

DART-Orbitrap 질량분석방법 중 내부표준법에 의한 수질의 atrazine, simazine의 정량 분석

최원석 · 최재원[†]

K water 수질분석연구센터

Quantitation by DART-Orbitrap Mass Spectrometer: Application of Atrazine and Simazine in Water by Internal Standards

Wonseok Choi and Jaewon Choi[†]

Water Analysis & Research Center, K water, Shintanjin-ro 560, Daedeok-gu, Daejeon 306-711, Korea

Received August 29, 2013/Revised September 11, 2013/Accepted September 17, 2013

Ambient sample ionization by direct analysis in real time (DART), with high resolution and accurate mass spectrometry (HR/AM), was applied to quantitation of atrazine and simazine in water. This system needs 0.5 min for sample run in mass spectrometer without sample preparation. As an internal standard, compounds which having similar physico-chemical properties such as deuterium isotope atrazine-d5 and simazine-d10 were compared. Optimal sample loading conditions such as loading volume and drying time were validated. For example, three to five μL loading volume on the disposable mesh card, and 20 min of sample drying conditions showed high sensitivities. In 1 to 50 $\mu\text{g/L}$ calibration ranges, Available calibration linearity coefficients were obtained for 0.9835~0.9997. QA/QC samples using 1, 2.5 and 5 $\mu\text{g/L}$ showed comparable averaged recovery rates between 94~123%. In the 1 $\mu\text{g/L}$ and 2.5 $\mu\text{g/L}$ samples, practical quantitation limits (PQL) were 1.2~2.7 $\mu\text{g/L}$. During experiments, bench top Orbitrap mass spectrometry showed under 3 ppm mass accuracy at the external calibration. Results of this study indicated that physico-chemical property such as vapour pressure is important factor in quantitative method of choice for ambient ionization.

Key words: DART, Orbitrap mass spectrometry, pesticide, water, quantitation

1. 서 론

농약, 유류, 유기용제 등에 의한 수질, 토양 오염사고는 여러 현장에서 가장 빈번하게 일어나고 있으며 성분 분석을 위해 사고 시료는 실험실로 운반되거나 최근 상용화된 휴대용 가스크로마토그래프-질량분석장치 (GC-MS)를 사용하더라도 시료의 전처리 과정이 필수적으로 요구된다. 이 과정에서 유기화합물은 추출과 농축 등 전처리 과정 중에서 대상기의 선택에 따라 미지의 목적 물질을 소실할 가능성이 있다. 예를 들어, 액-액 추출(liquid-liquid extraction, LLE)의 경우, 극성물질들의 소실 가능성과 고상추출(solid-phase extraction, SPE)의 경우, 대

상물질과 흡착제 사이에 물리화학적 선택성의 한계로 인해 원인물질의 흡착, 농축과정에서 일상적인 정량분석과 달리 미지의 목적화합물을 효과적으로 농축, 정제한다는 보장이 어려운 점이다.¹⁾ 한편 기존의 질량분석은 사중극자(quadrupole)방식의 full scan에 의한 스펙트럼 성분확인 시 질량 정확도(mass accuracy)의 한계와 함께 전처리하지 않은 시료를 주입하게 되면 매트릭스의 영향을 받게 되어 검출성분에 대한 신뢰도 및 감도 한계 등의 문제가 존재하며 이를 극복하기 위해 높은 분해능이 요구된다.²⁾

시료 전처리를 하지 않거나 원심분리, 여과 등 최소한의 전처리를 거친 후 LC 및 GC 컬럼을 거치지 않고 시

[†]To whom correspondence should be addressed.

료를 직접 이온화하여 질량분석기로 도입하는 직접 대기압 이온화 방법(direct sample atmospheric ionization)이 최근에 다양하게 소개되고 있으며 이는 대기 이온화(ambient ionization) 또는 대기압 탈착(desorption atmospheric ionization)이라고 명명하는 이온화 방법을 근간에 두고 있다.³⁻⁸⁾ 이 중 2005년에 발표된 실시간 이온화 방법(direct analysis in real time, DART)은 대표적인 대기압 탈착 방식으로서 전자분무 이온화 방식(electro spray ionization, ESI)에서 생성하는 수소 의 나트륨, 암모니아 이온 등 다양한 부가체(adduct) 형태를 가지는 것에 비해 단순화되어 수소 이온 중심의 부가체(adduct) 형태를 띠는 페닝(Penning) 이온화 현상이 일어난다.⁹⁾ DART소스는 시료를 직접 이온화하므로 GC 및 LC 등과 같은 전단 분리기술을 사용하지 않으므로 분석기기, 컬럼, 이동상 등을 생략하며 분석 생산성 측면에서 고속대량스크리닝(High Throughput Screening, HTP)에 적합하여 최근 식품,^{10,11)} 제약,¹²⁾ 생체 및 과학수사^{13,14)} 등 다양한 분야에서 사용되고 있다. 최근 국내에서는 고분해능 정밀질량분석방법(high resolution & accurate mass spectrometry, HR/AM)과 결합된 DART 방법이 농약류, 나노물질 등 정성 분석 목적으로 제한적인 시도 사례^{15,16)}가 있고 대부분의 응용 사례는 정량(quantitation)보다는 정성(identification) 방법으로서 검토되고 있다.¹⁷⁻²⁰⁾

