

人全血中芬太尼及其类似物的定量分析

使用 SCIEX QTRAP® 4500 LC-MS/MS 系统

Casey Burrows¹、Alex J. Krotulski²、Diana Tran¹、Xiang He¹、Oscar G. Cabrices³、Alexandre Wang¹、Holly McCall¹ 和 Xiaohong Chen¹

¹SCIEX, USA; ²Center for Forensic Science Research and Education at the Fredric Rieders Family Foundation, Willow Grove, USA; ³SCIEX, Canada

全国因使用阿片类药物过量已导致数千人死亡，人们对芬太尼类似物及其代谢物的担忧情绪不断上升。其中有些合成药物的效价很强，因此稍有过量就可能发生意外。此外，由于存在通过皮肤吸收或摄入的可能性，这些高效价药物还会危及公共健康和公共安全人员。为正确鉴定生物基质中的这些芬太尼类似物，法医实验室需要灵敏的 MS 系统来精确定量，还需要具有高度针对性的色谱法来分离和正确鉴定异构体。

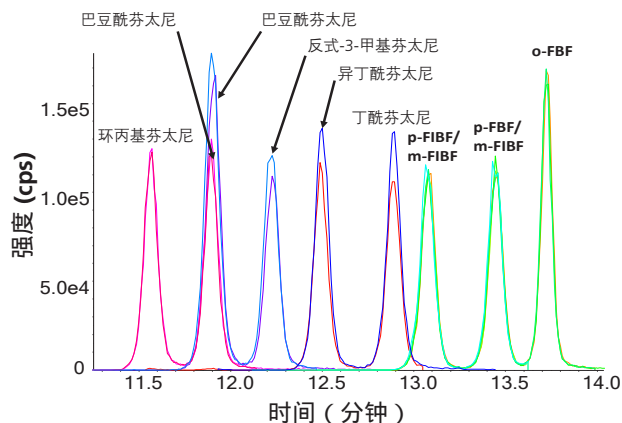
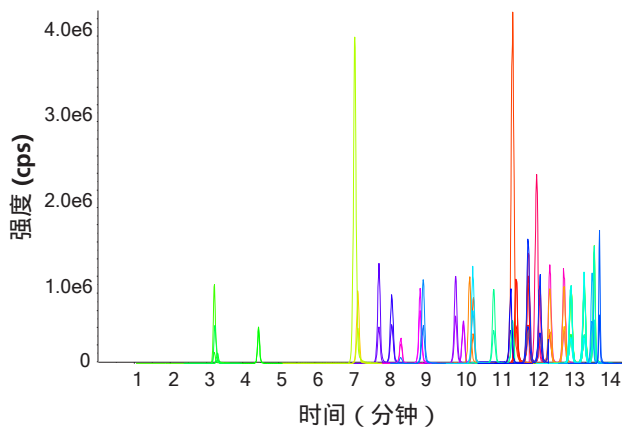


图1. 通过 LC-MS 分析的芬太尼类化合物的色谱图。上图所示为 34 种化合物在 17 分钟运行时间内的洗脱。下图显示了 11.3 到 14.0 分钟对 9 种异构体实现的基线分离。

现已开发出确认人血中是否存在芬太尼及其类似物的方法。由于很难根据类似碎裂模式监测是否含有异构体，因此在开发方法时，这些化合物中异构体的分离对于准确鉴定所有芬太尼类似物很关键。主要挑战在于，既要对这些异构体进行色谱分离，又要保持合适的峰形和合理的 LC 运行时间。测试了多个分析色谱柱和流动相组合，直到实现所需的分离（图 1）。

芬太尼方法的主要特点

- 样品前处理通过简单的乙腈沉降蛋白、离心，上清液吹干后用流动相复溶。
- 使用 ExionLC™ AC HPLC 系统在 17 分钟运行时间内实现了所有异构体的基线分离（图 1）。
- 芬太尼及其类似物包括 29 种分析物和 5 种内标，总共 58 个 MRM 离子对。
- 分析物在正离子化模式下使用 QTRAP® 4500 LC-MS/MS 系统监测。
- QTRAP 4500 系统的灵敏度可以检测出复杂生物基质样品中皮克 (pg) 级别的药物，线性良好，同时保持在线性范围内所有化合物测定的准确度。

