

超高效合相色谱-质谱技术对芬太尼类物质异构体的快速分离和检测

胡爽^{1,2} 花镇东^{*3} 黄钰⁴ 程芳彬⁵ 刘耀^{*1}

¹(中国人民公安大学侦查学院, 北京 100038)

²(北京警察学院刑事科学技术系, 北京 102202)

³(公安部禁毒情报技术中心, 毒品监测管控与禁毒关键技术公安部重点实验室, 北京 100193)

⁴(中国药科大学药学院, 南京 210009) ⁵(中山市公安局刑事警察支队, 中山 528403)

摘 要 芬太尼类物质作为一类新型精神活性物质, 具有种类繁多、更新换代迅速、结构极其相似等特点, 对其同分异构体进行准确性分析是当前毒品分析工作面临的难题。超高效合相色谱法是实现同分异构体高效分离的有力手段, 基于此, 本研究建立了超高效合相色谱-质谱技术快速分离和检测芬太尼类物质的分析方法, 对分离过程中色谱柱、改性剂、柱温等条件进行了优化。在最优条件下, 采用 Waters ACQUITY UPC² BEH 色谱柱, 以超临界流体 CO₂ 为主要流动相、含 20 mmol/L 甲酸铵的甲醇为改性剂, 在柱温 50 °C 下进行梯度洗脱, 使用 Xevo TQD 三重四极杆质谱进行检测, 6.5 min 内即可实现 13 种芬太尼类物质的有效分离, 所有同分异构体的分离度均大于 1.5, 并且色谱峰对称性良好。方法的检出限为 0.01~0.05 ng/mL, 保留时间的相对标准偏差均小于 0.6%, 9 种常见毒品对 13 种目标物的测定没有干扰。与常规的超高效液相色谱-质谱检测方法相比, 本方法在异构体分离方面具有显著优势, 可满足当前公安禁毒部门对于芬太尼类物质准确性分析的需要。

关键词 超高效合相色谱; 质谱; 芬太尼类; 异构体; 新精神活性物质

芬太尼类物质(芬太尼及各种芬太尼类似物)是一类具有强效麻醉镇痛效果的合成阿片类药物。近年来, 除合法医疗使用的芬太尼、瑞芬太尼和舒芬太尼外, 不法分子设计合成出多种芬太尼类物质, 作为毒品非法销售, 当前世界各国查获的该类物质已达百余种。摄入过量的芬太尼类物质极易引起呼吸抑制致死。在全球范围, 特别是北美地区, 因滥用芬太尼类物质而致死人数逐年攀升, 严重危害人类身体健康和公共安全, 因而引起了各国高度关注^[1-2]。截至 2020 年 12 月, 联合国《1961 年麻醉品单一公约》附表已列入芬太尼及 26 种芬太尼类似物。我国已于 2019 年 5 月 1 日对芬太尼类物质实施整类列管。芬太尼母体结构中含有两个苯环和一个哌啶环, 通过在环上不同位置引入不同取代基, 可衍生出大量异构体, 很多异构体对人体有显著不同的药理作用。在司法实践中, 对异构体准确性是公安机关侦查破案的前提, 也是审判机关定罪量刑的依据。目前, 芬太尼类物质的主要检测方法有气相色谱-红外光谱法^[3]、毛细管电泳-质谱联用法^[4]、气相色谱-质谱法^[5-8]、液相色谱-质谱法^[7,9-10]和表面增强拉曼光谱法^[11]等。以上分析方法对于种类繁多、结构和性质相似的同分异构体的高效分离和鉴定具有一定局限性。

超高效合相色谱(UPC²)是在超临界流体色谱(SFC)的基础上发展起来的一种新的分离分析技术, 使用超临界流体 CO₂ 作为主要流动相, 其扩散系数和粘度更接近于气体, 可实现快速高效分离; 其密度又接近于液体, 因而具有较高的溶解能力, 可在室温条件下分离和分析热不稳定且相对分子质量较大的物质。近年来, UPC² 技术被广泛应用于食品^[12]、三唑类农药^[13]、维生素^[14]和双酚类化合物^[15]等的分离和测定。已有文献报道 UPC² 技术用于毒品的分离分析, 如 2015 年 Pauk 等^[16]采用 UPC² 技术实现了 11 种卡西酮类和 4 种苯乙胺类混合物的超快速分离(分析时间 ≤ 1.6 min); 2016 年 Breitenbach 等^[17]

2021-11-16 收稿; 2022-03-05 接受

北京市教育委员会科研计划项目(No. KM202114019001)和公安部科技强警基础工作专项项目(No. 2020GABJC21)资助。

* E-mail: 28008085@qq.com; Liuyao1123@aliyun.com

通过超高效合相色谱-质谱(UPC²-MS)技术分析了两组合成大麻素类的缴获毒品,结果表明,UPC²对于位置异构体和非对映异构体有很好的分辨率;2017年Carnes等^[18]分别使用UPC²、RP-UHPLC和GC方法分离了合成卡西酮类物质,并进行了比较;2020年Segawa等^[19]通过UPC²技术分离了6组合成卡西酮类的位置异构体,通过保留时间、紫外吸收光谱和质谱数据区分取代基和取代位置。

本研究对公安机关缴获毒品中较常见的13种芬太尼类物质进行快速分离和检测,其中包括5组12种同分异构体,涵盖了碳链异构体、位置异构体、顺反异构体等多种类型。通过条件优化,建立了13种目标物的UPC²-MS分析方法,并与常规的UPLC-MS分析方法进行比较。本研究系统地考察了芬太尼类物质异构体的UPC²行为,为公安禁毒部门准确定性检测芬太尼类物质提供了技术支持。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

