

综 述

液相色谱 - 质谱分析中的基质效应

向 平, 沈 敏, 卓先义

(司法部司法鉴定科学技术研究所 上海市法医学重点实验室, 上海 200063)

摘 要: 介绍了液相色谱 - 质谱 (LC-MS) 分析中基质效应的产生机制、来源、评定方法和消除措施。基质效应由共流出的分析物和基质的竞争以及影响接口的离子化效率所致, 主要来源于生物样品中的内源性组分和样品处理后引入的杂质。不同批次的生物样品, 其基质效应存在差异, 可通过柱后注射法和提取后添加法 2 种方法评定基质效应。实例介绍了基质效应、提取回收率和整个方法过程效率的具体计算方法。基质效应可能影响 LC-MS 方法的灵敏度、准确度和精密度, 通过样品前处理、氘代内标的使用、色谱分离、质谱分析等过程的优化可有效消除基质效应。

关键词: 液相色谱 - 质谱; 基质效应; 评定; 消除

中图分类号: O657.63 文献标识码: A 文章编号: 1004-4957(2009)06-0753-04

doi: 10.3969/j.issn.1004-4957.2009.06.026

Matrix Effects in Liquid Chromatographic-Mass Spectrometric Analysis

XIANG Ping, SHEN Min, ZHUO Xian-yi

(Key Laboratory of Forensic Medicine, Institute of Forensic Sciences, Ministry of Justice, Shanghai 200063, China)

Abstract In this paper, the producing mechanism, origin, assessment methods (postextraction addition and postcolumn infusion methods) and reducing strategies (sample preparation, internal standard, chromatographic separation and mass source) of matrix effects in liquid chromatography-mass spectroscopy (LC-MS) were introduced. The matrix effects mainly result from the ionization efficiency of the target analyte in the interface owing to the presence of coeluting substances. Much attention should thus be paid to minimize them as much as possible during method development. For biological matrices, matrix effects were mainly produced from endogenous substances present in the sample and the foreign substances introduced during the sample preparation. The influence of matrix effects on the reliability of LC-MS was also shown in terms of precision and recovery.

Key words liquid chromatography-mass spectroscopy; matrix effect; assessment; overcome

基质是样品中被分析物以外的组分, 常对分析物的分析有显著干扰, 并影响分析结果的准确性, 这些影响和干扰被称为基质效应^[1]。液相色谱 - 质谱联用技术 (LC-MS) 是将分离性能优异的液相色谱法与灵敏、专属、能提供相对分子质量和结构信息的质谱法相结合的现代分离分析技术, 近年来发展迅速, 在生物样品分析中发挥了极大作用^[2-17], 但 LC-MS 普遍存在基质效应^[1, 13-14]。串联质谱以特异性强著称, 但越来越多的数据表明质谱检测同样需要注意避免基质效应^[18-23], 否则, 将影响数据的准确性。

基质效应可影响检出限 (LOD)、定量下限 (LOQ)、线性、准确度和精密度, 对后 3 者的影响在不使用同位素内标时将更明显。因此, LC-MS 分析时必须考察基质效应^[24-27]。国内有关液相色谱 - 质谱分析中基质效应的讨论较少^[28], 许多文献的 LC-MS 方法验证中未考察基质效应。

本文在应用 LC-MS 的经验基础上, 结合国内外文献 [1, 13-48], 介绍了液相色谱 - 质谱分析中基质效应的产生机制、来源、评定方法和消除措施。

收稿日期: 2009-02-06 修回日期: 2009-03-06

基金项目: 国家科研院所社会公益研究专项基金资助项目 (GY0601); 上海自然科学基金资助项目 (072R14114)

第一作者: 向平 (1968-), 女, 河南南阳人, 主任法医师, 硕士, Tel: 021-52352955, E-mail: xiangping2630@163.com