DART-질량분석법은 시료의 직접 이온화라는 특성 때문에 외부표준법에 의한 정량은 직선성을 기대하기 어

려우며, 적절한 내부표준물질을 이용한 정량성을 검토할 필요가 있다. 최근 직접 대기압 이온화 방법 중에 paper spray 방법을 이용하여 혈액 중의 의약품질에 대한 내부표준법 적용성 등 정량을 위한 시도가 보고되고 있다.^{21,22)} 본 연구는 물환경에서 화학물질에 의한 사고 시 수질 시료에 대한 고속 스크리닝 및 정량성을 검토할 목적으로 농약인 아트라진 및 시마진을 대상 물질로 선정하여 내부표준방법을 적용한 DART-Orbitrap 고분해능 질량분석방법의 정량성에 대해 검토하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 시약 및 기구

분석대상인 농약류는 Dr. Erhenstorfer (Augsburg, Germany)에서 구매하였으며, 메탄올에 용해된 10~50 µg/mL 범위의 단품을 이용하였으며, atrazine과 simazine을 선정하였다. 또한 내부표준방법 검토를 위해 atrazine-d5, simazine-d10 2종의 중수소치환 표준물질을 선정하였다. 대상물질에 대한 화학구조와 분자량 등의 물리화학적 정보를 Table 1에 요약하였다. 표준물질은 최종 매트릭스를 증류수로 희석하여 1~50 µg/L 범위에서 미세마이크로 피펫으로 3~5 µL 분취하여 시료의 이온화 조건 검토에 사용하였다.

2.2. DART 이온 소스

대기압 탈착 이온 소스는 실시간 이온화를 적용한

Table 1. Chemical structure, formula, molecular weight and vapor pressure of target pesticides and internal standard

Compound	CAS number	Chemical structure	Formula	Molecular weight	Vapor pressure (mmHg)
Atrazine	1912-24-9		C ₈ H ₁₄ ClN ₅	215.68	2.78×10 ⁻⁷
Simazine	122-34-9		C ₇ H ₁₂ ClN ₅	201.66	6.1×10 ⁻⁹
Atrazine-d5	163165-75-1		C ₈ H ₉ D ₅ ClN ₅	220.71	-
Simazine-d10	220621-39-6		C ₇ H ₁₂ ClD ₁₀ N ₅	211.72	-

DART 방식의 SVP 모델(Ion Sense™, MA, USA)을 사용하였다. 본 장비의 적용 온도 범위는 50~500°C이며 대상농약류들의 물리화학적 특성을 고려하여 300°C 조건에서 이온화하였다. 2.1에서 준비한 표준물질은 DART 전용의 금속 메쉬에 도포하여 이온화 하였으며, 질량분석기와 연계된 시료의 이온화 시간은 사전 검토를 통해 30초를 적용하였다.

2.3. 기기분석

DART 이온 소스와 연계할 고분해능 질량분석기는 Orbitrap MS 중에서 Exactive (Thermo-Fisher, Bremen, Germany) 모델을 사용하였다. 본 장비의 최대 분해능은 100,000이며, 본 실험은 50,000을 적용하였고, 시료에 대한 측정 질량의 정성 기준인 질량 정확도(mass accuracy)는 5 ppm 조건에서 시험하였다. DART-Orbitrap MS의 운영 세부 조건을 Table 2에 제시하였다.

2.4. 데이터 해석

측정 데이터는 Xcalibur 2.1 및 TOXID 1.0 (Thermo-Fisher, CA, USA)을 이용하여 정성하였으며 정량은 마이크로소프트사의 MS Excel 2010에서 내부표준방식의 계산식을 사용하였고, 그래프는 Prism 5 (GraphPad,

La Jolla, CA) 등을 이용하여 작성하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 내부표준물질의 이온 스펙트럼

