

超高效液相色谱串联飞行时间质谱测定奥芬太尼及其体外代谢产物

陈逸凡, 姜 于, 谭鸿宇, 郑 天*

江苏警官学院, 江苏 南京
Email: zhengtian@jspi.cn

收稿日期: 2021年4月14日; 录用日期: 2021年5月2日; 发布日期: 2021年5月14日

摘 要

本文应用人肝微粒体体外温孵法模拟了奥芬太尼在人体内的代谢过程, 并采用高分辨的超高效液相色谱串联三重四级杆飞行时间质谱对奥芬太尼及其在人肝微粒体中的主要代谢产物进行了分析, 结果表明奥芬太尼的主要体外代谢产物由奥芬太尼的醚键去甲基生成。此结果为实际工作中筛查奥芬太尼滥用者提供了潜在的代谢标志物, 但仍需在以后的工作中收集真实人体尿液样本或血液样本, 比对其中的主要代谢产物, 才能最终确认奥芬太尼的代谢标志物, 为正确认定奥芬太尼滥用行为提供参考。

关键词

奥芬太尼, 人肝微粒体, 超高效液相色谱 - 三重四级杆飞行时间质谱法, 代谢产物

Determination of Ocfentanil and Phase I Metabolites in Human Liver Microsomes by UPLC-QTOF/MS

Yifan Chen, Yu Jiang, Hongyu Tan, Tian Zheng*

Jiangsu Police Institute, Nanjing Jiangsu
Email: zhengtian@jspi.cn

Received: Apr. 14th, 2021; accepted: May 2nd, 2021; published: May 14th, 2021

*通讯作者。

文章引用: 陈逸凡, 姜于, 谭鸿宇, 郑天. 超高效液相色谱串联飞行时间质谱测定奥芬太尼及其体外代谢产物[J]. 分析化学进展, 2021, 11(2): 68-74. DOI: 10.12677/aac.2021.112007

Abstract

UPLC-QTOF/MS was applied to the determination of ocfentanil and its major phase I metabolites in human liver microsomes. Human liver microsomes were incubated *in vitro* with addition of ocfentanil and one major metabolite of ocfentanil was found in human liver microsomes. O-demethylation was found to be the main pathway of the ocfentanil metabolism. And the O-demethylated metabolite was recommended as poisoning marker of ocfentanil in human urine and blood sample. In practice, human urine and blood sample should be collected and the main metabolite in these samples should be screened and compared in order to confirm the metabolic marker of ocfentanil.

Keywords

Ocfentanil, Human Liver Microsome, UPLC-QTOF/MS, Metabolite

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

芬太尼属于强效合成阿片类药物，临床上常被用作镇痛剂和麻醉剂[1]。与传统毒品相比，芬太尼类药物作用更强，依赖性更强，且致死量小，具有极高的滥用风险[2]-[7]。从20世纪80年代开始，出现了芬太尼类似物的秘密和非法合成事件，而且新型芬太尼类似物不断出现，这对公众健康和安全构成重大威胁[8] [9] [10] [11]。我国于2013年对奥芬太尼进行了列管[12] [13]，奥芬太尼分子式为 $C_{22}H_{27}FN_2O_2$ ，结构式见图1。

