

# 超高效液相色谱-串联质谱法测定毛发中5种芬太尼类新精神活性物质的方法研究与应用

薛康<sup>1,2</sup> 何嘉玲<sup>1</sup> 吴雪梅<sup>1</sup> 周鑫平<sup>3</sup> 肖宇<sup>1</sup> 胡江涛<sup>1,2</sup> 何开蓉<sup>1,2\*</sup>

(1.成都海关技术中心 四川成都 610041;2.食品安全检测四川省重点实验室;3.四川百茶百道实业股份有限公司)

**摘要** 本文建立同时分析毛发中5种芬太尼类新精神活性物质的超高效液相色谱-串联质谱(UPLC-MS/MS)测定方法。该方法以外标法定量,毛发样品经甲醇超声提取后用HSS T3 C18色谱柱分离,采用多反应监测模式(MRM)测定目标物。5种芬太尼类物质在质量浓度0.1~50 ng/mL范围内,呈现良好的线性关系且相关系数大于0.99,5种芬太尼类物质的检出限为0.05 ng/mg,定量限为0.1 ng/mg,日内和日间变异系数均小于15%,方法回收率在90.5%~108.5%之间。运用该方法检测添加样品,能有效检测目标物且回收率较好。该方法操作简单,灵敏度高,选择性好,可用于毛发中芬太尼类物质的分析测定。

**关键词** 芬太尼类物质;毛发;超高效液相色谱串联质谱;新精神活性物质

**中图分类号** O657.63

## Establishment and Application of UPLC-MS/MS Method for 5 Fentanyl-Analogs of New Psychoactive Substance in Human Hair

XUE Kang<sup>1,2</sup>, HE Jialing<sup>1</sup>, WU Xuemei<sup>1</sup>, ZHOU Xinping<sup>3</sup>, XIAO Yu<sup>1</sup>, HU Jiangtao<sup>1,2</sup>, HE Kairong<sup>1,2\*</sup>

(1.Chengdu Customs Technology Center, Chengdu Sichuan, 610041, China;

2.Food Safety Detection Key Laboratory of Sichuan;3.Sichuan Baicha Baidao Industrial Co.,LTD)

**Abstract:** To establish an ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (UPLC-MS/MS) rapid determination method for simultaneous analysis of 5 fentanyl-analogs in human hair. Quantifies by external standard method, the hair was extracted with methanol by ultrasonic extraction and separated on Waters HSS T3 C18 column. Then target objects were simultaneously analyzed with multiple reaction monitoring (MRM) mode. 5 fentanyl-analogs had a good linear relationship within the range of 0.1–50 ng/mL, and correlation coefficients were larger than 0.99. The limits of detection (LOD) of 5 fentanyl-analogs were 0.05 ng/mg, and the limits of quantitation (LOQ) were 0.1 ng/mg. The coefficient of variation were all less than 15%. The recovery of the method was 90.5%–108.5%. Apply this method to test spiked samples, The results showed all compounds were detected and had good recovery. The established method has the advantages of simple pretreatment, high sensitivity and good selectivity, the method can be used for the determination of fentanyl-analogs in human hair analysis.

**Key Words:** Fentanyl-analogs; Human Hair; UPLC-MS/MS; New Psychoactive Substance

## 1 前言

芬太尼是20世纪50年代由比利时科学家保罗·杨森作为镇痛药开发的,是一种强效的阿片受体激动剂<sup>[1]</sup>。后来通过对芬太尼的结构进行不断修饰,已出现了数十种芬太尼类衍生物,近年来,芬太

尼类新精神活性物质的滥用已经引起国际社会的高度关注。2018年12月,中美元首会晤后,两国在禁毒方面达成新的合作意向与共识,我国决定对芬太尼类物质进行整类列管,将其指定为受控的新精神活性物质,并列入《非药用类麻醉药品和精神药品管

第一作者:薛康(1989-),男,硕士,工程师,研究方向为理化分析,E-mail:1099125251@qq.com

通信作者:何开蓉(1973-),女,本科,副高级工程师,研究方向为理化分析,E-mail:837581584@qq.com

基金项目:四川省重点研发项目(2020YFS0471)

