。已报道的有关降低抑制效应的方法包括:采用选择性更好的萃取方法去除基质[6],优化条件使被测物色谱保留时间更长[6,7],改变缓冲溶液及其浓度[3,8,9],分流[10]或纳流喷雾[11],柱后添加[12]和二维色谱[13]等。上述所有方法都可以用于减少信号抑制效应,因为在此条件下,产生更细更均一的雾滴。

在本文中,将目标化合物溶解于不同的水基质中,以研究样品基质对信号抑制的影响。在使用饮用水作基质时,特别是在水样品来源于地表水源时,信号抑制可能是由腐殖酸和甲酸引起的,这些物质在水含量高的流动相条件下很早流出[4]。这些酸是由称为腐殖质的有机物分解自然产生的有机酸。对于某些化合物,电离抑制会导致回收率显著降低。最近报道了在不同水基质中的抑制效应[4,14]。



Imazapyr(图 1)在不同的水基质中总回收率有明显差异[15]; 对于地下水中, 其回收率为 73%, 对于来自地表水源的饮用水, 其回收率为 48%。

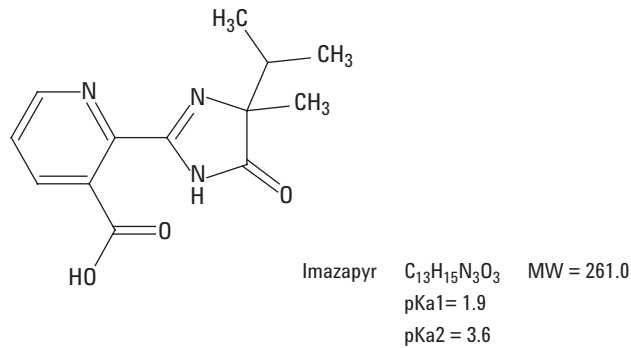


图 1. Imazapyr 的结构和本研究中使用样品的化学标样

本文进行了一系列实验来研究不同品基质的抑制效应, 通过测定总有机碳(TOC)含量, 来验证某种特定的基质是否是引起化合物总回收率明显变化的原因, 并观察其它参数是否影响抑制。

实验

所有分析都是用 Agilent 1100 系列液相色谱与 1100 四极杆质谱联用系统进行的。液相系统由真空脱气机、二

元泵、自动进样器和二极管阵列检测器(DAD)组成。四极杆质谱仪采用大气压电喷雾电离(API-ESI)源。图 2 是 10 mg/L Imazapyr 在负离子模式下的质谱图, 碰撞诱导解离电压为 75 v。该图是在流动注射分析(FIA)模式、改变碰撞诱导解离电压的情况下得到的。

使用自动 Labtoc TOC 分析仪测定了所有样品基质的 TOC。样品首先用浓磷酸酸化、通入氦气去除无机碳, 然后用过硫酸钠消解并用紫外(UV)光将有机碳转化为二氧化碳。用红外检测测量二氧化碳浓度。

初始工作选择了四种样品基质:

- 去离子水, TOC 测定值小于 0.1 mg/L
- 地表水, TOC 测定值为 0.5 mg/L
- 饮用水, TOC 测定值为 5 mg/L
- 河水, TOC 测定值为 15.5 mg/L

前三种基质也在基质解吸实验中使用。

在所有样品中都加入 Imazapyr, 含量均为 5 $\mu\text{g/L}$ 。在这个浓度下样品在 DAD 的工作范围以内, 可以用 MS 的全扫描模式分析。

