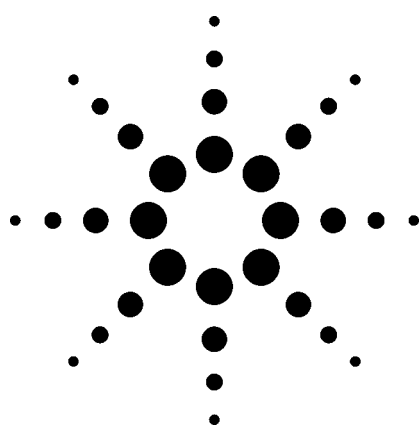




使用 LC-ESI-MS 负离子模式提高水样中被测物质的离子化效率

应用

环境

作者

Neil Cullum
Anglian Water Services Laboratories
Hinchingsbrooke Business Park
Kingfisher Way, Huntingdon, Cambs
UK

摘要

本文介绍了使用液相色谱-电喷雾电离质谱 (LC-ESI-MS) 的负离子模式提高样品离子化效率的实验改进，并用于类固醇雌激素和酸性除草剂这两类物质的测定。

前言

在使用电喷雾电离质谱 (ESI-MS) 负离子模式时，离子化抑制是一个有待解决的问题。事实上，当萃取效率相近时，低的离子化效率会导致不同样品基质的被分析物的回收率明显降低。

离子化抑制效应的主要原因是样品基质成分和目标化合物在电喷雾离子源进行离子化时相互之间的竞争，以及它们从所形成的液滴中释放出来的相互竞争作用。这种离子化抑制效应的程度取决于被分析化合物的性质，而且在流动相中水含量比例较高的时候更为明显。

有几种方法可以降低离子化抑制效应，从而提高目标化合物的萃取效率。

- 净化样品基质：除去样品提取物里的不希望存在的物质。对于含组分数较少的样品来说，可以有针对性地采取化学净化步骤来净化样品基质，而对于含组分数较多的样品来说，由于不同组分间的物理化学性质差别较大，所以不宜用此方法来处理样品基质。例如，样品中一些极性较大的组分不易在固相萃取柱上保留，或者在清洗步骤中就从固相萃取柱上洗脱下来。
- 使用从同种样品基质中萃取的标准品。只要被分析的样品基质只有一种，使用这种方法是有效的。如果要分析的是小批量的样品有多种不同的基质，就会导致分析通量降低。
- 使用内标物 (ISTD)：当分析单个样品组分时，这是个非常有效的方法（如果可以获得氘代标准品的话）。然而，当处理含有大量不同化合物的样品时，可能需要多个内标物，故增加了此方法的复杂性和成本。
- 在开发分析方法时，尝试其它的离子化方法（如果可以）；例如，大气压化学电离 (APCI) 和大气压光离子化 (APPI)。虽然这两种离子源不常发生离子化抑制效应的问题，但不一定适用于各种各样的被分析物。某些被分析物可能是热敏感物质，而其它物质也许不能被离子化的。在处理离子化抑制效应问题时，使用正/负离子模式切换是一个很有用的方法 [1]。例如，咪唑烟酸（一种除草剂）用 ESI 方法的负模式分析时，在不同的样品基质中，回收率是不同的 [2]；在地下水的样品



Agilent Technologies

基质中，回收率有 73%，而在自来水中（来源于地表水），则是 48%。然而，在正模式下分析时，来自这两种不同样品基质的咪唑烟酸的回收率均超过 90%。由于有些物质在这两种离子源中不能都离子化，所以这个方法可能不适合所有目标物的分析。

- 使用保留更强的 LC 分析条件，将目标化合物从基质干扰物中洗脱下来，或者将这些化合物转移到有机溶剂含量高的溶液中。
- 尝试其它技术：调整缓冲溶液的种类和/或 pH，柱后添加有机溶剂，以及使用纳米喷雾技术。