方法

样品制备：将甲醇溶解的一系列浓度的标准品加入人全血中，得到从 0.1 ng/ml 到 100 ng/ml 的所需浓度，形成一条校准曲线，用以评估动态范围。

1. 将 40 μ L 的对应甲醇标准品溶液加入 360 μ L 的人全血。加入 20 μ L 的内标溶液，以及 1.14 mL 的冷乙腈。
2. 样品经过强力涡旋和离心处理。
3. 转移 500 μ L 的上清液，吹干并与 125 μ L 稀释溶液（流动相）重组。
4. 对后续样品进行离心处理，并将上清液转移到进样小瓶中进行分析。

内标：卡芬太尼-D5、环丙基芬太尼-D5、芬太尼-D5、甲氧基乙酰芬太尼-D5 和去甲芬太尼-D5 用作内标（地西洋）。所有五种内标混合并在甲醇中稀释至浓度 1000 ng/mL。

液相色谱：HPLC 分离，柱温 30 $^{\circ}$ C 使用 Phenomenex C18 色谱柱在 SCIEX ExionLC™ AC 系统上完成。流动相包括水、甲醇、乙腈和改性剂。LC 流速为 0.3 mL/min，总运行时间为 17 分钟，进样量为 5 μ L。

质谱：QTRAP® 4500 系统，电喷雾离子化，正离子模式，数据采集软件 Analyst 1.7，Scheduled MRM 模式保证每个色谱峰有足够的的数据采集点，保证定量结果更加准确。

表 1 提供了离子源参数。针对每个离子对的去簇电压（DP）、碰撞能量（CE）和碰撞室出口电压（CXP）进行了优化，并在表 3 中列出。

表 1. 离子源条件。

参数	值
气帘气 (CUR)	30
碰撞气 (CAD)	8
离子喷雾电压 (IS)	2500 V
温度 (TEM)	650
离子源气体 1 (GS1)	50
离子源气体 2 (GS2)	50

表 2. 分析的 29 种目标化合物列表

2-咪喃基芬太尼	巴豆酰芬太尼	邻氟丁酰芬太尼 (o-FBF)
4-ANPP	环丙基芬太尼	对氟芬太尼
乙酰芬太尼	芬太尼	对氟丁酰芬太尼 (p-FBF)
丙烯酰芬太尼	异丁酰芬太尼	对氟异丁酰芬太尼
阿芬太尼	甲氧基芬太尼	对氟丙烯酰芬太尼
苜基芬太尼	间氟丁酰芬太尼 (m-FBF)	苯基芬太尼
β -羟基芬太尼	间氟异丁酰芬太尼 (m-FIBF)	对甲氧基乙酰芬太尼
丁酰芬太尼	N-甲基去甲芬太尼	舒芬太尼
卡芬太尼	去甲卡芬太尼	反式-3-甲基芬太尼
顺式-3-甲基芬太尼	去甲芬太尼	

异构体的分离

九种芬太尼类似物（反式-3-甲基芬太尼、顺式-3-甲基芬太尼、异丁酰芬太尼、丁酰芬太尼、p-FIBF/m-FIBF、p-FBF/m-FBF、o-FBF、环丙基芬太尼、巴豆酰芬太尼）是其他类似物的异构体，因此没有可用于检测的独特碎片。因此，这些类似物的色谱分离对于可靠的鉴定和定量至关重要，成为此研究的重点。

使用 Phenomenex C18 色谱柱完成了最佳色谱分离，可在整个梯度内为更多极性分析物提供更好的保留和选择性。为正确区分所有异构体（不包括 p-FBF/m-FBF 和 p-FIBF/m-FIBF），需要将色谱柱与优化的流动相结合，产生分离。此色谱分离针对此 MRM 实验进行了优化，但也可在 SCIEX X500R QTOF 上用于其他的筛查或确认技术。

