

Анализ вещества

УДК 543+544.173

ПОДАВЛЕНИЕ ИОНИЗАЦИИ КАК ЧАСТНЫЙ СЛУЧАЙ МАТРИЧНЫХ ЭФФЕКТОВ В ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ-МАСС-СПЕКТРОМЕТРИИ (ОБОБЩАЮЩАЯ СТАТЬЯ)

© Е. Н. Чернова¹, Я. В. Русских¹, З. А. Жаковская¹,
Е. М. Лопушанская², Н. Р. Галль³

Статья поступила 15 апреля 2016 г.

Метод высокoeffективной жидкостной хроматографии-масс-спектрометрии (ВЭЖХ-МС) с ионизацией при атмосферном давлении является одним из наиболее селективных и чувствительных, при этом он, как и другие аналитические методы, подвержен матричным эффектам. Одним из наименее изученных и наиболее непредсказуемым проявлением матричных эффектов при ВЭЖХ-МС анализе является подавление ионизации аналита компонентами матрицы (ion suppression). Поскольку данное явление может оказывать значительное влияние на такие параметры метода, как предел обнаружения, предел определения, точность и воспроизводимость, очевидно, что оценка вклада данного вида матричных эффектов и его учет при количественном анализе необходимы в процессе разработки и валидации методик. В статье обсуждены возможные причины и механизмы возникновения подавления ионизации, приведена максимально сжатая информация об основных подходах к выявлению этого эффекта, путях его минимизации и способах учета при измерениях.

Ключевые слова: высокoeffективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС); матричные эффекты; подавление ионизации (ion suppression); усиление ионизации.

Термином «матричные эффекты» ИЮПАК обозначает «комбинированное воздействие всех компонентов пробы, отличных от аналита, на его определение» [1]. Матричные эффекты, как правило, наблюдаются при определении низких концентраций целевых соединений в сложных многокомпонентных матрицах и могут проявляться при использовании практически любых инструментальных методов анализа: различных видов хроматографии, рентгенофлуоресцентного анализа, атомно-абсорбционной спектрометрии, спектрофотометрии и т.д. В большинстве случаев матричные эффекты являются следствием «перекрытия» аналитического сигнала целевого компонента и сигнала компонентов матрицы. Способы снижения матричного эффекта специфичны для каждого конкретного вида анализа и в большинстве случаев хорошо известны исследователям.

При разработке большинства аналитических методик обычно руководствуются общепринятой схемой: подбирают условия анализа и градуируют прибор, используя для этого стандартные растворы определяемого вещества, затем в тех же условиях анализируют реальные объекты.

Однако при использовании метода ВЭЖХ-МС и ВЭЖХ-МС/МС многие аналитики столкнулись с тем, что при переходе от анализа стандартных растворов, используемых для построения градуировочной зависимости, к анализу реальных объектов наблюдается весьма значительное уменьшение интенсивности аналитического сигнала (хроматографического пика аналита). Иногда это уменьшение настолько велико, что на хроматограмме реального объекта на месте пика аналита наблюдается «провал». В подавляющем большинстве случаев это объясняли низкой степенью извлечения, однако оптимизация процедуры пробоподготовки зачастую была неэффективной. Общепринятые в масс-спектрометрии методы снижения влияния матричных компонентов, такие как переход в режим мониторинга выделенных ионов (SIM) или заданных реакций (MRM), не всегда приводили к желаемому результату. Очевидно, что в подобных ситуациях матричные эффекты обусловлены не только перекрытием сигналов аналита и компонентов матрицы наря-

¹ Санкт-Петербургский научно-исследовательский центр экологической безопасности Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: zazhak@hotmail.com

² Всероссийский Научно-исследовательский институт метрологии им. Д. И. Менделеева, Санкт-Петербург, Россия; e-mail: lem@b10.vniim.ru

³ Физико-технический институт им. А. Ф. Иоффе Российской академии наук; Институт аналитического приборостроения Российской академии наук; Санкт-Петербург, Россия; e-mail: gall@ms.ioffe.ru

ду с неэффективностью процедуры пробоподготовки. Авторы работы [2] в 1996 г. связали это явление с подавлением ионизации (ion suppression) молекул аналита совместно элюируемыми из хроматографической колонки компонентами матрицы и рассмотрели вопросы количественной оценки эффектов подавления [2] или реже наблюдаемого усиления [3, 4] ионизации (ion enhancement) в условиях ВЭЖХ-МС с ионизацией электрораспылением.

Поскольку на настоящий момент общепринятых вариантов перевода англоязычных терминов ion suppression/ion enhancement не существует, авторы сочли целесообразным использовать в своей статье терминологию, предложенную в работе [5]: «подавление ионизации» — для обозначения «ion suppression» и «усиление ионизации» — для «ion enhancement».

Исследованию влияния матрицы применительно к методу ВЭЖХ-МС в целом и подавлению/усилению ионизации в частности посвящено множество зарубежных работ [6 – 12]. В некоторых зарубежных нормативных документах, устанавливающих требования к валидации методик анализа с применением метода ВЭЖХ-МС, количественная оценка матричных эффектов является обязательной и необходимой процедурой [13, 14]. При этом все действующие зарубежные нормативные документы ориентированы на требования, предъявляемые к валидации только биоаналитических методик, хотя при анализе объектов окружающей среды или пищевых продуктов методом ВЭЖХ-МС проблема подавления/усиления ионизации является не менее актуальной.

В отечественной научной литературе известны лишь единичные работы [5, 15], посвященные проблеме матричных эффектов и подавления/усиления ионизации в ВЭЖХ-МС. В действующих нормативных документах не упоминается о необходимости проведения соответствующих дополнительных исследований на стадии разработки или аттестации методики [16]. Неучет подавления/усиления ионизации может привести к получению как завышенных, так и заниженных (или ложно-отрицательных) результатов, что будет иметь весьма серьезные последствия, особенно в таких областях, как токсикология, фармакология, клинические исследования и т.п. Поскольку подавление/усиление ионизации может оказывать значительное влияние как на достоверность полученных результатов, так и на метрологические характеристики методики анализа, количественная оценка влияния подавления/усиления ионизации должна быть выполнена еще на стадии разработки методики. Эти эффекты необходимо также учитывать при валидации (аттестации) и применении методики.

Следует также отметить, что в соответствии с современными требованиями к компетентности лабораторий [17] результаты измерений необходимо представлять с указанием неопределенности измерений, при оценке которой нужно принимать во внимание

вклад всех влияющих факторов, а значит, и оценка вклада подавления/усиления ионизации является весьма актуальной.

Основную цель настоящей статьи авторы видят в акцентировании внимания химиков-аналитиков, применяющих метод ВЭЖХ-МС, на необходимости учитывать проблемы, связанные с подавлением/усилением ионизации. Следует также отметить назревшую необходимость гармонизации отечественных нормативных документов, касающихся разработки методик измерения, с существующими зарубежными.

Механизм возникновения подавления/усиления ионизации

Физико-химические механизмы возникновения подавления/усиления ионизации носят комплексный характер и до сих пор изучены недостаточно, однако не вызывает сомнений, что подавление и усиление ионизации являются следствием взаимодействия и, возможно, конкуренции между молекулами аналита и совместно элюируемыми мешающими соединениями.

Мешающие соединения условно можно разделить на две группы [18]. Первую группу составляют так называемые «эндогенные супрессоры», которые исходно присутствуют в материале матрицы и, несмотря на тщательность пробоподготовки, попадают в конечный экстракт. Это соли, высокополярные соединения, поверхностно-активные вещества и различные органические молекулы, такие как углеводы, амины, липиды, пептиды или метаболиты с химической структурой, близкой к структуре аналита.

Вторую группу образуют «экзогенные супрессоры» — соединения, первоначально не присутствующие в материале матрицы, но привнесенные из различных внешних источников в ходе пробоподготовки и анализа. Эта группа может включать пластификаторы и полимеры, следовые количества которых попадают в пробу, например, из материалов картриджей при твердофазной экстракции (ТФЭ), фталаты, ион-парные реагенты, органические кислоты, нелетучие соединения и пр. [18 – 22]. Источником экзогенных мешающих соединений могут стать устройства для отбора проб биологических жидкостей [23 – 29] или материалы дозирующих устройств [21, 23, 27, 28, 30, 31].

Поскольку явление подавления/усиления ионизации характерно для методов ионизации при атмосферном давлении, есть все основания предполагать, что в основном они связаны с процессами, происходящими на стадии ионизации. Так как степень подавления/усиления ионизации для одних и тех же объектов анализа может значительно отличаться при использовании различных методов ионизации (электрораспыления, химической и фотоионизации) [23, 30, 32], то и механизмы возникновения этих эффектов могут быть разными. Во всех случаях ионизации при атмо-

сферном давлении аналит, находящийся в потоке элюента, выходящего из хроматографической колонки, переводят в форму ионов, которые затем поступают в высоковакуумный масс-анализатор.

