

在法医毒理学研究中使用Tof-MRM确认芬太尼类似物

Michelle Wood, Thomas G. Rosano

Waters Corporation, 奥尔巴尼医学中心病理学和检验医学部

仅适用于法医毒理学应用。

摘要

本研究的第一个目的是评估Tof-MRM的性能，Tof-MRM是一种靶向采集模式，可与非靶向模式集成到同一HRMS平台上，本研究将利用Tof-MRM开发一种芬太尼类化合物的确认方法。第二个目的是使用文献报道过的一种创新技术 - 阈值精确校准（Threshold Accurate Calibration, TAC），在不使用氘代内标的前提下完成基质归一化。

优势

- Tof-MRM对芬太尼类似物具有优异的特异性和出色的灵敏度
- 采用创新的分析方法补偿基质效应
- 简化孔内样品前处理过程
- 可区分结构异构体
- 方法适应性强，若出现新型芬太尼类似物，可轻松更新方法

简介

采用四极杆飞行时间(QToF)质谱仪的高分辨率质谱分析法(HRMS)作为一种全面筛查技术,被越来越多地应用于法医毒理学领域。该方法通常以非靶向模式(即ToF-MS^E)采集数据,分别在低能量和高能量条件下生成母离子和碎片离子,然后结合这两种离子实现高特异性的鉴定¹⁻⁴。最近,在法医学领域的尿液药物检测双重确证工作流程中,研究人员也开始应用ToF-MS^E来确认常见药物成分⁵。

如果分析目标是鉴定并定量种类有限的一组目标分析物,也可以使用QToF仪器的靶向采集模式达成此目标⁶。近年来的法医毒理学研究显示,非法芬太尼(尤其是芬太尼类似物)的使用和滥用问题越来越严重。因此,人们迫切需要能够灵敏地检测并确认这些新型物质成分的新方法。

本研究的第一个目的是评估ToF-MRM的性能,ToF-MRM是一种靶向采集模式,可与非靶向模式集成到同一HRMS平台上,本研究将利用ToF-MRM开发一种芬太尼类化合物的确认方法。第二个目的是使用文献报道过的一种创新技术-阈值精确校准(Threshold Accurate Calibration, TAC),在不使用氘代内标的前提下完成基质归一化⁷⁻⁹。

实验

参比分析物

芬太尼类化合物(芬太尼、去甲芬太尼及所有类似物)的参比物质购自Cerilliant和/或Cayman Chemical,浓度为1 mg/mL。用甲醇稀释参比物质,制得浓度为10 µg/mL的芬太尼类化合物混合储备液,使用之前保存于-20 °C下。

TAC加标溶液

用水稀释芬太尼类化合物混合储备液,制得浓度为30 ng/mL的TAC加标溶液。使用水作为对应的空白加标溶液。

标准曲线样品、质控样品和案例样品

向不含分析物的尿液中加入芬太尼类化合物混合储备液,得到浓度为2 ng/mL的单一标准曲线样品。另制备浓度为0.8 ng/mL尿液的检测下限(LLD)对照样品。

将使用另一来源的参比物质制备的芬太尼类化合物混合储备液加入不含分析物的尿液中,制得浓度如下的质控(QC)样品:1.5、3.0、10 ng/mL尿液。

真实样品从日常案例工作中获得。

样品前处理

分别从各样品中（标准曲线样品、质控样品或案例尿样）取50 μL 加入96孔板中（每个样品两个相邻板孔），用于制备“纯”样品和“加标”样品（图1）。

向所有“加标”样品孔中加入50 μL TAC加标溶液，向相应的“纯”样品孔中加入50 μL 空白加标溶液。

然后向所有孔中加入500 μL 流动相(87% MPA:13% MPB)，将孔板转移至ACQUITY UPLC自动进样器，使用UPLC-ToF-MRM对样品进行分析，进样体积5 μL 。

液相色谱条件

液相色谱系统：	ACQUITY UPLC I-Class (FTN)
色谱柱：	ACQUITY UPLC HSS C ₁₈ 100 Å, 1.8 μm , 2.1 mm \times 150 mm (P/N 186003534)
柱温：	50 °C
样品温度：	10 °C
进样体积：	5 μL
流速：	0.4 mL/min
流动相A：	5 mM甲酸铵，pH 3.0
流动相B：	含0.1%甲酸的乙腈溶液
梯度程序：	表1

