

表征新兴芬太尼类似物的开创性工具

SCIEX X500R QTOF 系统非靶向筛查工作流程

Oscar G. Cabrices¹、Xiang He¹、Alex J. Krotulski² 和 Adrian M. Taylor³

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

芬太尼及其衍生类似物的持续滥用仍然是严重的公共健康和安全问题。随着芬太尼及其类似物更多地进入街头药店，过量摄入这些化合物导致的死亡人数在不断上升^[1-2]。

芬太尼类似物是暗中合成以产生类似于芬太尼精神药物效应的化合物。这些类似物的分子结构往往略有不同，因此研究人员使用传统的筛查方法（如免疫测定法或 GC-MS）难以有效地筛查。高分辨率质谱（HRMS）为公安法医实验室提供了可靠而快速的工具来分析新兴药物：包括阿片类药物、芬太尼及其类似物。

而且，公安法医实验室使用 HRMS 是必要的，它可以对法医扣押的药物制剂或生物样品中发现的潜在芬太尼类似物提供更全面的化学表征（如分子式查找、分子结构解析），从而支持现场权威调查。

本文介绍了用于鉴定法医生物样品中全新芬太尼类似物的非靶向筛查工作流程。使用 SCIEX X500R QTOF 系统结合 SCIEX OS 软件分子式查找工具和 ChemSpider 数据库搜索，大大简化了此工作流程。