ACQUITY UPC²超高效合相色谱仪(美国Waters公司),配备Xevo TQD三重四极杆质谱仪(美国Waters公司);UPLC-MS: ACQUITY UPLC I Class超高效液相色谱仪(美国Waters公司),配备Triple TOF 5600四极杆串联飞行时间质谱仪(美国AB Sciex公司);Milli-Q advantage A10超纯水装置(德国Merck公司);XS105DU电子天平(瑞士Mettler Toledo公司);KQ-600DE型超声清洗器(昆山市超声仪器有限公司)。

CO₂(纯度≥99.995%,北京氮普北分气体工业有限公司);甲醇、乙醇、乙腈、异丙醇和正己烷(色谱纯,德国Merck公司);甲酸(质谱纯,美国Fisher公司);氨水(上海安谱公司);甲酸铵盐(美国Honeywell公司);13种芬太尼类物质标准品(公安部第三研究所):(1)*N*-甲基芬太尼、(2)乙酰芬太尼、(3)*N*-苄基芬太尼、(4)芬太尼、(5)2-甲基乙酰芬太尼、(6)异丁酰芬太尼、(7)反式-3-甲基芬太尼、(8)顺式-3-甲基芬太尼、(9) α -甲基芬太尼、(10)2-氟芬太尼、(11)4-氟芬太尼、(12)4-氟异丁酰芬太尼和(13)4-氟丁酰芬太尼,其基本信息和化学结构式见电子版文后支持信息表S1和图S1。实验用水为超纯水(18.2 M Ω ·cm)。

1.2 标准溶液的配制

分别称取适量的13种芬太尼类物质标准品,用甲醇溶解并配制成1.0 mg/mL的标准储备溶液。使用时用异丙醇-正己烷(1:4, *V/V*)混合溶液稀释成系列浓度的标准溶液,供UPC²-MS分析;用0.1%(*V/V*)甲酸溶液稀释成系列浓度的标准溶液,供UPLC-MS分析。

1.3 色谱柱

ACQUITY UPC²色谱柱(美国Waters公司): BEH色谱柱(100 mm × 3.0 mm, 1.7 μ m, BEH柱)、CSH Fluoro-Phenyl色谱柱(100 mm × 3.0 mm, 1.7 μ m, FPH柱)、Torus 2-PIC色谱柱(100 mm × 3.0 mm, 1.7 μ m, 2-PIC柱)、HSS C₁₈SB色谱柱(100 mm × 3.0 mm, 1.8 μ m, C18柱)。ACQUITY UPLC色谱柱(美国Waters公司): BEH C₁₈色谱柱(100 mm × 2.1 mm, 1.7 μ m)。

1.4 色谱-质谱条件

1.4.1 UPC²-MS色谱条件

流动相A为超临界流体CO₂,流动相B为有机助溶剂,系统背压13.8 MPa,进样量5 μ L。梯度洗脱程序: 0.0~0.5 min, 98% A; 0.5~7.5 min, 98%~90% A; 7.5~8.5 min, 90%~80% A; 8.5~8.6 min, 80%~98% A; 8.6~10.0 min, 98% A。流速2 mL/min。

1.4.2 UPC²-MS质谱条件

电喷雾离子源正离子模式(ESI⁺),毛细管电压为3.3 kV,补偿液为0.25 mL/min甲醇,脱溶剂气温度400 $^{\circ}$ C,脱溶剂气流量600 L/h,锥孔气流量50 L/h。采集模式为多反应监测模式(MRM),相应的离子对、锥孔电压及碰撞能量通过Waters IntelliStart软件自动优化得到(见电子版文后支持信息表S1)。

1.4.3 UPLC-MS条件

柱温40 $^{\circ}$ C,流动相A为0.1%(*V/V*)甲酸溶液,流动相B为乙腈。采用梯度洗脱程序: 0.0~3.0 min,

95%~70% A; 3.0~3.2 min, 70%~60% A; 3.2~9.0 min, 60% A; 9.0~9.1 min, 60%~95% A; 9.1~10.0 min, 95% A。流速 0.4 mL/min。质谱采用电喷雾离子源正离子模式 (ESI⁺) ; MS1: TOF 全扫描模式, 质量扫描范围 m/z 100~1000; MS2: 二级碰撞诱导解离 (CID) 模式, 质量扫描范围 m/z 50~1000。

1.5 实际样品处理和分析

将实际案件中缴获的毒品充分研磨成均匀的粉末状, 称取约 1 mg 样品于具盖离心管中, 加入 1 mL 甲醇, 密封并振荡 10 min, 以 4000 r/min 离心 5 min, 取上清液作为样品溶液, 再用异丙醇-正己烷 (1:4, V/V) 混合溶液稀释至 0.1 $\mu\text{g/mL}$, 直接进样分离与分析。

2 结果与讨论

本研究考察的 13 种芬太尼类物质中包含 5 组 12 种同分异构体, 其中, 物质 (7) 和 (8) 为顺反异构体, 物质 (10) 和 (11) 为苯环分别存在邻位和对位氟取代的位置异构体, (12) 和 (13) 为异丁酰基和丁酰基的碳链异构体, 这 6 种物质的二级质谱碎片离子及丰度高度相似^[20], 难以通过质谱进行区分, 因此色谱分离对于准确鉴别这些物质具有重要意义。固定相、改性剂、柱温、系统背压、流速和洗脱梯度等因素都会对 UPC² 的分离效果产生影响, 其中, 固定相、改性剂和柱温的影响较大。因此, 本研究详细考察了 4 种色谱柱、5 种改性剂和 3 种柱温条件下, 13 种芬太尼类物质的 UPC² 分离效果。