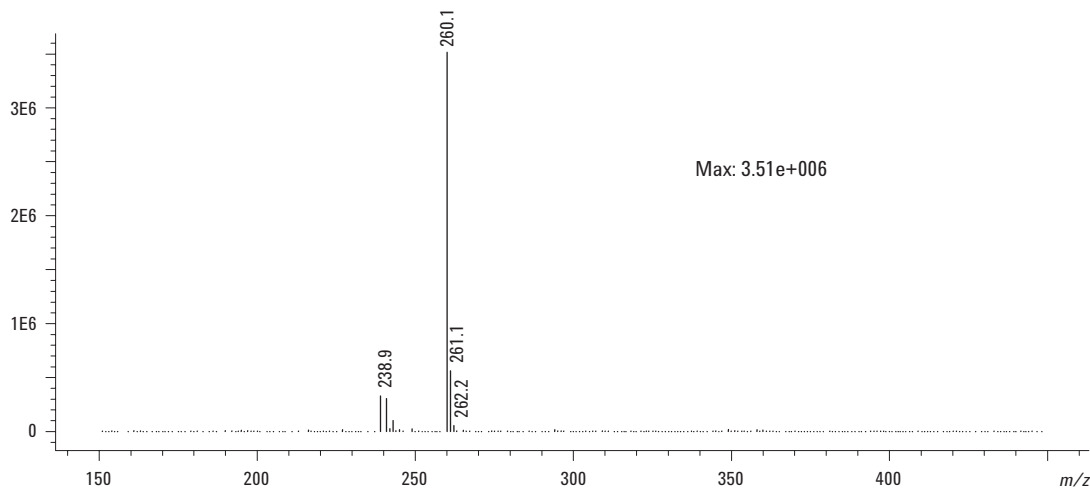


图 2. 在负离子模式、碰撞诱导解离电压为 75 伏的条件下, 10 mg/L Imazapyr 的质谱图。

本研究中使用的化学试剂和易耗品包括：

TMBE, 99.8%	HPLC 级	Sigma-Aldrich 部件号 29321-0
甲醇	HPLC 级	Rathburn Chemicals 部件号 RH1019
乙腈	HPLC 级	Rathburn Chemicals 部件号 RH1015
水	HPLC 级	Rathburn Chemicals 部件号 1020
甲酸, 98%	AR 级	Fisher Scientific 部件号 F/1900/PB08
盐酸, 37%		J.T.Baker 部件号 6011/2.5
Imazapyr 标样, 99%		Qmx 实验室部件号 C142830
Oasis HLB 卡套柱(60 mg, 3 mL)		Waters 公司部件号 WAT094226
Oasis MAX LP 卡套柱(60 mg, 3 mL)		Waters 公司部件号 186000368

样品制备

全自动固相萃取(SPE)使用 Tekmar Autotrace SPE 工作站和Oasis HLB (60 mg, 3 mL)卡套柱和以下系列溶液：

- 90:10 的甲基叔丁基醚(TBME):甲醇(0.01%甲酸)
 - 甲醇 (0.01%甲酸)
 - HPLC 级纯水
 - HPLC 级纯水 (0.25% 盐酸)
- 按下列顺序加入相应的溶剂,以活化每个卡套柱：

溶剂	溶液体积, mL
a	5
b	5
c	3
d	3

- 用去离子水将 50 mL 水相样品稀释到 200 mL, 并用 0.75 mL 浓盐酸酸化。本步骤是为了减少基质效应, 可以有足够的样品用泵输送通过卡套柱；
- 用泵将 100 mL 稀释的样品以 10 mL/min 的流速通过活化的卡套柱；
- 用空气干燥卡套柱 10 分钟；
- 分别用 1.5 mL 溶液(a)洗提卡套柱两次, 再用 1 mL 洗脱一次, 共 4 mL；

- 用弱的空气流将萃取液在 45℃ 的加热块上吹干
- 将残留物溶解在 0.25 mL 的 90:10 的水 (0.01% 甲酸)：甲醇溶液中。

基质去除步骤

离子抑制现象经常表现在萃取回收率变化上。为了将抑制现象与萃取回收率分开, 对由固相萃取步骤去除基质的过程进行了一系列实验。

研究了两种不同净化方法中化学机理, 以考察它们对离子抑制的影响。

MAX (阴离子) 卡套柱

MAX 卡套柱用于从基质中除去可能存在的腐殖酸。将这种卡套柱(60 mg, 3 mL)先用 3 mL 甲醇和 3 mL HPLC 级纯水老化, 再用泵使样品通过卡套柱以收集水。收集的水中加入 Imazapyr, 含量为 5 µg /L, 然后用标准方法重萃取。

HLB 卡套柱

用泵将不同类型的水样通过已活化的 HLB 卡套柱, 并收集水样品。收集的水中加入 Imazapyr, 含量为 5 µg /L, 然后用标准方法重萃取。

液相色谱条件

色谱柱	Zorbax Eclipse XDB-C18, 2.1 mm × 150 mm × 3.5 μm, 60°C	
柱流	二元泵, 等梯度模式	
流动相 A	0.01% 甲酸水溶液,	85%
流动相 B	乙腈,	15%
流速	0.3 mL/min	
进样量	50 μL	
DAD	230 nm (光谱范围 200-400nm)	

