

X500R 质谱SWATH®技术 “一网打尽” 芬太尼类毒品

A New Method for Screening, Identification and Quantitation of Fentanyl and its Derivatives by SWATH® of X500R

刘冰洁, 张崇, 程海燕, 李立军, 郭立海

Liu Bingjie, Cheng Haiyan, Li Lijun, Guo Lihai

SCIEX 亚太应用支持中心 北京

SCIEX China, Beijing

Key words: X500R; Amphetamines; Fentanyl and its derivatives; SWATH®

关键词: X500R; 阿片类; 芬太尼及其衍生物; SWATH®

引言

芬太尼是阿片类镇痛药的一种, 是麻醉和疼痛治疗中无可替代的良药。1960年, 杨森制药公司创始人保罗·杨森博士首次成功合成了比吗啡镇痛效果更强、副作用更小的镇痛药芬太尼。后又相继成功合成了舒芬太尼、阿芬太尼等。虽然是一种镇痛类药物, 但如果滥用会导致上瘾。在美国, 阿片类药物成瘾已成为大问题。2018年12月1日晚, 国务委员兼外交部长王毅在记者会上表示, 中美双方将采取积极行动加强对芬太尼类物质的管控。质谱作为当今最先进的痕量检测技术无疑将承担此重任。

然而在实际检测工作中面对两大挑战: 1) 芬太尼类药物“家族”庞大, 各种结构衍生物“不计其数”, 且不断有新型结构被合成并进行非法销售。2) 新型结构衍生物往往缺乏标准品。因此如何应用液质联用技术更好的进行筛查、定性以及定量分析成为难题。

SCIEX X500R 完整解决方案

SCIEX 优异性能的四极杆-飞行时间质谱 X500R, 结合专利的 SWATH® 采集模式, 可实现一针进样采集到样本中所有化合物的一级和二级质谱信息, 该数据可应用 SCIEX OS 软件自动进行目标化合物的定性定量以及非目标化合物的定性分析, 轻松实现芬太尼及其衍生物的“一网打尽”, 见图 1:

1) 目标化合物筛查定性:

通过 SWATH® 数据的一级质量精度、化合物同位素峰形、保

留时间和高质量精度的二级谱这“四大关”进行目标化合物筛查, 快速高效的提供最准确地定性筛查结果。SCIEX 具有专业的毒物毒品二级谱库, 包括几十种芬太尼类化合物, 是筛查准确性的保证。

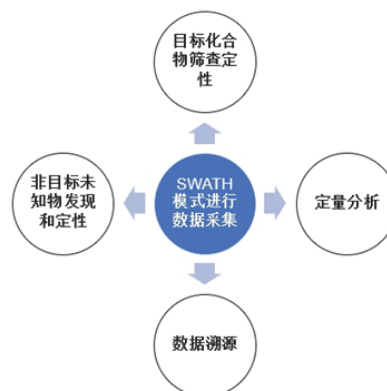


图1. SWATH® 数据真正实现一针进样, 四种功能。

2) 同时进行定量分析:

如有标准品, SWATH® 数据还可直接进行定量分析。值得一提的是, 该数据不仅可以通过一级质谱数据进行定量分析, 还可同时应用二级碎片离子进行定量分析, 并可自动计算离子丰度比。

3) 非目标新型衍生物的结构确证(无需标准品):

芬太尼衍生物繁多, 且不断“推陈出新”, 因而难以建立一个涵盖所有衍生物的二级谱库。但衍生物通常在芬太尼结构基础上进行改造, 具有相似的母核结构, 因此衍生物和原有的母药之间有共同的碎片离子, 或产生具有一定裂解规律的碎片离子。SCIEX OS 软件可应用此特点自动搜索发现样本中的可疑衍生物, 并进行结构推断。从而解决没有标准品无法鉴定的难题。

4) 数据溯源：

因 SWATH® 采集模式是完整记录了样本中所有离子的一级与二级质谱信息，因此该数据可用于溯源，便于将来继续对该数据进行信息的挖掘和分析，而无需重新进样。

综上所述，SWATH® 真正实现一针进样，四种功能。本文将从以上几方面阐述完整的解决方案，帮助您轻松应对挑战。

实验方法

1. 液相方法：

色谱柱：Phenomenex Kinetex C18 (100×2.1 mm, 2.6 μm)