2.1 色谱柱的选择

以同分异构体分离度 R ($R \geq 1.5$ 为基线分离、 $1 \leq R < 1.5$ 为基本分离、 $R < 1$ 为未分离)、峰对称性 (拖尾因子在 0.8~1.4 区间, 为对称峰)、半峰宽 (色谱峰高 1/2 处的峰宽度) 和分析时间 (最后一个物质的洗脱时间) 为评价指标, 在柱温为 40 $^{\circ}\text{C}$ 、改性剂为含 20 mmol/L 甲酸铵的甲醇或含 0.2% 氨水的甲醇的条件下, 考察了 4 种 UPC² 色谱柱的分离效果, 结果见表 1 和图 1。

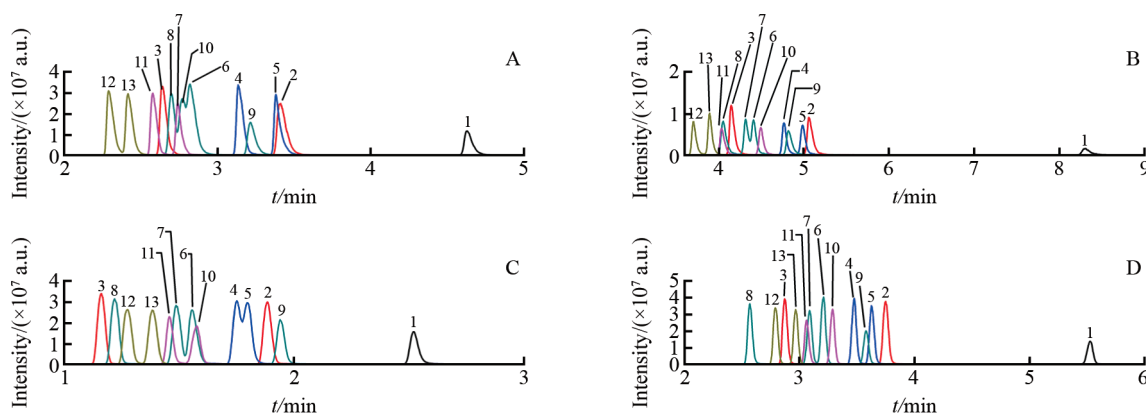


图 1 不同色谱柱对芬太尼类物质分离的色谱图: (A) FPH 柱; (B) C_{18} 柱; (C) 2-PIC 柱; (D) BEH 柱。分离条件如表 1 所示

1. *N*-甲基芬太尼, 2. 乙酰芬太尼, 3. *N*-苄基芬太尼, 4. 芬太尼, 5. 2-甲基乙酰芬太尼, 6. 异丁酰芬太尼, 7. 反式-3-甲基芬太尼, 8. 顺式-3-甲基芬太尼, 9. α -甲基芬太尼, 10. 2-氟芬太尼, 11. 4-氟芬太尼, 12. 4-氟异丁酰芬太尼, 13. 4-氟丁酰芬太尼

Fig.1 Chromatograms of fentanyls on various chromatographic columns: (A) FPH column; (B) C_{18} column; (C) 2-PIC column; (D) BEH column. The conditions of separation are shown in Table 1

1. *N*-Methylfentanyl, 2. Acetylfentanyl, 3. Benzylfentanyl, 4. Fentanyl, 5. 2-Methylacetylfentanyl, 6. Isobutyrfentanyl, 7. *trans*-3-Methylfentanyl, 8. *cis*-3-Methylfentanyl, 9. α -Methylfentanyl, 10. 2-Fluorofentanyl, 11. 4-Fluorofentanyl, 12. 4-Fluoro-isobutyryl fentanyl (FIBF), 13. 4-Fluorobutyrfentanyl

使用 FPH 柱分离时 (图 1A), (6) 异丁酰芬太尼、(7) 反式-3-甲基芬太尼和 (8) 顺式-3-甲基芬太尼这 3 种异构体的分离效果较差, 色谱峰有轻微的拖尾现象。使用 C_{18} 柱分离时 (图 1B), (6) 异丁酰芬太尼和 (7) 反式-3-甲基芬太尼未能分离 ($R < 1$), 大多数色谱峰有轻微的拖尾现象。使用 2-PIC 柱分离时 (图 1C), (4) 芬太尼和 (5) 2-甲基乙酰芬太尼未能分离 ($R < 1$), (6) 异丁酰芬太尼和 (7) 反式-3-甲基芬太尼未能基线分离 ($1 \leq R < 1.5$)。使用 2-PIC 色谱柱分离时, 所有目标物保留均较弱, 推测原因

是其键合相为 2-氨基甲基吡啶，与碱性目标物有电荷排斥作用。使用 BEH 色谱柱时的分离效果最佳（图 1D），5 组 12 种异构体都可基线分离($R \geq 1.5$)，13 种物质全部得到对称的峰，最快在 5.6 min 内即可完成分析过程，说明此色谱柱的固定相亚乙基杂化硅胶对芬太尼类物质具有更好的保留能力和选择性，因此，后续实验均使用 BEH 柱进行分离检测。