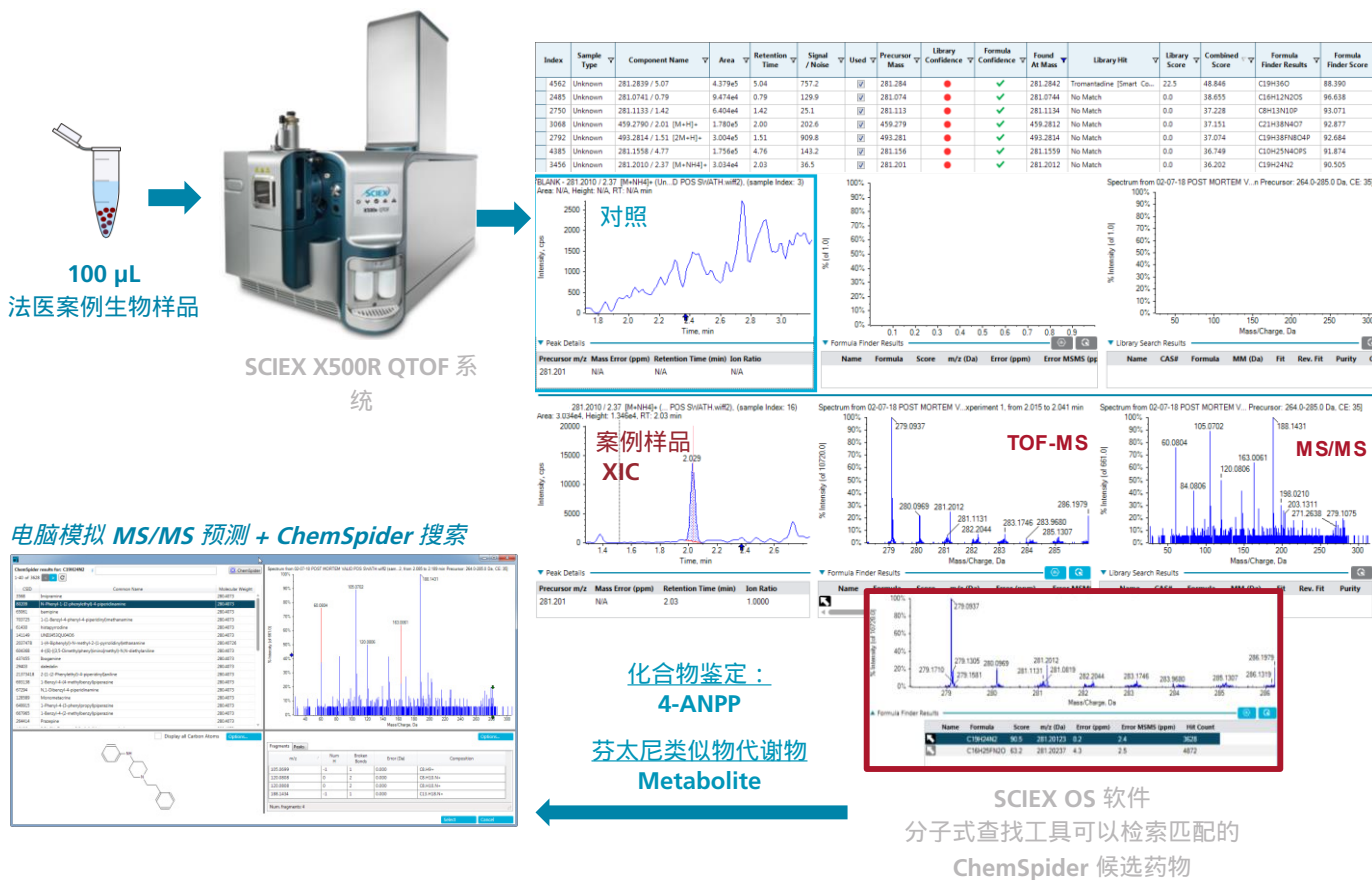


图1. 可靠地鉴定未知尸检血样中是否存在芬太尼类似物。利用在 SCIEX OS 软件进行非靶向筛查的数据分析的工作流程。XIC 由非靶向寻峰算法生成，对照样品比较用于鉴定相关和不同的色谱特征。经验式分子式查找和 ChemSpider 搜索用于更准确地鉴定法医样品中的化合物。TOF-MS 和 MS/MS 质谱数据用于鉴定尸检血样中芬太尼类似物4-ANPP，以及芬太尼类似物或其代谢物。

SCIEX X500R QTOF 系统用于鉴定全新芬太尼类似物的功能

- X500R QTOF 系统采集高分辨率 MS 数据来快速鉴定滥用药物，包括法医样品中的芬太尼及其类似物。
- SCIEX OS 软件利用整合的谱库搜索功能、分子式查找工具和碎裂预测工具协助对未知化合物进行质谱数据解析和结构剖析，帮助用户更加可靠地快速鉴定未知化合物。
- 这一革命性的 QTOF 技术与 SCIEX OS 软件相结合，为公安法医提供了简便的工具来检测法检目标样品中的每种化合物。

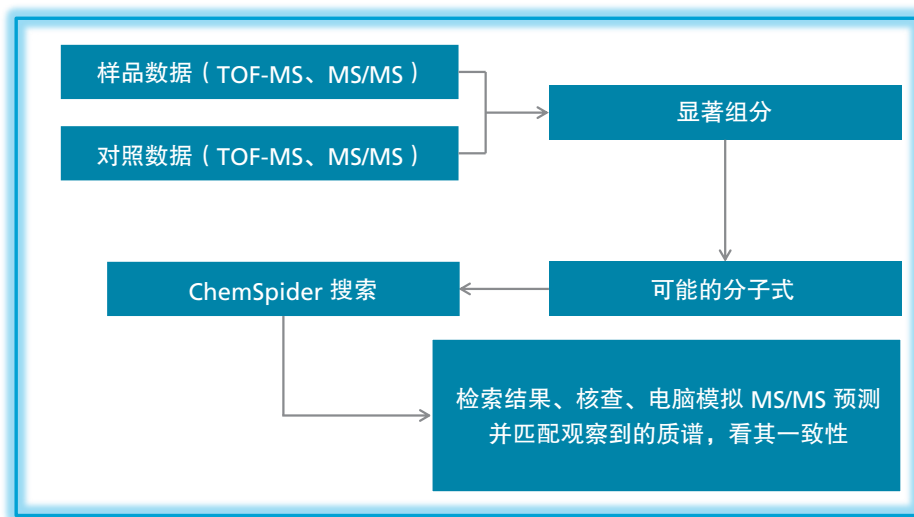


图2. 简化的全新芬太尼类似物发现流程。SCIEX OS 软件中的分子式查找功能使用质量精度和同位素模式计算可能的分子式。计算理论精确质量碎片并与 MS/MS 质谱对比，以减少匹配的分子式列表。最后，软件算法查找其他加合物形态以预测无电荷分析物的正确分子式，使用 TOF-MS 与 MS/MS 综合得分获得最高匹配度的结果。