При электрораспылении ионизация происходит в жидкой фазе в результате образования заряженных капель, формирующихся при распылении через капилляр, на который подают высокое напряжение. В процессе испарения жидкой фазы с поверхности заряженной капли аналит переходит в газовую фазу в виде положительно или отрицательно заряженных ионов. При химической и фотоионизации молекулы аналита переходят в газовую фазу за счет испарения пневмораспыленных нейтральных капель жидкости в потоке нагретого газа, одновременно контактируя с плазмой коронного разряда или потоком ионизирующих фотонов, т.е. ионизация происходит в газовой фазе [33].

Таким образом, все явления, которые приводят к изменению эффективности ионизации, можно разделить на три группы: происходящие в жидкой фазе, в газовой фазе [34 – 36] и на границе раздела фаз при испарении капель и выходе из них ионов.

По мнению большинства исследователей, основной вклад в процесс возникновения подавления/усиления ионизации, как правило, вносят явления, происходящие в жидкой фазе. В пользу этого говорят результаты исследования [37] с использованием комбинированного источника «электрораспыление и химическая ионизация» и сдвоенного источника электрораспыления.

Предполагается, что на эффективность ионизации в жидкой фазе матричные компоненты могут влиять разными путями: препятствуя переходу ионов аналита из жидкой фазы в газовую или непосредственно снижая эффективность электрораспыления.

Так, наличие в экстракте анализируемой пробы большого количества мешающих компонентов может привести к повышению вязкости и/или поверхностного натяжения, что приводит к увеличению размера образующихся заряженных капель и затрудняет испарение жидкой фазы и освобождение ионов аналита от сольватной оболочки [38].

Присутствие примесей поверхностно-активных веществ может оказывать существенное влияние на ионизацию гидрофильных аналитов. Авторы работ [39, 40] объясняли данное явление с помощью модели равновесного распределения (*equilibrium partition model*) молекул различной полярности между объемом и поверхностью испаряющейся капли, что может сильно уменьшить (т.е. вызвать подавление ионизации), или, наоборот, увеличить (т.е. вызвать усиление ионизации) долю ионов, вышедших в газовую фазу в условиях неполного испарения капли.

Еще одной причиной, затрудняющей переход в газовую фазу, считают адсорбцию молекул аналита на нелетучих компонентах, таких как макромолекулы или наночастицы [38].

Высокие концентрации нелетучих растворенных веществ могут быть причиной неэффективного испарения растворов, что препятствует образованию любых ионов.

Существенное влияние на процесс ионизации в жидкой фазе могут оказывать летучие сильные кислоты, используемые в качестве модифицирующих добавок в элюент. Например, трифторуксусная кислота (ТФУ) вызывает подавление ионизации аналитов, являющихся сильными основаниями, за счет эффективного ион-парного взаимодействия между анионами ТФУ и протонированными молекулами аналита, что приводит к потере заряда. Для молекул слабых оснований этот эффект выражен в меньшей степени [4, 19, 20, 22, 37, 41 – 43].

В рамках классической модели электрораспыления можно предположить, что эффективность ионизации может также определяться конкуренцией между определяемым веществом и матричными компонентами за имеющийся заряд и, возможно, за доступ к поверхности капли в жидкой фазе. Этим пытались объяснить возникающую в ряде случаев нелинейность градуировочной зависимости при повышении концентрации определяемого вещества ($> 10^{-5}$ моль/л) [44]. Существует предположение, что это связано с ограниченным количеством заряда, присутствующего на каплях при электрораспылении, или/и с насыщением поверхности заряженных капель ионами аналита, что затрудняет переход заряженных молекул аналита, находящихся в объеме капли, в газовую фазу [38, 40, 42, 44, 45].

В газовой фазе могут происходить другие процессы, также способствующие возникновению подавления/усиления ионизации. Один из механизмов может быть связан с образованием твердых конгломератов вследствие возможного присутствия в пробе нелетучих компонентов [37], на которых происходят адсорбция ионов и их вторичное связывание. Другой механизм, следующий из классической модели ионизации, связан с различием в сродстве к электрону или протону у молекул аналита и матрицы в газовой фазе, что приводит к перераспределению заряда между этими частицами [46]. При высоких концентрациях молекул матрицы этот эффект значим как в отношении переноса заряда от коронного разряда иглы при химической ионизации, так и между аналитом и мешающим соединением при электрораспылении. В частности, ионы аналита могут быть нейтрализованы в газовой фазе в результате реакции депротонирования с высокоосновными компонентами матрицы и далее не детектироваться [18]; или же переходить в газовую фазу как часть заряженного кластера растворителя и тоже не наблюдаться в масс-спектре (например, за счет того, что m/z образовавшихся кластеров может оказаться вне заданного диапазона сканирования) [47].

Кроме вышеперечисленного, степень подавления/усиления ионизации зависит и от природы самого

аналита. Чем полярнее соединение, тем больше проявляется эффект подавления ионизации [8, 9, 30, 48, 49]. Соединения с низкой молекулярной массой более подвержены подавлению/усилению ионизации, чем соединения с высокой молекулярной массой [50].

Несмотря на многочисленные исследования в этой области, информации о механизмах возникновения подавления/усиления ионизации явно недостаточно для создания последовательной непротиворечивой теории этого явления. На сегодняшний день можно говорить лишь об эмпирическом уровне понимания процессов подавления/усиления ионизации, причем указать, какие именно из описанных выше процессов доминируют при конкретном анализе, пока не представляется возможным. Интересно отметить, что механизмов, объясняющих подавление ионизации, предложено значительно больше, чем механизмов, способных объяснить активацию ионизации.

Очевидно, что относительный вклад всех описанных выше процессов зависит непосредственно от условий ионизации, в частности, от взаимного расположения распылительного капилляра, иглы и области ввода ионов в интерфейс, а также от геометрических размеров этой области. Кроме того, оказывают влияние использованные потоки элюента, наличие вспомогательных газов, скорость и температура газовых потоков, режим регистрации ионов (положительных или отрицательных) и т.д.

Так, в большинстве случаев подавление/усиление ионизации проявляются значительно меньше при использовании химической ионизации, чем при электрораспылительной [23, 37, 48, 51 – 55].

Фотоионизация при атмосферном давлении пока менее изучена в отношении влияния матрицы на процессы ионизации. Однако результаты немногочисленных исследований свидетельствуют, что при использовании фотоионизации влияние подавления/усиления ионизации значительно меньше, чем при использовании электрораспылительной и химической ионизации для анализа тех же объектов [32].

Многие исследователи изучали влияние конфигурации ионного источника на возникновение подавления/усиления ионизации [21, 18, 43]: подавление ионизации минимально проявляется при использовании источника с Z-спреем, а максимально — при линейной геометрии источника [43].

Сравнительно новый метод ВЭЖХ-МС с прямой электронной ионизацией (direct electron ionization liquid chromatography-mass spectrometry) основан на использовании жидкостного нанохроматографа в сочетании с масс-спектрометром с источником электронной ионизации [56]. Спектры электронной ионизации легко интерпретировать и воспроизводить, поэтому они могут быть включены в коммерчески доступные библиотеки масс-спектров (NIST, WILEY). В этих условиях совместно элюируемые соединения испаряются одновременно, переходя в газовую фазу,

и ионизируются при независимых столкновениях «единичная молекула — электрон». Таким образом, ионизация происходит в зоне высокого вакуума, где каждая молекула ионизируется независимо. При этом конечный результат зависит только от концентрации каждого компонента без каких-либо взаимных влияний [38, 57 – 59].

Поскольку сравнительно небольшое количество соединений при ионизации образует отрицательно заряженные ионы, режим регистрации отрицательных ионов является более специфичным и, следовательно, менее подвержен влиянию матрицы, в том числе подавлению ионизации [7, 60].

Экспериментальная оценка степени подавления/усиления ионизации

В зарубежной литературе описаны два основных подхода к изучению влияния матрицы в целом и подавления/усиления ионизации в частности: метод постэкстракционной добавки, предложенный в работе [53], и метод постколоночного ввода анализа [8].

В рамках метода постэкстракционной добавки матричные эффекты можно оценить количественно по результатам анализа в идентичных условиях трех различных серий образцов.

Серия 1 — растворы анализа различных концентраций в используемом растворителе.