质谱条件

V _{cap}	2500 V (负), 3000 V (正)
解离电压	75 V
全扫描范围	100-400 amu
喷雾室压力	50 psi
干燥气流速	13 L/min
干燥气温度	350°C

结果与讨论

本文将质谱检测器(MSD)回收率结果与 LC DAD 测定结果的比值来分析离子抑制效应。用UV测量的回收率受实验中检验基质的影响不明显。对所有的样品和不同类型的基质(表1), UV参考标准的回收率值为84.1% ± 1.7%。该法的高精确度表明无论是在蒸馏水、自来水、地表水, 还是被解吸的水样品中, 萃取和测量系统都能产生可重复的结果。去离子水萃取物中加入的示踪物质的量相对较高, 为 5.0 μg/L, 原因有三点, (1) 避免由于在低浓度萃取时的非线性抑制效果使研究的复杂化;(2) 在这个浓度下可以在扫描模式下工作, 因而可以将所有实验的光谱范围数据都保存。从而有可能发现离子抑制的原因是否可从谱图数据中得到解释;(3) 在这个浓度水平下, 可以使用 DAD 测量, 以提供可预测的、可重复的、与基质无关的参考回收率

值。结果, 用 MSD 和 DAD 测量的预期值应该约为 5.0 μg/L。

本研究以应用报告[15]中列出的 MS 参数为初始值。在这些实验条件下, 背景谱图中 m/z 195 处簇离子的存在表明, 需要优化电喷雾离子源的参数。背景中该簇离子的存在表明目标分析物在负离子模式下的响应值低。如果离子源的去溶剂化不足并且有聚合离子形成, 那么对去离子水样品 (MSD/DAD=0.77), 系统测量出的回收率结果偏低, MSD 在负离子模式下的值为参考 DAD 回收率结果的 77%。因此, 调整雾化室压力、干燥气温度和流速, 直到簇离子消失为止。在不产生 m/z 195 离子的离子源条件下, 对去离子水样品与参考 DAD 回收率结果相比, MSD 回收率大大提高, 即 91%。

表 1. 在不同基质中，DAD 和 MSD 测量的回收率数据

水样		固相萃取前添加 Imazapyr 的样品						用 MAX 解吸的基质			用 HLB 解吸的基质		
		DAD	负离子 ESI	比值	DAD	正离子 ESI	比值	DAD	负离子 ESI	比值	DAD	负离子 ESI	比值
去离子水	平均	4.17	4.16	1.00	4.10	4.03	0.98	4.21	4.1	0.97	4.22	4.15	0.98
	标准偏差	0.12	0.13		0.08	0.14		0.16	0.09		0.11	0.24	
	% 相对标准偏差	3	3.2		2.06	3.38		3.8	2.2		2.6	5.8	
地表水 TOC=0.5 mg/L	平均	4.35	2.96	0.68	3.98	4.03	1.01	4.1	3.91	0.95	4.3	4.04	0.94
	标准偏差	0.15	0.05		0.11	0.19		0.12	0.13		0.18	0.29	
	% 相对标准偏差	3.4	1.6		2.76	4.66		2.9	3.2		4.1	7.1	
自来水 TOC=5 mg/L	平均	4.29	1.55	0.36	3.94	4.14	1.05	4.13	2.45	0.59	4.17	3.57	0.86
	标准偏差	0.15	0.14		0.13	0.11		0.09	0.09		0.07	0.17	
	% 相对标准偏差	3.4	8.7		3.30	2.71		2.2	3.6		1.8	4.8	
河水 TOC=15.5 mg/L	平均	3.04	0.9	0.30	3.04	2.88	0.95						
	标准偏差	0.1	0.05		0.1	0.11							
	% 相对标准偏差	3.4	6		3.4	3.9							