收稿日期:2021-08-07

制品种增补目录》。

检材是案件的重要证据,如血液、毛发、尿液、分泌液和胃容物等,是法医毒物实验室常用的生物检材。生物检材的处理关系到分析结果的科学性与准确度,会对案件的侦办产生直接影响。血样、尿样及唾液在采样及保存过程中易受污染而造成假阴性,且其检出时间较短。因此,有时需要用易采集、易保存及检测窗口较长的毛发来进行鉴定。毛发具有可长时间保留药史等优点,可作为体液检材的有效补充,有时,其甚至会成为提供法庭证据的唯一手段<sup>[2]</sup>。因此,本文选择毛发样品作为本次试验的检材。

目前对芬太尼类物质及其代谢物的检验方法主要有气相色谱质谱联用法<sup>[3-5]</sup>、液相色谱质谱联用法<sup>[6-8]</sup>、液相色谱法<sup>[9]</sup>等。本文拟采用超高效液相色谱-串联质谱法对毛发中 5 种芬太尼类物质进行精确定性与定量检测,旨在建立一种灵敏度和准确度高、特异性和可操作性强的芬太尼类物质检验方法,为实际应用提供技术支持。

## 2 材料与方法

### 2.1 仪器与试剂、材料

ACQUITY UPLC I-Class TQ-XS 超高效液相色谱-串联质谱仪(美国 Waters 公司);3H20RI 离心机(中国赫西);AE240 电子天平(瑞士梅特勒);XW-80A 旋涡混合器(中国 HUXI);B8510E-DTH 超声波清洗器(美国必能信);Mili-Q Integral 3 超纯水仪(美国 Millipore 公司)。

芬太尼(Fentanyl,CAS 437-38-7);羟化去甲芬太尼(Hydroxynorfentanyl,CAS 83708-10-5);乙酰

芬太尼(Acetylfentanyl,CAS 3258-84-2);去甲舒芬太尼(Norsufentanil;CAS 61086-18-8);2,3-司可芬太尼(2,3-seco-Fentanyl;CAS 253342-66-4)。其中,乙酰芬太尼标准品质量浓度为 50  $\mu\text{g/mL}$ ,其他 4 种芬太尼标准品质量浓度为 100  $\mu\text{g/mL}$ 。甲醇(HPLC 级,Fisher 公司);乙腈(HPLC 级,Fisher 公司)乙酸铵(HPLC 纯,ACS 公司);甲酸(HPLC 级,CNW 公司),其他试剂均为分析纯。

### 2.2 溶液配制

取各芬太尼标准品适量,用溶剂配制成 1.0  $\mu\text{g/mL}$  的混合标准品中间溶液;用初始流动相逐级稀释成浓度为 50.0、20.0、10.0、5.0、1.0、0.5  $\text{ng/mL}$  的标准曲线工作液。

### 2.3 样品处理

毛发样品依次用适量水和丙酮振荡洗涤 2 次;晾干后剪成约 1 mm 段;置于 2 mL 研磨管中,用毛发研磨器粉碎成粉末状。

称取毛发粉末 20 mg,加入 1.0 mL 甲醇溶液,浸泡 4 h;冰浴超声 30 min;加入 1.0 mL 初始流动相,6 000 r/min 离心 5 min;取 1.0 mL 上清液,过 0.22  $\mu\text{m}$  有机滤膜,供仪器分析。

### 2.4 仪器条件

#### 2.4.1 质谱条件

离子化源模式:ESI+;雾化温度:550 $^{\circ}\text{C}$ ;扫描方式:多反应监测方式(MRM);毛细管电压:2.83 kV;脱溶剂气流量:1 000 L/hr;雾化气 40 psi。各化合物参数见表 1。