类似物 p-FBF 和 m-FBF 以及 p-FIBF 和 m-FIBF 无法进行色谱分离，因此它们组合到一起进行分析，如 p-FBF/m-FBF 和 p-FIBF/m-FIBF。这通常是化学上类似的位置异构体，需要在邻、间和对位种类与合适的分析时间之间权衡。为实现此研究的目的，已确定鉴定一组配对的类似物是最佳策略。

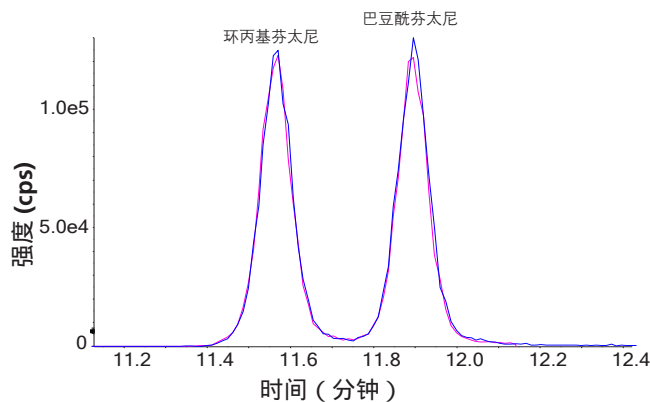
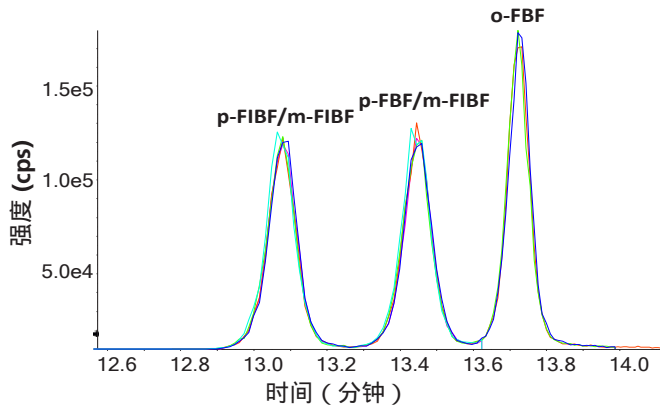
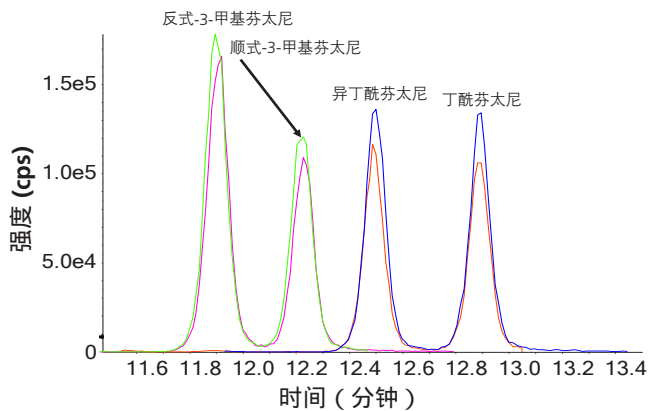


图2. 特定芬太尼异构体的分离示例。(上) 异构体反式-3-甲基芬太尼、顺式-3-甲基芬太尼、异丁酰芬太尼和丁酰芬太尼的分离(11.3到12.1分钟)。(中) 异构体 p-FIBF/m-FIBF、p-FBF/m-FIBF 和 o-FBF 的分离(12.8到14.0分钟)。(下) 异构体环丙基芬太尼、巴豆酰芬太尼的分离(11.3到12.1分钟)。

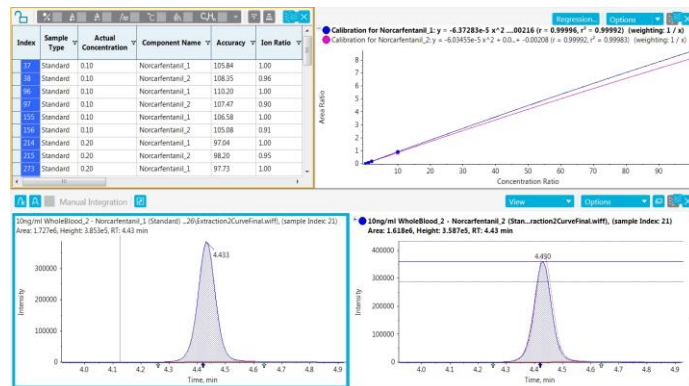


图3. 使用 SCIEX OS 1.4 软件对去甲卡芬太尼进行数据处理。(上) 从 0.1 ng/mL 到 100 ng/mL, 包含校准曲线的结果表。(下) 离子比重叠的第一个和第二个离子对。