质谱条件

质谱系统:	Xevo G2-XS QTof
电离模式:	ESI+
毛细管电压:	0.8 kV
锥孔电压:	25 V
脱溶剂气温度:	500 °C
脱溶剂气流速:	1000 L/h
锥孔气流速:	20 L/h
采集模式:	Tof-MRM (表2)

名称	RT	母离子 质量数(<i>m/z</i>)	子离子1 定量离子(<i>m/z</i>)	CE (eV)	子离子2 定性离子(<i>m/z</i>)	CE (eV)
4-ANPP	6.16	281.2012	188.1434	15	105.0699	40
乙酰芬太尼	5.11	323.2118	188.1434	32	105.0699	40
丙烯酰芬太尼	5.97	335.2118	188.1434	26	105.0699	40
丁酰芬太尼(BF)	7.21	351.2431	188.1434	25	132.0808	40
异丁酰芬太尼(iBF)	7.08					
卡芬太尼	7.03	395.2329	335.2118	20	246.1489	20
芬太尼	6.20	337.2274	188.1434	38	105.0699	40
4-氟丁酰芬太尼(4-BF)	7.53	369.2337	188.1434	26	105.0699	40
4-氟异丁酰芬太尼(4-FiBF)	7.42					
呋喃芬太尼	6.44	375.2067	188.1434	22	105.0699	40
β-羟芬太尼	5.40	353.2224	204.1385	26	335.2118	20
甲氧基乙酰芬太尼	4.81	353.2224	188.1434	22	105.0699	40
3-甲基芬太尼	7.03	351.2431	204.1385	25	146.0964	30
去甲芬太尼	3.22	233.1648	177.1386	28	150.0913	20

表2.保留时间(RT)和双Tof-MRM条件, 包括优化的碰撞能量(CE)。

数据管理

使用UNIFI科学信息系统进行仪器控制和数据处理。

创新分析方法：TAC

本研究使用文献报道过的一种新方法（阈值精确校准；TAC）¹⁻³来制备样品，在不使用氘代内标的前提下对基质效应进行归一化。

简而言之，即分析不添加（“纯”）和添加（“加标”）cut-off量的参比分析物的标准曲线样品、QC样品和未知样品（图1）。

确定每个试样的TAC比率（即“纯”试样的峰面积响应与“加标”试样的峰面积响应之比），并将该比率与浓度为cut-off阈值（在该测定中，cut-off阈值浓度为2 ng/mL）的尿液标准曲线样品的TAC比率进行比较，定性结果可以简单地表示为（例如）：

- 若分析物的TAC比率 \geq 标准曲线样品的TAC比率，则结果为阳性
- 若分析物的TAC比率 $<$ 标准曲线样品的TAC比率，则结果为阴性

TAC比率 = “纯”峰面积响应 / “加标”峰面积响应 - “纯”峰面积响应

核心技术：Tof-MRM

飞行时间质谱(Tof-MS)通常在各种法医学筛查分析中以非靶向采集模式（如MS^E）使用⁴⁻⁶。尽管这种模式已经可以实现检测限低至ng/mL水平的高灵敏度检测，同一台仪器还可以在另一种模式下（例如Tof-MRM，图2）运行。该模式是一种靶向模式，可进一步提高检测灵敏度。事实上，据报道，灵敏度可提高2~200倍⁷。当分析物浓度可能极低，并且/或者采用简化的样品制备方案（例如只进行稀释）时，高灵敏度将会非常有用。

本研究使用Tof-MRM分析稀释尿样中的芬太尼类化合物 - 由于这些物质的效价强度非常高，它们在样品中的浓度往往极低，甚至仅有亚ng/mL浓度水平。

结果与讨论

使用标准曲线样品对Tof-MRM模式进行初步评估的结果显示，与Tof-MS^E相比，灵敏度提高了5~20倍。由于研究目的是使用简单的样品前处理方案（样品有效稀释10倍），因此采用靶向采集模式开展其余的研究。

采用简单的孔内样品前处理方案（图1）制备样品，随后运行15 min色谱分离方法（表1）配合优化的双通道Tof-MRM监测方法进行分析（图3，表2）。该方法灵敏度极高，且能够区分结构异构体（图4）。

根据纽约州卫生署(New York State Department of Health)指南设计验证研究方案，并运行17个分析批来验证该方法。这种创新的TAC方法成功将基质效应归一化，并且能够对我们研究的所有芬太尼类化合物进行一致分析，在阈值浓度水平也可实现精确检测。分析物浓度接近cut-off值时（即0.8、1.5、3.0和10.0 ng/mL），也获得了可接受的精密度和准确度（图5）。

