

液相色谱-串联质谱检测兽药残留中的基质效应研究进展

王立琦, 贺利民, 曾振灵, 陈建新

(华南农业大学兽医学院, 兽医药理研究室, 广东 广州 510642)

摘要:液相色谱-串联质谱技术作为强有力的分析工具已被广泛应用于多个领域,但其检测中的基质效应对测定结果准确性的影响需引起重视。本文综述了液相色谱-串联质谱分析测定中基质效应的来源、重要性、产生的可能机制、影响因素、评价及消除和(或)补偿基质效应的方法,重点概括了典型兽药残留检测中应对基质效应的方法进展。

关键词:液相色谱-串联质谱;基质效应;机制;影响因素;兽药残留;消除方法

中图分类号:O 657.63 文献标识码:A 文章编号:1004-2997(2011)06-0321-12

Progress in Matrix Effect of Veterinary Drug Residues Analysis by High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry

WANG Li-qi, HE Li-min, ZENG Zhen-ling, CHEN Jian-xin

(Department of Veterinary Pharmacology and Toxicology,

College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: High-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is a powerful analytical tool which has been applied to a wide variety of studies. One limitation associated with LC-MS/MS analysis is its susceptibility to matrix effect, which should be paid attention. In the present paper, the sources, importance, proposed mechanism, factors, evaluation, eliminating and (or) compensating means of matrix effect in LC-ESI-MS/MS analysis are reviewed, and especially, progress in dealing with matrix effect in typical veterinary drug residues analysis by LC-ESI-MS/MS is summarized.

Key words: high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry; matrix effect; mechanism; factors; veterinary drug residues; elimination

液相色谱-串联质谱(high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry, LC-MS/MS)技术是通过接口装置将分离性能优异的液相色谱法与灵敏、专属、能提供分子

质量和结构信息的质谱法相结合的现代分离分析技术。单级的液相色谱-质谱联用(LC/MS)技术始于 20 世纪 70 年代,随着大气压电离(atmospheric pressure ionization, API)技术的

收稿日期:2011-07-21;修回日期:2011-09-17

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 31072166)资助

作者简介:王立琦(1986~),女(汉族),四川泸州人,博士研究生,从事兽医药理学研究。E-mail: wangliqi86@126.com

通信作者:贺利民(1967~),男(汉族),湖南益阳人,副研究员,从事食品质量与安全残留检测。E-mail: hlm1922@sohu.com

成功应用以及现代质谱技术的发展,20 世纪 90 年代,LC/MS 迅速取代 HPLC 成为药物分析的主要手段,特别是进入 21 世纪以来,LC-MS/MS 技术得到了极大的重视和发展,在药物分析^[1-4]、食品安全检测^[5-10]、环境分析^[11-16]及生命科学^[17-18]等许多领域得到了广泛应用。然而,随着 LC-MS/MS 应用的不断深入和成熟,人们欣赏该技术在分析检测一般基质试样中化合物所拥有的高抗基质干扰能力、高分析速度、高检测通量、高选择性、高灵敏度及化学结构定性的同时,也逐渐认识到该技术的一些不足^[19]。LC-MS/MS 分析中虽然非目标分析物可以不被监测(因检测基于目标物母离子与其相应特征子离子的匹配),但样品中的共流出物(非目标分析物)并非不存在,它们对目标分析物的离子化有很大影响。实验也已证明,复杂样品共提取基质成分和试样前处理引入的外来杂质会严重抑制或增强目标分析物在喷雾接口处的离子化,从而影响到检测的选择性和灵敏度,进而影响到分析结果的准确度和精密度。这一现象,即所谓的基质效应(matrix effect, ME),已引起有关研究人员的重视,并正成为该领域研究的热点。

液相色谱-质谱分析中的基质效应可追溯到 20 世纪 90 年代初,当改变样品基质的种类和浓度时,待测物电喷雾离子化(electrospray ionization, ESI)质谱的响应值降低了^[20]。2001 年,美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration, FDA)在《生物分析方法验证准则》中明确要求:在液相色谱-质谱分析方法开发和验证过程中需要对基质效应进行评价^[21]。

因不同离子源、不同质谱分析器的基质效应情况不同,液相色谱-电喷雾串联质谱仪在药物残留定性定量分析检测中应用最广;而从目前文献报道来看,复杂生物样品中药物分析检测的基质效应研究最多、最深。因此,本工作主要综述 LC-ESI-MS/MS 分析测定生物样品中基质效应的来源、产生的可能机制、影响因素及评价方法的基础上,总结近年国内外有关 LC-ESI-MS/MS 检测动物性食品中兽药残留的基质效应消除和/或补偿方法或措施,为深入研究可食性动物组织中兽药和有害物残留测定中的基质效应提供参考。

1 引起基质效应的物质来源

在 LC-ESI-MS(/MS)分析中,常常发现样品基质对目标化合物测定值有很大影响,一般认为这是由于色谱分离过程中与目标化合物共流出的物质对目标化合物离子化过程的影响^[22]。共流出干扰物可分为内源性杂质和外源性杂质。内源性杂质是指样品经前处理过程后依然保留在待分析样品溶液中的各种有机物(脂类、色素、糖类、可溶性蛋白或肽类、胺类及目标化合物的同系物及其代谢物等)或无机物(各种无机盐),当这些物质与目标化合物共流出色谱柱进入电离源时,将严重影响目标化合物的离子化过程。Little 等^[23]认为血浆试样中磷脂是最主要的内源性杂质,其对 ESI 和大气压化学电离(atmospheric pressure chemical ionization, APCI)模式都产生明显的离子抑制作用。外源性杂质由样品前处理各步骤引入,主要包括无机离子、缓冲溶液、有机酸、离子对试剂、增塑剂、表面活性剂残留、固相萃取(solid-phase extraction, SPE)小柱材料及色谱柱固定相流失物等。

2 基质效应的重要性

早在液相色谱-质谱分析技术发展的初期,就有学者开始关注由生物基质引起的目标分析物质谱响应与浓度之间的非线性问题^[24]。基质效应是由于样品中非待测物的存在,使待测物在仪器中的响应受到影响,或增强或减弱,进而影响待测物的检出限(limit of detection, LOD)、定量限(limit of quantification, LOQ)、线性、准确度和精密度等^[25]。