数据处理

使用 SCIEX OS 1.4 软件进行数据处理, 29 种分析物和 5 种内标可在软件中预览 Schedule MRM 的保留时间, 利用 Analytics 中的 MQ4 算法, 轻松完成了本底中峰值的检测和积分。MQ4 算法可用于在观察窗中选择正确的峰值, 特别是在异构体存在多个峰值时。这种易用性有助于分析重复的进样 (n=3), 用于验证离子比的一致性, 确认 ± 20% 内的浓度值准确性, 如图 3 和 4 所示。

在用 10 倍稀释和低进样量 5 μL 稀释全血样品后, 所有分析物都能在 0.1 ng/mL 的基质中成功检测。最不灵敏的分析物是去甲芬太尼, 用于定性的离子对的信噪比为 51.8。

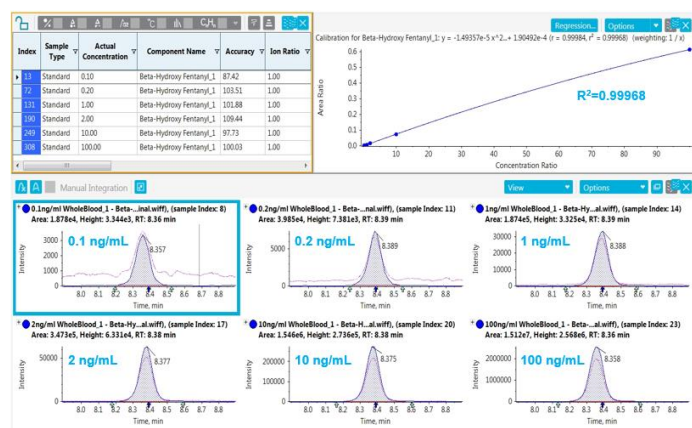


图 4. -羟芬太尼的数据处理。(上) 从 0.1 ng/mL 到 100 ng/mL, 包含校准曲线的结果表, (下) 存在离子比重叠的第一个和第二个离子对。

SCIEX OS 1.4 软件的 Analytics 部分新增了自动移除异常值的功能。这项新功能将根据用户设置的条件移除异常值。在下面的示例中，有目的的对高度浓缩的校准液进行进样，在校准范围高端形成饱和（图 5）。轻松地运用自动异常值算法，从校准曲线中移除高度浓缩的样品，并改善浓度曲线的拟合与相关性（图 5，下）。

结论

QTRAP 4500 系统结合 ExionLC AC 系统可以分离芬太尼及其类似物和代谢物，同时在低浓度复杂生物基质（如人全血）中保持灵敏度。Analyst 1.7 软件中的 Scheduled MRM 算法和 QTRAP 4500 系统的速度产生了大量易于量化的优质数据采集点。

- 芬太尼类似物和异构体的基线分离
- 液相色谱法可用于其他平台，包括 SCIEX X500R QTOF，用于筛查和确认技术。
- 此研究监测的化合物中平均约 4 个数量级的动态范围