将该确认方法应用于25个法医学案例样品，结果表明，使用Tof-MRM方法所得的结果与使用另一种UPLC-MS/MS快速筛查方法所得的结果完全一致⁸。所有案例样品的结果汇总于表3中，其中芬太尼、去甲芬太尼、β-羟基芬太尼和4-ANPP是检出率最高的几种化合物。4-ANPP是生产芬太尼类化合物的中间体，因此可能作为杂质出现在芬太尼制剂中；此外，该物质还被认为是芬太尼及一些类似物的代谢物（包括咪喃芬太尼、乙酰芬太尼和丙烯酰芬太尼）。

结论

本应用纪要介绍了一种用于法医毒理学分析的确认方法。

与此前的文献报道一致，Tof-MRM方法可实现比非靶向Tof-MS^E方法更高的灵敏度。

该方法利用一些创新方案，为尿液中芬太尼和芬太尼类似物的分析提供了一种简单、准确且精密的定性方法。

氘代内标，尤其是新型药物类似物的氘代内标并不一定能轻易获得，而本文介绍的TAC方案可实现准确的定性确认，无需使用氘代内标。

这种TAC方案还赋予了分析方法良好的适应性，若出现新型芬太尼类似物，分析人员可以轻松更新方法。

参考资料

1. Rosano TG, Wood M, Ihenetu K, and Swift TA. Drug Screening in Medical Examiner Casework by High-Resolution Mass Spectrometry (UPLC-MS^E-TOF). *Journal of Analytical Toxicology* 37(8), 1–14 (2013).
2. Dalsgaard P et al., Quantitative Analysis of Screening of 30 Drugs in Whole Blood by SPEUHPLC-TOF-MS. *Forensic Science and Criminology* 1 (1), 1–6 (2013).
3. Bidny S, Gago K, Chung P, Albertyn D, and Pasin D. Simultaneous Screening and Quantification of Basic, Neutral and Acidic Drugs in Blood Using UPLC-QTOF-MS. *Journal of Analytical Toxicology* 41(3), 181-195 (2017).
4. Grapp M, Kaufmann C, Streit F, and Binder L. Systematic Forensic Toxicological Analysis by Liquid Chromatography-Quadrupole-Time-of-Flight Mass Spectrometry in Serum and Comparison to Gas Chromatography Mass Spectrometry. *Forensic Science International* 287, 63–73 (2018).
5. Rosano TG, Ohouo PY and Wood M. Application of High Resolution UPLC-MS^E/TOF for Confirmation in Forensic Urine Drug Screening by UPLC-MS/MS. *In press Journal of Analytical Toxicology*, bky106, <https://doi.org/10.1093/jat/bky106>.
6. Wood M, Barknowitz G, Goshawk JA, and Lee R. Evaluation of Various ToF Acquisition Strategies for the Analysis of Illicit Drug Substances. Poster presentation at the 56th TIAFT Conference, Ghent, Belgium (2018).
7. Rosano T, Ohouo P, and Wood M. Application of High Resolution Mass Spectrometry for Fentanyl Analog Confirmation and Discovery in Forensic Urine Casework. Poster presentation at the Annual Meeting for the Society of Forensic Toxicologists (SOFT) Minneapolis, MN, US (2018).
8. Rosano T, Ohouo P, LeQue J, Freeto S, and Wood M. Definitive Drug and Metabolite Screening in Urine by UPLC-MS/MS Using a Novel Calibration Technique. *Journal of Analytical Toxicology* 40(8), 628-638 (2016).
9. Rosano T, Ohouo P, and Wood M. Screening with Quantification for 64 Drugs and Metabolites in Human Urine using UPLC-MS/MS Analysis and a Threshold Accurate Calibration. *Journal of Analytical Toxicology* 41(6), 536-546 (2017).

特色产品

ACQUITY UPLC I-Class PLUS系统 <<https://www.waters.com/134613317>>

Xevo G2-XS QToF四极杆飞行时间质谱仪 <<https://www.waters.com/134798222>>

UNIFI科学信息系统 <<https://www.waters.com/134801648>>

720006515ZH, 2019年3月



©2019 Waters Corporation. All Rights Reserved.

[使用条款](#) [隐私](#) [商标](#) [网站地图](#) [招聘](#) [Cookie](#) [Cookie设置](#)

[沪ICP备06003546号-2](#) [京公网安备 31011502007476号](#)