分析去离子水样品时，先对离子源金属表面进行彻底的清洗，并用 50:50 的异丙醇:水冲洗，然后进行质量轴校准和离子传输调整，可以提高去离子水样品的 MSD 回收率，达到参考 DAD 回收率的 97%。这些比值的 %RSD 大约为 3%。显然，对于清洁样品，离子源的去溶剂化和去簇化效率会产生明显的抑制效应。

如表 1 所示，无论在何种基质中，从添加样品中萃取的这种化合物，其正离子模式测定结果都没有表现出离子抑制。除了 DAD 数据的参考特性外，正离子模式的分析结果为研究 ESI 中信号抑制效应提供了一种参考。

依据将负离子模式的 ESI 结果与 DAD 和正离子 ESI 进行比较，可以更密切地把抑制的强度与基质中抑制剂的化学性质关联起来。

负离子抑制的特性可以从表 1 中所给的数据进行研究。对于从去离子水中萃取的样品，观察不到抑制效应。这种水的 TOC 要比 TOC 含量仅次于它的水至少低一个量级。负离子 ESI 谱图 (图 3) 与背景的谱图相比没有显著增加。此外，除了背景中的离子峰外，没有多少明显的离子峰。

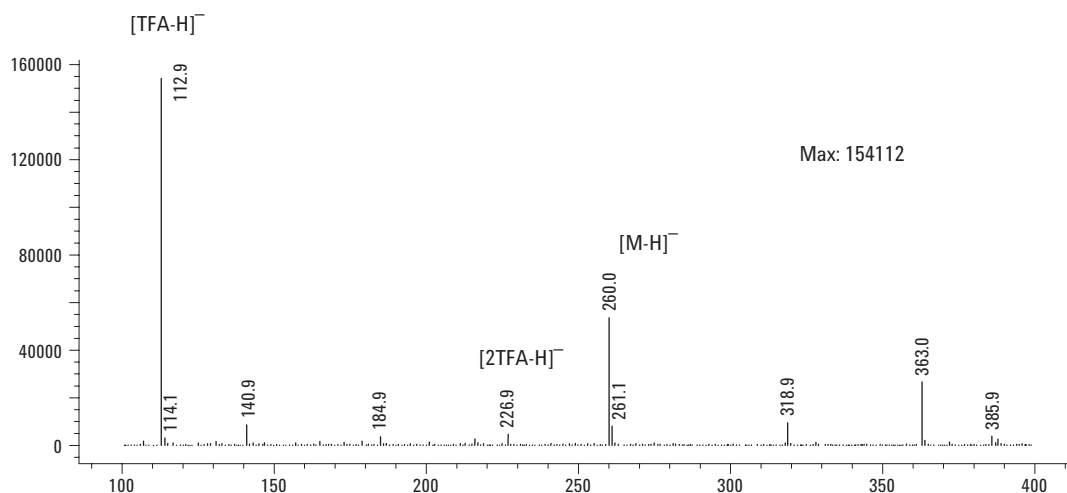


图 3. Imazapyr 在去离子水中的质谱图(含量 5.0 µg/L)

地表水的 TOC 测量值为 0.5 mg/L。用 MSD 测得的回收率结果为参考 DAD 信号测定值的 68%，这意味着存在明显的离子抑制。另外，谱图数据（图 4）表明在质荷比 300 以上有不少来自样品基质的背景离子。 m/z 300 以上的谱图表明与复杂聚合物的 ESI 谱相类似的谱系开始出现。

对于（TOC 测定值 5 mg/L）自来水的样品的分析结果得出质谱法测出的回收率是紫外法测得的结果的 36%。谱图数据（图 5）表明在质荷比 200 以上有不少来自样品基质的背景离子。聚合物谱系在低质量端的抑制被进一步增强。与前面的样品相比，离子的数目和强度都增加。