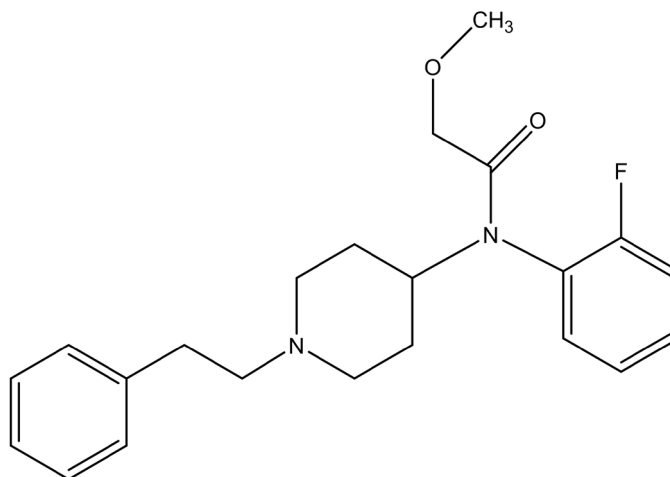


Figure 1. Molecular structural formula of ocfentanil

图1. 奥芬太尼的化学结构

由于生物检材中毒品代谢产物的检出是吸毒行为认定或毒品中毒死亡认定的重要依据[14]，而目前国

内对奥芬太尼的检测研究较多[6] [15] [16] [17] [18] [19], 但对其代谢产物的研究较少, 因此, 确定奥芬太尼在体内的代谢途径和主要代谢产物, 可以为生物检材中检出此类新精神活性物质提供依据。由于健康和伦理问题, 难以进行体内人体代谢研究, 动物实验过程复杂, 耗时长, 且所需新精神活性物质样品量大, 也难以开展。肝微粒体体外温孵法是药物代谢研究的常用方法[20] [21] [22], 但用于法庭科学中对毒品及新精神活性物质的代谢产物进行筛查的研究并不多见。本文采用肝微粒体体外温孵法, 建立了超高效液相色谱串联高分辨飞行时间质谱法检测奥芬太尼在人肝微粒体中代谢产物及其主要代谢途径的方法, 为法庭鉴定生物检材中的奥芬太尼提供潜在的代谢标志物。

2. 材料与方法

2.1. 仪器与试剂

2.1.1. 仪器

Triple TOF™ 5600 液相色谱串联三重四极杆飞行时间质谱仪(Q-TOF/MS, 美国爱博才思分析仪器公司), 密理博纯水机 Milli-Q Integral 5 (德国默克密理博公司), Allegra 64R 冷冻离心浓缩仪(美国贝克曼公司), QUINTIX65-1CN 天平(十万分之一天平, 赛多利斯科学仪器有限公司), ME104/02 天平(万分之一天平, 瑞士梅特勒-托利多有限公司), 超声波清洗器(舒美 KQ500E, 中国昆山市超声仪器有限公司)。

2.1.2. 试剂

奥芬太尼($1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 甲醇溶液, 公安部)、甲醇和乙腈(色谱纯, 德国默克股份两合公司), 甲酸和甲酸铵(色谱纯, 美国西格玛奥德里奇公司), 人肝微粒体(~20-Donor Pool, Mixed Gender, 康宁公司, 美国), UDP-葡萄糖醛酸(UDPGA)、辅酶 II (NADP⁺)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(PDH)和葡萄糖单内酯(D-Saccharic acid 1,4-lactone monohydrate)均购自美国西格玛奥德里奇公司, D-葡萄糖-6-磷酸二钠盐(G-6-P)购自北京索莱宝科技有限公司, 丙甲菌素购自上海源叶生物科技有限公司, 氯化镁、氯化钾、氯化钠、磷酸二氢钾、十二水合磷酸氢二钠均购自中国国药集团化学试剂有限公司。

2.2. 方法

2.2.1. 仪器条件

1) 色谱条件: 飞诺美 Phenomenex Kinetex C18 色谱柱($100 \times 3 \text{ mm}$, $2.6 \mu\text{m}$ 100 \AA), 柱温 30°C , 流速 $400 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$; 进样量 $1 \mu\text{L}$, A 相为 0.1% 甲酸水溶液, B 相为甲醇。梯度洗脱程序: 0 min, 95%A, 维持 2 min; 2~8 min, A 相由 95% 变为 80%; 8~16 min, A 相比比例降低为 5%, 随后维持 2 min, 18~19 min, A 相恢复 95%, 维持 3 min。

2) Q-TOF/MS 质谱条件: 电喷雾离子源(ESI), 正离子模式检测, 离子源温度(TEM): 550°C , 雾化气(GS1): 50 Pa, 干燥气(GS2): 50 Pa, 气帘气(CUR) 35 Pa, 电压(IS): 5500 V, 去簇电压(DP): 80 eV。扫描范围: MS1: 100~800 Da, MS2: 50~800 Da, 破碎电压(CE): MS1: 10 eV, MS2: $35 \pm 20 \text{ eV}$, 通过 Analyst TF 1.7 Software 获得数据。代谢物由 MetabolitePilot 2.0 和 PeakView 2.2 进行分析。