表1 不同色谱柱对芬太尼类物质的色谱分离结果

Table 1 Chromatographic separation results of fentanyl on various chromatographic columns

序号 No.	色谱柱 Column	改性剂 Modifier	温度 Temperature (°C)	峰数量 Number of peaks	$R \geq 1.5$	$1 \leq R < 1.5$	$R < 1$	对称峰数量 Number of symmetric peaks	半峰宽 Half width (min)	分析时间 Analysis time (min)
1	FPH	甲醇+0.2%的氨水 0.2% Ammonium hydroxide in methanol	40	13	9	0	3	0	0.0491	4.63
2	C18	甲醇+0.2%的氨水 0.2% Ammonium hydroxide in methanol		13	10	0	2	1	0.0628	8.31
3	2-PIC	甲醇+20 mmol/L 甲酸铵 20 mmol/L Ammonium formate in methanol		13	8	2	2	9	0.0395	2.52
4	BEH	甲醇+0.2%的氨水 0.2% Ammonium hydroxide in methanol		13	12	0	0	13	0.0476	5.52

2.2 改性剂和柱温的影响

超临界流体 CO₂ 的极性太弱，对一些极性化合物的溶解能力差，为了增加流动相对极性化合物的溶解和洗脱能力，通常向 CO₂ 中加入少量（1%~5%）极性溶剂，这类极性溶剂称为改性剂。改性剂在合相色谱流动相中所占比例较低，但对色谱行为有较大影响，能显著影响分析物的保留时间、分离度和峰形。本研究采用 BEH 柱，在柱温 40 °C 条件下，比较了 5 种改性剂（含 20 mmol/L 甲酸铵的甲醇、含 0.2% 氨水的甲醇、含 20 mmol/L 甲酸铵的乙醇、含 0.2% 氨水的乙醇、含 0.2% 氨水的乙腈）的分离效果，结果见表2中1~5，相关色谱图见图 2。由表 2 可知，采用甲醇时洗脱速度最快，乙醇次之，而使

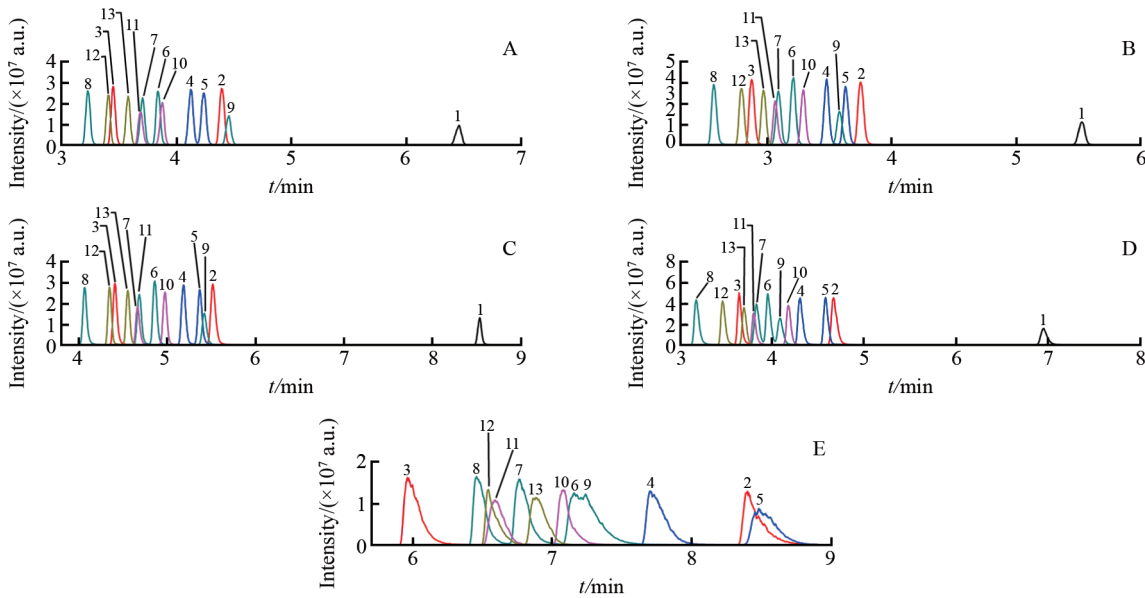


图2 使用BEH色谱柱、40 °C时，不同改性剂对芬太尼类物质分离效果的影响：(A) 甲醇+20 mmol/L 甲酸铵；(B) 甲醇+0.2%的氨水；(C) 乙醇+20 mmol/L 甲酸铵；(D) 乙醇+0.2%的氨水；(E) 乙腈+0.2%的氨水。序号1~13对应的物质同图1

Fig.2 Influence of different modifiers on separation of fentanyl using BEH column at 40 °C: (A) 20 mmol/L ammonium formate in methanol; (B) 0.2% ammonium hydroxide in methanol; (C) 20 mmol/L ammonium formate in ethanol; (D) 0.2% ammonium hydroxide in ethanol; (E) 0.2% ammonium hydroxide in acetonitrile. 1–13 correspond to the substances as in Fig.1

用乙腈时保留时间显著增加，并且出现明显拖尾，峰宽增大。添加 0.2% 氨水与添加 20 mmol/L 甲酸铵相比，保留时间明显缩短，这是由于添加氨水后，芬太尼类物质去质子化，极性减弱，因而更快地被洗脱出来。总之，除含 0.2% 氨水的乙腈外，其余4种改性剂均获得了较理想的结果，所有异构体都能完全或基本分离。考虑到氨水易挥发，导致流动相组成发生变化，影响保留时间的重现性，而乙醇相对甲醇分析耗时更长，因此，本研究选择含 20 mmol/L 甲酸铵的甲醇作为改性剂。