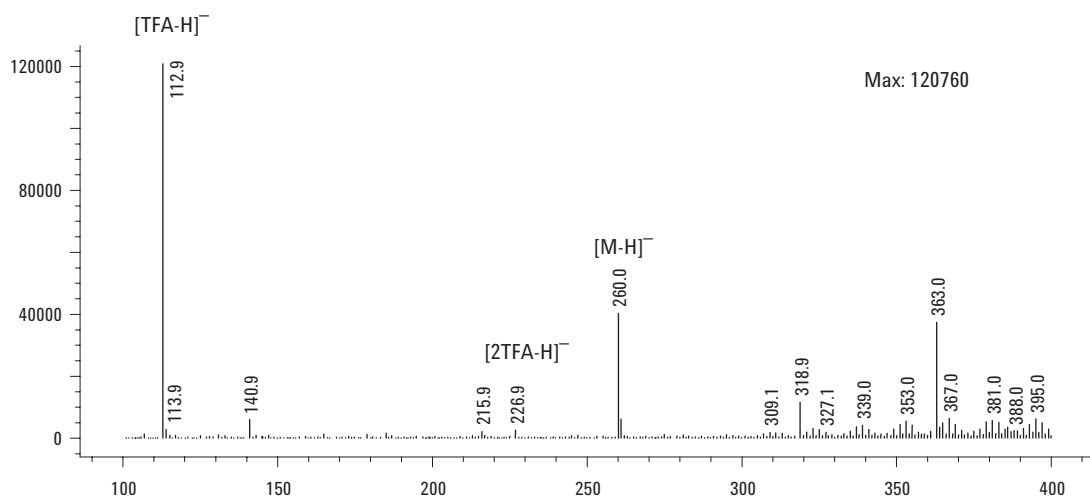


图 4. Imazapyr 在地表水中的质谱图(含量 5.0 µg/L)。注意由于样品基质影响，背景中 m/z 300 以上的离子数目显著增加

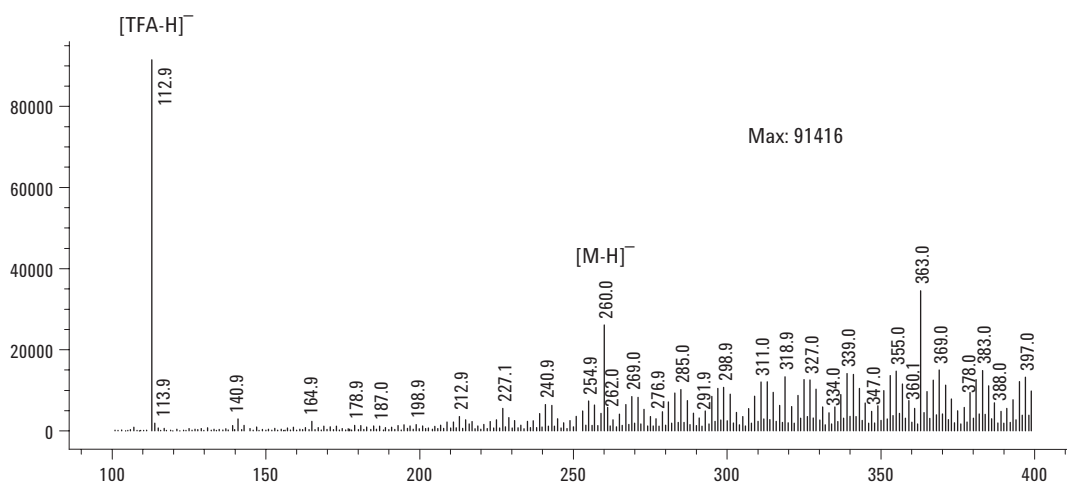


图 5. Imazapyr 在自来水中的质谱图(含量 5.0 µg/L)。由于基质中组分增加， m/z 200 以上离子数目急剧增加

为了进一步研究基质的影响，收集了含高 TOC 含量 (15.5 mg/L) 的河水，在不进行任何基质解吸的情况下分析。样品中加入 Imazapyr 的含量仍为 5.0 $\mu\text{g/L}$ ，用样品制备一节中所述的步骤萃取。萃取的样品在正离子和负离子模式下分析，并用 DAD 分析。由于没有对萃取的方法进行改进，所以可以预料，与从简单基质中萃取相比，结果会有一些差异。主要差别只是由于河水样品和简单基质样品中萃取的效率不同。结果表明，由于从有机物含量高的基质中萃取的效率问题，DAD 测量的回收率显著降低。尽管如此，在 5 $\mu\text{g/L}$ 的浓度水平下得到的色谱图和 ESI 谱图数据仍然非常好。即使没有对从河水中萃取样品的方法进行特定设计，回收率关系仍可保持。对比正离子 MSD 与 DAD 回收率结果可以看出，当萃取效率比这些河水样品中的低时，有机含量高的样品在正离子模式下没有呈现出明显的抑制。该萃取样品的正离子模式谱图与图 6 所示的自来水的非常相似。