Для второй серии образцов используют подготовленные к анализу экстракты матрицы, заведомо не содержащей анализа, в которые анализ вводят в тех же концентрациях, что и при приготовлении растворов серии 1. В случае когда получение свободной от анализа пробы не представляется возможным, для постэкстракционной добавки можно использовать близкие по физико-химическим свойствам соединения, заведомо отсутствующие в пробе (структурные или изотопно-меченные аналоги анализа). Любые отклонения площадей пиков анализа, полученные при анализе образцов серии 2, относительно данных, полученных для серии 1, будут указывать на проявление матричного эффекта, в том числе и подавления/усиления ионизации.

Для приготовления третьей серии образцов анализ в тех же количествах вносят непосредственно в матрицу перед проведением пробоподготовки. Различия в площадях пиков анализа для образцов серий 1 и 3 будут характеризовать общую эффективность процедуры, которая подразумевает совокупное влияние компонентов основы пробы (далее обозначено как матричный эффект или МЭ) и степени извлечения анализа на конечный результат измерения при применении конкретной методики. Используя полученные результаты, можно рассчитать степень влияния матричных компонентов, степень извлечения и

общую эффективность процедуры по соответствующим формулам [53]:

$$\begin{aligned} \text{Матричные эффекты} = \\ \frac{\text{Площадь пика аналита, введенного в экстракт матрицы}}{\text{Площадь пика аналита при анализе стандартного раствора}} \cdot 100\%, \quad (1) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Степень извлечения} = \\ \frac{\text{Площадь пика аналита, введенного в экстракт матрицы перед экстракцией}}{\text{Площадь пика аналита, введенного в экстракт матрицы}} \cdot 100\%, \quad (2) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Эффективность процедуры} = \\ \frac{\text{Площадь пика аналита, введенного в матрицу перед экстракцией}}{\text{Площадь пика аналита при анализе стандартного раствора}} \cdot 100\%. \quad (3) \end{aligned}$$

Важно отметить, что степень извлечения, рассчитанная по формуле (2), характеризует «истинную» величину извлечения, не подверженную влиянию матричных соединений. Значение МЭ > 100 % указывает на увеличение регистрируемого аналитического сигнала целевого соединения, а МЭ < 100 % свидетельствует об ослаблении сигнала. При проведении анализа в режиме SIM или MRM расчетные значения, полученные по формуле (1), будут характеризовать относительное изменение интенсивности сигнала аналита, связанное непосредственно с процессом ионизации его молекулы. В этом случае МЭ < 100 % свидетельствует о возникновении подавления ионизации, МЭ > 100 % — об усилении ионизации.

В соответствии с требованиями к валидации биоаналитических методик [14] при использовании для определения метода внутреннего стандарта матричные эффекты предлагается оценивать по отдельности для аналита и соответствующего внутреннего стандарта по формуле (1) и затем рассчитывать нормализованный матричный фактор:

$$\begin{aligned} \text{Матричный фактор}_{\text{норм}} = \\ \frac{\text{Матричный эффект}_{\text{аналит}}}{\text{Матричный эффект}_{\text{вн. стандарт}}} \cdot 100\%. \quad (4) \end{aligned}$$

Нормализованный матричный фактор должен быть рассчитан не менее чем для шести образцов биологической матрицы различных доноров, а коэффициент вариабельности матричного фактора, рассчитанный в соответствии со стандартной процедурой, не должен превышать 15 % [14].

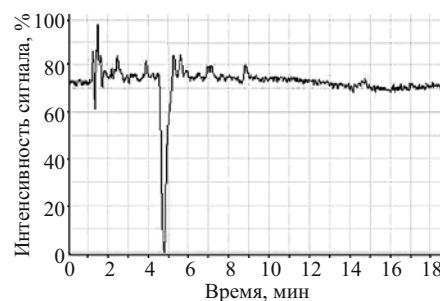


Рис. 1. Пример масс-хроматограммы, полученной авторами настоящей статьи при исследовании влияния матричных компонентов на ионизацию метилбентазона

В рамках метода постколоночного введения матричные эффекты оценивают следующим образом: экстракт пробы, не содержащей аналита, вводят в колонку хроматографа. В поток элюента после колонки, но до источника ионизации, постоянно подают раствор аналита, регистрируя аналитический сигнал в непрерывном режиме. Если в процессе элюирования компонентов экстракта из колонки происходит резкое изменение интенсивности регистрируемого сигнала аналита, то это свидетельствует о возникновении подавления/усиления ионизации. Такой подход позволяет выделить диапазон времен удерживания, внутри которого влияние компонентов матрицы на интенсивность сигнала аналита будет максимальным. Более детально схема проведения этого эксперимента описана в работе [8].

На рис. 1 приведен пример масс-хроматограммы, полученной авторами настоящей статьи при исследовании влияния матричных компонентов на ионизацию метилбентазона. Очевидно, что подавление ионизации возникает в области времен удерживания 4 – 5 мин.

Таким образом, метод постколоночного введения позволяет оценить степень подавления/усиления ионизации качественно, что особенно полезно при подборе хроматографических условий анализа, а метод постэкстракционной добавки — количественно и, при необходимости, для каждого проводимого анализа.

Однако перечисленные методы не могут считаться абсолютно надежными и имеют некоторые ограничения. Так, при использовании метода постэкстракционной добавки следует учитывать, что степень подавления/усиления ионизации может оказаться различной для однотипных проб, полученных из разных источников в рамках проведения одной исследовательской работы (например, сыворотка крови, взятой у разных пациентов, может существенно отличаться по составу) [7, 61].

Процедура, описанная в руководстве [14], регламентирует требования только к методикам анализа биообъектов, но далеко не всегда может быть распространена на другие объекты исследования (экологические и т.п.). В случае значительных вариаций в ком-

понентном составе матрицы (например, при анализе остаточных количеств фармпрепаратов в сточной воде) или невозможности получения достаточного количества однотипных образцов оценка нормализованного матричного фактора становится затруднительной.

В некоторых случаях исследователи отмечали нелинейную зависимость подавления/усиления ионизации от концентрации аналита в пробе. Например, при концентрации кленбутерола в моче 93 мкг/л МЭ составлял 37 %, а при 45 мкг/л — 93 % [62]. Следовательно, при разработке и валидации методики оценку подавления ионизации необходимо проводить в диапазоне концентраций аналита, близком к ожидаемой. Количество вводимого в пробу внутреннего стандарта также должно быть близко к ожидаемому количеству аналита.

Перечисленные подходы широко используют в научной практике, однако на сегодняшний день не предложено стандартизованных процедур учета полученных данных при вычислении конечных результатов анализа и оценке неопределенности измерений.

Способы минимизации и учета подавления/усиления ионизации

Для масс-спектрометрических методов анализа общепринятым подходом к снижению влияния матричных компонентов является переход от сканирования полного масс-спектра (Fullscan) к анализу в режиме мониторинга выделенных ионов (SIM) или, при тандемной масс-спектрометрии, в режиме мониторинга заданных реакций (MRM). Однако в случае значительного вклада в матричные эффекты процессов подавления/усиления ионизации данный подход не приводит к желаемым результатам, так как имеет место не просто перекрывание аналитических сигналов ионов целевых компонентов и сигналов ионов компонентов матрицы, а снижается (вплоть до отсутствия ионизации вообще) или возрастает абсолютное количество ионизированных молекул определяемых веществ.

Наиболее эффективным и наименее трудозатратным способом учета всех матричных эффектов, в том числе и подавления/усиления ионизации, на результаты анализа, видимо, является использование метода изотопного разбавления, т.е. применение в качестве внутренних стандартов изотопно-меченых аналогов определяемых соединений. Такой подход позволяет корректно учесть изменение интенсивности аналитического сигнала благодаря равноценному воздействию подавления/усиления ионизации на оба соединения [63 – 67].

Однако в случае ВЭЖХ-МС метод изотопного разбавления имеет свою специфику. Так, например, при возможности выбора предпочтительным является использование ^{13}C -, ^{15}N - и ^{17}O -меченых соединений, а не более дешевых и доступных дейтерированных.

Поскольку дейтерий и водород имеют гораздо более значительные различия в своих физических свойствах, чем, например, ^{12}C и ^{13}C , замена водорода на дейтерий может изменять физико-химические свойства соединения (например, липофильность). В результате может измениться не только эффективность его ионизации, но и хроматографическое время удерживания. При этом аналит и его изотопно-меченый аналог будут элюироваться совместно с различными компонентами матрицы и, соответственно, окажутся в различной степени подвержены подавлению/усилению ионизации [68, 69]. Это явление, известное в масс-спектрометрии как дейтеро-водородный изотопный эффект, в случае ВЭЖХ-МС может существенно исказить результаты анализа (до 50 %) [70].