实验方法

样品制备：法医尸检血样使用蛋白沉淀萃取，法医尿样则进行离心处理和稀释以供分析。

LC-MS/MS 仪器：SCIEX Exion LC AC和X500R QTOF系统。色谱柱：Phenomenex Kinetex Phenyl-Hexyl；数据采集：SWATH数据采集方法，同时获得TOF MS和MS/MS数据

数据分析：使用 SCIEX OS 软件进行非靶向处理，并根据两种不同的置信度标准进行分析物鉴定：分子式查找和谱库得分。然后，根据这两种置信度类别，使用自定义加权计算综合得分。

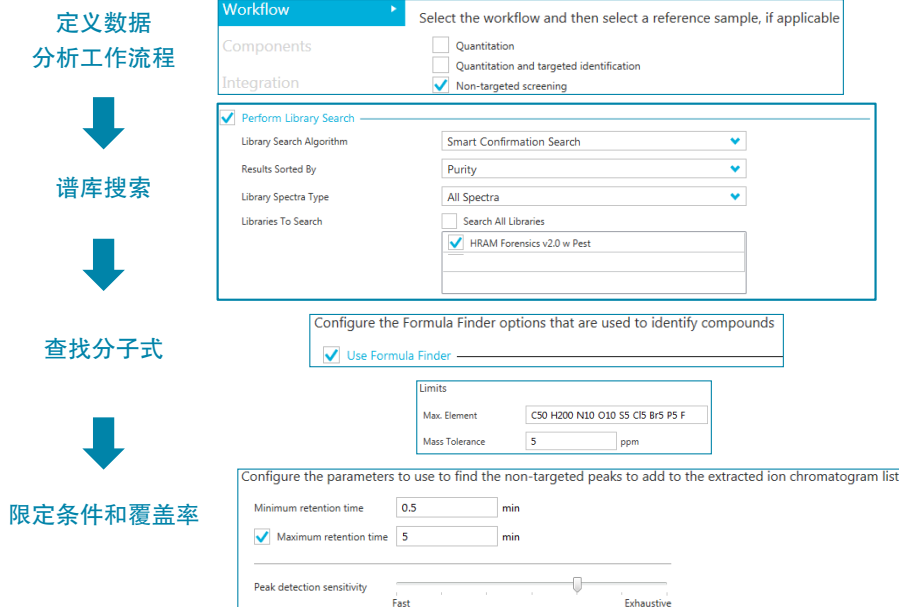


图3. SCIEX OS 软件提供直接的数据分析。通过定义三个参数可以轻松地编程非靶向数据处理：谱库搜索算法、基于指定元素的分子式查找和峰值检测灵敏度，检索法医样品中的所有可能的化合物。

高质量 MS/MS 采集保证可靠的芬太尼类似物表征

了解芬太尼的核心分子结构及其生成的 MS/MS 碎片模式，是鉴定现场出现的新类似物的关键。

图 4 显示了芬太尼的结构 ($C_{22}H_{28}N_2O$) 及产生的精确质量 MS/MS 碎片离子。芬太尼的化学修饰经常通过取代结构的苯乙基、哌啶、苯胺和/或丙酰胺部分来进行，产生潜在位置异构体和结构上可变的种类，其中许多会保留现有的或更加有害的阿片类药物属性。

这些修饰使得这类化合物的表征变得复杂^[3]，但由于可重现和可预测的碎裂模式，对确定是否存在类似物核心结构极为有用。

SCIEX X500R QTOF 系统生成全面的高质量 MS/MS 质谱数据，促进化合物碎裂，从而对全新阿片类药物芬太尼类似物进行可靠的鉴定。图 5 显示了疑似含有芬太尼类似物的法医尿样的 XIC 和 TOF-MS 质谱。