然而，负离子模式表现出很大的抑制效应。从 MSD 负离子测定的回收率只有用 DAD 测定的参考 DAD 回收率的 30%。

萃取效率相同时，从不同基质中用 DAD 测定的回收率结果非常相似，与正离子模式下的结果相同。因此，观察到的离子抑制效应与负离子 ESI 过程相关而且还与图 4、5 中看到的产生谱系的物种的化学性质直接相关。抑制效应以及负离子谱图的复杂性和负离子谱系强度都随着基质中有机物含量的增加而增加，其中有机物含量可以用测得的 TOC 表示。图 7 和图 8 表示了 TOC 和回收率以及反算数据的偏差之间的关系。从图中可以看出，即使在较低的 TOC 浓度下，也表现出显著的抑制。

为了进一步验证这些观察到的现象，采用两种不同的净化方法对蒸馏水、地表水和自来水进行了基质解吸实验。

用 HLB 卡套柱检测在相同的萃取条件下的净化效果，用 Oasis MAX 卡套柱研究阴离子交换剂对抑制的作用。

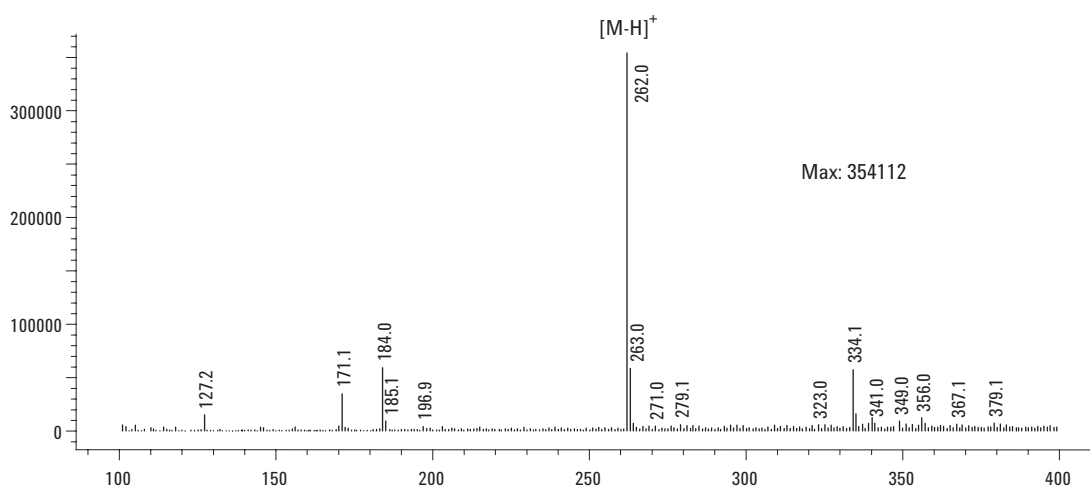


图 6. 使用 HLB 卡套柱、从自来水中萃取的 Imazapyr 质谱图，正离子模式。显示出 m/z 200 以上低背景离子丰度

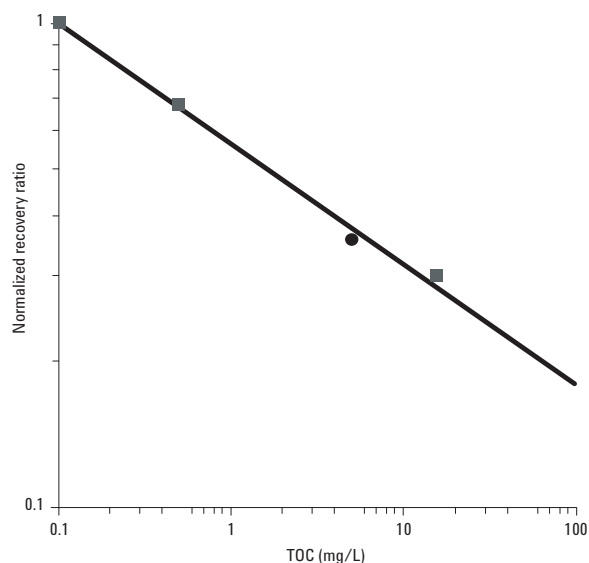


图 7. 归一化回收率比值与 TOC 的关系

在负离子 ESI 测定模式下, 无论使用何种净化方法, 在添加的分析物之前的基质解吸都显著增加了 ESI 回收率与参考 DAD 回收率的比值。在所有情况下, 净化方法都会降低 m/z 200 以上的离子连续谱的强度, 降低幅度为 50% 到 90%。该谱系的强度降低幅度越大, MSD 与 DAD 回收率比值也越大, 意味着离子抑制的程度越小。这有力地证明了部分抑制效应不是由于去溶剂化不够, 而主要与基质中化合物在萃取步骤中进入被萃取样品有关。这些抑制剂化合物的化学性质会在许多萃取化学中持续发挥其显著影响。