Taylor 指出分析生物样品时 LC-ESI-MS/MS 法普遍存在基质效应,若分析方法未对基质效应进行评价,所得的实验结果不可靠^[22]。Annesley^[26]系统考察了 ESI-MS 分析血浆样品中的离子抑制现象,并提出了消除基质效应的多种方法,充分强调基质效应的重要性。Rogatsky 等^[27]建议在 LC-MS/MS 分析方法建立时必须评价基质效应的强度,并提出“抑制系数”和“增强因子”作为 LC-MS/MS 分析方法的两个质控参数。由此可见,基质效应是 LC-MS/MS 分析中非常严重的问题,应该引起相关学者的重视。

3 基质效应产生的可能机制

一般认为 LC-ESI-MS/MS 测定中目标物的电离是这样实现的:从色谱柱流出的目标物经过带有高电压的毛细管出口尖端时,喷雾产生带电液滴,在加热雾化气的作用下,带电液滴溶剂不断蒸发而收缩,液滴表面电荷密度越来越大,当达到瑞利(Rayleigh)极限时会发生库仑爆炸,带电液滴分裂成更小的液滴,在质量和电荷重新分配后,更小的液滴进入稳定态,然后再重复蒸发、电荷过剩和液滴分裂系列过程。当带电液滴半径小于 10 nm 时,液滴表面形成的电场足够强,电荷的排斥作用导致部分离子从液滴表面逃逸出来,而不再是液滴的分裂,最终目标物以单电荷或多电荷离子的形式从溶液中转移至气相,形成气相离子,在电场作用下目标物的气相离子进入质量分析器^[28]。由此可见,喷雾液滴中的基质组分和仪器的色谱、质谱条件等各种因素都会对这一过程中目标物的电离和转化效率产生影响,进而影响到目标物的定性和定量。

虽然产生这种影响的机制目前尚不十分清楚,但通常认为共提取基质成分与待测目标物在色谱柱出口电离竞争是引起基质效应的主要机理^[22,29]。随同目标物从色谱柱上一起被洗脱出来的共提取基质成分(共流出物),会同目标物离子竞相竞争液滴表面,从而导致目标物的离子化效率降低或增强,引起响应降低或增高,便产生了所谓的基质抑制或基质增强效应。King 等^[30]实验证明:血浆提取液在电喷雾电离过程中,带电液滴中的难挥发性溶质是产生离子抑制的主要原因,它们阻止小带电液滴的形成,使其较难达到离子发射所需的半径和表面电荷,从而减少了目标物气相离子的形成,而气相中离子的中和反应和净电荷的损失不是主要因素。

4 基质效应的评价方法

LC-MS/MS 分析中用以评价基质效应的方法主要有柱后注射法(post-column infusion method)与提取后添加法(post-extraction spiking method)。其中,柱后注射法能直观的显示基质效应产生的时间和影响程度,适合在色谱方法筛选过程中评估基质效应的影响情况,为色谱条件的优化提供信息;而提取后加入法能量化基质效应,广泛运用于方法学验证过程。

4.1 柱后注射法

柱后注射法可以对基质效应进行动态分析,测定过程示于图 1。经液相色谱柱分离的空白基质提取液与通过注射泵恒速注射的克伦特罗纯溶剂标准溶液在三通接口处混合,经过带有高电压的毛细管出口时喷雾电离,明显可见有 2 个时间段的克伦特罗信号强度受到抑制。柱后注射法由 Bonfiglio 等^[31]首次提出,此法可以定性评价基质效应,且有助于确定基质效应产生的时间,对消除或补偿基质效应起指导作用。若待测物的保留时间在基质效应产生时间范围内,可以通过调整色谱分离条件,使待测物避开基质效应产生的时间出峰,即可减少基质对检测的影响。作为一门有效的基质效应评价工具,柱后注射法被许多学者用于方法验证中基质效应的考察^[26,30-35]。使用该方法需要注意的是,通过注射泵恒速注射的待测物浓度应该在分析范围内,若浓度过高以致超过仪器线性范围时,可造成检测结果不可靠。

4.2 提取后添加法

提取后添加法是将空白样品按前处理方法进行提取净化后,在提取液中添加待测物,再按已定的色谱、质谱条件进行检测,与同样浓度的纯溶剂或流动相中待测物的离子强度进行比较,观察基质效应,测定过程示于图 2(质量色谱图为待测物莱克多巴胺)。Matuszewski 等^[19]首次提出这种可以对基质效应的强度进行定量的评价方法,分别测定提取后添加待测物与流动相中添加同样浓度待测物的离子响应强度,计算它们的相对比值来评价基质效应情况。若比值小于 1.0,说明基质对待测物的响应产生抑制作用;若大于 1.0,说明基质的存在增强了待测物的响应;若等于 1.0,说明待测物的响应未受影响,这是最为理想的一种情况,也是建立检测方法时所追求的最高目标。但在实际中,很难得到这样的结果,一般相对比值在 0.85~1.15 之间则认为基质效应不明显。

5 基质效应的影响因素

从目前的研究分析,基质效应的产生及强度大小主要与待测物本身的极性及浓度、选用的样品前处理方法、样品基质来源及成分、色谱分析条件与离子源结构等多种因素有关^[36]。