2.2.2. 奥芬太尼人肝微粒体体外温孵模型的建立

人肝微粒体温孵试验反应体系由 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ K_2HPO_4 缓冲液($\text{pH} = 7.4$)组成, 其中含氯化镁 $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, NADPH 生成系统($0.2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 辅酶 II (NADP⁺)、 $1.2 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(PD)和 $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 葡萄糖-6-磷酸(G-6-P)), 葡萄糖单内酯 $1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, UDP-葡萄糖醛酸(UDPGA) $2 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和奥芬太尼(甲醇溶液, 1 mM, 加样 $5 \mu\text{L}$ 至 $250 \mu\text{L}$ 体系中, 终浓度约为 $20 \mu\text{M}$), 肝微粒体蛋白的浓度为 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 反应体系的终体积为 0.25 mL。其中, 空白对照组不含药物, 以反应 0 h 的样品作为阴性对照。

实验过程中,先将微粒体温孵体系与丙甲菌素(25 $\mu\text{g}/\text{mg}$ protein)混合后,置于4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下反应20 min,以缩短UGTs活性的延迟。再按上述顺序依次加入所需试剂,预温孵5 min后,加入NADPH生成系统和UDPGA启动代谢反应。所有的反应均在37 $^{\circ}\text{C}$ 进行。1 h后加入1 mL冰乙腈沉淀蛋白,振荡3 min,终止反应。13000 rpm高速离心10 min后,吸取上清1 mL,离心浓缩至干。挥干样品用200 μL 甲醇复溶,涡旋3 min,13000 rpm离心10 min两次后,吸取上清待进样。每一份样品重复2次。空白对照同时进行。

3. 结果与讨论

3.1. 奥芬太尼质谱特征解析

在2.2.1实验条件下,奥芬太尼的二级质谱如图2(a)所示,母离子为371.2127,子离子为188.1428,146.0967,134.0969,105.0705。图2(b)为其提取离子流图,出峰时间为11.472 min。推测其裂解途径如图3所示[23]:奥芬太尼分子结构中N-苯基酰胺部分的C-N键发生 α -断裂,脱去1个烷基醛,得到碎片A,而碎片A很快进一步碎裂为质荷比146.0967的B后消失。分子结构中哌啶环的N-C和C-C键断裂,碎裂为D(质荷比188.1428)、E(质荷比134.0969)和F。质荷比105.0705的离子G为苯乙基碎片。

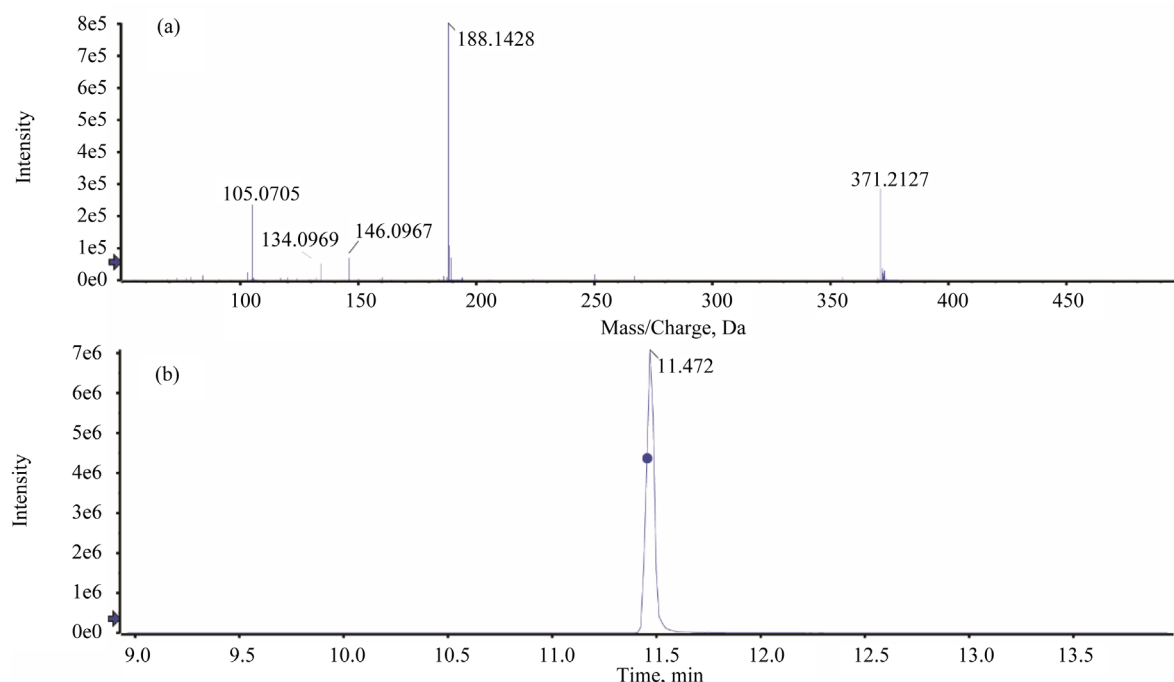


Figure 2. Mass spectrogram (a) and extracted Ion chromatography (b) of ofcentanil