대상 농약들의 정성은 기존 사례¹⁵를 참고하여 스펙트럼을 확인하였으며, 내부표준물질인 atrazine-d5, simazine-d10을 DART-Orbitrap MS에서 이온화 특성을 검토하였다. 준비한 각 내부표준물질 50 µg/L를 마이크로피펫으로 5 µL 취하여 메탈 메쉬에 도포하고 Orbitrap MS의 스캔 범위를 100~600 amu로 설정하였다 (Table 2). 대상내부표준물질들의 이온 스펙트럼을 Fig. 1에 나타내었다. 분해능 50,000 조건의 full scan 스펙트럼 중 atrazine-d5의 수소치환 분자량인 221 amu 주변부 스펙트럼을 확대하고 Xcalibur 2.1의 원자조성(elemental composition) 시뮬레이션을 이용하여 비교한 결과, 염소 동위원소인 35와 37의 자연존재비율인 3:1로 질량 스펙트럼이 관찰되었다. Simazine-d10의 수소치환 분자량인 212 amu와 361 amu에서도 각각 염소 동위원소의 자연 존재비율을 확인되었으며 모두 2 ppm 이내의 정확도를 나타내어 정성단계에서 성분확인용으로 사용할 수 있었다.

3.2. 시료 성상에 따른 이온화 효율

다음으로 이온화 효율에 미치는 시료의 형태에 대한 최적화 테스트를 검토하였다. DART를 이용한 이온화 방법은 현재까지 타블릿 형태의 의약품, 식품, 국방과학 분야 등 주로 고체상 시료를 적절히 시료 채취 후 직접 이온화 방법으로 분석이 이뤄지고 있지만, 액상의 시료를 직접 이온화로 적용한 사례가 거의 없다. 이전에 저자들은 물시료의 정성(identification) 분석 사례²²에서 액상시료를 직접 이온화하여 대상 화합물인 acetochlor를 1 µg/L 수준에서 동위원소까지 검출 가능성을 보고하였다. 여기서는 수질의 미량 정량분석을 고려한 감도 테스트를 위해 5 µg/L의 농도로 조제한 시료들을 금속 mesh가 결합된 전용 auto sampler인 transmission

Table 2. Operating condition of DART-Orbitrap mass spectrometer

Instrument	Orbitrap Exactive (Thermo)
Scan range	100~600 amu
Resolution	50,000
Polarity	positive
Run time	1 min
Ionization source	DART-SVP model (Ion Sense)
Spray voltage	1.5 Kv
Capillary temperature	250°C
Capillary voltage	25 V
Tube lens voltage	170 V
Skimmer voltage	36 V
Ionization time	30 sec

Table 3. Linearity of the pesticides for each internal standard (Y=ax+b, R²)

	Atrazine-d5						Simazine-d10					
	D.W			Raw water			D.W			Raw water		
	a	b	R ²	a	b	R ²	a	b	R ²	a	b	R ²
Atrazine	0.0129	-0.0025	0.9997	0.0221	-0.0313	0.9956	0.0288	-0.0024	0.9981	0.0467	-0.0814	0.9962
Simazine	0.0151	-0.0041	0.9995	0.0185	0.0135	0.9951	0.0337	-0.0059	0.9985	0.06	-0.1317	0.9835

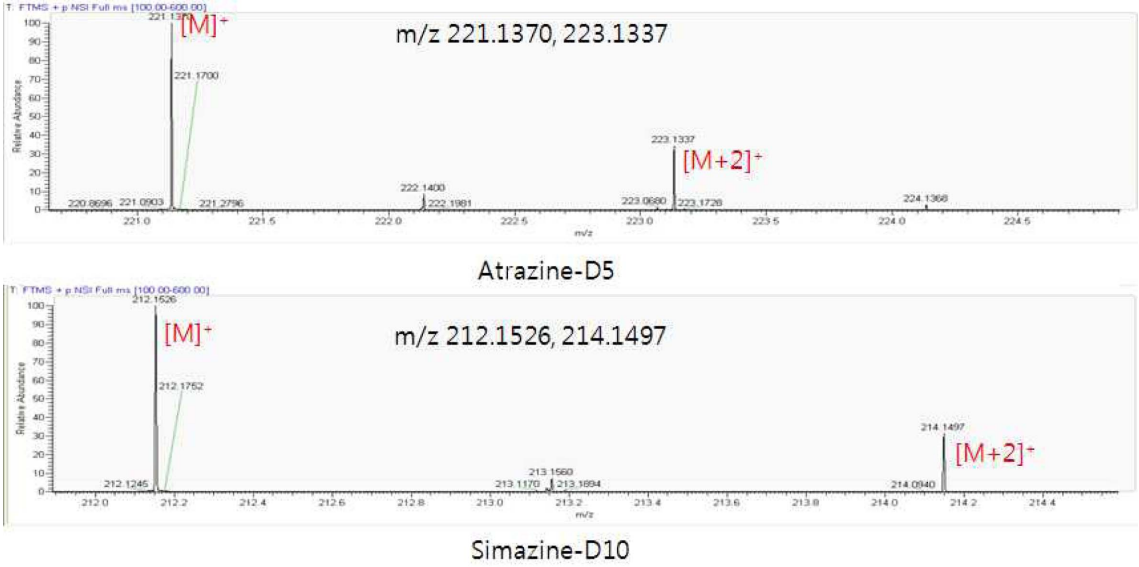


Fig. 1. High resolution mass spectrum and their isotopes of internal standards.