流速：0.4 mL/min；

柱温：40 °C；

进样量：5 μL；

洗脱程序：梯度洗脱；

2. 质谱方法：

扫描方式：SWATH® 采集方式

离子源：ESI+ 源

CDS 自动校正

IS 电压：5500 V (+)

源温度 TEM: 650 °C

气帘气 CUR: 35 psi 碰撞气 CAD: 7

雾化气 GS1: 55 psi 辅助气 GS2: 60 psi

去簇电压 DP: 80 V 碰撞能量 CE: 35 ± 15 V

TOF MS Range: 100-1000 Da

MS/MS MS Range: 500-1000 Da

3. SCIEX 专利 SWATH® 技术特点：

SWATH® (Sequential Windowed Acquisition of all Theoretical mass spectra) 是将所有离子分配到连续的窗口内，每个窗口内的所有离子一起传输到碰撞室打碎产生 MS/MS 二级碎片，通过 SCIEX 专利技术的去卷积功能将碎片归属到对应的母离子（见图 2）。SCIEX 专利 SWATH® 技术具有如下特点：

1. 通过该技术得到所有母离子的二级碎片，保证了低含量的目标物的二级信息不被遗漏，因此能够一针进样完整和准确的实现痕量残留的定性和定量工作。

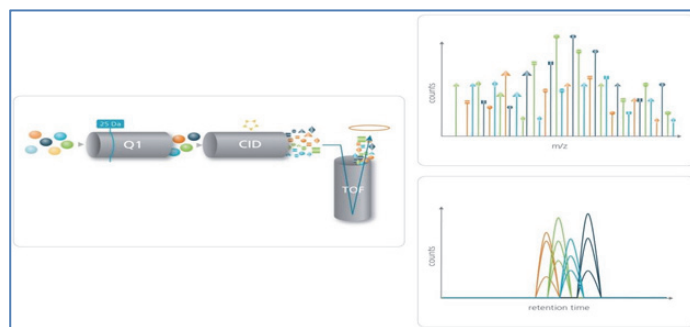


图2. SWATH®采集模式示意图。

2. 独有的智能可变窗口 (Variable Windows)，根据样品中离子质荷比的分布，在分布密集的区域设置窄的窗口，在离子较少的区域设置宽的窗口，保证所有离子采集到高质量准确的二级质谱图（见图3）。

Method duration		13.5 min		Total scan time: 0.670 sec		
Estimated cycles:		1208		超快的质谱扫描速度 一级和二级总循环时间只有 0.67 秒		
	Precursor ion start mass (Da)	Precursor ion stop mass (Da)	Decluster potential (V)	DP spread (V)	Collision energy (V)	CE spread (V)
1	100.0000	200.0000	80	0	35	15
2	199.0000	250.0000	80	0	35	15
3	249.0000	320.0000	80	0	35	15
4	319.0000	330.0000	80	0	35	15
5	329.0000	350.0000	80	0	35	15
6	349.0000	355.0000	80	0	35	15
7	354.0000	363.0000	80	0	35	15
8	362.0000	370.0000	80	0	35	15
9	369.0000	400.0000	80	0	35	15
10	399.0000	450.0000	80	0	35	15
11	449.0000	500.0000	80	0	35	15
12	499.0000	600.0000	80	0	35	15
13	599.0000	800.0000	80	0	35	15
14	799.0000	1000.0000	80	0	35	15