在本应用文摘中，我们证明了在分析酸性物质时，通过调节流动相 pH，并结合柱后添加异丙醇，可以降低离子化抑制效应。下面介绍两个例子。

实验

第一个样品是类固醇雌激素，主要的组分有：雌酮 (E1)，雌二醇 (E2) 和乙炔基雌二醇 (EE2)，它们的结构式见图 1。

最初，在负离子模式下，对这三个雌激素分别进行流动注射分析 (FIA)，获得优化的负离子电喷雾条件，在此条件下，采用 HPLC 级水和乙腈混合体系的简单梯度洗脱来分离这三种甾族类化合物。见图 2。

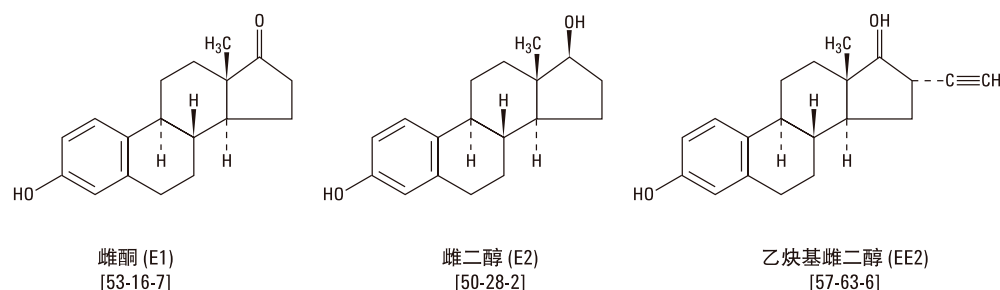


图 1. 类固醇雌激素的结构

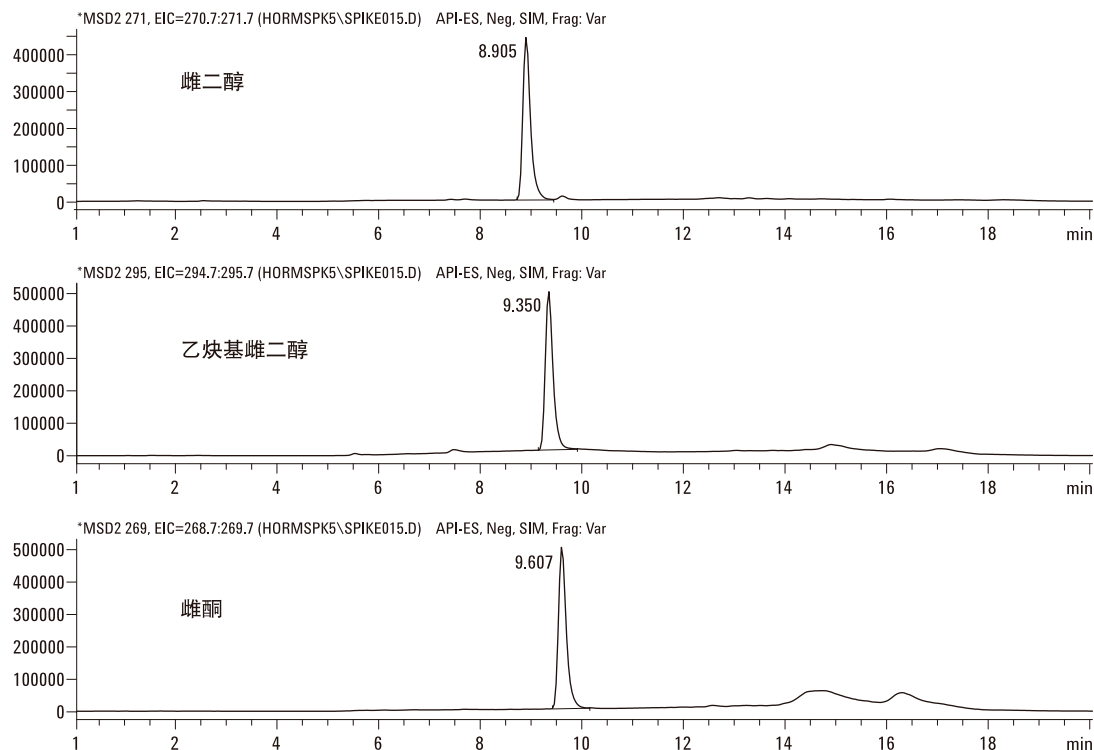


图 2. 类固醇雌激素混和标准品的提取离子流图；其中每种标准品的浓度均为 25 ng/L

测试 A

在去离子水中加入标准品，每个样品的浓度均为 10ng/L，样品经过固相萃取（SPE）后，进行 LC/MS 分析。

下面是 6 次重复测定的结果：

E1 = 9.99 ± 0.25 ng/L (100% 回收率)

E2 = 8.97 ± 0.40 ng/L (90% 回收率)

EE2 = 9.61 ± 0.35 ng/L (96% 回收率)

从测试 A 的结果可以看出，当样品基质是去离子水时，获得了良好的回收率和重现性。

测试 B

在自来水（来源于地表水源）中加入同样的标准品，每种样品的浓度都是 10 ng/L，萃取的程序、LC/MS 的分析条件都与测试 A 相同。

下面是 6 次重复测定的结果：

E1 = 4.93 ± 0.27 ng/L (49% 回收率)

E2 = 2.47 ± 0.20 ng/L (25% 回收率)

EE2 = 3.70 ± 0.51 ng/L (37% 回收率)

将使用自来水做溶剂的测试 B 和使用去离子水做溶剂的测试 A 相比，可以看出，在测试 B 中，回收率明显降低了许多（为 25%–50%），与此同时，实验的精密度也有所下降。

测试 C

测试 C 的目的是为了证实自来水测试 B 中回收率的明显降低是源于萃取效率还是质谱的离子化抑制效应。将空白自来水进行同样的固相萃取，在萃取物中加入三种雌激素混和标准品，它们的浓度均为 20ng/L，然后进行质谱分析，结果见图 3。