1 基质效应的产生机制

LC-MS/MS中的基质效应由分析物的共流出组分影响电喷雾接口的离子化效率所致,表现为离子增强或抑制作用。King等^[29]实验发现,基质效应由形成带电雾滴时非挥发性的基质组分与分析物离子竞争产生,这些非挥发性基质组分将雾滴牢牢吸在一起,阻止其分裂成更小的微滴。根据接口处离子化和离子蒸发过程中的变化情况,这种竞争可能妨碍(离子抑制)或增强(离子增强)所分析目标物离子的形成效能,亦即分析目标物离子的形成效能与进入电喷雾源的基质密切相关。

2 基质效应的来源

基质效应主要来源于生物样品的内源性组分。内源性组分是指生物样品中存在的有机和无机成分,经前处理后仍存在于提取液中。包括离子颗粒物成分(电解质、盐类)、强极性化合物(酚类、色素)和各种有机化合物(糖类、胺类、尿素、脂类、肽类及其分析目标物的同类物及其代谢物)。其中磷脂是最主要的内源性组分,其对电喷雾电离(ESI)和大气压化学电离(APCI)均会产生离子抑制作用,具有表面活性的甘油磷脂酰胆碱是最强的内源性组分^[30]。

外源性组分在生物样品中不存在,但同样会带来基质效应,其由样品前处理过程引入,包括塑料和聚合物的残留、邻苯二甲酸盐、清洁剂(烷基酚)、离子对试剂、有机酸、缓冲液、SPE柱材料、流动相等。Mei等^[31]通过生物样品分析发现,不同品牌的塑料管中的聚合物或抗凝管中的肝素锂等也可产生基质效应。另外,APCI离子化方式比ESI对基质效应更敏感。基质效应不但与离子化方式有关,而且与各个仪器厂家的源设计也有关。

3 基质效应的评定

通过评定基质对分析物信号的影响程度,可大致将基质效应的评定归结为2种方法:柱后注射法和提取后添加法。

3.1 柱后注射法

柱后注射法属于动态方法,注射泵和接色谱柱的液相系统通过三通接头与质谱连接(图1)。注射泵恒流注射一定浓度的分析物;生物样品不添加分析物,提取后按已定的色谱条件进样,记录分析物的响应,此方法可考察整个色谱循环的基质影响。需要注意的是,注射分析物浓度应在所需要分析的浓度范围内,若浓度过高,可能影响离子化效率而使结果出现偏差。

柱后注射法可通过基质效应在一个色谱循环中的出现和消失,清楚地显示不同样品前处理的影响、分析柱的适用性和基质效应的作用机制。Taylor等^[32]以免疫抑制剂西罗莫司(50 mg/L)柱后注射,选用3种不同的进样方式对西罗莫司选用离子对 m/z 931.6/864.6

进行选择反应监测模式检测发现,流动相进样,整个色谱循环中信号无变化;乙腈沉淀蛋白的样品,大部分色谱过程被抑制;经SPE法处理的样品,在出峰较早的时间段内有较小的抑制,其后则信号强而稳定,没有抑制。说明采用SPE法处理,基质效应不明显,优于乙腈沉淀蛋白方法。

3.2 提取后添加法

采用提取后添加法建立数学模型评定基质效应在LC-MS/MS中使用的最多,而且,此法可同时考察提取回收率。按照Matuszewski等^[33]的建议,比较3个不同条件下的信号峰面积平均值,其中,Set1:纯的标准品溶液,Set2:不同来源的生物样品基质提取后添加,Set3:不同来源的样品基质提取前添加,则基质效应(ME) = Set2/ Set1,提取回收率(RE) = Set3/ Set2,方法过程效率(PE) = Set3/ Set1。这种考察方法可更全面、客观地量化评价基质效应。选取不同来源的空白基质,采用低、高2个浓度点,各条件下重复测定5个样品。以血液中低浓度添加地西洋为例进行说明,见表1。