表2 不同改性剂和不同柱温条件下BEH柱对芬太尼类物质的色谱分离结果
Table 2 Chromatographic separation results of fentanyl using BEH column with different modifiers and column temperatures

序号 No.	改性剂 Modifier	温度 Temperature (°C)	峰数量 Number of peak	$R \geq 1.5$	$1 \leq R < 1.5$	$R < 1$	对称峰数量 Number of symmetric peak	半峰宽 Half width (min)	分析时间 Analysis time (min)
1	甲醇+0.2%的氨水 0.2% Ammonium hydroxide in methanol	40	13	12	0	0	13	0.0476	5.52
2	乙醇+0.2%的氨水 0.2% Ammonium hydroxide in ethanol	40	13	9	3	0	5	0.0566	6.95
3	乙醇+20 mmol/L 甲酸铵 20 mmol/L Ammonium formate in ethanol	40	13	12	0	0	13	0.0518	8.53
4	乙腈+0.2%的氨水 0.2% Ammonium hydroxide in acetonitrile	40	12	10	0	2	0	0.1141	8.48
5	甲醇+20 mmol/L 甲酸铵 20 mmol/L Ammonium formate in methanol	40	13	10	2	0	13	0.0469	6.46
6		50	13	12	0	0	13	0.0446	6.36
7		60	13	10	2	0	11	0.0432	6.28

柱温是 UPC² 中影响色谱行为的另一个重要因素，可影响同分异构体的分离度和分析物的保留性能。通常，随着柱温升高，超临界流体 CO₂ 的密度降低，洗脱能力减弱，从而使保留时间延长。但实际上，温度对不同分析物的影响方式不尽相同。考察了 3 种柱温（40、50 和 60 °C）下的分离情况，结果见表 2 中 5~7。随着柱温升高，除（1）*N*-甲基芬太尼外，其它物质的保留时间均延长；（6）异丁酰芬太尼和（7）反式-3-甲基芬太尼、（6）异丁酰芬太尼和（9） α -甲基芬太尼这两组异构体的分离度呈下降趋势，其它异构体的分离度呈上升趋势。当柱温为 50 °C 时，所有同分异构体均得到完全分离，因此，选择最佳柱温为 50 °C。

综上，优化的 UPC² 条件为：使用 BEH 色谱柱，以含 20 mmol/L 甲酸铵的甲醇为改性剂，柱温 50 °C。在此条件下，13 种目标物的混合标准溶液浓度为 200 ng/mL 时，异构体的色谱分离效果见图 3。

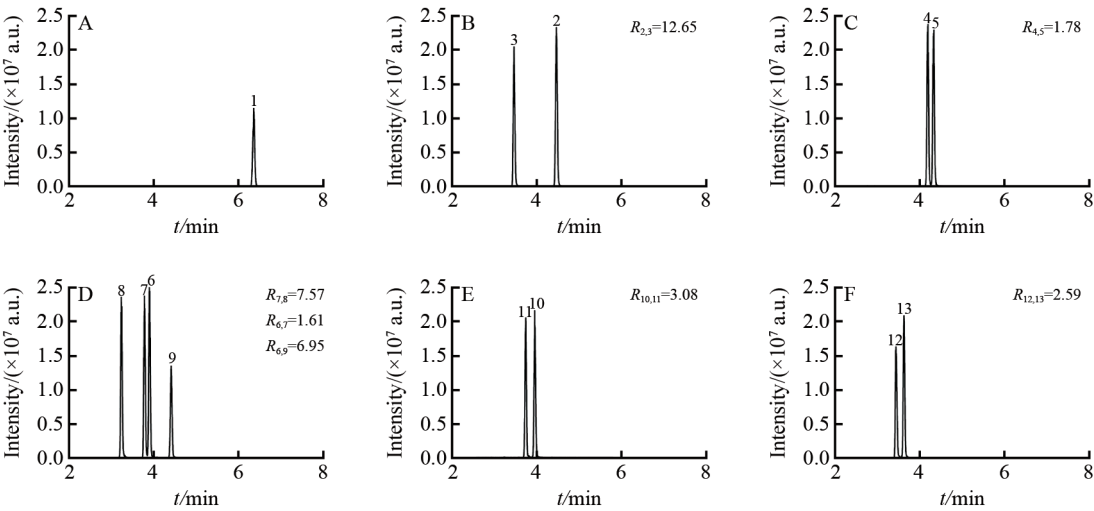


图3 最佳条件下13种芬太尼类物质分离的色谱图，序号1~13对应的物质同图1
Fig.3 Separation chromatograms of 13 kinds of fentanyl under optimal conditions. 1-13 correspond to the substances as in Fig.1