图3. SWATH®方法界面，根据离子质荷比智能可变窗口。

3. SCIEX 专利技术的去卷积功能，保证二级谱碎片归属准确。

4. 以SICEX X500R 质谱业内超快的扫描速度为基础，可以轻松实现更多窗口的扫描。

4. 样品前处理

样品充分研磨混匀，称取约 1 mg，加入 10 mL 甲醇，涡旋振荡，离心后取上清液，甲醇稀释后进行 LC-MS/MS 分析。

结果与讨论

1. 目标化合物筛查定性：

本实验共筛查 24 种芬太尼类化合物，在上述 LC-MS 条件下 24 种化合物提取离子流图见图 4。

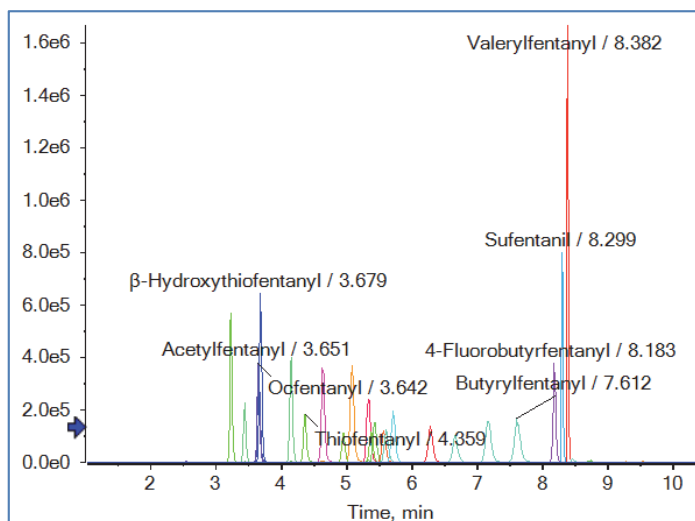


图4. 24种芬太尼衍生物提取离子流色谱图。

在此液相条件下，同分异构体可达到很好的分离，比如丁酰芬太尼（Butyrylfentanyl）、异丁酰芬太尼（Isobutyrfentanyl）、阿法甲基芬太尼（Alpha-methylfentanyl）、3-甲基芬太尼分子式（3-Methylfentanyl）均为 $C_{23}H_{30}N_2O$ ，分离谱图见图 5。

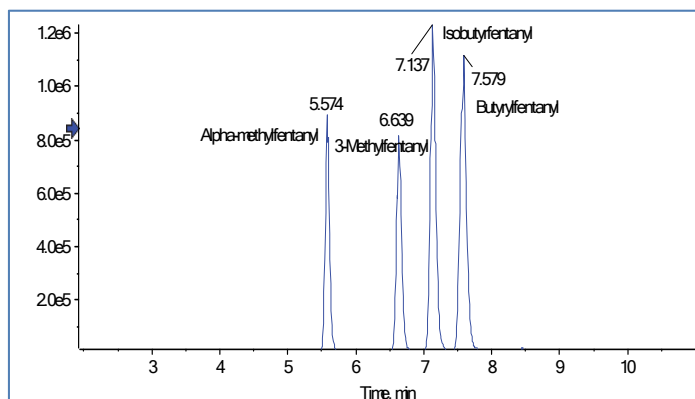


图5. 四种同分异构体得到很好的分离。

SCIEX OS 软件自动根据化合物的质量误差、同位素分布、保留时间和二级碎片谱图“四大关”进行目标化合物筛查，保证筛查结果的准确性。

如图 6 所示，某份样本中阳性检出戊酰芬太尼，其质量误差、同位素分布、保留时间和二级碎片谱图四项均为绿色对勾，说明匹配良好。质量偏差小于 1 ppm，体现仪器良好的质量精度和稳定性；实测二级谱图与数据库匹配得分大于 90 分，体现 SCIEX 专利技术的去卷积功能以及智能可变窗口保证二级碎片谱的准确性。

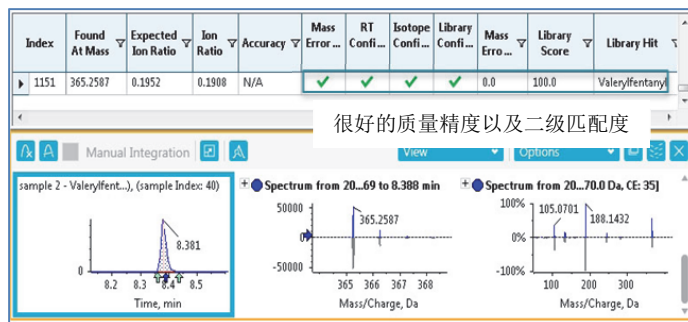


图6. 样本中阳性检出的戊酰芬太尼谱图。

2. 同时进行定量分析

高质量精度质谱的定量可以采用一级离子定量也可以选择二级碎片离子进行定量。但传统扫描模式无法实现一针进样同时得到一级和二级的定量数据，而 SWATH[®] 完美解决了这个问题。SWATH[®] 允许自由选择母离子或者任意子离子进行定量，还可自动计算离子丰度比。与此同时，SCIEX OS 软件可在同一界面同时处理定性和定量数据，界面直观，省时省力。