在 2.56 分钟时发现强峰 (371.2128 Da)。根据 TOF-MS 数据生成的同位素模式使用分子式查找功能，可以推测出候选化合物的

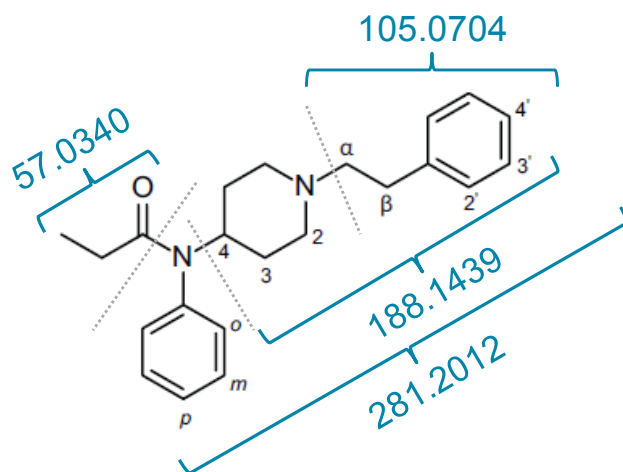


图4. 芬太尼核心产生用于类似物表征和鉴定的关键 MS/MS 碎片。四个碎片离子已被用作鉴定法医样品中新兴芬太尼物质的重要组成部分。

的分子式。最佳拟合分子式是 $C_{22}H_{27}N_2O_2F$ ，它类似于芬太尼中的元素组成，表明存在芬太尼类似物SWATH® 采集所生成的高质量 MS/MS 碎片可用于进一步鉴定法医尿样中的芬太尼类似物。

法医尿样

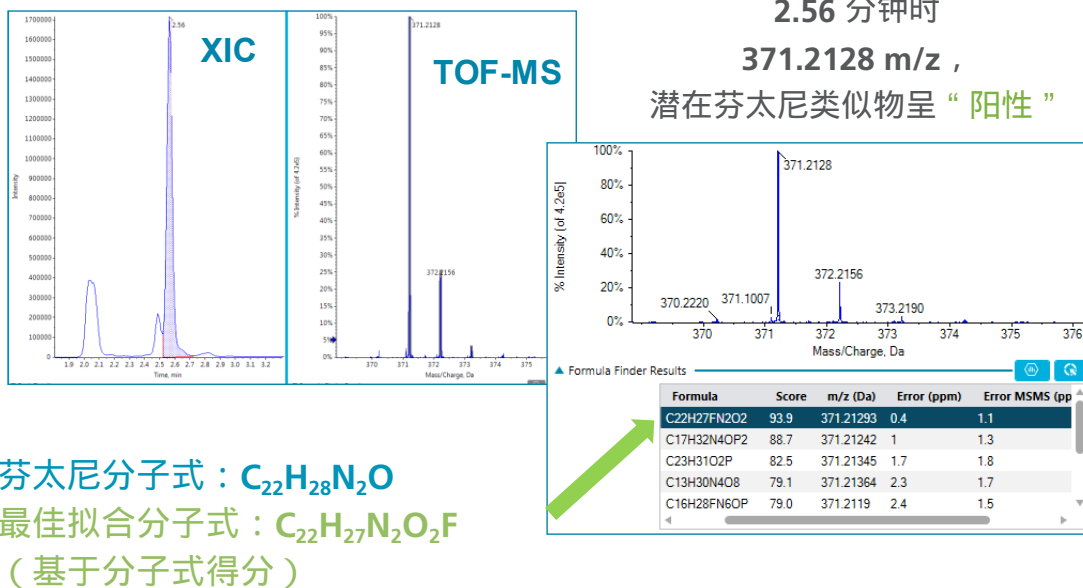
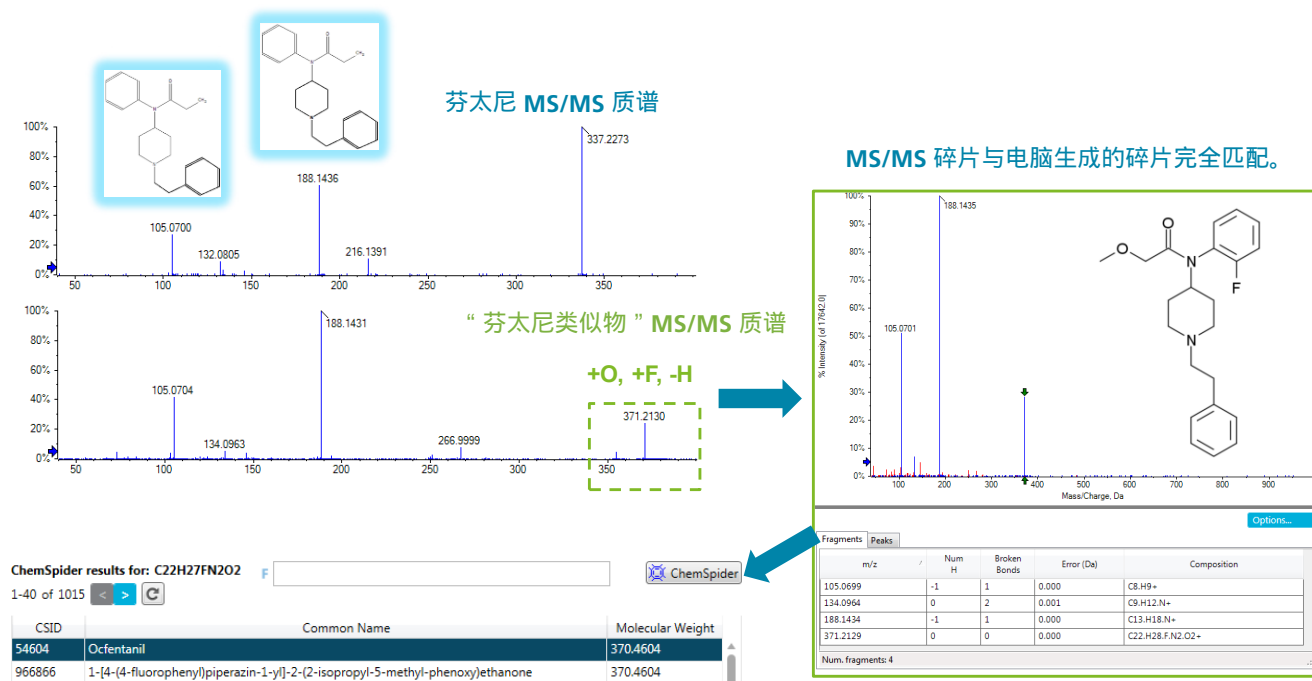