一般认为引起抑制效果的试剂是腐殖酸; 它将在 MAX 卡套柱中被阴离子交换树脂优先去除, 但结果表明不是腐殖酸的影响。HLB 卡套柱解吸化学在降低抑制效果方面比 MAX 卡套柱更有效。因此, 要么由于萃取条件问题腐殖酸没有被有效去除, 要么引起抑制的化合物不完全是腐殖酸。

水样品在 ESI-MS 分析中的离子抑制已经有广泛报道, 涉及广泛的萃取和测量条件。本文研究了一类非常复杂的、产生较高质荷比离子连续谱的化合物, 与以前报

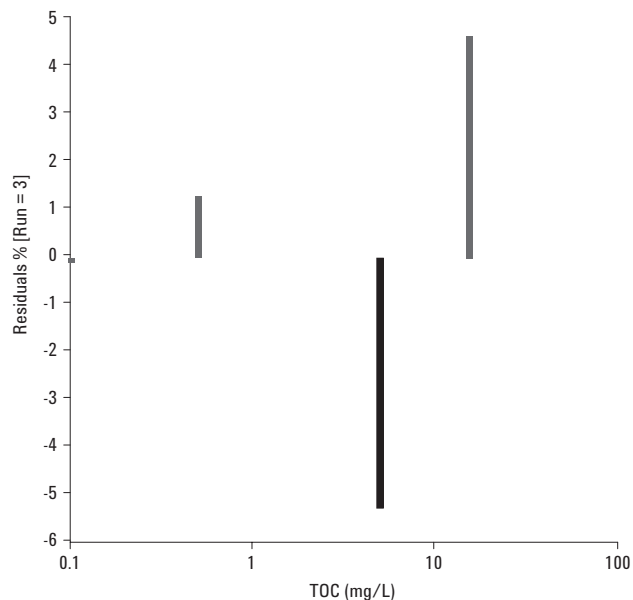


图 8. 图 7 的反算数据的偏差

道的有很大不同。这样一种不同的混合物事实上可以进行任何简单萃取步骤。一种理想的技术应该可以很好地区分这些物质, 不论其中有多少这样的化合物。

结论

本文研究了负离子模式下电喷雾质谱分析水样品的离子抑制效应, 得到两点结论。一是离子抑制受某些仪器条件影响而累积, 这些条件使得样品难以完全去溶剂化, 并在谱图上表现为强烈的成簇化。

第二点结论是绝大部分离子抑制现象主要是由样品瓶中的某些化合物引起的, 这些化合物也经过了萃取步骤, 其存在可以从光谱上得到验证。这些抑制剂在负离子模式质谱图中出现在质荷比 m/z 200 以上的连续区域。连续谱的强度绝大部分要高于测量的 m/z , 因此它可以从回收率结果上反映出离子抑制来, 却不能在色谱信号中看到。在专门的串联质谱技术中, 这种效应也很难被测定到。这种离子连续谱的强度越高, 说明抑制效果越强。在这些样品中, 离子在连续谱中的正离子响应与负离子响应相比要低得多。非常有趣的是, 在正离子模式下并没有产生离子抑制。

本研究结果表明可靠的检测方法对分析结果的质量是非常重要的, 高效的样品萃取方法是非常关键的; 如果样品足够干净, 就可以不需要使用串联质谱技术以及不用昂贵的同位素标记的内标物。将来的工作将侧重于发展这类化合物的更精确的鉴定方法以及分离技术, 比目前简单的 SPE 具有更强的分辨能力。