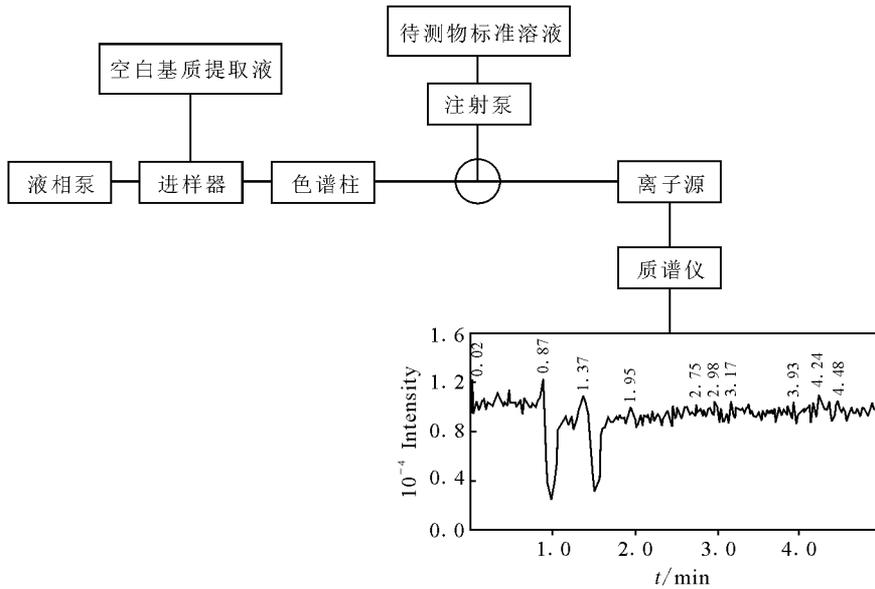


图 1 柱后注射法测定过程示意图

Fig. 1 Diagram of the post-column infusion system

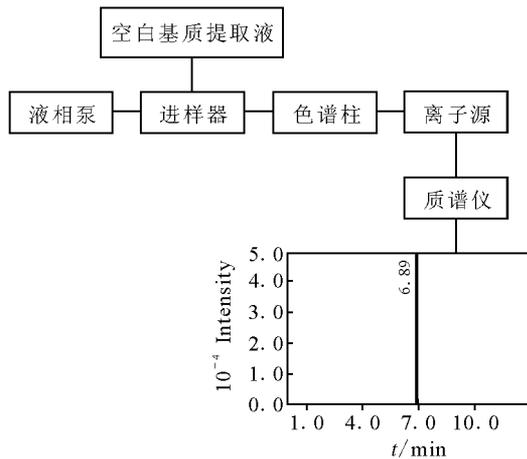


图 2 提取后添加法测定过程示意图

Fig. 2 Diagram of post-extraction addition

5.1 待测物的极性及其浓度

Bonfiglio 等^[31]采用反相色谱柱对 3 种极性不同的药物进行 LC-ESI-MS/MS 分析,结果表明基质效应与药物的化学性质有关:药物极性越大,离子响应强度受抑制越严重。这种现象的发现对选择非同位素内标具有指导意义。若选定的内标与待测物极性相差较大,色谱分离保留时间差异大,基质效应对它们的影响会不同,导致二者信号强度的变化不一致,因而无法起到校正作用,有时还适得其反。本文作者在采用

LC-ESI-MS/MS 分析蛋白同化类激素时,发现用氘代睾酮内标计算诺龙、勃地龙、康力龙等激素时,回收率有的竟达到 200%,而采用基质匹配标准溶液校正可获得满意的结果^[37]。因此,在同时检测多种极性不同的待测物时,力求选择多种相应待测物的同位素内标进行校正或采用基质匹配标准溶液校正,否则得出的结果不可靠^[38]。

通常基质中待测物浓度不同,受到的基质效应影响也不同。Van Hout 等^[39]考察了不同浓度水平的克伦特罗在猪尿中的响应情况,发现随着猪尿中克伦特罗浓度的增加,基质效应会相对减弱。

5.2 样品前处理方法

基质效应的产生主要依赖于样品基质,因此,上机溶液中基质成分的含量是影响基质效应的重要因素之一。样品前处理方法的选择直接影响基质效应的强度,提取净化好的方法,基质成分含量少,基质效应会减小,否则,会放大基质效应。上样前对样品进行浓缩或增加进样体积,都会使基质效应加强。药物残留分析检测中,传统的样品提取净化方法主要可分为组织捣碎法、振荡提取法、液-液萃取法 (liquid-liquid extraction, LLE)、超声提取法、索氏抽提法及蛋白质沉淀法 (protein precipitation, PPT)。通常振荡提取法、索氏抽提法和 LLE 法的基质效应相对

较弱,而组织捣碎法、超声提取法和 PPT 法的基质效应相对较强。有学者详细研究了生物样品不同的前处理方法对基质效应的影响,发现 LLE 法引起的基质效应最小,PPT 法则最明显,其共提取的内源性物质会在较大程度上影响样品的检测^[29,31]。现代固相萃取技术不仅能对传统提取方法的产物进一步净化,而且本身集提取、净化与富集于一体,在样品前处理过程中越来越受到青睐。根据目标分析物在 SPE 小柱上的保留机制不同,可将 SPE 柱分为反相、正相和离子交换等模式,实际应用中应根据测定基质和待测物的理化性质进行选择^[40]。近年迅速发展的分子印迹固相萃取(molecularly imprinting solid-phase extraction, MISPE)柱具有高度的选择性和良好的适应性,不断应用于环境分析、药物分析、食品安全检测等领域的样品前处理,可有效消除基质效应^[41]。Zorita 等^[42]采用 MISPE 柱对废水中的酸性药物进行提取净化,结果发现,与自来水相比,池水与污水均未出现明显的基质效应。

5.3 样品来源及基质成分

通常情况下,研究者在建立检测方法时,往往忽略了不同来源的样品对方法适应性和可靠性的考察,但实际检测的样品来自于不同个体、不同地方,个体间及地区间样品的差异会引起不同的基质效应。Matuszewski 等^[19]指出考察基质效应时,应对不同来源、不同批次的样品进行分析测定评价。Ismail 等^[43]研究也证明,仅仅用同源基质不足以评价方法的可靠性。因此,在考察一种方法是否准确可靠时,需要对不同来源的样品进行分析测定,若其结果的变异系数在 15% 以上,则需要对方法进行改进^[22]。笔者采用 LC-ESI-MS/MS 分析猪肌肉中 9 种 β -兴奋剂类残留时,分别对采自 8 个地区的样品进行基质效应比较,发现地区间样品基质效应存在一定差异。

不同的样品基质,如肌肉、肝脏、尿液等的组成不尽相同,因此也会对基质效应产生影响^[44]。Dams 等^[33]指出:基质效应的存在还取决于分析的生物液体种类。不同生物液体的特征基质成分不同,会在不同时间产生干扰。如尿液中的主要干扰物质是亲水性成分(无机盐、尿酸等);而唾液中可能同时含有亲水性与亲脂性成分(蛋白质、氨基酸、粘液素等),因此其对分析物的干扰