图5. 分子式查找工具结合可靠的精确质量信息生成潜在匹配分子式。使用 SCIEX X500R QTOF 系统分析的法医尿样，包含假定的芬太尼类似物。(左) 显示相关特征的 XIC 和 TOF-MS 质谱图，以及 (右) 分子式查找工具根据获取的同位素模式列出与峰值最相关的候选药物分子式。



奥芬太尼列在 ChemSpider 候选药物清单顶部

图6. SWATH®采集与 ChemSpider 搜索相结合,可提高化合物鉴定的置信度。芬太尼(上)和疑似芬太尼类似物(下)获取的 MS/MS 质谱数据差异。电脑模拟 MS/MS 预测和 ChemSpider 数据库搜索有助于可靠地鉴定此法医尿样中的奥芬太尼。

图 6 显示芬太尼阳性样品与调查的案例样品之间的 MS/MS 质谱数据比较。芬太尼的 188 m/z 和 105 m/z 碎片以及电脑模拟 MS/MS 预测表明存在 +F 和 +O 原子,并且移除了一个 -H 原子。根据 ChemSpider 数据库对数据进行进一步评估,可靠地鉴定了此法医尿样中的奥芬太尼。

表1. 用于未知芬太尼类似物鉴定的典型 MS/MS 碎片离子

核心结构的变化**	MS/MS 碎片离子 (Da)		
芬太尼核心(丙酰胺变体)	281.2012	188.1439	105.0704
α/β-甲基取代物	295.2169	202.1596	119.0861
3-甲基取代物	295.2169	202.1596	105.0704
α/β-羟基取代物	297.1962	204.1388	121.0653
	279.1856	186.1283	105.0704
邻、间、对甲基取代物	295.2169	188.1439	105.0704
卡芬太尼(哌啶变体)	279.1856	186.1277	105.0704
噻芬太尼(苯乙基变体)	287.1577	194.1003	111.0268