module에 5 μ L를 도포하여 10회 반복 측정이 되도록 준비하고 비건조 시료는 도포 직후 이온화하였고, 건조 시료는 실내에서 20분 건조한 것을 측정에 사용하였다. 이때 10회 반복 측정은 1분 이내에 종료하도록 시간을 설정하여 batch 내에서 시료가 변화할 수 있는 시간을

최소화 하였다. 두 조건에 대한 반복 측정의 총 크로마토그램을 Fig. 2에 비교하였다. 크로마토그램에서 보듯, 건조하지 않은 액상 시료의 이온화는 전반적으로 감도가 낮으며 시료마다의 피크 세기 차이가 크며 후반부에서 transmission module의 열전도에 의한 건조 결과로

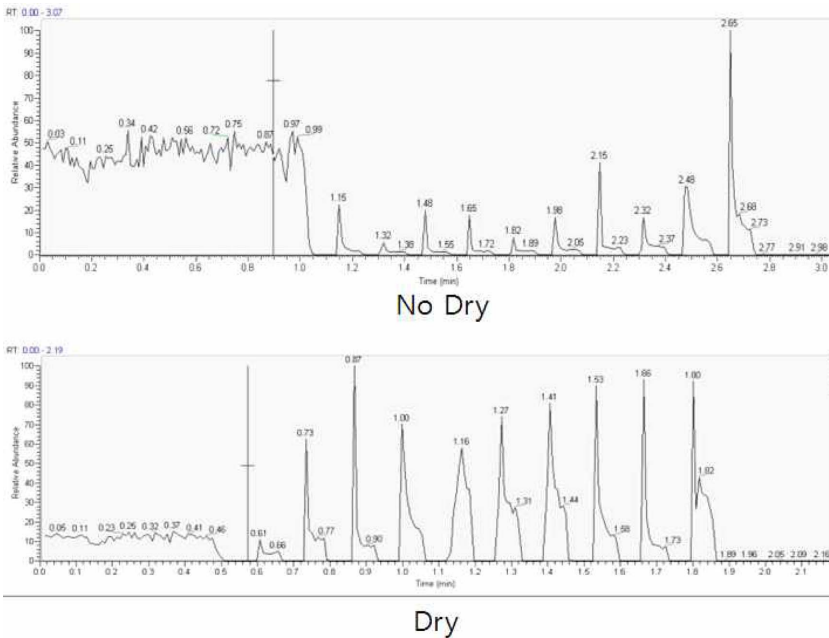


Fig. 2. Repeated total ion chromatogram(TIC) between wet and dried sample; sample run was done by the transmission module for DART.

판단되는 가장 큰 세기가 관찰되었다. 이에 비해 20분 간 건조한 시료는 피크 세기가 화합물에 따라 3~10배 정도 크고 안정한 경향을 보여주었다. DART와 같은 대기압 탈착 이온화 방식은 원리상으로 화합물이 기체상태(gas phase)를 유지할 때 가장 감도가 좋으며, 300°C에서 5 µL의 시료 적용은 충분한 기화 조건으로 예상하였으나 실제 이온화 단계에서 충분한 탈기(desolvation)이 일어나지 못하는 것으로 판단되었다. 이 후 40분간 건조한 시료도 추가 검토하였으나 과도한 건조 시간은 오히려 건조 중 기화 손실이 발생하는 것으로 나타났다. 따라서 이후의 시료측정은 20분 건조 후 진행하였다.

3.3. 검정곡선의 직선성

DART이온화 소스에 대한 정량성 평가는 3종의 대상 물질에 대해 증류수와 원수 matrix에 대해 검토하였고, 각각 1, 2.5, 5, 10, 20, 50 µg/L로 6단계의 농도를 준비하고 내부표준물질인 atrazine-d5와 simazine-d10은 각 시료에 50 µg/L이 되도록 첨가하였다. 전용 자동주입기(auto sampler)인 transmission module에서 시료가 이온화되어 표현되는 농도별 총이온 크로마토그램을 Fig. 3에 도시하였다. DART-Orbitrap 질량분석 조건에서 6개 농도로 측정된 검정곡선은 안정화 시간을 포함하여 3분 이내에 종료되었으며 측정 성분에 대한 질량 정확도(mass accuracy)는 3 ppm 이내를 유지하였다.