表 1 5 种化合物的质谱参数

| 化合物       | 保留时间 | 监测离子对(m/z)   | 锥孔电压(V) | 碰撞能(eV) |
|-----------|------|--------------|---------|---------|
| 羟化去甲芬太尼   | 2.05 | 249.0/165.9* | 18      | 14      |
|           |      | 249.0/93.9   |         | 22      |
| 去甲舒芬太尼    | 5.20 | 277.1/95.9*  | 30      | 20      |
|           |      | 277.1/127.9  |         | 14      |
| 乙酰芬太尼     | 6.06 | 323.1/188.0* | 44      | 24      |
|           |      | 323.1/104.9  |         | 36      |
| 芬太尼       | 7.89 | 337.1/188.0* | 32      | 38      |
|           |      | 337.1/104.9  |         | 22      |
| 2,3-司可芬太尼 | 8.76 | 339.2/204.1* | 14      | 24      |
|           |      | 339.2/120.0  |         | 48      |

注:\*为定量离子对。

#### 2.4.2 色谱条件

HSS T3 色谱柱(100mm $\times$ 2.1mm,1.8  $\mu\text{m}$ ,美国 Waters 公司),柱温 35 $^{\circ}\text{C}$ ;流动相 A:5 mmol/L 乙酸

铵-0.1%甲酸缓冲溶液,流动相 B:乙腈;流速为 0.30 mL/min,进样量 1.0  $\mu\text{L}$ 。采用梯度洗脱,洗脱程序见表 2。

表2 梯度洗脱程序

| 时间/min | 流动相 A / (%) | 流动相 B / (%) |
|--------|-------------|-------------|
| 0      | 90          | 10          |
| 4      | 75          | 25          |
| 5      | 75          | 25          |
| 10     | 70          | 30          |
| 13     | 55          | 45          |
| 13.5   | 5           | 95          |
| 14.5   | 90          | 10          |
| 16     | 90          | 10          |