2.3 化合物分子结构与保留时间的关系

UPC² 的分离原理类似正相色谱, 流动相的极性小于固定相, 因此物质的极性越强, 通常洗脱时间越长^[16], 13 种芬太尼类物质的洗脱顺序也基本符合此规则。*N*-甲基芬太尼的哌啶环N原子上仅有甲基, 极性强于哌啶环N上连接苄基或苯乙基的其它芬太尼类物质, 因此, 在所有色谱条件下均在最后被洗脱出来。异丁酰芬太尼、芬太尼、乙酰芬太尼的酰基碳链依次缩短, 极性增强, 保留时间也依次增加。反式-3-甲基芬太尼和顺式-3-甲基芬太尼与芬太尼相比, 哌啶环上有甲基取代极性更弱, 因此二者保留均弱于芬太尼。苯环上存在氟取代的 2-氟芬太尼、4-氟芬太尼和 4-氟异丁酰芬太尼的保留时间均小于对应的无取代基的芬太尼和异丁酰芬太尼, 这可能是由于氟苯基吸电子能力强于苯基, 导致与苯环相连的氮原子的碱性变弱, 极性降低。值得注意的是, 苄基芬太尼与芬太尼相比, 取代基少一个亚甲基, 一般认为极性应更强, 但在实际测试中, 苄基芬太尼的保留时间要小于芬太尼, 这可能是由于苄基芬太尼分子结构中苯基离哌啶环上的N原子更近, 对其孤对电子的吸引更强, 导致其极性更弱。

2.4 UPC²-MS与UPLC-MS分析结果的比较

采用UPLC BEH C₁₈ 色谱柱对 13 种芬太尼类物质进行分离, 并优化梯度洗脱程序, 使这些物质的出峰时间位于与 UPC² 类似的 3~6 min 区间, 色谱图如图 4A 所示。(6) 异丁酰芬太尼、(7) 反式-3-甲基芬太尼、(8) 顺式-3-甲基芬太尼和 (9) α -甲基芬太尼这组异构体, 以及 (10) 2-氟芬太尼和 (11) 4-氟芬太尼这组异构体完全未分离, 而其余 3 组异构体也仅有部分分离, 说明UPLC对于13种芬太尼类物质异构体的分离效果远不及 UPC²。虽然使用更平缓的UPLC洗脱梯度有可能获得更好的分离效果, 但耗时更长, 由此导致的峰展宽也会使灵敏度降低, 从而影响方法的实用性。应用 UPC² 和 UPLC 两种色谱方法, 在最佳实验条件下得到的 13 种芬太尼类物质的保留时间数据进行线性拟合, 结果呈现显著正交分布规律 ($R^2=0.59$), 如图 4B 所示, 表明这两种色谱方法选择性差异大, 具有较好的互补性。

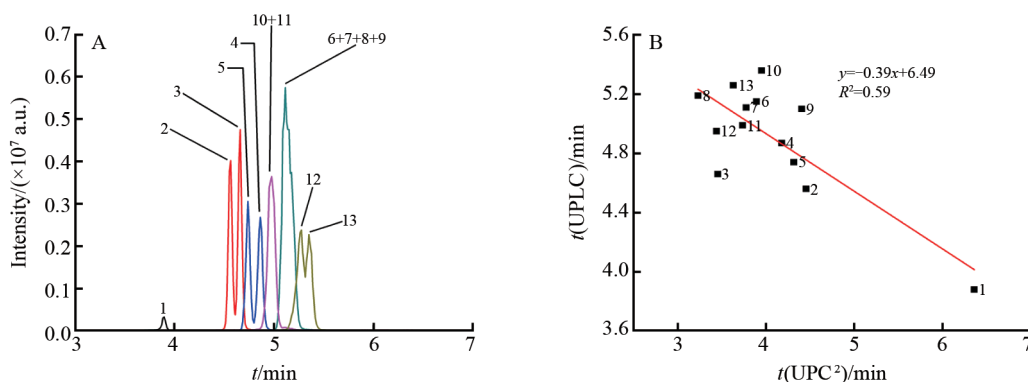


图4 最佳UPLC-MS条件下芬太尼类物质分离的色谱图(A)以及与UPC²的正交性评价图(B), 序号1~13对应的物质同图1

Fig.4 (A) Separation chromatogram of fentanyls under optimal conditions of UPLC-MS and (B) orthogonal evaluation with UPC². 1–13 correspond to the substances as in Fig.1

2.5 方法学指标评价

配制 13 种芬太尼类物质的系列浓度标准溶液, 在最优条件下进行 UPC²-MS 测试, 以所选的MRM通道色谱峰信噪比大于3为标准, 各物质的检出限在 0.01~0.05 ng/mL 之间。200、5 和 0.1 ng/mL 浓度水平下各物质保留时间的平均值和相对标准偏差 (RSD, $n=6$) 见表 3。结果表明, 同一浓度下 13 种目标物的保留时间 RSD < 0.6%, 保留时间随浓度变化小于 1.45%。同时, 考察了 9 种毒品 (甲基苯丙胺、氯胺酮、海洛因、曲马多、地芬诺酯、丁丙诺啡、咖啡因、羟考酮和 3,4-亚甲二氧基苯丙胺) 及掺杂剂对测定结果的影响, 发现均未干扰各芬太尼类物质的检测。以上结果说明, 本方法的专属性强、灵