**这些分析物分类符合迄今遇到的所有芬太尼类似物。还有其他核心分类未列出。

简化尸检样品的芬太尼类似物分析

随着新的芬太尼相关物质陆续进入街头药店,研究人员往往依靠其化学知识来判断对芬太尼核心结构做了哪些化学修饰。应用 HRMS 是帮助简化表征新型合成阿片类药物^[4](包括新的芬太尼类似物)的关键。

表 1 展示了基于类似核心结构的典型 MS/MS 碎片离子,获取自不同芬太尼类似物参考标准品的分析。这些离子的表征简化了药物鉴定工作流程,因为具有共同核心的化合物会提供类似的碎裂模式。

因此,显示的表格可用作确定存在哪种核心芬太尼类型结构的指南,完全根据对这些典型碎片的鉴定来确定。例如,如果怀疑样品中有芬太尼类似物,并且存在碎片离子 202.1596 Da 和 105.0704 Da,则分析员可以确定此未知类似物包含与 3-甲基芬太尼变体相关或类似的核心结构。

此外，已经观察到，包含 α/β -甲基或 3-甲基取代芬太尼类似物的疑似样品可根据 MS/MS 碎裂模式区分；由于甲基种类和苯乙基部分的 α -剪切在碎裂期间的位置不同，可分为 119.0861 Da 离子的 α/β -甲基取代物碎片和 105.0704 Da 离子的 3-甲基取代物碎片。

图 7 所示为由于鉴定出 4-ANPP 代谢物而怀疑含有芬太尼类似物的尸检血样分析。

空白对照与疑似阳性 (323.2123 Da、 $C_{21}H_{26}N_2O$) 直接比较。通过生成电脑模拟 MS/MS 预测和搜索 ChemSpider 数据库进一步评估数据，鉴定出乙酰芬太尼。

此表征的支持依据是鉴定出两种芬太尼核心碎片离子 (188.1441 Da 和 105.0697 Da)。217.0245 Da 碎片离子的存在归因于 SWATH® 采集 (Q1 窗口化采集) 的性质，及其与类似物的关系可通过比较离子图谱排除掉。