参考文献

1. Constantopoulos T. L., Jackson G. S., and Enke C. G. (1999) "Effects of salt concentration on analyte response using electrospray ionization mass spectrometry", *J. Am Soc Mass Spectr* **10** (7): 625-634.
2. Ikononou M. G., Blades A. T., and Kebarle P., (1991) "Electrospray Mass-Spectrometry of methanol and water solutions suppression of electric-discharge with SF₆ gas", *J. Am Soc Mass Spectr* **2** (6): 497-505.
3. Apffel A., Fischer S., Goldberg G., et al. (1995) "Enhanced Sensitivity for peptide-mapping with electrospray liquid-chromatography mass-spectrometry in the presence of signal suppression due to trifluoroacetic acid-containing mobile phases", *J. Chromatogr A* **712** (1): 177-190.
4. Steen R. J. C. A., Leonards P. E. G., and Brinkman U. A. T., et al. (1999) "Ecological risk assessment of agrochemicals in European estuaries", *Environ Toxicol Chem* **18** (7): 1574-1581.
5. Bonfiglio R., King R. C., and Olah T. V., et al. (1999) "The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds", *Rapid Commun Mass Sp* **13** (12): 1175-1185.
6. Matuszewski B. K., Constanzer M. L., and Chavez-Eng C. M. (1998) "Matrix effect in quantitative LC/MS/MS analyses of biological fluids: A method for determination of finasteride in human plasma at picogram per milliliter concentrations", *Anal Chem* **70** (5): 882-889.
7. Muller C., Schafer P., and Stortzel M., et al. (2002) "Ion suppression effects in liquid chromatography-electrospray-ionisation transport-region collision induced dissociation mass spectrometry with different serum extraction methods for systematic toxicological analysis with mass spectra libraries", *J Chromatogr B* **773** (1): 47-52.
8. Choi B. K., Hercules D. M., and Gusev A. I., (2001) "LC-MS/MS signal suppression effects in the analysis of pesticides in complex environmental matrices", *Fresen J. Anal Chem* **369** (3-4): 370-377.
9. Kuhlmann F. E., Apffel A., and Fischer S. M., et al. (1995) "Signal enhancement for gradient reverse-phase high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry analysis with trifluoroacetic and other strong acid modifiers by postcolumn addition of propionic acid and isopropanol", *J. Am Soc Mass Spectr* **6** (12): 1221-1225.
10. Gangl E. T., Annan M., and Spooner N., et al. (2001) "Reduction of signal suppression effects in ESI-MS using a nanosplitting device", *Anal Chem* **73** (23): 5635-5644.
11. Bahr U., Pfenninger A., Karas M., and Stahl B. (1997) "High sensitivity analysis of neutral underivatized oligosaccharides by nanoelectrospray mass spectrometry", *Anal Chem* **69** (22): 4530-4535.
12. Choi B. K., Gusev A. I., and Hercules D. M. (1999) "Postcolumn introduction of an internal standard for quantitative LC-MS analysis", *Anal Chem* **71** (18): 4107-4110.
13. Pascoe R., Foley J. P., and Gusev A. I. (2001) "Reduction in matrix-related signal suppression effects in electrospray ionization mass spectrometry using on-line two-dimensional liquid chromatography", *Anal Chem* **73** (24): 6014-6023.
14. Draper W. M. (2001) "Electrospray liquid chromatography quadrupole ion trap mass spectrometry determination of phenyl urea herbicides in water", *J. Agr Food Chem* **49** (6): 2746-2755.
15. Cullum N., Stephens P., and Evans S. (2002) "Determination of acidic herbicides in ground-water and potable water by LC/MSD using selective ion monitoring". Agilent Technologies publication, 5988-5882EN. www.agilent.com/chem

如需详细信息

如需了解有关产品和服务的详细信息，请登录我们的
网站：www.agilent.com/chem

安捷伦公司对本材料中可能包含包含的错误以及由本材料的提供、性能和使用等引起的意外或伤害不负任何责任。

本资料中内容如有变动，恕不另行通知。

© 安捷伦科技有限公司版权所有，2003。

中国印刷
2003年11月18日
5989-0371CHCN