При использовании в качестве внутренних стандартов не изотопно-меченых аналогов следует учитывать, что степень влияния подавления/усиления ионизации на ионизацию молекулы аналита и соответствующего внутреннего стандарта может существенно различаться из-за различий в их химических свойствах. В этом случае вследствие возникновения подавления/усиления ионизации используемые в количественных расчетах соотношения (площадь пика аналита/площадь пика внутреннего стандарта), полученные при анализе градуировочного раствора и экстракта пробы, могут различаться в несколько раз. В связи с этим для приготовления градуировочных растворов настоятельно рекомендуется использовать не растворитель, а анализируемую матрицу или ее экстракт (так называемая «матричная градуировка») [71, 72].

При отсутствии изотопно-меченых аналогов хорошей альтернативой является метод «эхо-пика» [73], суть которого заключается в двух последовательных инъекциях в течение одного анализа: сначала вводят анализируемую пробу, а затем, через короткий промежуток времени, — раствор аналита известной концентрации в растворителе. В результате аналит из анализируемой пробы и аналит из раствора элюируются в непосредственной близости друг от друга, следовательно, ожидается, что они будут подвержены подавлению/усилению ионизации в одинаковой степени [74]. Пример масс-хроматограммы, полученной авторами настоящей статьи методом «эхо-пика» в режиме мониторинга выделенных ионов, представлен на рис. 2. Первый пик соответствует инъекции исследуемой пробы (экстракт природной воды, содержащий карбофуран), второй — эхо-инъекции раствора стандарта карбофурана в метаноле (1 нг на ввод).

Очевидно, что использование изотопного разбавления или техники «эхо-пика» помогает повысить достоверность результатов измерения за счет учета влияния подавления/усиления ионизации, однако не является способом непосредственно снизить степень этого эффекта.

В связи с этим кратко рассмотрим основные способы минимизации подавления/усиления ионизации.

Оптимизация пробоподготовки. Правильно подобранная процедура пробоподготовки может значительно уменьшить влияние матричных компонентов в тех случаях, когда хроматографически невозможно отделить аналит от совместно элюируемых компонентов матрицы.

Практические рекомендации по методам подготовки проб к анализу хроматографическими методами полно освещены в книге [75]. Однако в случае использования ВЭЖХ-МС существует ряд особенностей, поэтому целесообразно рассмотреть некоторые методы пробоподготовки с точки зрения их влияния на подавление/усиление ионизации при проведении масс-спектрометрического анализа.

Благодаря своей простоте и малым временным затратам весьма популярным методом пробоподготовки при анализе биологических сред является *осаждение белка*. В качестве осаждающих агентов чаще всего используют ацетонитрил, трихлоруксусную кислоту, метанол, этанол или сульфат цинка. В большинстве случаев после осаждения белков пробу без дальнейшей очистки вводят непосредственно в прибор, поэтому в случае ВЭЖХ-МС выбору подходящего осаждающего агента нужно уделять особое внимание. Например, сульфат цинка является очень эффективным осаждающим агентом, однако его использование ограничено из-за опасности сильного загрязнения ионного источника, а трихлоруксусная кислота может быть причиной значительного подавления ионизации для некоторых аналитов. Кроме того, на процесс ионизации могут оказывать значительное влияние соли, амины, жирные кислоты, фосфолипиды, триглицериды и другие компоненты биологического материала, которые остаются в супернатанте после осаждения белков [21, 23, 37, 47, 52]. Наиболее подходящим осаждающим агентом при подготовке пробы для ВЭЖХ-МС считается ацетонитрил, так как он обеспечивает максимальное удаление белков и максимальное извлечение аналита при минимальном подавлении/усилении ионизации [76].

Жидкостная экстракция жидких и твердых матриц позволяет удалить большее количество мешающих матричных соединений, чем при осаждении белков [77], однако является значительно более длительным и ресурсозатратным процессом, обладая при этом сравнительно низкой селективностью. Аналиты экстрагируют из матрицы летучим органическим растворителем. Затем путем отгонки растворителя полученный экстракт концентрируют, в результате чего он обогащается аналитом. Однако в результате концентрирования вместе с целевым веществом концентрируются и все мешающие соединения, как экзогенные, так и эндогенные, которые могут явиться причиной возникновения подавления/усиления ионизации [46].

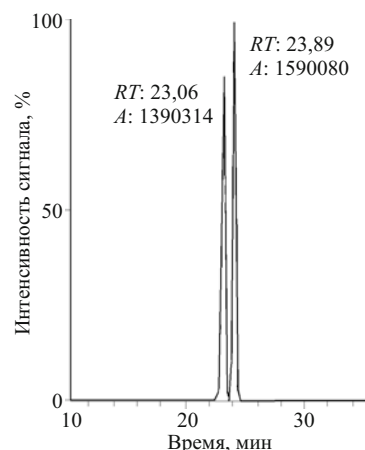


Рис. 2. Масс-хроматограмма, полученная методом «эхо-пика»: сканирование в узком диапазоне m/z (222, 11190 – 222, 11412), детектирование в режиме масс-спектрометрии с преобразованием Фурье (FTMS) (RT — время удерживания; A — площадь пика сигнала)

Метод твердофазной экстракции (ТФЭ, SPE) может считаться наиболее распространенным в аналитической практике, так как он позволяет удалить мешающие матричные компоненты, провести обогащение экстракта аналитом (концентрирование пробы), селективное выделение и, при необходимости, фракционное разделение целевых соединений.

Преимуществами ТФЭ являются: простота выполнения, высокая селективность, высокая степень извлечения, высокая чистота полученного экстракта, экспрессность, возможность автоматизации, возможность on-line режима, малый расход растворителей.

Опыт, накопленный исследователями и производителями сорбентов и устройств для ТФЭ, позволяет подобрать условия для оптимального решения конкретной аналитической задачи. Соответствующие руководства по выбору сорбентов с подробным описанием процедуры их применения в зависимости от типа матрицы и аналита разработаны ведущими изготовителями [78 – 81]. Сравнительно недавно некоторые компании начали предлагать специальные сорбенты, использование которых может снизить степень подавления ионизации, например, Agilent Bond Elut Plexa [78].

В работе [82] представлен обзор методов ТФЭ.

Различными исследовательскими группами разработано большое количество процедур пробоподготовки для экологического и биомедицинского анализа с использованием ТФЭ, при этом особое внимание уделено именно проблеме снижения МЭ [9, 22, 30, 77, 83 – 94].

Детальный обзор валидированных методик ЖХ-МС, предполагающих применение оборудования с автоматизированными системами и со встроенными системами пробоподготовки, приведен в ряде работ [30, 66, 83, 84, 95 – 97].

Достаточно новыми продуктами для ТФЭ можно считать сорбенты на основе молекулярно-имприн-

тированных полимеров (МИП, MIPs), или полимеров с молекулярными отпечатками. Их преимуществом является наличие специфичных микропор, форма которых соответствует форме молекулы целевого соединения [98 – 105].

Для твердых, полутвердых и вязких проб альтернативой классической ТФЭ является метод твердофазной матричной дисперсии (ТФМД, MSPD, matrix solid-phase dispersion), который позволяет за одну стадию провести измельчение, экстракцию и очистку природных и биологических матриц без предварительного переведения их в менее вязкую и гомогенную форму [106, 107].

Оптимизация хроматографических условий разделения. Изменение условий хроматографирования довольно широко используется для преодоления матричных эффектов. При этом условия анализа подбирают таким образом, чтобы хроматографический пик аналита находился вне области, подверженной влиянию матричных компонентов [8, 9, 26, 30, 83, 94]. Эту область влияния предварительно определяют методом постколоночного введения аналита в соответствии с описанной выше процедурой [8].

Общепринятые подходы к оптимизации хроматографических условий хорошо известны и достаточно широко освещены в литературе [22, 28, 37, 94, 108 – 113]. Однако использование в сочетании с ВЭЖХ масс-спектрометрического детектирования накладывает некоторые ограничения на их применение.

Так, например, наиболее распространенные модифицирующие и буферные добавки (неорганические кислоты и их соли) вследствие их нелетучести могут оказать влияние на процесс ионизации, а также привести к сильному загрязнению и коррозии ионного источника [22, 37, 110 – 113]. В связи с этим для ВЭЖХ-МС рекомендуется использовать только летучие соединения: гидроксид аммония, муравьиную и уксусную кислоты, их аммонийные соли и гидрокарбонат аммония, которые охватывают практически весь необходимый диапазон pH элюента [114 – 116].