敏度高、重复性良好，可满足芬太尼类物质定性检测的需求。

表3 13种芬太尼类物质的方法学指标评价

Table 3 Methodological index evaluation of 13 kinds of fentanyl analogues

序号 No.	化合物 Compound	检出限 LOD (ng/mL)	保留时间 RT (min)			RSD (% , n=6)		
			0.1 ng/mL	5 ng/mL	200 ng/mL	0.1 ng/mL	5 ng/mL	200 ng/mL
1	N-甲基芬太尼 N-Methylfentanyl	0.02	6.25	6.30	6.30	0.15	0.06	0.05
2	乙酰芬太尼 Acetylfentanyl	0.05	4.28	4.37	4.37	0.13	0.10	0.10
3	N-苄基芬太尼 Benzylfentanyl	0.02	3.28	3.35	3.35	0.41	0.28	0.08
4	芬太尼 Fentanyl	0.02	4.05	4.13	4.09	0.30	0.14	0.07
5	2-甲基乙酰芬太尼 2-Methylacetylfentanyl	0.05	4.15	4.23	4.23	0.24	0.16	0.10
6	异丁酰芬太尼 Isobutyrfentanyl	0.02	3.73	3.80	3.80	0.37	0.25	0.11
7	反式-3-甲基芬太尼 trans-3-Methylfentanyl	0.02	3.59	3.67	3.67	0.53	0.15	0.12
8	顺式-3-甲基芬太尼 cis-3-Methylfentanyl	0.02	3.04	3.12	3.12	0.58	0.28	0.22
9	α-甲基芬太尼 α-Methylfentanyl	0.02	4.21	4.30	4.30	0.28	0.11	0.09
10	2-氟芬太尼 2-Fluorofentanyl	0.01	3.78	3.85	3.85	0.27	0.15	0.11
11	4-氟芬太尼 4-Fluorofentanyl	0.01	3.54	3.63	3.62	0.27	0.20	0.07
12	4-氟异丁酰芬太尼 4-Fluoro-isobutyryl fentanyl	0.05	3.26	3.34	3.34	0.32	0.34	0.09
13	4-氟丁酰芬太尼 4-Fluorobutyrfentanyl	0.05	3.44	3.52	3.52	0.39	0.30	0.16

2.6 实际样品分析

采用本方法对各地缴获的可疑芬太尼类物质进行检测，共检测了 10 个样品。结果表明，5 个样品检测出芬太尼类物质，其中，样品 1、2 和 3 均检测出乙酰芬太尼，样品 4 检测出 4-氟异丁酰芬太尼和 4-氟丁酰芬太尼，样品 5 检测出异丁酰芬太尼（Isobutyrfentanyl）、4-氟芬太尼（4-Fluorofentanyl）和 4-氟异丁酰芬太尼（4-FIBF）。由样品 5 的色谱图（图 5）可知，4-氟异丁酰芬太尼的含量远高于异丁酰芬太尼和 4-氟芬太尼，推测其原因可能是在生产加工过程中，作为原料的 4-氟苯胺中含有微量未氟代的苯胺，以及异丁酰氯中含有微量丙酰氯所产生的副产物。

3 结论

采用 UPC²-MS 联用技术分离并检测了 13 种芬太尼类物质。UPC² 固定相和流动相具有选择多样性，可根据目标物的属性进行优化，色谱柱使用小颗粒填料，从而提高了分离效率、分离度和灵敏

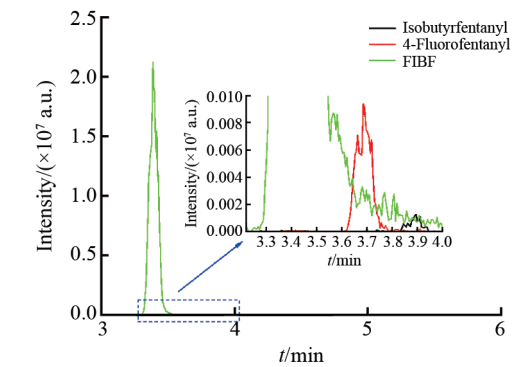


图5 实际缴获毒品中芬太尼类物质的色谱图
Fig.5 Chromatograms of fentanyls in real samples

度。在分离条件方面, 固定相是影响色谱分离的关键因素, 改性剂和柱温对于分析物的保留时间和异构体分离具有较大的影响。UPC²-MS 技术具有专属性强、灵敏度高、重复性好、快速简便和绿色环保等优势, 与常规的超高效液相色谱-质谱检测方法相比, 在位置异构体和顺反异构体分离方面具有显著优势。UPC²-MS 技术在新精神活性物质检测方面具有广阔的应用前景, 可成为传统检测技术的有力补充, 在检测实际案件缴获毒品和生物检材时, 可采取两种以上的色谱方法相互印证, 以确保检测结果的科学性、可靠性和准确性。