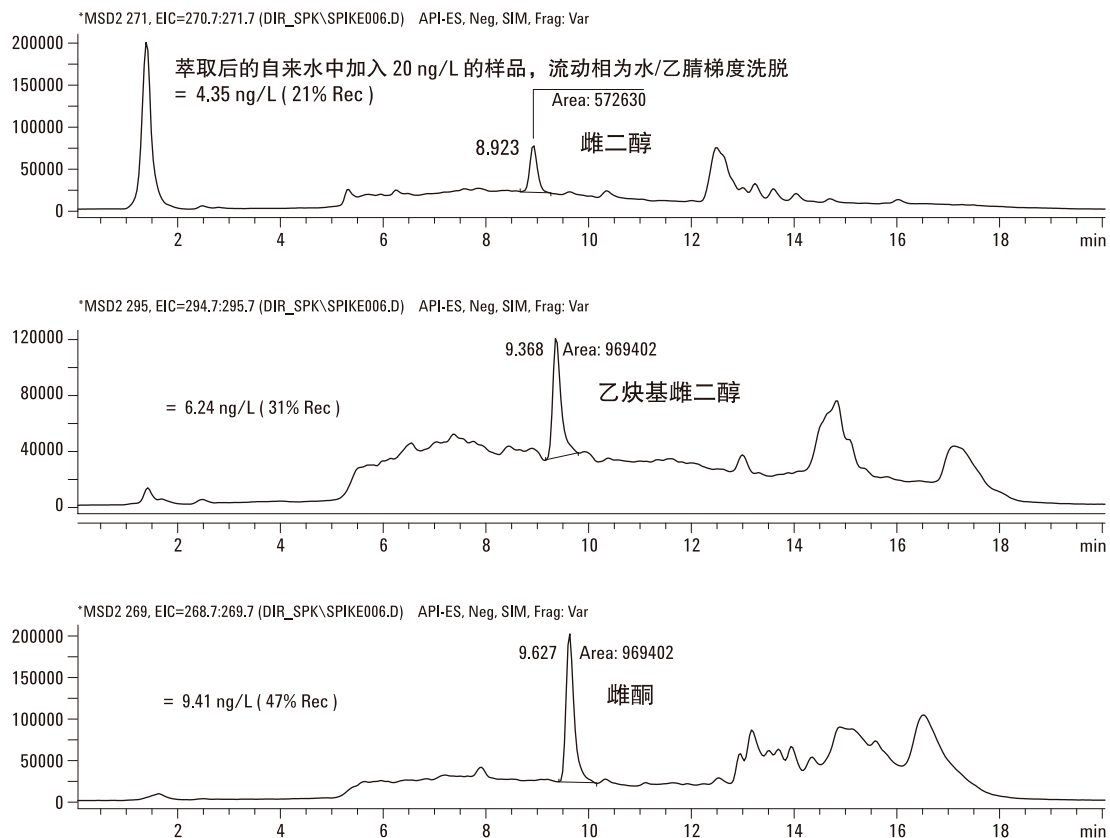


图 3. 在经过固相萃取的自来水中添加类固醇雌激素混和标准品的提取离子流图；其中每个标准品的浓度均为 20 ng/L

下面是 6 次重复测定的结果：

E1 = 9.41 ± 0.52 ng/L (47% 回收率)

E2 = 4.35 ± 0.41 ng/L (21% 回收率)

EE2 = 6.24 ± 0.29 ng/L (31% 回收率)

测试 C 和测试 B 的样品回收率基本相同。在经过固相萃取的自来水中添加类固醇雌激素混和标准品，样品的回收率仍然降低。通过直接在自来水中加入标准样品的测试说明：回收率降低的主要原因是质谱离子化抑制效应，而不是前处理的萃取效率低。

测试 D

在文献中有报道，为了提高类固醇的离子化效率，在 LC 流动相的水相中加入少量的氨水 (0.1%)。我们配制了这样的流动相，为了满足高 pH 的实验条件，使用的是 ZORBAX Extend LC 柱。在自来水中加入标准品，每种样品的浓度均为 10 ng/L，然后进行萃取、萃取物使用新的流动相条件进行分析。结果见图 4。