Аналогичная ситуация наблюдается и при выборе ион-парных реагентов. Используемые в ВЭЖХ алкилсульфаты, алкилсульфонаты и четвертичные аммониевые соли загрязняют ионный источник, в связи с чем для ВЭЖХ-МС рекомендуют летучие ион-парные реагенты — фторкарбоновые кислоты (пентафтормасляную или гептафтормасляную), ацетат дибутиламмония или бикарбонат триэтиламмония [109]. Однако при их использовании могут возникнуть другие проблемы. Так, например, интенсивность аналитического сигнала большинства аминокислотных соединений при добавлении к элюенту фторированных карбоновых кислот понижается примерно на 30 – 80 % [20]. Популярная у аналитиков трифторуксусная кислота (ТФУ), которая является замечательным ион-парным реагентом, оказывается и сильным «супрессором», в

связи с чем ее применения по возможности нужно избегать или использовать в минимальных количествах [47, 86]. При невозможности избежать применения ТФУ компенсировать ее негативное влияние можно путем постколоночного введения в элюент различных модификаторов, например, пропионовой кислоты и 2-пропанола [19, 41].

Хорошей альтернативой, позволяющей избежать применения ион-парных реагентов при анализе высокополярных соединений, является жидкостная хроматография гидрофильных взаимодействий (Hydrophilic-interaction liquid chromatography — HILIC). Во-первых, при использовании HILIC-колонок значительно проще отделить пики полярных соединений от области фронта растворителя, во-вторых, высокое содержание летучей органической подвижной фазы (ацетонитрила) способствует снижению предела обнаружения при электрораспылительной ионизации [49, 66, 17].

Во многих случаях снизить влияние матричных соединений на процесс ионизации возможно за счет уменьшения скорости потока элюента. С этой точки зрения весьма перспективным является использование нанохроматографии и наноэлектроспрея [10, 118, 119].

Еще одним техническим решением проблемы может быть использование систем высокоэффективной жидкостной хроматографии сверхвысокого давления (ультра-ВЭЖХ), подразумевающей использование колонок с размером частиц фазы не более 2 мкм и насосов сверхвысокого давления. Разрешающая способность таких систем существенно превышает возможности традиционной хроматографии и во многих случаях позволяет достичь приемлемого разрешения пиков аналита и компонентов матрицы [60, 94].

При использовании двумерной жидкостной хроматографии последовательное разделение компонентов пробы на двух колонках с различными свойствами в большинстве случаев позволяет эффективно отделить от аналита матричные компоненты, имеющие сходно близкие времена удерживания [111, 120 – 124].

Таким образом, несмотря на то что метод ВЭЖХ-МС с ионизацией при атмосферном давлении является одним из наиболее селективных и чувствительных, для него, как и для многих других, характерно наличие матричных эффектов. Одним из наименее изученных и наиболее непредсказуемым проявлением матричных эффектов при ВЭЖХ-МС анализе является подавление/усиление ионизации.

Постепенно накапливается информация о способах выявления, оценки, минимизации и учета степени подавления/усиления ионизации. Появляются нормативные документы, содержащие рекомендации для аналитиков. Состояние вопроса проиллюстрировано на рис. 3.

Нам представляется, что имеющиеся рекомендации и опыт следует более активно использовать



Рис. 3. Обобщенная информация об усилении/подавлении ионизации

в отечественных лабораториях как при разработке и валидации аналитических методик, так и при анализе единичных проб методом ВЭЖХ-МС. Этому способствовали бы перевод на русский язык и издание нормативных документов, выпущенных авторитетными международными организациями (см. рис. 3). Свой вклад должны внести метрологи, специализирующиеся на аттестации методик определения вредных веществ в пищевых продуктах и объектах окружающей среды. Возможно, следует также уделить внимание оптимизации разрабатываемого масс-спектрометрического оборудования, по крайней мере, в части геометрии ионных источников и режимов работы при атмосферной ионизации.

Авторы выражают глубокую признательность профессору, заведующей лабораторией ИАП РАН Л. Н. Галль, руководителю отдела ВНИИМ им. Д. И. Менделеева А. И. Крылову и руководителю лаборатории ВНИИМ Г. Р. Нежиховскому за консультативную помощь при подготовке материалов статьи.

REFERENCES (ЛИТЕРАТУРА)

1. IUPAC Gold book. URL: <http://www.goldbook.iupak.org/M03759.html> (accessed 16.02.2016).
2. Buhrman D. L., Price P. I., Rudewicz P. J. Quantitation of SR 27417 in human plasma using electrospray liquid chromatography mass spectrometry: a study of ion suppression / J. Am. Soc. Mass. Spectrom. 1996. Vol. 7. P. 1099 – 1105.
3. Tonidandel L., Seraglia R. Matrix effect, signal suppression and enhancement in LC-ESI-MS / Advances in LC-MS instrumentation (ed. A. Cappiello). — Amsterdam: Elsevier Publications, 2007. P. 193 – 210.
4. Gosetti F., Mazzucco E., Zampieri D., Gennaro M. C. Signal suppression/enhancement in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry / J. Chromatogr. A. 2010. Vol. 1217. N 25. P. 3929 – 3937.
5. Dikunets M. A., Savel'eva N. B., Bolotov S. L., et al. Study of the Matrix Effect on the Determination of Nonconjugated Xenobiotics in Human Urine by High Performance Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry / J. Anal. Chem. 2010. Vol. 65. N 13. P. 1333 – 1340.
6. Trufelli H., Palma P., Famigliini G., Cappiello A. An overview of matrix effects in liquid chromatography — mass-spectrometry / Mass Spectrom. Rev. 2011. Vol. 30. P. 491 – 509.
7. Stahnke H., Reemtsma T., Alder L. Compensation of matrix effects by postcolumn infusion of a monitor substance in multiresidue analysis with LC-MS/MS / Anal. Chem. 2009. Vol. 81. N 6. P. 2185 – 2192.
8. Bonfiglio R., King R. C., Olah T. V., Merkle K. The effect sample preparation methods on the variability of the electrospray ionization response for model drug compounds / Rapid Commun Mass Spectrom. 1999. Vol. 13. N 12. P. 1175 – 1185.
9. Furey A., Moriarty M., Bane V., et al. Ion suppression: a critical review on causes, evaluation, prevention and applications / Talanta. 2013. Vol. 115. P. 104 – 122.