图2. 奥芬太尼的二级质谱图(a)和提取离子流图(b)

3.2. 奥芬太尼在人肝微粒体中主要代谢产物的质谱特征分析

3.2.1. 奥芬太尼在人肝微粒体中主要代谢产物

实验发现奥芬太尼在人肝微粒体体外温孵后主要通过O-去甲基化反应(图4)产生了代谢产物 $\text{C}_{21}\text{H}_{25}\text{FN}_2\text{O}_2$ (M1),具体信息见表1。

3.2.2. 奥芬太尼主要代谢产物M1的质谱特征分析

奥芬太尼代谢物M1的二级质谱如图5(a)所示,母离子为357.1968,子离子为188.1425,146.0949,105.0703,73.0485。图5(b)为其提取离子流图,出峰时间为10.88 min。推测其裂解途径如图6所示:碎

片 A、B、C 均与奥芬太尼所产生的碎片相同。

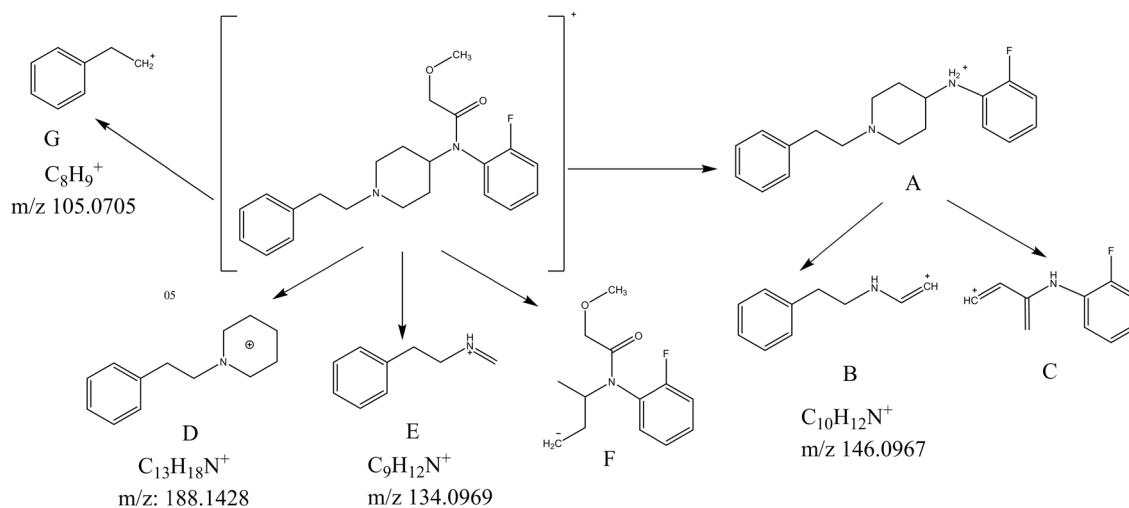


Figure 3. Proposed fragmentation route of ocfentanil

图 3. 奥芬太尼可能的质谱裂解过程

Table 1. Main Phase I metabolites produced by ocfentanil in a model of in vitro incubation of human liver microsomes

表 1. 奥芬太尼在人肝微粒体体外温孵中产生的主要代谢产物

| 化合物 | 反应类型 | 保留时间 (min) | 分子式 | 质荷比 | | 误差值 (ppm) | 碎片离子 | 响应强度 |
|------|--------|------------|--|----------|----------|-----------|--|------------------------|
| | | | | 理论值 | 测定值 | | | |
| 奥芬太尼 | - | 11.472 | C ₂₂ H ₂₇ FN ₂ O ₂ | 371.2129 | 371.2127 | -0.6 | 188.1428, 146.0967, 134.0969, 105.0705 | 7.00 × 10 ⁶ |
| M1 | O-去甲基化 | 10.880 | C ₂₁ H ₂₅ FN ₂ O ₂ | 357.1973 | 357.1968 | -1.4 | 188.1425, 146.0949, 105.0703 | 1.60 × 10 ³ |