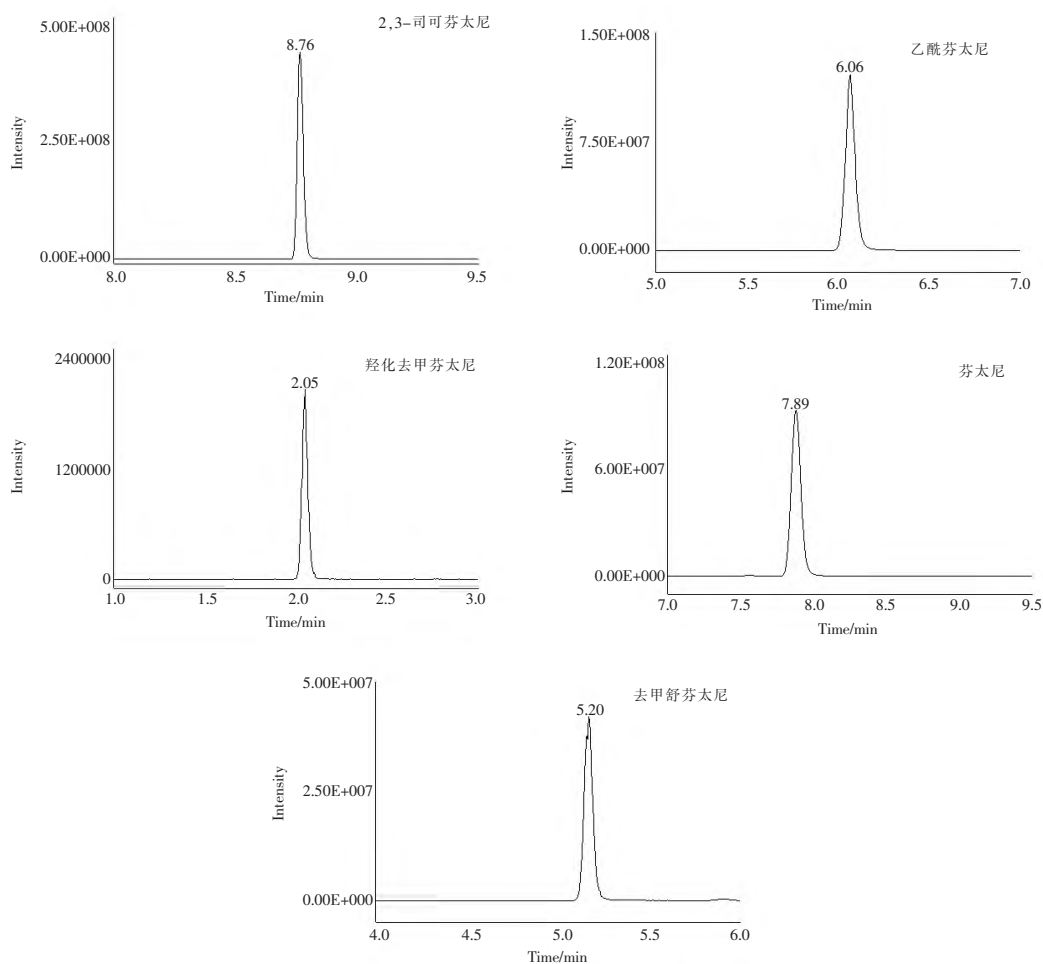


图1 5种芬太尼类物质总离子流图

### 3 结果与讨论

#### 3.1 色谱条件的选择

芬太尼类化合物的分子结构主要由丙基烷基酰胺、哌啶基环和苯基烷基部分组成,具有一定的极性,故本文采用HSS T3色谱柱。同时,实验对比了乙腈—5 mmol/L 乙酸铵(0.1%甲酸)、乙腈—水(0.1%甲酸)、甲醇—5 mmol/L 乙酸铵(0.1%甲酸)、甲醇—水(0.1%甲酸)4组流动相对目标物的选择与分离效果。结果表明,将乙腈—5 mmol/L 乙酸铵(0.1%甲酸)作为流动相,5种目标物均能够得到较好的分离度和峰形,谱图见图1。

#### 3.2 质谱条件的优化

本实验采用正离子模式(ESI+)和多反应监测扫描方式(MRM)优化质谱参数。将100 ng/mL的芬太尼类物质标准溶液直接进样分析,调节毛细管电压,使一级质谱中基峰离子响应最强,二级质谱的母离子选择一级质谱中的基峰离子,确定各化合物的母离子后,通过调节优化CE电压和DP电压,进行筛选最优子离子,保证子离子的灵敏度,5种芬太尼类物质的质谱参数见表1。

#### 3.3 方法学验证

##### 3.3.1 线性范围

取适量混合标准品中间液适量,用初始流动相逐级稀释成质量浓度为0.5、1.0、5.0、10.0、20.0、50 ng/mL的工作浓度。以每个目标物响应值为纵坐标(y),目标物质量浓度为横坐标(x),最小二乘法进行回归(权重系数为1/x),求得线性方程和线性系数。结果表明在质量浓度为0.5~50.0 ng/mL范围内,5种芬太尼类化合物具有良好的线性关系,相关系数大于

0.99。

**3.3.2 检出限和定量限**

将配置的校准曲线样品按照 1.3 方法进行处理并检测,以 3 倍信噪比(S/N≥3)和 10 倍信噪比(S/N≥10) 计算检出限和定量限,5 种芬太尼类物质的检出限均为 0.01 ng/mg,定量限为 0.03 ng/mg。

**3.3.3 准确度、精密度和回收率**

称取数份 20 mg 空白毛发样本,分别滴加适量的混合标准品溶液,晾干,配置成低(0.05 ng/mg)、中(0.2 ng/mg)和高(1.0 ng/mg)3 个浓度的样本溶液,经

1.3 方法处理后检测,记录每种芬太尼类物质在 3 个浓度的平均峰面积  $A_s$ ,同时用甲醇稀释混合标准品溶液,配置成浓度为 0.1 ng/mL、4.0 ng/mL 和 20.0 ng/mL 的对照品,上机检测得到每种芬太尼类物质在这 3 个浓度的峰面积  $A_m$ ,以  $A_s/A_m$  计算准确度,结果见表 3。

将低(0.05 ng/mg)、中(0.2 ng/mg)和高(1.0 ng/mg) 3 个浓度的样本每个配制 6 份,处理后分析,计算日内精密度的连续检测 3 d,计算日间精密度的同时计算加标回收率,结果见表 3。