10. Van Eeckhaut A., Lanckmans K., Sarre S., et al. Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: Evaluation of matrix effects / *J. Chromatogr. B*. 2009. Vol. 877. N 23. P. 2198 – 2207.
11. Peters F. T., Drummer O. H., Musshoff F. Validation of new methods / *Forensic Sci. Int.* 2007. Vol. 165. N 2 – 3. P. 216 – 224.
12. Thompson M., Ellison S., Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis / IUPAC, Pure and Applied Chemistry. 2002. Vol. 74. P. 835 – 855.
13. U.S. Food and Drug Administration's (FDA) Guidance for Industry on Bioanalytical Method Validation. URL: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm070107.pdf> (accessed 15.12.2015).
14. Guideline on bioanalytical method validation of European Medicines Agency — Committee for Medicinal Products for Human Use. 2011. URL: http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf (accessed 16.02.2016).
15. Yaroshenko D. V., Kartsova L. A. Matrix effect and methods for its elimination in bioanalytical methods using chromatography-mass spectrometry / *J. Anal. Chem.* 2014. Vol. 69. N 4. P. 311 – 317.
16. RF State Standard GOST R 52379–2005. Nadležashchaya klinicheskaya praktika (GCP) [Good Clinical Practice. Russian Federation National standard]. From 01.04.2006. URL: <http://gostrf.com/normadata/1/4293852/4293852873.pdf> [in Russian].
17. ISO/IEC 17025:2005. General requirements for the competence of testing and calibration laboratories (IDT). Interstate standard. From 01.01.2012. URL: <http://gostrf.com/normadata/1/4293801/4293801404.pdf> [in Russian].
18. Antignac J. P., Wash F., Monteau H. D., et al. The ion suppression phenomenon in liquid chromatography-mass spectrometry and its consequences in the field of residue analysis / *Anal. Chim. Acta*. 2005. Vol. 529. P. 129 – 136.
19. Eshraghi J., Chowdhury S. K. Factors affecting electrospray ionization of effluents containing trifluoroacetic acid for high-performance liquid chromatography/mass spectrometry / *Anal. Chem.* 1993. Vol. 65. P. 3528 – 3533.
20. Gustavsson S. A., Samskog J., Markides K. E., Langstrom B. Studies of signal suppression in liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry using volatile ion-pairing reagents / *J. Chromatogr. A*. 2001. Vol. 937. P. 41 – 44.
21. 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 / *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003. Vol. 17. N 1. P. 97 – 103.
22. Mallet C. R., Lu Z., Mazzeo J. R. A study of ion suppression effects in electrospray ionization from mobile phase additives and solid phase extracts / *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004. Vol. 18. N 1. P. 49 – 58.
23. Schuhmacher J., Zimmer D., Tesche F., Pickard V. Matrix effects during analysis of plasma samples by electrospray and atmospheric pressure ionization mass spectrometry: practical approaches to their elimination / *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003. Vol. 17. P. 1950 – 1957.
24. Wood M., Laloup M., Ramirez Fernandez M., et al. Quantitative analysis of multiple illicit drugs in preserved oral fluid by solid-phase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry / *Forensic Sci. Int.* 2005. Vol. 150. P. 227 – 238.
25. Tong X. C. S., Wang J. Y., Zheng S., et al. Effect of signal interference from dosing excipients on pharmacokinetic screening of drug candidates by liquid chromatography/mass spectrometry / *Anal. Chem.* 2002. Vol. 74. N 24. P. 6305 – 6313.
26. Shou W. Z., Weng N. D. Post-column infusion study of the dosing vehicle effect in the liquid chromatography/tandem mass spectrometry of discovery pharmacokinetic samples / *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003. Vol. 17. N 6. P. 589 – 597.
27. Larger P. J., Breda M., Fraier D., et al. Ion-suppression effects in liquid chromatography-tandem mass spectrometry due to a formulation agent, a case study in drug discovery bioanalysis / *J. Pharm. Biomed.* 2005. Vol. 39. P. 206 – 216.
28. Weaver R., Riley R. J. Identification and reduction of ion suppression effects on pharmacokinetic parameters by polyethylene glycol 400 / *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2006. Vol. 20. P. 2559 – 2564.
29. Xu X., Mei H., Wang S., et al. A study of common discovery dosing formulation components and their potential for causing time-dependent matrix effects in high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry assays / *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005. Vol. 19. P. 2643 – 2650.
30. 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. Chromatogr. A*. 2004. Vol. 1058. P. 61 – 66.
31. Leverence R., Avery M. J., Kavetskaia O., et al. Signal suppression/enhancement in HPLC-ESI-MS/MS from concomitant medications / *Biomed. Chromatogr.* 2007. Vol. 21. P. 1143 – 1150.
32. Hanold K. A., Fischer S. M., Cormia P. H., et al. Atmospheric pressure photoionization. 1. General properties for LC/MS / *Anal. Chem.* 2004. Vol. 76. N 10. P. 2842 – 2851.
33. Lebedev A. T. Mass-spektrometriya dlya analiza ob"ektov okruzhayushchei sredy [Mass-spectrometry for the environmental analysis]. — Moscow: Tekhnosfera, 2013. — 632 p. [in Russian].
34. Cole R. B. Some tenets pertaining to electrospray ionization mass spectrometry / *J. Mass Spectrom.* 2000. Vol. 35. N 7. P. 763 – 772.
35. Kebarle P. A brief overview of the present status of the mechanisms involved in electrospray mass spectrometry / *J. Mass Spectrom.* 2000. Vol. 35. P. 804 – 817.
36. Cech N. B., Enke C. G. Practical implications of some recent studies in electrospray ionization fundamentals / *Mass Spectrom. Rev.* 2001. Vol. 20. P. 362 – 387.
37. King R., Bonfiglio R., Fernandez-Metzler C., et al. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization / *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 2000. Vol. 11. N 11. P. 942 – 950.
38. Cappiello A., Famiglini G., Palma P., et al. Overcoming Matrix Effects in Liquid Chromatography-Mass Spectrometry / *Anal. Chem.* 2008. Vol. 80. P. 9343 – 9348.
39. Enke C. G. A predictive model for matrix and analyte effects in electrospray ionization of singly-charged ionic analytes / *Anal. Chem.* 1997. Vol. 69. P. 4885 – 4893.
40. Cech N. B., Enke C. G. Relating electrospray ionization response to nonpolar character of small peptides / *Anal. Chem.* 2000. Vol. 72. P. 2717 – 2723.
41. Appfel A., Fisher S., Goldberg G., et al. 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*. 1995. Vol. 712. P. 177 – 190.
42. Zhou S., Cook K. D. A mechanistic study of electrospray mass spectrometry: charge gradients within electrospray droplets and their influence on ion response / *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2001. Vol. 12. P. 206 – 214.
43. Holčápek M., Volna K., Jandera P., et al. Effects of ion-pairing reagents on the electrospray signal suppression of sulphonated dyes and intermediates / *J. Mass Spectrom.* 2004. Vol. 39. P. 43 – 50.
44. Ikonomu M. G., Blades A. T., Kebarle P. Investigations of the electrospray interface for liquid chromatography/mass spectrometry / *Anal. Chem.* 1990. Vol. 62. P. 957 – 967.
45. Bruins C. H. P., Jeronimus-Stratingh K., Ensing W. D., Jong G. J. D. On-line coupling of solid-phase extraction with mass spectrometry for the analysis of biological samples: I. Determination of clenbuterol in urine / *J. Chromatogr. A*. 1999. Vol. 863. N 1. P. 115 – 122.
46. Sangster T., Spence M., Sinclair P., et al. Unexpected observation of ion suppression in a liquid chromatography/atmospheric chemical ionization mass spectrometric bioanalytical method / *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004. Vol. 18. P. 1361 – 1364.
47. Jessome L. L., Volmer D. A. Ion suppression: a major concern in mass-spectrometry / *LC-GG North America*. 2006. Vol. 24. N 5. P. 498 – 510.
48. Liang H. R., Foltz R. L., Meng M., Bennet P. Ionization enhancement in atmospheric pressure ionization and suppression in electrospray ionization between target drugs and stable-isotope-labeled internal standards in quantitative liquid chromatography/tandem mass spectrometry / *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003. Vol. 17. P. 2815 – 2821.
49. Naidong W. Bioanalytical liquid chromatography tandem mass spectrometry methods on underivatized silica columns with aqueous/organic mobile phases / *J. Chromatogr. B*. 2003. Vol. 796. N 2. P. 209 – 224.
50. Kloepper A., Quintana J., Reemtsma T. Operational options to reduce matrix effects in liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry analysis of aqueous environmental samples / *J. Chromatogr. A*. 2005. Vol. 1067. P. 153 – 160.
51. Barnes K. A., Fussel R. J., Startin J. R., et al. Determinations of the pesticides diflufenzuron and clofentezine in plums, strawberries and blackcurrant-based fruit drinks by high performance liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry / *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1995. Vol. 9. P. 1441 – 1445.
52. Matuszewsky B. K., Constanzer M. L., Chavez-Eng C. M. 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.* 1998. Vol. 70. P. 882 – 889.
53. Matuszewsky 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 / *Anal. Chem.* 2003. Vol. 75. N 13. P. 3019 – 3030.
54. **Vanderford B. J., Pearson R. A., Rexing D. J., Snyder S. A.** Analysis of endocrine disruptors, pharmaceutical and personal care products in water using liquid chromatography/tandem mass spectrometry / *Anal. Chem.* 2003. Vol. 75. N 22. P. 6265 – 6274.