比尿液更显著。

前述基质效应物(内源性物质和外源性杂质)是 LC-ESI-MS/MS 分析中引起基质效应的物质基础,必须设法去除或通过色谱分离条件改变来避开。Shen 等^[45]研究发现,采用强离子交换(SCX)小柱可有效去除磷脂从而减小基质效应,若待测物可通过离子交换机制得到保留,建议不要选择混合模式的 SPE 小柱(如 MCX)净化,因为其反相保留机制不利于消除由磷脂引起的离子信号抑制现象。Little 等^[23]建立了源内多反应监测(in-source multiple reaction monitoring)法,以监测基质中甘油磷脂酰胆碱的浓度,以量化其产生的基质效应。Ismail 等^[35,46]在研究 LC-ESI-MS/MS 分析人血浆中二氢可待因、伪麻黄碱及扑尔敏的基质效应时,采用监测甘油磷脂酰胆碱的特征离子来评价基质效应,发现基质效应出现的时间与甘油磷脂酰胆碱的保留时间一致。

5.4 色谱分析条件

若待测物在基质效应严重的时间段内被洗脱,则会对实验结果产生较大影响。在常采用的反相色谱分离过程中,基质效应主要产生于分析的前段时间,因此,实际检测时应通过调整色谱条件使待测物尽量延后出来,以与快速流出的强极性基质成分分开。但在高通量分析时,由于分析时间很短,基质会对出峰较早的待测物产生干扰,因此高通量分析极性大的待测物时,应该审慎评定测定结果^[34]。若采用梯度洗脱或延长色谱分离时间,可在一定程度上解决这个问题。流动相的组成及流速、进样体积也可影响基质效应。通常说来,流速越小、进样量越小,引起的基质效应越小。笔者在采用 LC-ESI-MS/MS 分析猪肌肉中 β -兴奋剂类残留时,比较了不同进样量(10 μ L 和 20 μ L)基质效应的差别,结果发现进样量越大,基质效应越明显。此外,前一个样品待测物或基质成分在色谱柱中的残留、聚集均有可能导致基质效应^[38,47]。

5.5 离子源

在药物残留分析中,采用 API 技术的 LC-MS/MS 应用最为广泛。Matuszewski 等^[19]采用提取后添加法对 LC-MS/MS 分析中的基质效应进行了定量评价,实验结果表明,采用 APCI 源时,未观察到基质效应,而采用 ESI 源时则出现严重的基质效应。Souverain 等^[29]采

用传统的 PPT、LLE、SPE 及在线 SPE 前处理方法对 ESI 源与 APCI 源的基质效应进行研究,实验发现无论用何种前处理方法,ESI 源均比 APCI 源的基质效应更明显。Dams 等^[33]采用 LC-MS/MS 分析生物样品中非法药物吗啡时发现,APCI 源与 ESI 源均存在基质效应,但是 APCI 源不如 ESI 源明显。

6 消除或补偿基质效应的方法

基质效应在化学分析中客观存在,不可能被完全消除。在生物样品分析中通常采用内标法、空白基质标准添加法及优化色谱-质谱分析条件对可能的基质效应进行消除和(或)补偿。动物组织中兽药残留检测中的基质效应研究较少、较浅,但事实上也存在较强的基质效应,特别是采用 LC-ESI-MS/MS 进行多残留快速筛查时(因认为其具有高选择性而简化了前处理程序)。近年来,致力于消除和补偿基质效应的研究逐渐增多,表 1 中概括了 LC-ESI-MS/MS 分析动物性食品中兽药残留时应对基质效应所采取的方法和对典型兽药产生基质效应的评价。

6.1 同位素内标法

同位素与待测组分在样品制备、色谱分离及质谱检测的全过程中具有相似的行为,受基质效应的影响也一致,因此,同位素内标法被认为是补偿基质效应最理想的方法^[48-50]。但因同位素内标价格昂贵,且不易得到,使其应用受到限制,一般在严格的分析测定中使用较多。用待测物的同系物代替同位素,有时可有效补偿基质效应,但正式检测前应进行方法效能指标考察,否则,有可能适得其反。

6.2 空白基质匹配标准校正法

空白基质匹配标准校正法是将空白样品经过前处理后,加入系列浓度待测物标准作为基质匹配标准溶液,用以对检测结果进行校正。Hernandez 等^[51]指出,处理生物样品时不采用空白基质匹配标准溶液法,而应采用空白基质标准添加法来补偿基质效应。Hernando 等^[13]在建立食品中阿弗麦菌素残留的 LC-MS/MS 方法时,采用空白基质匹配标准溶液方法有效补偿了基质效应。武志雄等^[52]研究 LC-MS/MS 法测定猪肉组织中的阿维菌素、伊维菌素残留,采用空白样品提取液配制标准以补偿基质效应。张丽芳等^[53]在建立 LC-MS/MS 法测定肉肠中莱克多巴胺残留量的过程中,通过基质加标法考察了基质对莱克多巴胺响应值的抑制现象。杨雯等^[54]利用 LC-MS/MS 法对禽类产品中的克球酚残留进行分析,采用基质匹配标准溶液校准法对其进行定量。王全林等^[55]在建立纯牛奶、婴儿配方奶粉中苯甲酸雌二醇残留检测的 UP-LC-MS/MS 分析方法时,用基质匹配标准校正方法补偿基质效应。

6.3 优化净化方法及色谱分离条件

Bogialli 等^[56]研究指出,多层净化可以有效消除基质干扰物对待测物的影响。需要注意的是,并不是净化效果越好,对分析待测物就越有利。因为在通过优化提取净化方法来减少基质成分的同时,待测物也会受到损失,使其回收率受到影响(但同位素内标法一般没有关系),因此,需要对样品净化程度和回收率进行综合衡量。而通过调整流动相的组成及流速、色谱分离的时间及上样量等亦可有效减小基质效应。

表 1 LC-MS/MS 分析兽药残留中的基质效应评价

Table 1 Evaluation of matrix effect in analysis of residues of veterinary drugs with LC-MS/MS