분석결과, 증류수에 첨가한 시료는 표준물질의 농도에 비례하여 크로마토그램의 세기가 증가하였으며, 원수의

경우 matrix 영향으로 인하여 농도 증가에 따른 피크 크기의 증가가 뚜렷하지 않았다. 증류수와 원수에 첨가하여 측정된 데이터 파일에서 각 대상 성분의 질량 스펙트럼과 면적값을 엑셀로 전환하고 첨가한 내부표준물질의 농도를 이용하여 내부표준방법에 의한 검정곡선의 직선성을 검토하였다(Fig. 4a, b). 증류수에 첨가한 검정곡선 직선성은 Fig. 4a에서 보듯 atrazine-d5가 0.9995~0.9997로서 simazine-d10보다 다소 우수한 것으로 나타났다. 또한 원수에 첨가한 경우, 전반적으로 증류수에 비하여 직선성은 저하되는 경향을 나타내었고, matrix 존재 하에서도 atrazine-d5는 0.995 이상의 안정된 직선성을 유지한 반면, simazine-d10은 0.98까지 저하되는 사례도 나타났다(Fig. 4b). 그러나 유기물 matrix가 포함된 조건에서 시료를 직접 이온화하는 경우에도 고분해능 질량분석방법과 결합되어 방해성분과 대상 스펙트럼의 질량 분리가 이뤄지거나, 여기에 적정 내부표준물질의 사용은 검출성분에 대한 정량이 가능함을 나타내었다.

3.4. 정량한계, 회수율

위 검토결과를 이용하여 검출, 정량한계 및 회수율을 산출하고 DART-Orbitrap 질량분석방법의 적용성을 평가하였다. 3.3에서 검토한 결과를 참고하여 대상성분은 1, 2.5, 5 µg/L 및 3.3과 동일 수준의 내부표준물질로 구성된 첨가시료를 준비하였다. 각 시료는 transmission module에 5 µL씩 10개의 도포 및 20분 건조 후에 10 회 반복 측정하고 평균, 표준편차 등을 이용하여 방법검

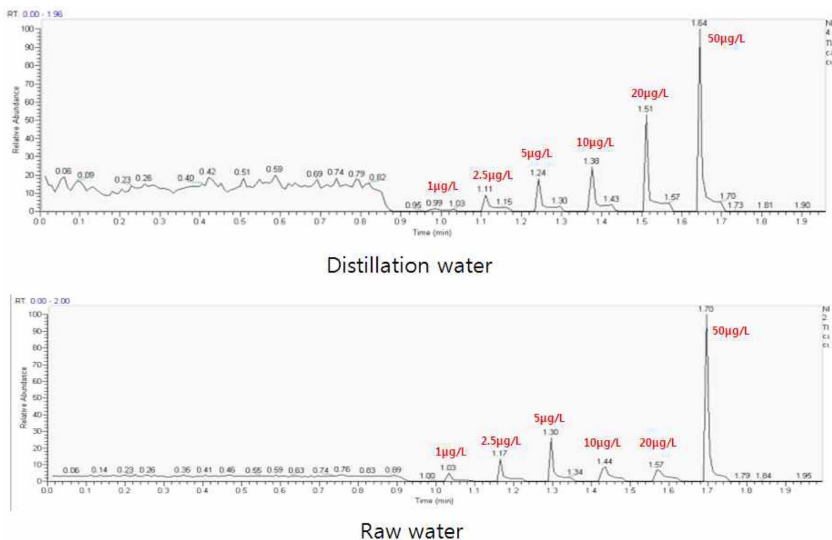


Fig. 3. TIC of calibration curves for 1~50 µg/L between deionized water and raw water.