References

- [1] VARDANYAN R S, HRUBY V J. *Future Med. Chem.*, 2014, 6(4): 385-412.
- [2] MOUNTENEY J, GIRAUDON I, DENISSOV G, GRIFFITHS P. *Int. J. Drug Policy*, 2015, 26(7): 626-631.
- [3] SUZUKI S. *Forensic Sci. Int.*, 1989, 43(1): 15-19.
- [4] RITTGEN J, PUTZ M, ZIMMERMANN R. *Electrophoresis*, 2012, 33(11): 1595-1605.
- [5] GILBERT N, ANTONIDES L H, SCHOFIELD C J, COSTELLO A, KILKELLY B, CAIN A R, DALZIEL P R V, HORNER K, MEWIS R E, SUTCLIFFE O B. *Drug Test. Anal.*, 2020, 12(6): 798-811.
- [6] ROJKIEWICZ M, MAJCHRZAK M, CELINSKI R, KUS P, SAJEWICZ M. *Drug Test. Anal.*, 2017, 9(3): 405-414.
- [7] KANAMORI T, IWATA Y T, SEGAWA H, YAMAMURO T, KUWAYAMA K, TSUJIKAWA K, INOUE H. *J. Forensic Sci.*, 2017, 62(6): 1472-1478.
- [8] BUCHALTER S, MARGINEAN I, YOHANNAN J. *J. Chromatogr. A*, 2019, 1596: 183-193.
- [9] LURIE I S, IIO R. *J. Chromatogr. A*, 2009, 1216(9): 1515-1519.
- [10] BUSARDO F P, CARLIER J, GIORGETTI R, TAGLIABRACCI A, PACIFICI R, GOTTARDI M, PICHINI S. *Front. Chem.*, 2019, 7(2): 184-197.
- [11] SALEMMILANI R, MOSKIVITS M, MEINHART C D. *Analyst*, 2019, 144(2): 3080-3087.
- [12] BERNAL J L, MARTIN M T, TORIBIO L. *J. Chromatogr. A*, 2013, 1313(SI): 24-36.
- [13] ZHANG Wen-Hua, XIE Wen, HOU Jian-Bo, CHEN Qin-Ke, LI Shu-Min, ZHU Ze-Long, ZOU Xue-Quan, XU Dun-Ming. *Chin. J. Chromatogr.*, 2019, 37(12): 1356-1362.
张文华, 谢文, 侯建波, 陈钦可, 李淑敏, 祝泽龙, 邹学权, 徐敦明. *色谱*. 2019, 37(12): 1356-1362.
- [14] ZHOU Wei, WANG Bo, LIU Qian-Qian, YANG Sheng-Xin, WANG Li-Ting. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2015, 43(1): 115-120.
周围, 王波, 刘倩倩, 杨盛鑫, 王丽婷. *分析化学*, 2015, 43(1): 115-120.
- [15] QIU Yue, LI Gen-Rong, LONG Mei, RUAN Yan, TAN Chao-Lan, ZHANG Lu, XIA Zhi-Ning. *Chin. J. Anal. Chem.*, 2020, 48(2): 255-261.
邱月, 李根容, 龙梅, 阮燕, 谭超兰, 张璐, 夏之宁. *分析化学*, 2020, 48(2): 255-261.
- [16] PAUK V, ZIHLOVA V, BOROVCOVA L, HAVLICEK V, SCHUG K, LEMR K. *J. Chromatogr. A*, 2015, 1423: 169-176.
- [17] BREITENBACH S, ROWE W F, MCCORD B. *J. Chromatogr. A*, 2016, 1440: 201-211.
- [18] CARNES S, BRIEN S, SZEWCZAK A, TREMEAU C L, ROWE W F, MCCORD B, LURIE I S. *J. Sep. Sci.*, 2017, 40(17): 3545-3556.
- [19] SEGAWA H, KUSAKABE K, ISHII A, KATO N, IWATA Y T, YAMAMURO T, KANAMORI T. *Anal. Sci. Adv.*, 2020, 1(1): 22-33.
- [20] HUA Zhen-Dong, JIA Wei, LIU Cui-Mei, QIAN Zhen-Hua. *Handbook of New Psychoactive Substance Analysis-Mass Spectrometry (Second Edition)*. Beijing: People's Public Security University of China Press, 2019: 529-561.
花镇东, 贾薇, 刘翠梅, 钱振华. *新精神活性物质分析手册-质谱分册 (第二版)*. 北京: 中国人民公安大学出版社, 2019: 529-561.

Fast Separation and Detection of Fentanyl Isomers by Ultra Performance Convergence Chromatography-Mass Spectrometry

HU Shuang^{1,2}, HUA Zhen-Dong^{*3}, HUANG Yu⁴, CHENG Fang-Bin⁵, LIU Yao^{*1}

¹(School of Criminal Investigation, People's Public Security University of China, Beijing 100038, China)

²(Department of Criminal Science and Technology, Beijing Police College, Beijing 102202, China)

³(Key Laboratory of Drug Monitoring and Control, Anti-Drug Information Technology Center of the Ministry of Public Security, Beijing 100193, China)

⁴(School of Pharmacy, China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China)

⁵(Zhongshan Public Security Bureau Criminal Detachment, Zhongshan 528403, China)

Abstract As a new class of psychoactive substances, fentanyl isomers have the characteristics of wide variety, rapid replacement and extremely similar structures. The accurate identification of their isomers is a major problem faced by drug analysts. Ultra performance convergence chromatography is a powerful tool to achieve efficient separation of isomers. Therefore, a new method was established for fast separation and detection of fentanyl isomers by ultra performance convergence chromatography-mass spectrometry in this work. The separation conditions of the chromatographic column, modifiers and column temperature were optimized. The separation and detection was conducted on Waters ACQUITY UPC² BEH column with supercritical fluid CO₂ as primary mobile phase, methanol containing 20 mmol/L ammonium formate as the modifier, column temperature at 50 °C and a Xevo TQD triple quadrupole as mass spectrometer. A total of 13 kinds of fentanyl isomers were completely separated within 6.5 min with an above 1.5-resolution to all the isomers. The chromatographic peaks were perfectly symmetric. Methodological statistics showed that, 9 kinds of common drugs did not interfere with the determination of 13 kinds of target substances; the detection limits were 0.01–0.05 ng/mL and the relative standard deviations of the retention time were less than 0.6%. Compared with the conventional ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry detection method, this method had significant advantages in the separation of isomers, which fully met the anti-drug public security departments' needs for the accurate identification of fentanyl isomers.

Keywords Ultra performance convergence chromatography; Mass spectrometry; Fentanyl isomers; New psychoactive substances

(Received 2021-11-16; accepted 2022-03-05)

Supported by the Scientific Research Project of Beijing Municipal Education Commission (No. KM202114019001) and the Science and Technology to Strengthen Basic Work Project of Ministry of Public Security (No. 2020GABJC21).