基质	化合物	定量方法	基质效应评价	参考文献
牛奶	莱克多巴胺、喷布特罗、克伦特罗等 10 种 β -兴奋剂	同位素内标法(克伦特罗-D ₉)	分析基质对 β_2 -受体激动剂和 β_2 -受体阻滞剂存在的抑制作用。结果表明,采用确定的前处理方法,基质对妥布特罗和美托洛尔的抑制作用较大,抑制率分别为 15.1% 和 13.8%,其余 8 种 β -兴奋剂抑制率在 4.0%~8.8% 之间。	王娟等 ^[57]
猪肉、猪肝、猪尿、虾、鸡蛋和牛奶	β -受体激动剂类、磺胺类、苯并咪唑类等 76 种兽药	空白基质匹配标准溶液校正	采用空白虾、猪肉、猪肝、鸡蛋和牛奶基质匹配标准溶液,对基质效应进行考察,结果发现,相同化合物在不同基质中测定的标准曲线的斜率有显著差异,存在较强的基质效应。	郭德华等 ^[58] , Hoof ^[59]

续表

基质	化合物	定量方法	基质效应评价	参考文献
动物饲料与饮水	6 种 β -兴奋剂	同位素内标法(克伦特罗-D ₉ , 莱克多巴胺-D ₅)	通过比较标准溶液及空白基质提取液添加标准溶液的斜率对基质效应进行研究,采用优化提取净化方法来进行补偿。	Juan 等 ^[60]
猪、鸡肌肉、肝脏、肾脏;牛奶及蜂蜜	13 种氨基糖苷类	空白基质匹配标准溶液校正	采用提取后添加法考察基质效应,发现各药抑制小于 10%。在选择三氯乙酸(TCA)浓度时,发现 10% TCA 时,回收率最高,但是考虑到该浓度可能增加 ESI 模式下的离子抑制,最终选择了 5%。	Zhu 等 ^[61]
牛奶	链霉素、双氢链霉素	空白基质匹配标准溶液校正	通过比较曲线斜率考察了流动相中添加不同浓度七氟丁酸(HFBA)对待测物离子响应的抑制情况,结果发现,随 HFBA 浓度增加,离子抑制增强。抑制率最高可达 62.2%(链霉素)、25.7%(双氢链霉素)。并指出,离子对试剂会引起基质效应。	Gremilogan-ni 等 ^[62]
鱼、虾、甲鱼肌肉	喹烯酮、喹乙醇、5 种大环内酯类	空白基质匹配标准溶液校正	鲫鱼肌肉基质对泰乐菌素和北里霉素,南美白对虾肌肉基质对北里霉素,甲鱼肌肉基质对泰乐菌素和红霉素无明显基质效应;基质对其余分析物的离子化均有不同程度的影响。	刘永涛等 ^[63]
鸡肉、鸡肝、猪肉、牛奶、蜂蜜	螺旋霉素、替米考星、罗红霉素等 12 种大环内酯类	空白基质匹配标准溶液校正	对基质效应进行考察,发现各样品基质对 12 种大环内酯类抗生素的离子化均有非常强的基质效应,且不同基质对各大环内酯类抗生素的基质效应也不同。	王凤美等 ^[64] , He 等 ^[65]
猪肉	泰拉霉素	空白基质匹配标准同系物内标(罗红霉素)法	样品基质对离子化有非常强的抑制作用。	刘勇军等 ^[66] 、倪红佳等 ^[67]
鸡肝、鸡肉、鱼肉	林可酰胺类和大环内酯类共 7 种药物	空白基质匹配标准溶液校正	不同样品基质对离子化有非常强的抑制或促进作用。	岳振峰等 ^[68]
牛、猪、羊饲料	大环内酯类、磺胺类等 13 类共 33 种药物	空白基质匹配标准溶液校正	采用提取后添加法,考察了不同饲料基质对待测物的基质效应,结果发现不同基质间待测物响应值差异较大(或增强或抑制),说明基质效应较强。	Boscher 等 ^[69]
鸡肉	大环内酯类、氨基糖苷类、磺胺类等 8 类共 24 种药物	空白基质匹配标准溶液校正	通过提取后添加法对基质效应进行了考察,发现除双氢链霉素与链霉素出现离子信号增强现象外,其他分析物离子强度抑制率达 79%~99%。	Chiaochan 等 ^[70]
蜂蜜	大环内酯类、磺胺类、四环素类及喹诺酮类	空白基质匹配标准溶液校正	实验对一系列浓度标准溶液及空白基质添加待测物溶液的斜率进行比较,发现存在基质效应。	Vidal 等 ^[71]
猪、牛肌肉	大环内酯类、磺胺类、林可酰胺类、四环素类等 8 类共 39 种抗菌药	空白基质匹配标准溶液校正	采用提取后添加法对基质效应进行考察,发现待测物响应强度变异很大,抑制率可达 40%。	Carretero 等 ^[72] , 赵东豪 ^[73]

续表

基质	化合物	定量方法	基质效应评价	参考文献
牛奶	大环内酯类、磺胺类、 β -内酰胺类等 5 类共 25 种药物	空白基质匹配标准溶液校正	随药物不同离子响应信号抑制情况差异很大。一些药物响应信号呈现明显的抑制(泰乐菌素、红霉素、出峰时间较晚的磺胺类)或增强(氯苄西林、杆肽菌素)。	Turnipseed 等 ^[74]
4 种鱼的可食性组织	大环内酯类、磺胺类等 8 类药物及 1 类染料共 38 种化合物	—	将标液与空白基质加标溶液进行比较,所有待测物可见明显基质效应,大部分药物信号至少被抑制 50%。	Smith 等 ^[75]
可食性动物组织、牛奶、鸡蛋	11 种蛋白同化激素类药物	空白基质匹配标准溶液校正	将纯溶剂标准溶液与空白基质加标溶液比较,待测物明显基质抑制效应。	贺利民等 ^[76]
蜂蜜	14 种磺胺类药物与氯霉素	空白基质匹配标准溶液校正	采用 LLE 提取时,发现基质抑制效应明显,故采用 SPE 净化,并用磷酸盐缓冲液淋洗,可有效减小基质效应。	Sheridan 等 ^[77]
鲜蛋与蛋白粉	硝基咪唑类代谢物	空白基质匹配标准溶液校正	制备不同浓度的空白基质与纯溶剂匹配标准曲线,比较二者的斜率及截距,结果发现,商品全蛋与蛋白粉均存在基质效应,因此二者必须采用空白基质匹配标准溶液对基质效应进行补偿。	Szilagyi 等 ^[78]
禽肉、海产品	氯霉素	同位素内标稀释法	采用液液萃取、多步固相萃取净化,建立 LC-MS/MS 方法,评价其检测动物性食品中氯霉素的基质效应。	Mottier ^[79]
禽肉、血浆、蛋	硝基咪唑类	同位素内标法(二甲硝唑-D ₃ 、洛硝达唑-D ₃ 、异丙硝唑-D ₃ 、羟化甲硝唑-D ₂ 、2-羟甲基-1-甲基-5-硝基咪唑-D ₃ 、羟化异丙硝唑-D ₃ 、甲硝唑-D ₃)	采用提取后添加法考察基质抑制效应,发现禽肉、血浆、蛋中异丙硝唑与羟化异丙硝唑受到的抑制最明显;而蛋中甲硝唑、羟化甲硝唑与洛硝达唑仅受到轻微抑制;而在所有被测基质中,二甲硝唑与 2-羟甲基-1-甲基-5-硝基咪唑均无基质效应。	Mitrowska ^[80]