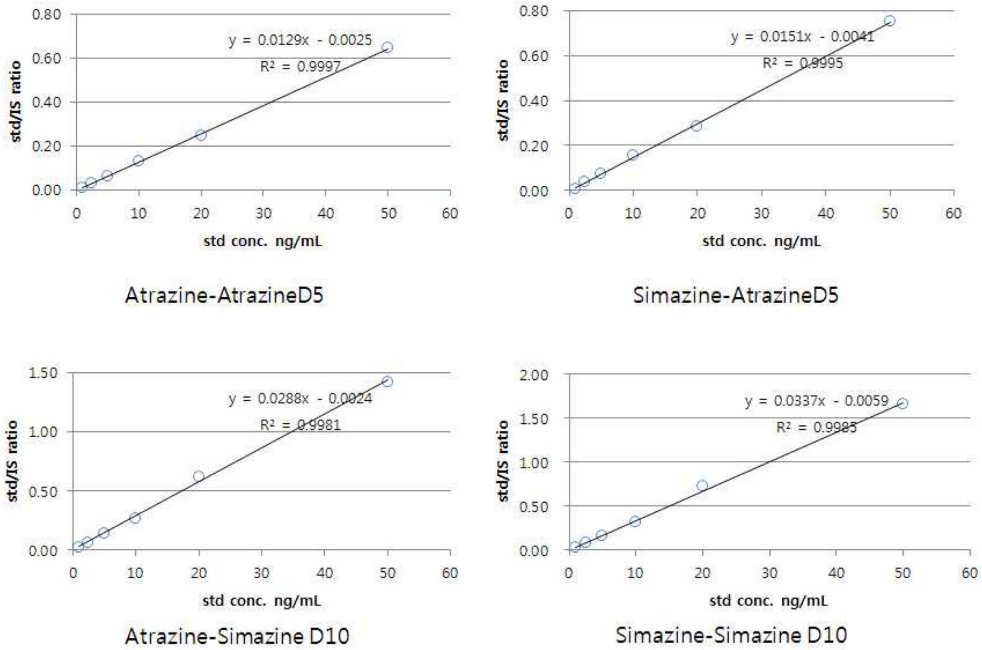


Fig. 4a. Calibration curves for deionized water matrix.

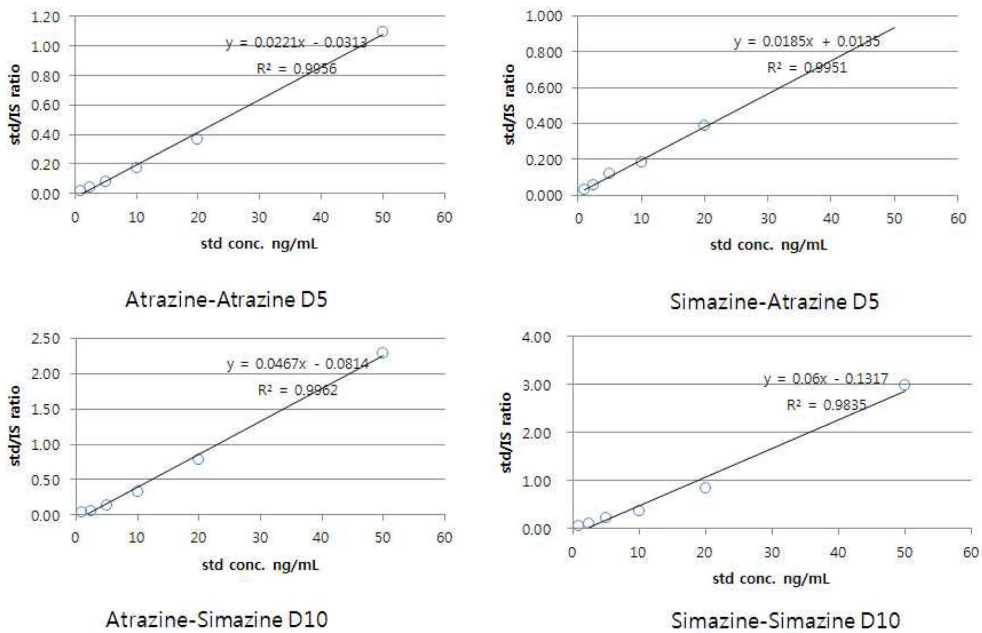


Fig. 4b. Calibration curves for raw water matrix.

출한계와 정량한계를 산출하였으며 정량 한계값과 상대 표준편차 범위를 Fig. 5에 나타내었다. 2종의 내부표준 물질 선택에 따라 1 µg/L 및 2.5 µg/L 첨가 조건에서 atrazine의 정량 한계값은 1.2~2.7 µg/L로서 유사한 값이

제시된 반면, 5 µg/L 조건에서는 atrazine-d5에 대한 simazine 정량 한계값과 simazine-d10에 대한 atrazine의 정량 한계값이 유의하게 증가하는 경향을 나타내었다. Simazine의 정량한계값도 1~2.5 µg/L의 저농도 구

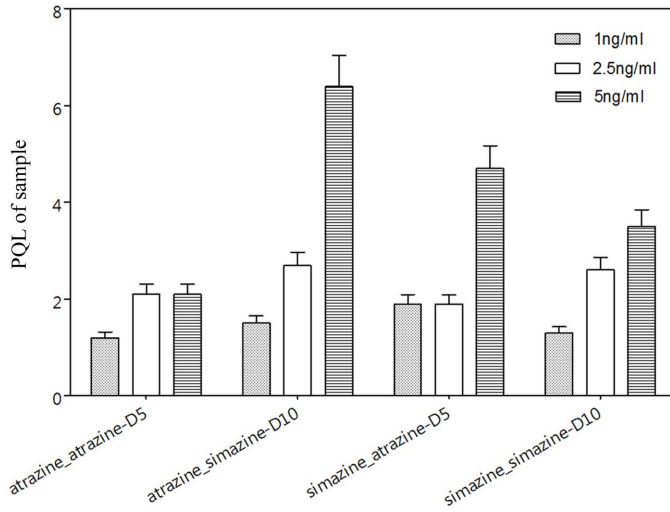


Fig. 5. Practical quantitation limits(PQLs) for different spiked samples.