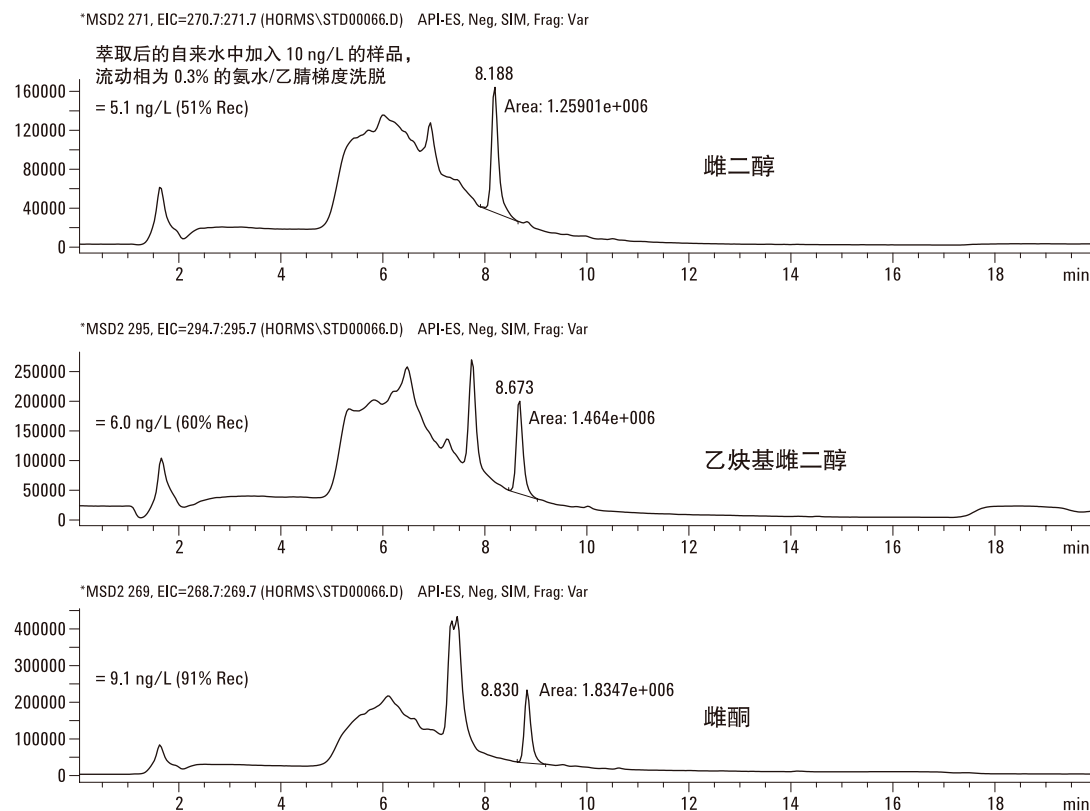


图 4. 使用新的 LC 条件分析自来水萃取后加入类固醇样品 (10 ng/L) 的萃取离子色谱图

下面是 6 次重复测定的结果：

E1 = 7.86 ± 0.35 ng/L (79% 回收率)
E2 = 6.24 ± 0.24 ng/L (62% 回收率)
EE2 = 6.37 ± 0.49 ng/L (64% 回收率)

从图 4 中可以看出，样品峰的强度都增加了 4-5 倍，而且校准曲线线性很好。

与测试 C 相比，采用测试 D 的流动相条件提高了回收率；在相同的萃取条件下，在流动相中添加氨水明显地降低了离子化抑制效应。

标准样品	测试 C % 回收率	测试 D % 回收率
E1	47	79
E2	21	62
EE2	31	64

虽然在流动相中添加氨水可以显著提高三种激素的回收率，但是回收率仍低于去离子水样品基质（测试 A）的回收率。

测试 E

为了降低离子化抑制效应，我们使用有机溶剂（主要是醇类）作为柱后添加剂。在测试 E 中使用与测试 D 相同的 LC 条件，但在色谱柱后面接了一个三通，引入异丙醇，流速为 0.2 mL/min。在自来水中加入标准品，每种样品的浓度都是 10 ng/L，将此样品在改进的萃取条件下进行萃取，而后进行质谱分析。结果见图 5。

下面是 6 次重复测定的结果：

E1 = 9.44 ± 0.26 ng/L (94% 回收率)
E2 = 8.92 ± 0.26 ng/L (89% 回收率)
EE2 = 8.24 ± 0.24 ng/L (82% 回收率)