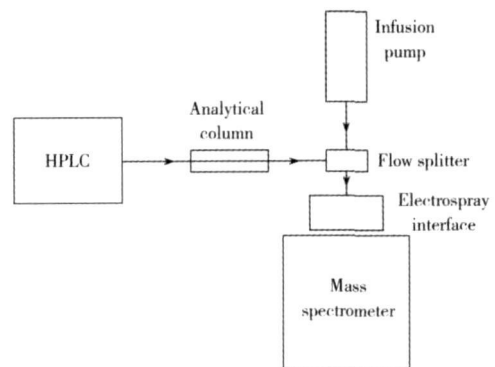


图 1 柱后注射法示意图

Fig 1 Schematic layout of the postcolumn infusion system

3.3 绝对基质效应与相对基质效应

相同基质、不同生物样品间, 其基质效应亦存在差异^[34]。同一血浆样品添加不同浓度的分析物, 经 LC-MS/MS 分析, 其精密度在可接受范围内, 但采用不同批次的血浆, 在低浓度时相对标准偏差 (RSD) 过高。由此可见, 在评定基质效应时还应考虑不同批次间生物样品的差异。生物样品提取后添加与纯的标准品溶液的比值称为绝对基质效应, 不同批次的生物样品提取后添加与纯的标准品溶液的比值称为相对基质效应。不考虑其它因素, 绝对基质效应主要影响方法的准确度, 而相对基质效应主要影响方法的精密度。

表 1 3 个不同条件下的信号峰面积及基质效应、回收率和过程效率的计算结果

Table 1 Results for signal peak areas, matrix effects, recoveries and process efficiencies obtained under three different conditions

Sample	Peak area			ME %	RE %	PE %
	Set1 (mean)	Set2	Set3			
1	165 500	97 500	87 800	59	90	53
2		102 000	83 200	62	82	50
3		99 100	84 600	60	85	51
4		97 500	85 700	59	88	52
5		90 400	83 700	55	93	51
6		104 000	83 700	63	81	51
M ean				60	86	51
RSD s_r %				4.8	5.5	2.0

4 基质效应的消除

LC-MS 分析时的基质效应客观存在, 并随生物样品的不同而不同。影响基质效应的因素很多, 如样品、样品基质、样品前处理过程、色谱条件、色谱分离效果、流动相和离子化等, 故基质效应的消除或降低, 首先要有合适的样品前处理方法, 其次要有分离良好的液相条件。

4.1 样品前处理

改进前处理方法、纯化样品、尽可能地减少最终提取液中的基质成分是最有效、彻底地消除基质效应的方法。生物样品的前处理方法很多, 研究普遍认为利用有机溶剂蛋白质沉淀法或稀释法处理的样品, 其基质效应明显高于 SPE 或 LLE 方法。Bonfiglio 等^[35]采用直接进样, 分析甲基叔丁基醚 (MTBE) 液液提取、Oasis 柱和 Empore 柱固相萃取、乙腈蛋白质沉淀等几种不同方法处理的血浆样品, 考察基质效应, 结果发现, 乙腈蛋白质沉淀法离子抑制最为明显, 液液提取法基质效应最小。同时还发现, 3 个分析物的离子抑制作用与其化学性质有关, 极性最强的分析物离子抑制作用最明显, 极性最弱的分析物受到的离子抑制作用最小。

通过基质效应评定的方法, 可系统检查基质效应产生的环节。例如, 尿液中的肌酸酐或木脂素可较强抑制激素类分析, 应通过前处理过程去除。在样品进样前进行稀释也可降低其基质效应, 但此法在超痕量分析时不适用。尽管样品前处理过程繁琐, 但样品纯化仍是最佳的基质效应消除方法。

4.2 同位素内标

同位素内标不但可抵消质谱离子化时的基质效应, 还可消除样品前处理过程中的差异。例如, Antignac 等^[36]对 20 个组织中添加醋酸曲安缩松的样品进行比较发现, 使用氟氫可的松作内标时信号强度的相对标准偏差为 32.0%, 使用同位素内标醋酸曲安缩松-d₆。其相对标准偏差可降为 5.7%。