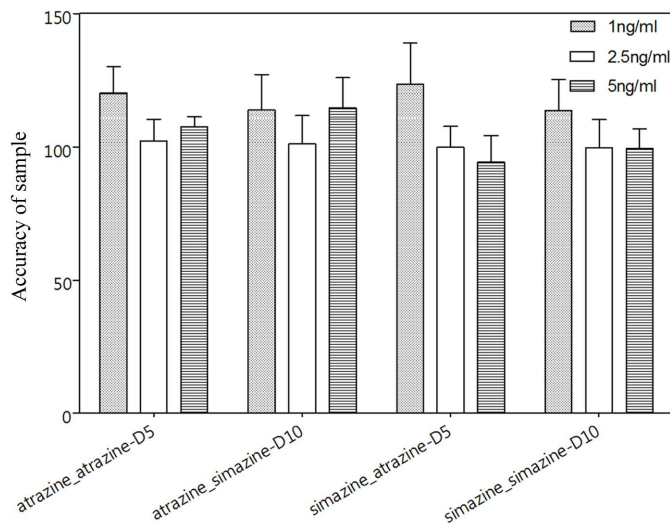


Fig. 6. Accuracy between internal standards for different spiked samples.

간에서는 atrazine-d5로 산출된 평균 1.9 µg/L로서 simazine-d10에 비해 변화가 적은 것으로 나타났다. 3.3에서 제시된 검정곡선의 직선성 및 본 장에서 검토한 정량 한계로 판단할 때 매트릭스를 포함한 저농도 조건에서 atrazine-d5의 적용이 상대적으로 우수한 정량 결과가 도출될 것으로 판단되었다.

회수율을 각 농도 조건별로 계산한 결과를 Fig. 6에 상대표준편차 범위와 함께 나타내었다. 3가지 농도의 첨가 시료에 대해 2종의 내부표준물질로 정량한 각 시료들의 평균 회수율은 94~123% 수준으로 관찰되었고, 이

결과는 이전에 발표되었던 정량성 검토 사례^{21,22}와 유사한 수준으로 양호한 결과가 얻어졌다. 회수율은 1 µg/L 첨가 시료보다 2.5 및 5 µg/L에서 상대적으로 안정된 회수율을 보였으며 검정곡선의 직선성 및 정량한계 결과와 달리 simazine-d10을 이용한 회수율이 상대적으로 우수한 결과를 나타내었다. 정량한계값과 회수율의 범위를 Table 4에 나타내었다. 따라서 DART와 같은 대기압 직접 이온화 방법을 적용한 시료의 정량은 사전에 충분한 검토를 필요로 하며, 특히 대상물질과 유사한 물리화학적 성질을 가진 내부표준물질을 조건별로

Table 4. Practical quantification limit (ng/mL) and recovery for each spiking samples

	PQL			Recovery		
	1 ng/mL	2.5 ng/mL	5ng/mL	1ng/mL	2.5ng/mL	5ng/mL
Atrazine-Atrazine d5	1.2	2.1	2.1	120.2	102.2	107.5
Atrazine-Simazine d10	1.5	2.7	6.4	113.9	101.2	114.8
Simazine-Atrazine d5	1.9	1.9	4.7	123.4	99.9	94.3
Simazine-Simazine d10	1.3	2.6	3.5	113.8	99.8	99.6

비교하여 정량분석법으로 확립하는 것이 중요한 것으로 판단되었다.

4. 결 론

본 연구는 대기압 탈착 이온화 소스인 DART와 Orbitrap 고분해능 질량분석법과 연계하여 시료의 전처리 없이 5 µL의 시료를 이온화하여 수질의 atrazine, simazine 등에 대한 신속한 분석 및 정량성을 검토한 결과, 다음과 같은 결론은 얻었다.