表 3 各芬太尼类物质的准确度、回收率及精密度

| 化合物       | 准确度/% |       |       | 回收率/% |       |       | 精密度 RSD/% |       |       |       |      |       |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-----------|-------|-------|-------|------|-------|
|           |       |       |       |       |       |       | 日内        |       |       | 日间    |      |       |
|           | 0.05  | 0.2   | 1     | 0.05  | 0.2   | 1     | 0.05      | 0.2   | 1     | 0.05  | 0.2  | 1     |
| 芬太尼       | 102.4 | 97.8  | 98.8  | 106.2 | 95.9  | 102.5 | 98.8      | 95.6  | 100.4 | 99.5  | 98.7 | 96.3  |
| 羟化去甲芬太尼   | 106.2 | 93.6  | 95.4  | 96.8  | 99.6  | 99.8  | 105.8     | 96.4  | 99.5  | 99.5  | 91.6 | 99.6  |
| 乙酰芬太尼     | 101.5 | 103.8 | 97.6  | 90.5  | 90.7  | 98.4  | 97.7      | 106.8 | 109.5 | 101.5 | 97.6 | 90.5  |
| 去甲舒芬太尼    | 104.3 | 99.6  | 105.2 | 95.5  | 108.5 | 108.5 | 95.6      | 104.5 | 95.5  | 100.5 | 96.4 | 99.8  |
| 2,3-司可芬太尼 | 93.8  | 100.5 | 92.5  | 106.8 | 98.6  | 94.4  | 99.7      | 108.5 | 97.8  | 98.9  | 93.3 | 105.2 |

**3.4 方法应用**

该试验采用样品添加的方式模拟实际案例。取适量毛发,浸泡在 1.0 μg/mL 的混合标准溶液中 72 h,取出后晾干,按照 2.3 方法处理并做加标回收,提取液上机检测,超高效液相色谱-串联质谱方法如上文所述,5 种芬太尼类新精神活性物质在此份毛发样品中均被检出且加标回收率在 90.5%~108.5% 之间。

**4 结论**

本文采用了 UPLC-MS/MS 技术建立毛发中 5 种芬太尼类新精神活性物质的检测方法,该方法操作简单,成本低、灵敏度高,可应用于临床试验毛发检材中芬太尼类新精神活性物质的检测,满足检验鉴定的要求。芬太尼类物质作为一种新精神活性物质,已被整类列管,由于其药性极强,成瘾性很高,因此需要相关部门的重视,加强技术投入,严格监控芬太尼类物质的滥用情况。

**参考文献**

[1] STANLEY T H. The Fentanyl Story [J]. J Pain, 2014, 15(12): 1215-26.

[2] 秦楠,向平,施妍.生物基质中芬太尼类物质分析方法研究进展[J].中国司法鉴定,2019(1):13-22.

[3] 郑晓宇,赵彦彪,杨虹贤,等.气相色谱-质谱法和液相色谱-飞行时间质谱法定性分析疑似毒品中的 2,5-二甲氧基芬太尼和对甲氧基咪唑芬太尼[J].理化检验-化学分册,2020,56(8):923-926.

[4] Szeitz A, Riggs K W, Harvey-Clark C. Sensitive and selective for fentanyl using gas chromatography with mass selective detection [J]. J Chromatogr B, 1996, 675:33-42.

[5] 李芳,邸永辉,高金贵.气相色谱-质谱改良法测定血浆舒芬太尼浓度的建立[J].中华麻醉学杂志,2013,12(33):1464-1467.

[6] 阎仁信,石建忠,朱国玉.UPLC-MS/MS 检验尿液中 7 种芬太尼类物质[J].中国法医学杂志,2020,3(35):286-289.

[7] 罗耀,张建莹,黄昌雄,等.液相色谱-串联质谱法测定固体及液体药物中 27 种新型毒品芬太尼类物质[J].分析测试学报,2020,4(39):427-433.

[8] 施妍,强火生,刘伟,等.血液中 20 种芬太尼类物质 UPLC-MS/MS 法的建立及应用[J].法医学杂志,2019,35(4):411-418.

[9] 马金孝,吕淞,海克蓉.高效液相色谱法测定人血浆中芬太尼的浓度测定分析[J].宁夏医学杂志,2009,1(31):57-58.