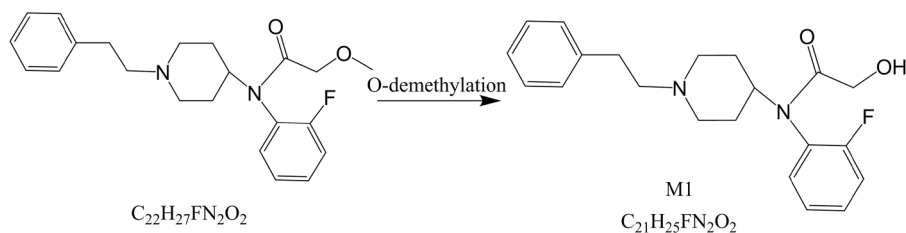
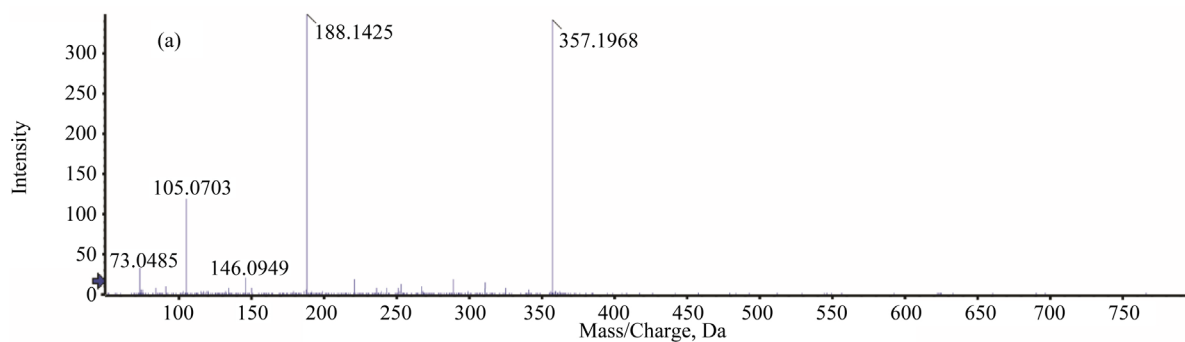


Figure 4. The main metabolic pathway of ocfentanil

图 4. 奥芬太尼的主要代谢途径



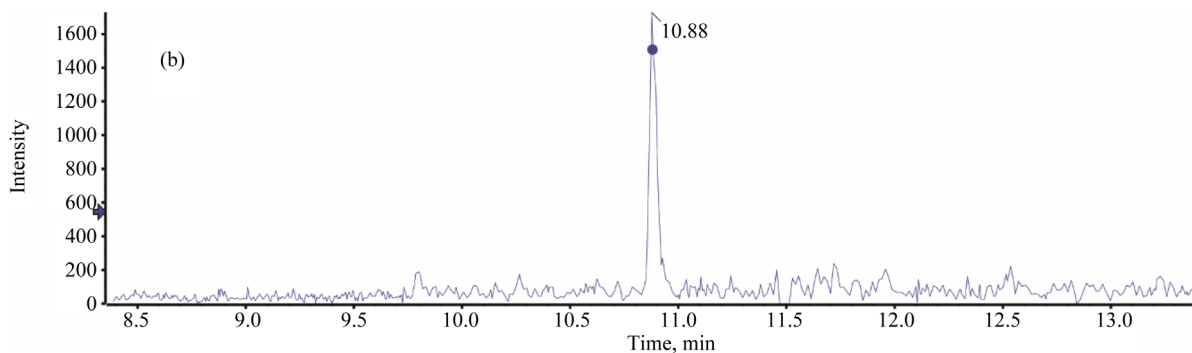


Figure 5. Mass spectrogram (a) and extracted ion chromatography (b) of the main metabolite of ocfentanil, M1

图 5. 奥芬太尼主要代谢物 M1 的二级质谱图(a)和提取离子流图(b)