1. DART 이온소스의 수질 시료 적용은 소량의 시료를 즉시 이온화하는 조건보다 20분간 건조한 조건에서 스펙트럼의 감도 개선이 관찰되어 시료 손실을 최소화한 건조시료의 도입이 미량분석에 중요한 요소로 판단되었다.

2. 중수소치환 내부표준물질을 이용한 증류수 및 원수에 첨가한 1~50 µg/L의 검정곡선 검토 결과, 원수 조건의 일부 화합물을 제외하고 atrazine, simazine에 대해 0.995 이상의 직선성이 얻어졌으며, 1~2.5 µg/L 첨가 시료에서 atrazine 및 simazine의 정량한계는 1.2~2.7 µg/L 범위로서 물리화학적 성질이 유사한 내부표준물질의 적용을 통해 미량 농도에 대한 정량성이 제시되었다.

3. 본 방법은 수질시료에 대해 전처리 및 농축 과정을 생략하고 LC 및 GC 등의 분리 수단을 거치지 않으면서도 매우 적은 시료량을 사용할 수 있는 직접 이온화 소스인 DART를 고분해능 질량분석법에 접목한 분석방법으로서 분석시간이 매우 빠른 장점을 지니면서 대상성분과 유사한 성질의 내부표준물질을 적용시에 낮은 µg/L 수준의 정량한계를 나타내어, 수질사고 또는 액상시료에 대한 정량적인 신속 스크리닝 방법론을 제시하였다.

참고문헌

- J. H. Jang, Y. S. Kim and J. W. Choi, *Journal of the Korean Society on Water Environmental*, **2012**, 28, 6, 843-850.
- J. W. Choi, *Journal of the Korean Society for Environmental Analysis*, **2012**, 15, 4, 282-291.
- J. P. Williams, V. J. Patel, R. Holland and J. H. Scrivens, *Rapid Commun. Mass Spectrom* **2006**, 20, 1447-1456.
- I. Cotte-Rodriguez, H. Hernandez-Soto, H. Chen and R. G. Cooks, *Anal. Chem* **2008**, 80, 1512-1519.
- T. J. Kauppila, V. Arvola, M. Haapala, J. Pol, L. Aalberg, V. Saarela, S. Franssila, T. Kotiaho and R. Kostiaainen, *Rapid Commun. Mass Spectrom* **2008**, 22, 979-985.
- J. Dalhleish, M. Wlekinski, J. Shelley, C. Mulligan, Z. Ouyang and R. G. Cooks, *60th ASMS*, **2012**, MP 681, Vancouver, Canada.
- P. Dwivedi, J. Keelor, P. Holmes and F. Fernandez, *60th ASMS*, **2012**, MP 684, Vancouver, Canada.
- M. Wells, M. Goodwin, M. Stump, M. Fico, M. Gildersleeve and B. Solomin, *60th ASMS*, **2012**, TP 649, Vancouver, Canada.
- L. Song, C. G. Stephen, D. Bhandari, D. C. Kelsey and J. E. Bartmess, *Anal. Chem* **2009**, 81, 10080-10088.
- K. Fräsera, G. A. Lane, D. E. Otter, S. J. Harrison, S. Y. Quek, Y. Hemar and S. Rasmussen, *Food Chemistry*, **2013**, 141, 3, 1, 2060-2065.
- R. L. Self and W. H. Wu, *Food Control*, **2012**, 25, 1, 13-16.
- Z. Zhou, J. Zhang, W. Zhang, Y. Bai and H. Liua, *Analyst*, **2011**, 136, 2613-2618.
- E. S. Chernetsova and G. E. Morlocka, *International Journal of Mass Spectrometry*, **2012**, Volume 314, 15, 22-32.
- K. Clemons, J. Dake, E. Sisco and G. F. Verbeck, *Forensic Science International*, **2013**, volume23, 98-101.
- W. S. Choi, J. H. Jang, Y. D. Kim and J. W. Choi, *Journal of the Korean Society for Environmental Analysis*, **2012**, 15, 4, 292-300.
- W. S. Choi and J. W. Choi, *Journal of the Korean Society for Environmental Analysis*, **2013**, 16, 1, 62-70.
- Á. Kuki, L. Nagy, M. Zsuga and S. Kéki, *International Journal of Mass Spectrometry*, **2011**, 303, 1, 225-228.
- M. D. Likar, G. Cheng, N. Mahajan and Z. Zhang, *Jour-*

- nal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **2011**, 55, 3, 569–573.
19. C. S. DeRoo and R. A. Armitage, *Anal. Chem.*, 2011, 83, 18, 6924–6928.
 20. H. J. Kim, W. S. Baek and Y. P. Jang, *Food Chemistry*, **2011**, 129, 3, 1305–1310.
 21. N. E. Manicke, P. A. Rabie, N. Spooner, Z. Ouyang and R. G. Cooks, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, **2011**, 1501–1507.
 22. C. Wang, H. Zhu, Z. Cai, F. Song, Z. Liu and S. Liu, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2013**, 405, 10, 3159–3164.