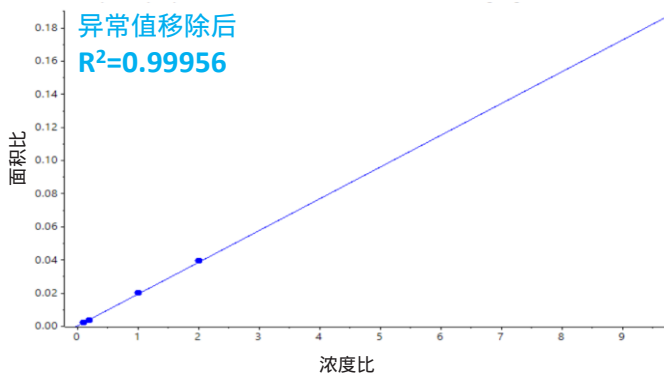
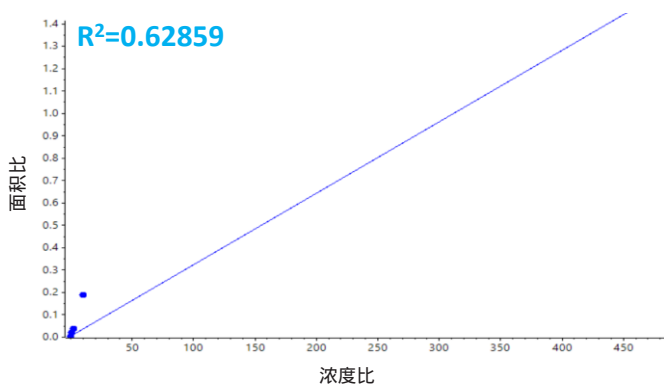
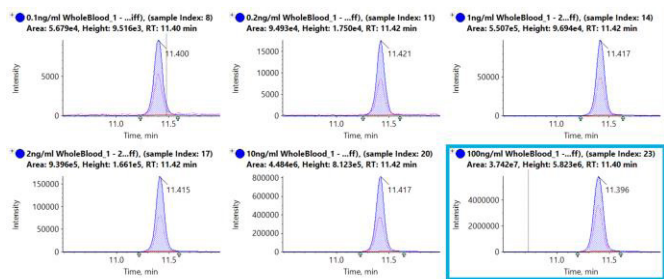


图5. 自动剔除异常值改进了数据质量。（上）浓度范围内 2-呋喃基芬太尼的 MRM 痕量。（中）所有 6 种浓度的浓度曲线，显示浓度最高时的饱和，导致线性拟合差。（下）自动拒绝异常值移除了最高浓度，大大改善了浓度曲线的线性拟合。

表3. 监测的芬太尼类化合物的 MRM 离子对, 包括优化的化合物相关参数

分析物	Q1	Q3	RT (min)	DP	EP	CE	CXP
2-呋喃基芬太尼_1	375.2	188.1	11.2	70	10	29	12
2-呋喃基芬太尼_2	375.2	105.0	11.2	70	10	53	10
4-ANPP_1	281.2	188.1	8.0	67	10	23	14
4-ANPP_2	281.2	105.0	8.0	67	10	41	10
乙酰芬太尼_1	323.2	188.1	7.6	61	10	29	14
乙酰芬太尼_2	323.2	105.0	7.6	61	10	45	12
乙酰芬太尼_1	335.2	188.1	9.7	70	10	29	18
乙酰芬太尼_2	335.2	105.0	9.7	70	10	45	8
阿芬太尼_1	417.3	268.1	9.9	76	10	23	18
阿芬太尼_2	417.3	197.0	9.9	76	10	35	14
苄基芬太尼_1	323.2	174.1	8.7	71	10	29	12
苄基芬太尼_2	323.2	91.0	8.7	71	10	57	8
β -羟基芬太尼_1	353.3	204.1	8.2	71	10	31	20
β -羟基芬太尼_2	353.3	335.2	8.2	71	10	25	12
丁酰芬太尼_1	351.3	188.1	12.6	61	10	31	14
丁酰芬太尼_2	351.3	105.0	12.6	61	10	49	8
卡芬太尼_1	395.3	335.2	12.0	71	10	25	22
卡芬太尼_2	395.3	246.1	12.0	71	10	27	16
卡芬太尼-D5	400.3	340.2	11.9	81	10	25	16
顺式-3-甲基芬太尼_1	351.3	202.1	12.0	56	10	31	16
顺式-3-甲基芬太尼_2	351.3	105.0	12.0	56	10	49	8
巴豆酰芬太尼_1	349.2	188.1	11.7	51	10	29	14
巴豆酰芬太尼_2	349.2	105.0	11.7	51	10	57	10
环丙基芬太尼_1	349.2	188.1	11.4	70	10	31	14
环丙基芬太尼_2	349.2	105.0	11.4	70	10	51	10
环丙基芬太尼-D5	354.3	188.1	11.3	70	10	33	16
芬太尼_1	337.2	188.1	10.2	51	10	29	4
芬太尼_2	337.2	105.0	10.2	51	10	53	4
芬太尼-D5	342.2	105.0	10.1	90	10	52	20
异丁酰芬太尼_1	351.3	188.1	12.3	76	10	31	12
异丁酰芬太尼_2	351.3	105.0	12.3	76	10	53	8
甲氧基芬太尼_1	353.3	188.1	7.1	76	10	29	14
甲氧基芬太尼_2	353.3	105.0	7.1	76	10	49	6
甲氧基芬太尼-D5	358.3	188.1	7.0	46	10	29	14