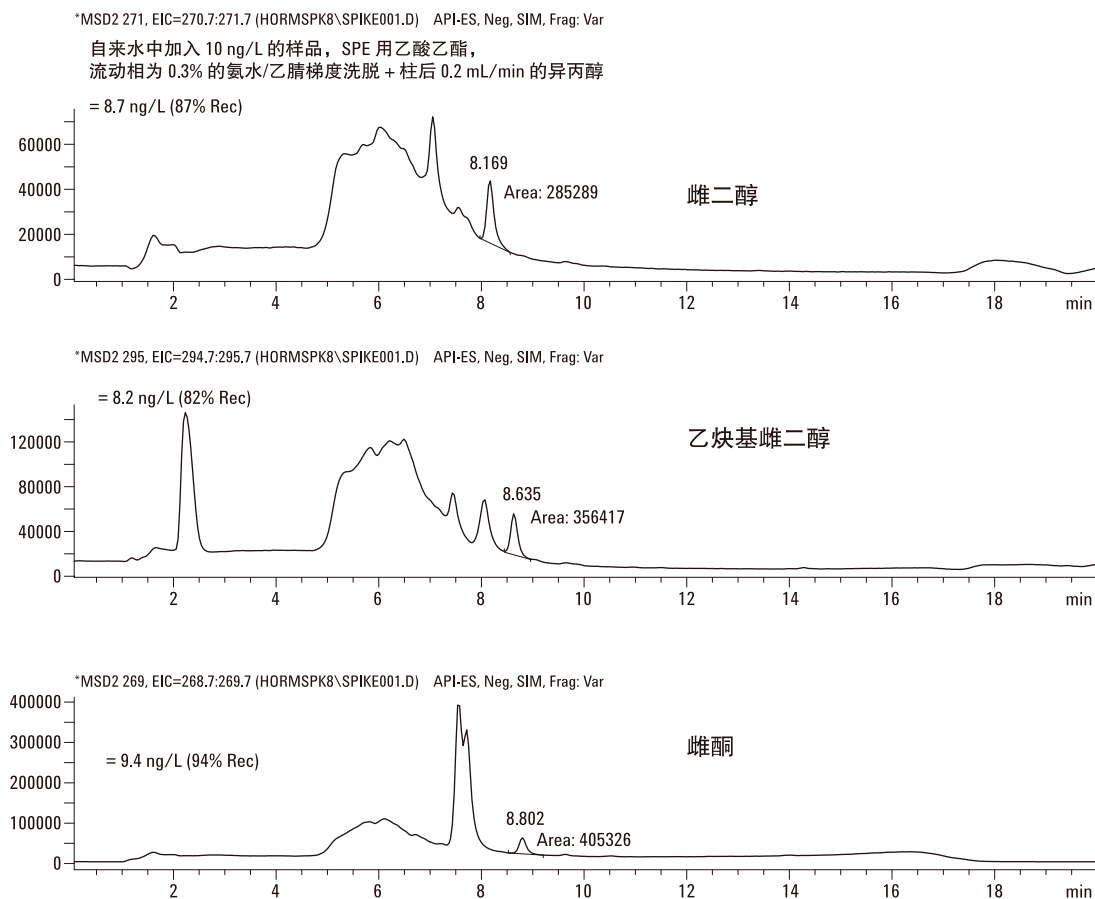


图 5. 使用柱后添加异丙醇分析自来水基质中加入的类固醇样品（10 ng/L）的提取离子流图

与测试 D 的结果相比，采用测试 E 的流动相条件提高了回收率。因此，萃取条件相同时，在柱后流出物中添加异丙醇可以提高离子化效率，见表 1。

表 1. 不同检测条件下类固醇的回收率对比

标准品	测试 A % 回收率	测试 B % 回收率	测试 C % 回收率	测试 D % 回收率	测试 E % 回收率
E1	100	49	47	79	94
E2	90	25	21	62	89
EE2	96	37	31	64	82

对类固醇样品的测试结论

测试 C 的结果说明，类固醇样品的回收率低是由离子化抑制效应所导致的，而不是萃取率低带来的。采用测试 E 的萃取方法，得到了超过 80% 的回收率，由此可以得出结论：在流动相中加入氨水，同时使用柱后加异丙醇，降低了分析类固醇雌激素的离子化抑制效应。

第二个分析例子是酸性除草剂，这是另一类有离子化抑制效应的化合物。这些化合物包括 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D)、2-甲基-4-氯基苯氧乙酸 (MCPA)、间氯代过氧苯甲酸盐、2-甲基-4-氯基苯氧丙酸、2,4-滴丁酸 (2,4-DB)、2-甲基-4-氯基苯氧丁酸 (MCPB)、3,5-二氯-N- (1,1-二甲基丙炔基) 苯甲酰胺。