7 展望

基质效应对待测物的定性与定量准确性有影响,建立分析方法时需对其进行考察以保证方法的可靠性。动物性食品中兽药残留检测中的基质效应问题已引起越来越多学者的重视。尽管基质效应产生的原因复杂、来源广泛、影响因素较多,研究者在探索基质效应产生机制的同时,应该投入更多的时间和精力研究消除和(或)补偿基质效应的可行方法和有效措施,研制通用性基质和构建基质效应估算的数学模型是一个新思路。

参考文献:

- [1] LEE M S, KERNS E H. LC/MS applications in drug development [J]. Mass Spectrom Reviews, 1999, 18: 187-279.
- [2] SRINIVAS N R. Applicability of bioanalysis of multiple analytes in drug discovery and development; Review of select case studies including assay development considerations [J]. Biomed Chromatogr, 2006, 20: 383-414.
- [3] 刘福艳, 刘福强, 谢元超, 等. 液质联用技术在药物分析中的应用研究进展 [J]. 中国药品标准, 2008, 9(6): 443-446.

- [4] JEMAL M, OUYANG Z, XIA Y Q. Systematic LC-MS/MS bioanalytical method development that incorporates plasma phospholipids risk avoidance, usage of incurred sample and well thought-out chromatography[J]. *Biomed Chromatogr*, 2010, 24(1): 2-19.
- [5] HERNANDO M D, SUREZ BARCENA J M, BUENO M J, et al. Fast separation liquid chromatography tandem mass spectrometry for the confirmation and quantitative analysis of avermectin residues in food[J]. *J Chromatogr A*, 2007, 1155(1): 62-73.
- [6] CRNOGORAC G, SCHMAUDER S, SCHWACK W. Trace analysis of dithiocarbamate fungicide residues on fruits and vegetables by hydrophilic interaction liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22(16): 2539-2546.
- [7] 王凤池. 液质联用技术在食品安全检测中的应用研究[D]. 河北: 河北大学, 2008.
- [8] MALIK A K, BLASCO C, PICO Y. Liquid chromatography-mass spectrometry in food safety [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(25): 4018-4040.
- [9] REBANE R, LEITO I, YURCHENKO S, et al. A review of analytical techniques for determination of Sudan FIV dyes in food matrixes[J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1217(17): 2747-2757.
- [10] GOTO T. Development of analytical methods for residual N-methyl carbamate pesticides in foods [J]. *J Pharm Soc Japan*, 2010, 130(8): 999-1010.
- [11] PEREZ C E, HANSEN M, LEON V M, et al. Multiresidue method for the determination of 32 human and veterinary pharmaceuticals in soil and sediment by pressurized-liquid extraction and LC-MS/MS[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 398(3): 1173-1184.
- [12] BABIC S, PAVLOVIC D M, APERGER D, et al. Determination of multi-class pharmaceuticals in wastewater by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS-MS)[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 398(3): 1185-1194.
- [13] FANG G Z, WANG X N, WANG S. Multiwalled carbon nanotubes as SPE adsorbents for simultaneous determination of seven sulfonylurea herbicides in environmental water by LC-MS-MS[J]. *Chromatogr*, 2010, 72(5/6): 403-409.
- [14] PIEPER C, RISSE D, SCHMIDT B, et al. Investigation of the microbial degradation of phenazone-type drugs and their metabolites by natural biofilms derived from river water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) [J]. *Water Res*, 2010, 44(15): 4559-4569.
- [15] GINEYS N, GIROUD B, VULLIET E. Analytical method for the determination of trace levels of steroid hormones and corticosteroids in soil, based on PLE/SPE/LC-MS/MS[J]. *Anal Bioanal Chemistry*, 2010, 397(6): 2295-2302.
- [16] WILLE K, NOPPE H, VERHEYDEN K, et al. Validation and application of an LC-MS/MS method for the simultaneous quantification of 13 pharmaceuticals in seawater [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2010, 397(5): 1797-1808.
- [17] DAKNA M, HE Z Y, YU W C, et al. Technical, bioinformatical and statistical aspects of liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) and capillary electrophoresis-mass spectrometry (CE-MS) based clinical proteomics: A critical assessment[J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877(13): 1250-1258.
- [18] LIN L C, WU H Y, TSENG V S M, et al. A statistical procedure to selectively detect metabolite signals in LC-MS data based on using variable isotope ratios [J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2010, 21(2): 232-241.
- [19] MATUSZEWSKI B K, CONSTANZER M L, CHAVEZ-ENG C M. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS [J]. *Anal Chem*, 2003, 75: 3019-3030.
- [20] FENN J B, MANN M, MENG C K, et al. Electrospray ionization-principles and practice [J]. *Mass Spectrom Reviews*, 1990, 9: 37-70.
- [21] Anon. Guidance for industry. Bioanalytical method validation [EB/OL]. <http://www.fda.gov/cder/guidance/guidance.htm>. Accessed May 28, 2001.
- [22] TAYLOR P J. Matrix effects: The achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography electrospray-tandem mass spectrometry [J]. *Clin Biochem*, 2005, 38: 328-334.
- [23] LITTLE J L, WEMPE M F, BUCHANAN C M. Liquid chromatography-mass spectrometry/mass spectrometry method development for drug metabolism studies: Examining lipid matrix ioni-