表3. 监测的芬太尼类化合物的 MRM 离子对, 包括优化的化合物相关参数 (续)

分析物	Q1	Q2	RT (min)	DP	EP	CE	CXP
<i>N</i> -甲基去甲芬太尼_1	247.2	98.0	3.1	56	10	23	14
<i>N</i> -甲基去甲芬太尼_2	247.2	70.0	3.1	56	10	41	10
去甲卡芬太尼	291.2	231.2	4.3	56	10	19	16
去甲卡芬太尼_2	291.2	259.2	4.3	56	10	13	20
去甲芬太尼	233.2	84.0	3.2	71	10	36	6
去甲芬太尼_2	233.2	150.1	3.2	71	10	25	10
去甲芬太尼-D5	238.2	84.0	3.1	75	10	24	20
<i>o</i> -FBI	369.2	188.1	13.5	80	10	33	12
<i>o</i> -FBI_2	369.2	105.0	13.5	80	10	53	12
对氟芬太尼	355.2	188.1	10.8	81	10	31	16
对氟芬太尼_2	355.2	105.0	10.8	81	10	55	8
<i>p</i> -FBI/ <i>m</i> -FBI_1	369.2	188.1	13.2	80	10	31	18
<i>p</i> -FBI/ <i>m</i> -FBI_2	369.2	105.0	13.2	80	10	53	16
<i>p</i> -FIBI/ <i>m</i> -FIBI_1	369.3	188.1	12.9	56	10	31	14
<i>p</i> -FIBI/ <i>m</i> -FIBI_2	369.3	105.0	12.9	56	10	53	12
对氟丙烯酰芬太尼	353.2	188.1	10.2	66	10	33	12
对氟丙烯酰芬太尼_2	353.2	105.0	10.2	66	10	51	10
苯基芬太尼	385.2	188.1	13.5	76	10	31	12
苯基芬太尼_2	385.2	105.0	13.5	76	10	53	12
对甲氧基乙酰芬太尼	353.3	188.1	8.8	61	10	33	14
对甲氧基乙酰芬太尼_2	353.3	105.0	8.8	61	10	55	8
舒芬太尼	387.2	238.2	13.8	68	10	25	12
舒芬太尼_2	387.2	111.0	13.8	68	10	47	8
反式-3-甲基芬太尼	351.3	202.1	11.7	81	10	31	14
反式-3-甲基芬太尼_2	351.3	105.0	11.7	81	10	49	10

For Research Use Only. Not for use in Diagnostics Procedures.

AB Sciex is operating as SCIEX.

© 2019. AB Sciex. The trademarks mentioned herein are the property of AB Sciex Pte. Ltd. or their respective owners. AB SCIEX™ is being used under license.

RUO-MKT-02-8322-ZH-A



SCIEX中国公司

北京分公司
地址: 北京市朝阳区酒仙桥中路24号院
1号楼5层
电话: 010-5808 1388
传真: 010-5808 1390

全国免费垂询电话: 800 820 3488, 400 821 3897

上海公司及亚太区应用支持中心
地址: 上海市长宁区福泉北路518号
1座502室
电话: 021-2419 7200
传真: 021-2419 7333

网址: www.sciex.com.cn

广州分公司
地址: 广州市天河区珠江江西路15号
珠江城1907室
电话: 020-8510 0200
传真: 020-3876 0835

微博: @SCIEX