实验

在分离酸性除草剂时，使用的是含 0.01% 甲酸的水和乙腈为流动相的梯度洗脱 [2]。在流动相中加入甲酸是为了提高化合物的保留行为和分离效率。另外，用三乙胺代替了氨水 (0.1%)，并直接加到了柱后添加剂异丙醇中，三乙胺的浓度为 0.01%。柱后加入混合液的流速为 0.2 mL/min。所有样品的浓度均为 0.1 µg/L，实验结果见表 2。

两组数据都来自于被认证有效的方法，每组数据都是 11 批样品的重复测定的结果。

最终测试条件

LC 条件

仪器	Agilent 110 系列 HPLC		
色谱柱	ZORBAX Extend-C18, 2.1 mm x 150 mm x 3.5 μm		
温度	60 °C		
流动相 A	HPLC 级水中加入 0.1% 的氨水		
流动相 B	乙腈		
洗脱梯度	初始	%B	5
	0.5 min	%B	5
	1.0 min	%B	40
	12.0 min	%B	80
	13.0 min	%B	80
	13.5 min	%B	5
流速	0.3 mL/min		
柱后添加剂	异丙醇 0.2 mL/min		
质谱条件			
干燥气流速	13.0 L/min		
干燥气温度	350 °C		
雾化器压力	50 psi		
V _{cap}	3000 V (负)		
SIM 离子	E1	= 269	碎裂器电压 = 190 V
	E2	= 271	碎裂器电压 = 210 V
	EE2	= 295	碎裂器电压 = 200 V

表 2. 酸性除草剂的分析性能数据 (用回收率 % 来表示)

化合物	没有柱后添加剂		有柱后添加剂*	
	地下水 (%)	自来水 (%)	地下水 (%)	自来水 (%)
2,4-二氯苯氧乙酸	85.0	76.7	85.3	84.0
2-甲基-4-氯基苯氧乙酸	91.5	83.2	84.9	84.4
间氯代过氧苯甲酸盐	95.8	89.8	84.3	85.0
2-甲基-4-氯基苯氧丙酸	96.6	93.9	82.9	82.7
2,4-滴丁酸	90.7	81.6	87.1	87.8
2-甲基-4-氯基苯氧丁酸	93.2	84.2	87.6	88.6
3,5-二氯-N-(1,1-二甲 基丙炔基) 苯甲酰胺	86.8	87.5	82.6	84.6

* 柱后添加剂是含 0.01% 三乙胺的异丙醇，流速为 0.2 mL/min。

从表 2 数据可以看出，对于酸性除草剂来说，当不使用柱后添加剂时，离子化效率受到抑制，尤其是，2,4-二氯苯氧乙酸、2-甲基-4-氯基苯氧乙酸、间氯代过氧苯甲酸盐、2,4-滴丁酸、2-甲基-4-氯基苯氧丁酸这几种样品在这两种不同的样品基质里，回收率差别达到 10%。

当柱后加入含 0.01% 三乙胺的异丙醇添加剂时，不同样品基质中的回收率值没有明显差别。所以，降低了离子化抑制效应。

参考文献

1. N. Cullum, C-K. Meng, and P. Zavitsanos, "Effect of Sample Matrix on Suppression of Ionization in Water Samples Using LC-ESI-MS". Agilent Technologies, publication 5989-0371EN, www.agilent.com/chem
2. N. Cullum, P. Stephens, and S. Evans, "Determination of Acidic Herbicides in Groundwater and Potable Water by LC/MSD using Selective Ion Monitoring", Agilent Technologies, publication 5988-5882EN, www.agilent.com/chem

如需了解更多信息

如需要了解有关我们产品和服务的更多信息，请访问我们的网站 www.agilent.com/chem/cn。

安捷伦对本资料中出现的错误，以及由于提供或使用本资料所造成的有关损失不承担责任。

本资料中所涉及的信息、说明和指标，如有变更，恕不另行通告。

© 安捷伦科技公司，2005

中国印刷
2005 年 5 月 31 日
5989-2883CHCN



Agilent Technologies