 55. **Ching C., Zhang Z. P., Karnes H. T.** A study of matrix effects on an LC/MS/MS assay for olanzapine and desmethyl olanzapine / *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2004. Vol. 35. N 5. P. 1149 – 1167.
 56. **Cappiello A., Famiglini G., Palma P., et al.** Advanced liquid chromatography-mass spectrometry interface based on electron ionization / *Anal. Chem.* 2007. Vol. 79. N 14. P. 5364 – 5372.
 57. **Cappiello A., Famiglini G., Palma P., et al.** Application of nano-FIA-direct-EI-MS to determine diethylene glycol in produced formation water discharges and seawater samples / *Chemosphere.* 2007. Vol. 69. N 4. P. 554 – 560.
 58. **Famiglini G., Palma P., Pierini E., Trufelli H., Cappiello A.** Organochlorines pesticides by LC-MS / *Anal. Chem.* 2008. Vol. 80. N 9. P. 3445 – 3449.
 59. **Famiglini G., Palma P., Termopoli V., et al.** Single-step LC/MS method for the simultaneous determination of GC-amenable organochlorine and LC-amenable phenoxy acidic pesticides / *Anal. Chem.* 2009. Vol. 81. N 17. P. 7373 – 7378.
 60. **Marín J. M., Gracia-Lor E., Sancho J. V., et al.** Application of ultra-high-pressure liquid chromatography-tandem mass spectrometry to the determination of multi-class pesticides in environmental and wastewater samples: Study of matrix effects / *J. Chromatogr. A.* 2009. Vol. 1216. P. 1410 – 1420.
 61. **Callahan J. H., Shefcheck K. J., Williams T. L., Musser S. M.** Detection, confirmation, and quantification of staphylococcal enterotoxin B in food matrix using liquid chromatography mass spectrometry / *Anal. Chem.* 2006. Vol. 78. P. 1789 – 1800.
 62. **Annesley T. M.** Ion suppression in mass spectrometry / *Clin. Chem.* 2003. Vol. 49. P. 1041 – 1044.
 63. **Freitas L. G., Gotz C. W., Ruff M., et al.** Quantification of the new triketone herbicides, sulcotrione and mesotrione, and other important herbicides and metabolites, at the ng/l level in surface waters using liquid chromatography-tandem mass spectrometry / *J. Chromatogr. A.* 2004. Vol. 1028. P. 277 – 286.
 64. **Ismail 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. Chromatogr. B.* 2008. Vol. 875. P. 333 – 343.
 65. **Zhao Z., Metcalfe C. D.** Characterizing and compensating for matrix effects using atmospheric pressure chemical ionization liquid-chromatography-tandem mass spectrometry: Analysis of neutral pharmaceuticals in municipal wastewater / *Anal. Chem.* 2008. Vol. 80. N 6. P. 2010 – 2017.
 66. **Xu R. N., Fan L., Rieser M. J., El-Shourbagy T. A.** Recent advances in high-throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS / *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007. Vol. 44. P. 342 – 355.
 67. **Hao C., Zhao X., Tabe S., Yang P.** Optimization of a multiresidual method for the determination of waterborne emerging organic pollutants using solid-phase extraction and liquid chromatography/tandem mass spectrometry and isotope dilution mass spectrometry / *Environ. Sci. Technol.* 2008. Vol. 42. P. 4068 – 4075.
 68. **Stokvis E., Rosing H., Beijnen J. H.** Stable isotopically labeled internal standard in quantitative bioanalysis using liquid chromatography/mass spectrometry: necessity or not? / *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005. Vol. 19. P. 401 – 407.
 69. **Wang S., Cyronak M., Yang E.** Does a stable isotopically labeled internal standard always correct analyte response? A matrix effect study on a LC/MS/MS method for the determination of carvedilol enantiomers in human plasma / *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2007. Vol. 43. P. 701 – 707.
 70. **Lindegardh N., Annerberg A., White N. J., Daya N. P. J.** Development and validation of a liquid chromatographic-tandem mass spectrometric method for determination of piperazine in plasma. Stable isotope labeled internal standard does not always compensate for matrix effects / *J. Chromatogr. B.* 2008. Vol. 862. P. 227 – 236.
 71. **Jemal M.** High throughput quantitative bioanalysis by LC-MS/MS / *Biomed. Chromatogr.* 2000. Vol. 14. P. 422 – 429.
 72. **Kang J. Hick L. A., Price W. E.** Using calibration approaches to compensate for remaining matrix effects in quantitative liquid chromatography/electrospray ionization multistage mass spectrometric analysis of phytoestrogens in aqueous environmental samples / *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2007. Vol. 21. P. 4065 – 4072.
 73. **Alder L., Lüderitz S., Lindtner K., Stan H.-J.** The ECHO technique — The more effective way of data evaluation in liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis / *J. Chromatogr. A.* 2004. Vol. 1058. P. 67 – 79.
 74. **Zrostlíková J., Hajšlová J., Poustka J., Begany P.** Alternative calibration approaches to compensate the effect of co-extracted matrix components in liquid chromatography-electrospray ionisation tandem mass spectrometry analysis of pesticide residues in plant materials / *J. Chromatogr. A.* 2002. Vol. 973. P. 13 – 26.
 75. **Sychov K. S.** Podgotovka probe v gazovoi i zhidkostnoi khromatografii [Sample preparation in gas and liquid chromatography]. — Moscow: KOKORO, 2012. — 160 p. [in Russian].
 76. **Polson C., Sarkar P., Incledon B., et al.** Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in LCMS/MS / *J. Chromatogr. B.* 2003. Vol. 785. P. 263 – 275.
 77. **Avery M. J.** Quantitative characterization of differential ion suppression on liquid chromatography/atmospheric pressure ionization mass spectrometric bioanalytical methods / *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2003. Vol. 17. P. 197 – 201.
 78. **Chang M.** Ispol'zovanie produktov Agilent Bond Elut Plexa dlya snizheniya ionnoi supressii i uluchsheniya chuvstvitel'nosti zhidkostnoi khromat-mass-spektrometrii (ZhKh-MS). Farmatsevticheskie sredstva i dzheneriki s maloi molekulyarnoi massoi. Metodicheskie rekomendatsii [Application of Agilent Bond Elut Plexa products for decreasing of ion suppression and sensitivity improvement in liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS). Pharmaceuticals and generics with low molecular mass]. URL: <http://www.agilent.com/cs/library/applications/5990-8388RU.pdf> (07.07.2016) [in Russian].
 79. **John M., Rödel M. (eds.).** Solid Phase Extraction Application Guide. Macherey-Nagel. URL: ftp://ftp.mn-net.com/english/Flyer_Catalogs/Chromatography/SPE/SPE_Applis.pdf (16.02.2106).
 80. **Guide to Solid Phase Extraction.** Supelco. Bulletin 910. URL: <http://www.sigmaaldrich.com/Graphics/Supelco/objects/4600/4538.pdf> (assessed 16.02.2106).
 81. **Beginner's Guide to SPE [Solid-Phase Extraction].** Waters. 2016. URL: https://waters.com/waters/en_US/Beginner_%27s-Guide-to-SPE-_5B5Solid-Phase-Extraction_%5D/nav.htm?cid=134721476 (assessed 16.02.2106).
 82. **Żwir-Ferenc A., Biziuk M.** Solid Phase Extraction Technique — Trends, Opportunities and Applications / *Polish J. Environ. Stud.* 2006. Vol. 15. N 5. P. 677 – 690.
 83. **Van Hout M. W. J., Hoffland C. M., Niederländer H. A. G., de Jong G. J.** On-line coupling for solid-phase extraction with mass spectrometry for the analysis of biological samples. II. Determination of clenbuterol in urine using multiple-stage mass spectrometry in an ion-trap mass spectrometer / *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2000. Vol. 14. P. 2103 – 2111.
 84. **Koeber R., Fleischer C., Lanza F., et al.** Evaluation of a multidimensional solid-phase extraction platform for highly selective on-line clean-up and high-throughput LC-MS analysis of triazines in river water samples using molecular imprinted polymers / *Anal. Chem.* 2001. Vol. 73. P. 2437 – 2444.
 85. **Tachon R., Pichon V., Barbe Le Borgne M., Minet J. J.** Comparison of solid-phase extraction sorbents for sample clean-up in the analysis of organic explosives / *J. Chromatogr. A.* 2008. Vol. 1185. P. 1 – 8.
 86. **Benijts T., Dams R., Lambert W., De Leenher A.** Countering matrix effects in environmental liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry water analysis for endocrine disrupting chemicals / *J. Chromatogr. A.* 2004. Vol. 1029. P. 153 – 159.
 87. **Lindsey M. E., Meyer M., Thurman E. M.** Analysis of trace levels of sulfonamide and tetracycline antimicrobials in groundwater and surface water using solid-phase extraction and liquid chromatography/mass spectrometry / *Anal. Chem.* 2001. Vol. 73. N 19. P. 4640 – 4646.
 88. **O'Connor S., Locke J., Aga D. S.** Addressing the challenges of tetracycline analysis in soil: Extraction, clean-up, and matrix effects in LC-MS / *J. Environ. Monit.* 2007. Vol. 9. P. 1254 – 1262.
 89. **Hogenboom A. C., Hofman D. A., Niessen W. M. A., Brinkman U. A. Th.** On-line dual-precursor-based trace enrichment for the determination of polar and acidic microcontaminants in river water by liquid chromatography with diode-array UV and tandem mass spectrometric detection / *J. Chromatogr. A.* 2000. Vol. 885. P. 377 – 388.
 90. **Niessen W. M. A., Manini P., Andreoli R.** Matrix effects in quantitative pesticide analysis using liquid chromatography-mass spectrometry / *Mass Spectrom. Rev.* 2006. Vol. 25. P. 881 – 899.
 91. **Van De Steene J. C., Mortier K. A., Lambert W. E.** Tackling matrix effects during development of a liquid chromatographic-electrospray ionisation tandem mass spectrometric analysis of nine basic pharmaceu-