- zation effects in plasma[J]. *J Chromatogr B*, 2006, 833: 219-230.
- [24] BROWN F R, DRAPER W M. The matrix effect in particle beam liquid chromatography/mass spectrometry and reliable quantification by isotope dilution[J]. *Biol Mass Spectrom*, 1991, 20(9): 515-521.
- [25] 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, 2(86): 753-756.
- [26] ANNESLEY T M. Ion suppression in mass spectrometry[J]. *Clin Chem*, 2003, 49(7): 1 041-1 044.
- [27] ROGATSKY E, STEIN D. Evaluation of matrix effect and chromatography efficiency: New parameters for validation of method development[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2005, 16: 1 757-1 759.
- [28] 陈耀祖, 涂亚平. *有机质谱原理及应用*[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 18.
- [29] SOUVERAIN S, RUDAZ S, VEUTHEY J L. Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures[J]. *J Chromatogr A*, 2004, 1 058: 61-66.
- [30] KING R, BONFIGLIO R, FERNANDEZ-METZLER C, et al. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2000, 11: 942-950.
- [31] BONFIGLIO R, KING R C, OLAH T V, et al. The effects of sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 1999, 13: 1 175-1 185.
- [32] SHOU W Z, NAIDONG W. Post-column infusion study of the 'dosing vehicle effect' in the liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of discovery pharmacokinetic samples[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17: 589-597.
- [33] DAMS R, HUESTIS M A, LAMBERT W E, et al. Matrix effect in bio-analysis of illicit drugs with LC-MS/MS; Influence of ionization type, sample preparation, and biofluid[J]. *J Am Soc Mass Spectrom*, 2003, 14: 1 290-1 294.
- [34] MULLER C, SCHAFER P, STORTZEL M, et al. 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]. *J Chromatogr B*, 2002, 773: 47-52.
- [35] POLSON C, SARKAR P, INCLEDON B, et al. Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr B*, 2003, 785: 263-275.
- [36] FABIO G, ELEONORA M, DAVIDE Z, et al. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1 217: 3 929-3 937.
- [37] 动物源食品中 11 种激素多残留的测定 液相色谱-串联质谱法[S], 农业部公告 1031-1-2008.
- [38] LAGERWERF F M, VAN DONGEN W D, STEENVOORDEN R J J M, et al. Exploring the boundaries of bioanalytical quantitative LC-MS-MS[J]. *Trends Anal Chem*, 2000, 19: 418-427.
- [39] VAN HOUT M W J, NIEDERLANDER H A G, DE ZEEUW R A, et al. Ion suppression in the determination of clenbuterol in urine by solid-phase extraction atmospheric pressure chemical ionisation ion-trap mass spectrometry[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17: 245-250.
- [40] POOLE C F. New trends in solid phase extraction[J]. *Trends in Anal Chem*, 2003, 22(6): 362-373.
- [41] KOLE P L, VENKATESH G, KOTECHA J, et al. Recent advances in sample preparation techniques for effective bioanalytical methods[J]. *Biomed Chromatogr*, 2011, 25: 199-217.
- [42] ZORITA S, BOYD B, JÖNSSON S, et al. Selective determination of acidic pharmaceuticals in wastewater using molecularly imprinted solid-phase extraction[J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 626: 147-154.
- [43] ISMAIEL O A, HALQUIST M S, ELMAMLY M Y, et al. Monitoring phospholipids for assessment of matrix effects in a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for hydrocodone and pseudoephedrine in human plasma[J]. *J Chromatogr B*, 2008, 875: 333-343.
- [44] 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, 28(8): 1 386-1 388.
- [45] SHEN J X, MOTYKA R J, ROACH J P, et al.