配制 24 种芬太尼衍生物标准曲线 0.02 ng/mL~2 ng/mL，建立 SWATH[®] 一级和二级碎片定量方法，得到定量线性，以阳性检出

化合物戊酰芬太尼为例，一级和二级碎片线性关系均在 0.995 以上，准确度均在 85%-115% 之间，符合定量方法学要求。此外，即便在低浓度点 0.02 ng/mL，二级谱库匹配评分依旧在 90 分以上。表明极好的同时定量定性的性能（见图 7）。

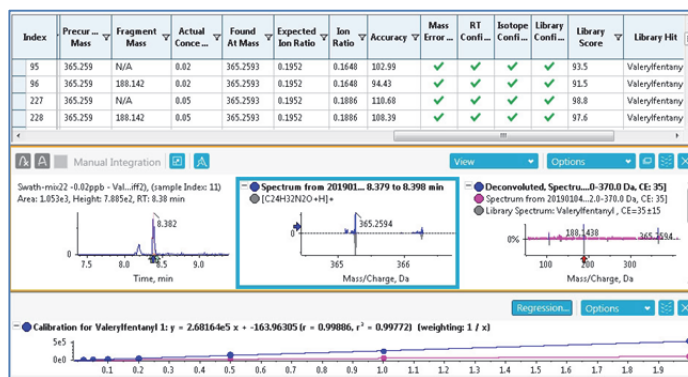


图7. 同一数据，同一界面，同时定量和定性分析（戊酰芬太尼）。

3. 非目标新型衍生物发现和结构确证（无需标准品）：

芬太尼衍生物通常具有相似的母核结构，比如 3-甲基芬太尼、乙酰芬太尼、丁酰芬太尼、异丁酰芬太尼、奥芬太尼、呋喃芬太尼、戊酰芬太尼等均有与芬太尼相似的母体结构（部分化合物结构见