但同位素内标购置困难, 且在多个分析物同时检测时, 由于存在极性差异, 即使是同类物的同位素内标也很难抵消基质效应, 造成定量结果偏差。例如, 采用原体药物的同位素内标同时分析某药物及其葡萄糖苷结合物, 则该内标无法抵消极性较强的葡萄糖苷结合物的质谱离子化变化。

4.3 色谱分离

合适的色谱分离也可降低基质效应。Dijkman 等^[37]以水中的酸性除草剂为目标物, 考察了单柱、柱前切换和双柱等 3 种液相模式的基质效应。结果发现, 采用单柱时色谱信号明显降低, 而柱前切换和双柱可避免该问题, 尤其双柱模式对基质效应的消除非常有效。

如前所述, 基质效应主要出现在出峰较早的时间段, 所以, 可使分析物的峰有一定的色谱保留, 以降低基质效应。采用柱后注射法确定基质效应的出现时间, 即可调整色谱条件, 使分析物避免在此段时间内出峰。此方法在高通量分析时无法使用, 但可用快速梯度的方法将分析物与溶剂分离。

4.4 质谱分析

基质效应随离子源、离子化模式和仪器的不同而不同。修正质谱分析是一种比较易行的方法, 无

需改变样品的前处理和色谱条件。虽然 APC I 同样存在基质效应, 但是对于特定的化合物, 特别是对于蛋白质沉淀法处理的样品, 若采用 ESI 有明显的基质效应, 但可能该基质并不影响 APC I 的离子化。另外, APPI 因其离子化机制不同于 APC I 和 ESI, 也不会产生相似的基质效应。

LC-MS/MS 分析时应采用相同基质的标准物质添加以校正, 以使结果更准确。Mei 等^[31]经考察后认为应尽可能使用同一牌子的塑料管, 避免使用肝素锂管抗凝, 以减少基质效应影响。

参考文献:

- [1] TAYLOR P J [J]. *Clin Biochem*, 2005, 38(4): 328-334
- [2] HOPFGARTNER G, HUSSER C, ZELL M. [J]. *J Mass Spectrom*, 2003, 38: 138-150
- [3] 沈敏, 向平, 沈保华, 等. [J]. *中国司法鉴定*, 2006, 22(1): 14-20
- [4] 再帕尔·阿不力孜, 李斌, 阿布拉江·克依木, 等. [J]. *现代仪器*, 2004, 5: 9-13
- [5] 向平, 卓先义, 沈保华, 等. [J]. *中国法医学杂志*, 2006, 21(3): 149-151
- [6] 向平, 沈敏, 沈保华, 等. [J]. *法医学杂志*, 2006, 22(1): 52-54
- [7] 何芝洲, 付铁军, 徐凯节, 等. [J]. *分析测试学报*, 2008, 27(11): 62-72
- [8] 许泓, 林安清, 古珑, 等. [J]. *分析测试学报*, 2007, 26(1): 23-28
- [9] 孙雷, 朱馨乐, 张骊, 等. [J]. *中国兽药杂志*, 2008, 42(11): 16-19
- [10] 孙其然, 向平, 沈敏. [J]. *法医学杂志*, 2008, 24(4): 268-271
- [11] DRESEN S, KEMPF J, WEINMANN W. [J]. *Forensic Sci Int* 2006, 161: 86-91
- [12] MARQUET P, SAINT-MARCOUX F, GAMBLE T N, et al [J]. *J Chromatogr B*, 2003, 789(1): 9-18
- [13] MAURER H H. [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 381: 110-118
- [14] XU R N, FAN L, RIESER M J et al [J]. *J Pharm Biomed Anal* 2007, 44: 342-355
- [15] 滕久委, 李德良. [J]. *分析测试学报*, 2008, 27(8): 851-855
- [16] 牟仁祥, 陈铭学. [J]. *分析测试学报*, 2008, 27(9): 973-976
- [17] 宓捷波, 张骏, 王云凤, 等. [J]. *分析测试学报*, 2008, 27(11): 1214-1216, 1220
- [18] VAN DE STEENE J C, MORTIER K A, LAMBERT W E. [J]. *J Chromatogr A*, 2006, 1123(1): 71-81
- [19] PAGLIA G, D'APOLITO O, GAROFALO D, et al [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 860(2): 153-159
- [20] ISMAELO A, HALQUIST M S, EIMAMLY M Y, et al [J]. *J Chromatogr B*, 2007, 859(1): 84-93
- [21] JAND S, SUBBAIAH G, SANTALM, et al [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20(23): 3509-3521
- [22] DE NARDI C, BONELLI E [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2006, 20(18): 2709-2716
- [23] 向平, 沈敏, 沈保华, 等. [J]. *色谱*, 2008, 26(4): 469-472
- [24] PETERS F T, DRUMMER O H, MUSSHOF F [J]. *Forensic Sci Int* 2007, 165(2/3): 216-224
- [25] LI Shuijun, JIA Jingying, LIU Gangyi et al [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 870: 63-67
- [26] TAVERNIERS J, DE LOOSE M, VAN BOCKSTAELE E. [J]. *Trends Anal Chem*, 2004, 23: 535-552
- [27] Guidance for bioanalytical method validation [EB/OL]. (2001-05) [2009-01-20] <http://www.fda.gov/cder/guidance>
- [28] 齐美玲. [J]. *药物分析杂志*, 2005, 25(4): 476-479
- [29] KING R, BONFIGLIO R, FERNANDEZ-METZLER C, et al [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2000, 11: 942-950
- [30] LITTLE J L, WEMPE M F, BUCHANAN C M. [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 833(2): 219-230
- [31] MEI H, HSIEH Y, NARDO C, et al [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17(1): 97-103
- [32] TAYLOR P J, JOHNSON A G. [J]. *J Chromatogr B*, 1998, 718: 251-257
- [33] MATUSZEWSKI B K, CONSTANZER M L, CHAVEZ-ENG C M. [J]. *Anal Chem*, 2003, 75: 3019-3030
- [34] HEGSTAD S, KHABANIH Z, KRISTOFFERSEN L, et al [J]. *J Anal Toxicol* 2008, 32: 364-372
- [35] BONFIGLIO R, KING R C, OLAH T V, et al [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1999, 13: 1175-1185
- [36] ANTIGNAC J P, WASCH K, MONTEAU F, et al [J]. *Anal Chim Acta* 2005, 529: 29-136
- [37] DIJKMANA E, MOOIBROEKA D, HOOGERBRUGGEA R, et al [J]. *J Chromatogr A*, 2001, 926: 113-125
- [38] ZELENY R, HARBECK S, SCHMEL H. [J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1216(2): 249-256
- [39] CHU Shaogang, LETCHER R J [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1215(1/2): 92-99
- [40] PATEL N K, SUBBAIAH G, SHAH H, et al [J]. *J Chromatogr Sci* 2008, 46(10): 867-875
- [41] KHUROO A H, MONI T, VERMA P R, et al [J]. *J Chromatogr Sci* 2008, 46(10): 854-861
- [42] SINGH S P, SINGH R S, WAHAJUDDIN, et al [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 876(1): 1-7
- [43] HENIG K, BÜCHELIE [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 876(1): 129-136
- [44] CHEN H C, KUO H W, DING W H. [J]. *Chemosphere*, 2009, 74(4): 508-514
- [45] TOTTI S, FERNONDEZ M, GHINIS, et al [J]. *Talanta* 2006, 69(3): 724-729
- [46] PATEL B N, SHARMA N, SANYAL M, et al [J]. *Anal Chim Acta* 2008, 629(1/2): 145-157
- [47] LI Shuijun, HENG Xiaoxiang, SHENG Hongguang et al [J]. *J Chromatogr B*, 2008, 875(2): 459-464
- [48] SPANLEY S M, FOO H C. [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 836(1/2): 1-14