- ticals in aqueous environmental samples / *J. Chromatogr. A*. 2006. Vol. 1123. P. 71 – 81.
92. **Blackwell P. A., Holten L., Holten Lützhof H.-C., et al.** Ultrasonic extraction of veterinary antibiotics from soils and pig slurry with SPE clean-up and LC-UV and fluorescence detection / *Talanta*. 2004. Vol. 64. P. 1058 – 1064.
93. **Kruve A., Künnapas A., Herodes K., Leito I.** Matrix effects in pesticide multi-residue analysis by liquid chromatography-mass spectrometry / *J. Chromatogr. A*. 2008. Vol. 1187. P. 58 – 66.
94. **Chambers E., Wagrowsky-Diehl D. M., Lu Z., Mazzeo J. R.** Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses / *J. Chromatogr. B*. 2007. Vol. 852. P. 22 – 34.
95. **Hopfgartner G., Bourgoigne E.** Quantitative high-throughput analysis of drugs in biological matrices by mass spectrometry / *Mass Spectrom. Rev.* 2003. Vol. 22. P. 195 – 214.
96. **Stoob K., Singer H. P., Goetz C. W., et al.** Fully automated online solid phase extraction coupled directly to liquid chromatography-tandem mass spectrometry: Quantification of sulfonamide antibiotics, neutral and acidic pesticides at low concentrations in surface waters / *J. Chromatogr. A*. 2005. Vol. 1097. P. 138 – 147.
97. **Kuster M., López de Alda M., Barceló D.** Liquid chromatography-tandem mass spectrometric analysis and regulatory issues of polar pesticides in natural and treated waters / *J. Chromatogr. A*. 2009. Vol. 1216. P. 520 – 529.
98. **Dai C. M., Geissen S. U., Zhang Y. L., et al.** Selective Removal of Diclofenac from Contaminated Water Using Molecularly Imprinted Polymer Microspheres / *Environ. Pollut.* 2011. Vol. 159. N 6. P. 1660 – 1666.
99. **Meng Z., Chen W., Mulchandani A.** Removal of estrogenic pollutants from contaminated water using molecularly imprinted polymers / *Environ. Sci. Technol.* 2005. Vol. 39. N 22. P. 8958 – 8962.
100. **Byun H. S., Youn Y. N., Yun Y. H., Yoon S. D.** Selective separation of aspirin using molecularly imprinted polymers / *Sep. Purif. Technol.* 2010. Vol. 74. P. 144 – 153.
101. **Gendrikson O. D., Zherdiaev A. V., Dzantiev B. B.** Молекулярно импринтированные полимеры и их применение в биохимическом анализе [Molecular imprinted polymers and their application in biochemical analysis] / *Usp. Biol. Khimii*. 2006. Vol. 46. P. 149 – 192 [in Russian].
102. **Pichon V.** Selective sample treatment using molecularly imprinted polymers / *J. Chromatogr. A*. 2007. Vol. 1152. P. 41 – 53.
103. **Zorita S., Boydb B., Jönssonb S., et al.** Selective determination of acidic pharmaceuticals in wastewater using molecularly imprinted solid-phase extraction / *Anal. Chim. Acta*. 2008. Vol. 626. P. 147 – 154.
104. **Sun Z., Schüssler W., Sengl M., et al.** Selective trace analysis of diclofenac in surface and wastewater samples using solid phase extraction with a new molecularly imprinted polymer / *Anal. Chim. Acta*. 2008. Vol. 620. P. 73 – 81.
105. **Mohamed R., Richoz-Payot J., Gremaud E., et al.** Advantages of molecularly imprinted polymers LC-ESI-MS/MS for the selective extraction and quantification of chloramphenicol in milk-based matrices. Comparison with a classical sample preparation / *Anal. Chem.* 2007. Vol. 79. N 24. P. 9557 – 9565.
106. **Barker S. A.** Matrix solid phase dispersion (MSPD) / *J. Biochem. Biophys. Methods*. 2007. Vol. 70. P. 151 – 162.
107. **Kristenson E. M., Ramos L., Brinkman U. A. Th.** Recent advances in matrix solid-phase dispersion / *Trends Anal. Chem.* 2006. Vol. 25. N 2. P. 96 – 111.
108. **Bogialli S., Curini R., Di Corcia A., et al.** Simple and rapid assay for analyzing residues of carbamate insecticides in bovine milk: Hot water extraction followed by liquid chromatography-mass spectrometry / *J. Chromatogr. A*. 2004. Vol. 1054. P. 351 – 357.
109. **Taylor P. J.** Matrix effects: the Achilles heel of quantitative high-performance liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry / *Clin. Biochem.* 2005. Vol. 38. N 4. P. 328 – 334.
110. **Law B., Temesi D.** Factors to consider in the development of generic bioanalytical high-performance liquid chromatographic-mass spectrometric methods to support drug discovery / *J. Chromatogr. B*. 2000. Vol. 748. P. 21 – 30.
111. **Choi B. K., Hercules D. M., Gusev A. I.** Effect of liquid chromatography separation of complex matrices on liquid chromatography-tandem mass spectrometry signal suppression / *J. Chromatogr. A*. 2001. Vol. 907. P. 337 – 342.
112. **Giorgianni F., Cappiello A., Beranova-Giorgianni S., et al.** LC-MS/MS analysis of peptides with methanol as organic modifier: improved limits of detection / *Anal. Chem.* 2004. Vol. 76. N 23. P. 7028 – 7038.
113. **Quintana J. B., Reemtsma T.** Sensitive determination of acidic drugs and triclosan in surface and wastewater by ion-pair reverse-phase liquid chromatography/tandem mass spectrometry / *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2004. Vol. 18. P. 765 – 774.
114. **Dolan J.** A Guide to HPLC and LC-MC Buffers Selection. ACE. URL: http://www.hplc.eu/Downloads/ACE_Guide_BufferSelection.pdf (16.02.2016).
115. **Cappiello A., Famigliani G., Rossi L., Magnani M.** Buffers in LC-MS / *Anal. Chem.* 1997. Vol. 69. P. 5136 – 5141.
116. **Mannur V. S., Patel D., Mastiholimat V. S., Shah G.** Selection of buffers in LC-MS: an overview / *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res.* 2011. Vol. 6. N 1. P. 34 – 37. URL: <http://globalresearchonline.net/journal-contents/volume6issue1/Article-008.pdf> (16.02.2016).
117. **Ji H. Y., Park E., Lee K., Lee H.** Quantification of doxazosin in human plasma using hydrophilic interaction liquid chromatography with tandem mass spectrometry / *J. Sep. Sci.* 2008. Vol. 31. P. 1628 – 1633.
118. **Schmidt A., Karas M., Dülcks T.** Effect of different solution flow rates on analyte ion signals in nano-ESI MS or: When does ESI turn into nano-ESI / *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* 2003. Vol. 14. P. 492 – 500.
119. **Gangl E. T., Annan M., Spooner N., Vouras P.** Reduction of signal suppression effects in ESI-MS using a nanosplitting device / *Anal. Chem.* 2001. Vol. 73. N 23. P. 5635 – 5644.
120. **Dijkman E., Mooibroek D., Hoogerbrugge R., et al.** Study of matrix effects on the direct trace analysis of acidic pesticides in water using various liquid chromatographic modes coupled to tandem mass spectrometric detection / *J. Chromatogr. A*. 2001. Vol. 926. P. 113 – 125.
121. **Hernández F., Sancho J. V., Pozo Ó. J.** An estimation of the exposure to organophosphorus pesticides through the simultaneous determination of their main metabolites in urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry / *J. Chromatogr. B*. 2004. Vol. 808. P. 229 – 239.
122. **Rogatsky E., Balent B., Goswami G., et al.** Sensitive quantitative analysis of C-peptide in human plasma by 2-dimensional liquid chromatography-mass spectrometry isotope-dilution assay / *Clin. Chem.* 2006. Vol. 52. P. 872 – 879.
123. **Pascoe R., Foley J. P., Gusev A. I.** Reduction in matrix-related signal suppression effects in electrospray ionization mass spectrometry using on-line two-dimensional liquid chromatography / *Anal. Chem.* 2001. Vol. 73. N 24. P. 6014 – 6023.
124. **Deng Y., Zhang H., Wu J. T., Olah T. V.** Tandem mass spectrometry with online high-flow reversed-phase extraction and normal-phase chromatography on silica columns with aqueous-organic mobile phase for quantitation of polar compounds in biological fluids / *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2005. Vol. 19. P. 2929 – 2934.