- Minimization of ion suppression in LC-MS/MS analysis through the application of strong cation exchange solid-phase extraction (SCX-SPE)[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2005, 37: 359-367.
- [46] ISMAIEL O A, HALQUIST M S, ELMAMLY M Y, et al. Monitoring phospholipids for assessment of ion enhancement and ion suppression in ESI and APCI LC/MS/MS for chlorpheniramine in human plasma and the importance of multiple source matrix effect evaluations[J]. *J Chromatogr B*, 2007, 59: 84-93.
- [47] PASCOE R, FOLEY J P, GUSEV A I, et al. Reduction in matrix-related signal suppression effects in electrospray ionization mass spectrometry using on-line two-dimensional liquid chromatography[J]. *Anal Chem*, 2001, 73: 6 014-6 023.
- [48] MATUSZEWSKI B K. Standard line slopes as a measure of relative matrix effect in quantitative HPLC-MS bioanalysis [J]. *J Chromatogr B*, 2006, 830: 293-300.
- [49] MARCHI I, VIETTE V, BADOUD F, et al. Characterization and classification of matrix effects in biological samples analyses[J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1 217: 4 071-4 078.
- [50] O'HALLORAN S, ILETT K F. Evaluation of a deuterium-labeled internal standard for the measurement of sirolimus by high-throughput HPLC electrospray ionisation tandem mass spectrometry [J]. *Clin Chem*, 2008, 54: 1 386-1 389.
- [51] HERNANDEZ F, SANCHO J V, POZO O J. Critical review of the application of liquid chromatography/mass spectrometry to the determination of pesticide residues in biological samples[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, 382(4): 934-946.
- [52] 武志雄, 胡江涛, 郑卫东, 等. 猪肉组织中阿维菌素、伊维菌素残留的高效液相色谱-串联质谱法研究[J]. *四川大学学报: 医学版*, 2010, 41(3): 523-526.
- [53] 张丽芳, 王霄旸, 张 涛, 等. 液相色谱-串联质谱法测定肉肠中莱克多巴胺残留量的研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(8): 197-200.
- [54] 杨雯莹, 徐锦忠, 杨功俊, 等. 液相色谱-电喷雾串联质谱法测定禽类产品中克球酚的残留[J]. *色谱*, 2009, 27(2): 144-148.
- [55] 王全林, 张爱芝, 陈立仁. 超高效液相色谱-串联质谱法对奶制品中苯甲酸雌二醇残留的测定[J]. *分析测试学报*, 2009, 28(9): 1 069-1 073.
- [56] BOGIALLI S, CIAMPANELLA C, CURINI R, et al. Development and validation of a rapid assay based on liquid chromatography-tandem mass spectrometry for determining macrolide antibiotic residues in eggs[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 12 (16): 6 810-6 815.
- [57] 王 娟, 李秀琴, 张庆合, 等. 液相色谱-串联质谱法检测牛奶中10种 β -兴奋剂[J]. *食品安全质量检测技术*, 2009, 1(1): 51-56.
- [58] 郭德华, 邓晓军, 赵善贞, 等. 固相萃取-高效液相色谱/串联质谱同时检测动物源性食品中76种兽药残留[J]. *分析化学*, 2010, 38(3): 318-324.
- [59] HOOF N V, COURTHEYN D, ANTIGNAC J, et al. Multi-residue liquid chromatography/tandem mass spectrometric analysis of beta-agonists in urine using molecular imprinted polymers[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2005, 19: 2 801-2 808.
- [60] JUAN C, IGUALADA C, MORAGUES F, et al. Development and validation of a liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the analysis of beta-agonists in animal feed and drinking water [J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1 217: 6 061-6 068.
- [61] ZHU W X, YANG J Z, WEI W, et al. Simultaneous determination of 13 aminoglycoside residues in foods of animal origin by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry with two consecutive solid-phase extraction steps [J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1 207: 29-37.
- [62] GREMILOGIANNI A M, MEGOULAS N C, KOUPPARIS M A. Hydrophilic interaction vs ion pair liquid chromatography for the determination of streptomycin and dihydrostreptomycin residues in milk based on mass spectrometric detection[J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1 217: 6 646-6 651.
- [63] 刘永涛, 刘振红, 丁运敏, 等. HPLC-MS/MS同时测定水产品中喹烯酮、喹乙醇和5种大环内酯类抗生素残留[J]. *食品科学*, 2009, 30(24): 294-298.
- [64] 王凤美, 陈军辉, 林黎明, 等. UPLC-MS/MS法对动物源性食品中12种大环内酯类抗生素残留的测定 [J]. *分析测试学报*, 2009, 28(7): 784-788.
- [65] HE L M, ZHAO D H, SU Y J, et al. Determi-

- nation of macrocyclic lactone drug residues in animal muscle by liquid chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *J AOAC INT*, 2009, 92(1): 348-358.
- [66] 刘勇军, 吴银良, 姜艳彬, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定猪肉中泰拉霉素残留[J]. *分析化学*, 2009, 37(10): 1 489-1 493.
- [67] 倪姮佳, 黄显会, 方炳虎, 等. 高效液相色谱-串联质谱法测定猪组织中的土拉霉素[J]. *分析测试学报*, 2011, 3: 307-311.
- [68] 岳振峰, 陈小霞, 谢丽琪, 等. 高效液相色谱串联质谱法测定动物组织中林可酰胺类和大环内酯类抗生素残留[J]. *分析化学*, 2007, 35(9): 1 290-1 294.
- [69] BOSCHER A, GUIGNARD C, PELLET T, et al. Development of a multi-class method for the quantification of veterinary drug residues in feed-stuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2010, 1 217: 6 394-6 404.
- [70] CHIAOCHAN C, KOESUKWIWAT U, YUDTHAVORASIT S, et al. Efficient hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry for the multiclass analysis of veterinary drugs in chicken muscle[J]. *Anal Chim Acta*, 2010, 682: 117-129.
- [71] VIDAL J L M, LUIZ M D M A, GONZALEZ R R, et al. Multiclass analysis of antibiotic residues in honey by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *J Agric Food Chem*, 2009, 57: 1 760-1 767.
- [72] CARRETERO V, BLASCO C, PICÓ Y. Multi-class determination of antimicrobials in meat by pressurized liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2008, 1 209: 162-173.
- [73] 赵东豪, 贺利民, 聂建荣. 猪肉组织中阿维菌素类药物残留的高效液相色谱-串联质谱法测定[J]. *分析测试学报*, 2008, 27(8): 862-865.
- [74] TURNIPSEED S B, ANDERSEN W C, KARBIWNYK C M, et al. Multi-class, multi-residue liquid chromatograph tandem mass spectrometry screening and confirmative methods for drug residues in milk[J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2008, 22: 1 467-1 480.
- [75] SMITH S, GIESEKER C, REIMSCHUESSEL R, et al. Simultaneous screening and confirmation of multiple classes of drug residues in fish by liquid chromatography-ion trap mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2009, 1 216: 8 224-8 232.
- [76] 贺利民, 黄显会, 方炳虎, 等. 超高效液相色谱-串联质谱法测定动物肌肉组织和鸡蛋中残留的 11 种甾体激素类药物[J]. *色谱*, 2008, 26(6): 714-719.
- [77] SHERIDAN R, POLICASTRO B, THOMAS S, et al. Analysis and occurrence of 14 sulfonamide antibacterials and chloramphenicol in honey by solid-phase extraction followed by LC/MS/MS analysis[J]. *J Agric Food Chem*, 2008, 56: 3 509-3 516.
- [78] SZILAGYI S, DE LA CALLE B. Development and validation of an analytical method for the determination of semicarbazide in fresh egg and in egg powder based on the use of liquid chromatography tandem mass spectrometry[J]. *Anal Chim Acta*, 2006, 572: 113-120.
- [79] MOTTIER P, PARISOD V, GREMAUD E. Determination of the antibiotic chloramphenicol in meat and seafood products by liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry[J]. *J Chromatogr A*, 2003, 994(1/2): 75-84.
- [80] MITROWSKA K, POSYNIK A, ZMUDZKI J. Multiresidue method for the determination of nitroimidazoles and their hydroxy-metabolites in poultry muscle, plasma and egg by isotope dilution liquid chromatography-mass spectrometry[J]. *Talanta*, 2010, 81: 1 273-1 280.