图 8)。因此可与母药产生相同的碎片离子, 或者具有一定裂解规律的碎片离子。芬太尼二级碎片谱见图 9, 其主要特征碎片解析见图 10。

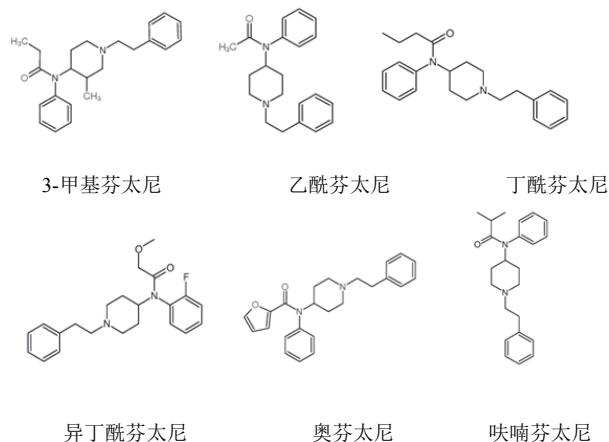


图8. 部分衍生物结构图。

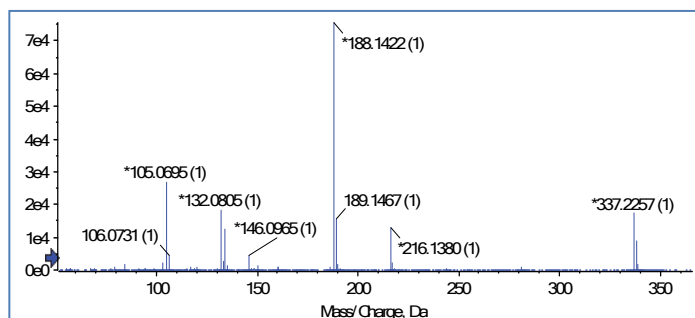


图9. 芬太尼二级碎片谱。

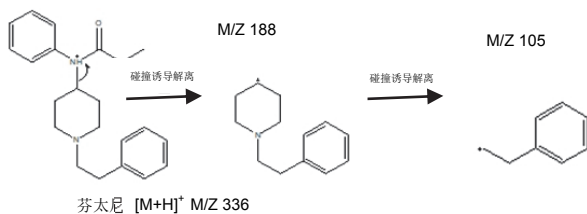


图10. 芬太尼主要特征碎片解析。

SCIEX OS 软件可应用衍生物与母体化合物结构相似的特点, 自动搜索发现样本中的可疑衍生物, 并进行结构推断。从而解决没有标准品无法鉴定的难题。

OS 软件自动将样本数据与空白数据进行对比, 比如在样本中的 3.642 分钟发现差异峰, 其 M/z 为 371.2133, 且自动预测分子式为 $C_{22}H_{27}FN_2O_2$, 搜库结果显示与 M/z 为 336.2202 的芬太尼进行了匹配, 故该物质应该为芬太尼结构类似物。因此通过软件自动搜索, 快速发现了样本中的芬太尼衍生物。(见图 11)

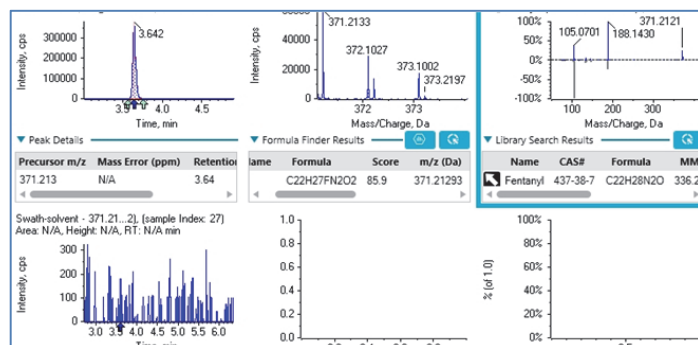


图11. 新型衍生物的和结构确证。

可进一步应用 OS 软件的自动结构解析功能, 对化合物结构进行推测, 结果表明预测的结构与未知物的实测二级谱具有接近 100% 的匹配率 (见图 12), 说明推测结构的可信度。应用这种方式可鉴定得到该化合物为奥芬太尼。该鉴定思路可应用到芬太尼类各种新型毒品的发现和鉴定实验中。

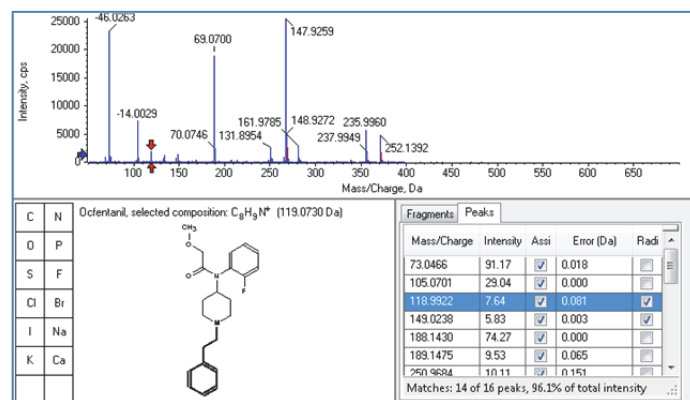


图12. 软件自动进行结构解析。

总结：

1. 本实验建立了24种芬太尼类毒品的检测方法，X500R 超快的扫描速度和SCIEX 独有的SWATH®技术使得一次进样同时得到所有化合物的一级和二级数据。因此目标化合物筛查定性、定量、非目标化合物发现和确证都可一针完成，无需重新进样。且该数据可用于溯源。
2. SWATH®连续同时采集的一级和二级数据，允许我们可以随意选择一级母离子或者任意二级碎片离子进行定量，并同时可计算离子丰度比。
3. 高灵敏度的二级谱图为化合物的定性提供依据，即使样品中的被测物含量很低依然能够得到高质量的二级谱。通过一级质量、同位素分布、保留时间和二级库匹配四大置信条件进行定性和确证，使得结果可信度更高。
4. 应用OS 软件非目标化合物筛查功能，结合SWATH®采集模式全面高质量的一级和二级数据，可快速的发现未知样本中的目标化合物，并自动进行结构解析，从而轻松完成对新型芬太尼衍生生物的鉴定。
5. SCIEX OS软件自动化程度高，操作简单，可在同一界面完成定性和定量分析，界面直观，省时省力。

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-02-8934-ZH-B



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