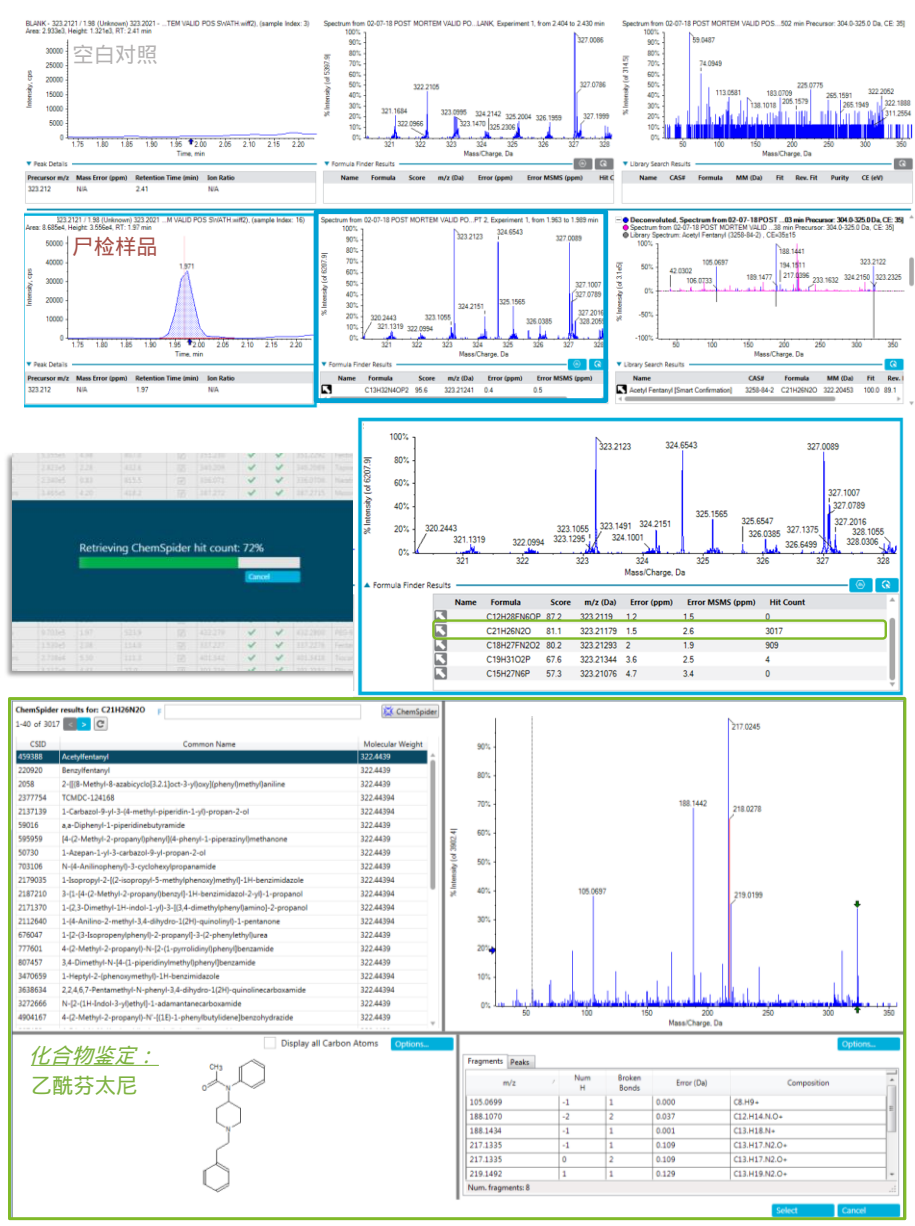


图7. 通过 SCIEX OS 软件进行的综合数据处理。使用 SCIEX X500R QTOF 系统分析的法医尸检血样通过非靶向筛查工作流程自动处理，从而在 ChemSpider 搜索结果中高度可靠地快速鉴定乙酰芬太尼。电脑模拟 MS/MS 质谱匹配进一步确认在此样品中发现芬太尼类似物。

结论

- 开发了用于表征新型芬太尼类似物的简化非靶向筛查方法，并且已经使用 SCIEX X500R QTOF 系统成功地应用于不同的法医生物样品。
- SCIEX OS 软件中的分子式查找功能通过生成电脑模拟 MS/MS 预测和搜索 ChemSpider 数据库来表征尿样和尸检血样中存在的新型芬太尼衍生物（如奥芬太尼）。
- 在已知芬太尼类似物中发现的典型 MS/MS 碎片离子碎裂特征，为法医研究人员提供了简化的鉴定工作流程，帮助他们应对不断出现并具有此性质的新化合物。
- 虽然此工作流程可以简单地表征新兴芬太尼类似物，但如果在现成的数据库（如 ChemSpider）中找不到获取的化学信息，则新型未知芬太尼类型化合物的鉴定需要全面的 MS/MS 数据研究。

参考资料

1. NFLIS Brief: Fentanyl and Fentanyl-Related Substances Reported in FLIS, 2015-2016.
https://www.nflis.deadiversion.usdoj.gov/DesktopModules/ReportDownloads/Reports/11350_R1_NFLIS_Research_Brief_Fentanyl.pdf
2. CDC Article: Increases in Drug and Opioid-Involved Overdose Deaths - United States, 2010-2015.
<https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm655051e1.htm>.
3. Cayman Chemical Application Note: Tips for Interpreting GC-MS Fragmentation of Unknown Substituted Fentanyls.
<https://www.caymanchem.com/news/tips-for-interpreting-gc-ms-fragmentation-of-unknown-substituted-fentanyls>
4. SCIEX Technote: SWATH[®] Acquisition Enables the Ultra-Fast and Accurate Determination of Novel Synthetic Opioids.

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-02-7599-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