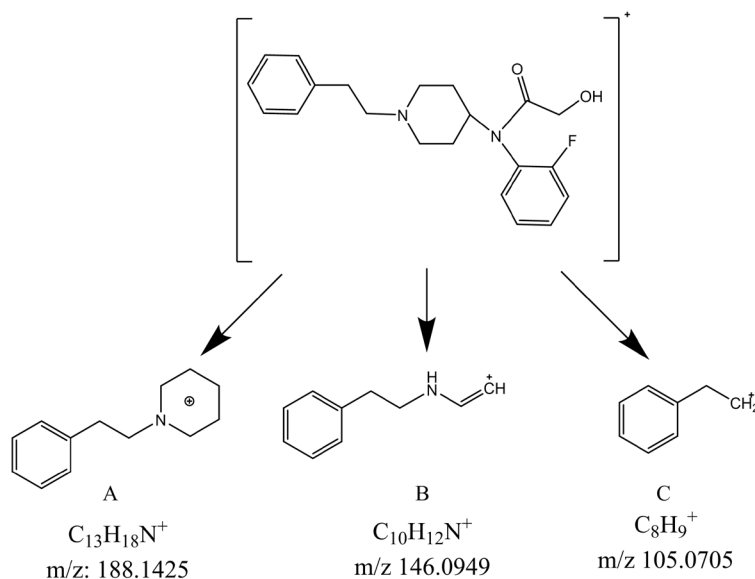


Figure 6. The proposed fragmentation route of the main metabolite of ocfentanil in UPLC-QTOF/MS

图 6. 奥芬太尼主要代谢产物 M1 可能的质谱裂解过程

4. 结论

本文应用高分辨的液相色谱串联三重四极杆飞行时间质谱对奥芬太尼进行了检测, 对其质谱特征进行了分析, 确定奥芬太尼的母离子为 371.2115, 主要的子离子为 188.1423, 146.0964, 134.0964, 105.0705, 推测奥芬太尼首先是其分子结构中 N-苯基酰胺部分的 C-N 键发生 α -断裂, 脱去 1 个烷基醛, 再进一步碎裂为质荷比 146.0964 的离子。同时, 其哌啶环中 N-C 和 C-C 键也会发生断裂, 碎裂为质荷比 188.1423、质荷比 134.0964 的碎片。质荷比 105.0705 的离子为苯乙基碎片, 这为推断芬太尼类物质质谱裂解规律提供了线索。

随后, 本文用人肝微粒体体外温孵法进行了奥芬太尼的体外代谢实验, 并对奥芬太尼的主要代谢产物 M1 进行了分析, 结果表明奥芬太尼的主要代谢产物由 O-去甲基化代谢反应生成, 其分子式为 $C_{21}H_{25}FN_2O_2$, 母离子质荷比为 357.1973。此结果为实际工作中筛查奥芬太尼滥用者提供了潜在的生物标志物, 但仍需在以后的工作中收集真实人体尿液样本或血液样本, 比对其中的主要代谢产物, 才能最终确认奥芬太尼的代谢标志物, 为正确认定奥芬太尼滥用行为提供参考。

参考文献

- [1] 朱有为. 快速认识新型“毒品”芬太尼[J]. 中国药物滥用防治杂志, 2019, 25(6): 338+342.
- [2] 蔡衡衡, 刘鑫. 新精神活性物质发展与管制综述[J]. 中国法医学杂志, 2021, 36(1): 14-19.
- [3] 黄锐, 孟文文. 新精神活性物质防控的困境与对策研究[J]. 云南警官学院学报, 2021(1): 14-21.
- [4] 李学洋, 李晶, 李方方, 于智睿, 杨雪, 李宁涛. 芬太尼类新精神活性物质危害及其口岸监管难点与对策分析[J]. 中国药物依赖性杂志, 2020, 29(5): 397-400.
- [5] 杨丽君. 我国新精神活性物质形势剖析[J]. 云南警官学院学报, 2020(2): 1-7.
- [6] Degreef, M., Blanckaert, P., Berry, E.M., van Nuijs, A.L.N. and Maudens, K.E. (2019) Determination of Ocfentanil and W-18 in a Suspicious Heroin-Like Powder in Belgium. *Forensic Toxicology*, **37**, 474-479. <https://doi.org/10.1007/s11419-019-00480-3>
- [7] Drummer, O.H. (2019) Fatalities Caused by Novel Opioids: A Review. *Forensic Sciences Research*, **4**, 95-110. <https://doi.org/10.1080/20961790.2018.1460063>
- [8] 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.
- [9] 杨丽君. 全球新精神活性物质形势分析[J]. 云南警官学院学报, 2020(3): 1-7.
- [10] 初钰霖. 芬太尼类物质滥用的扩张形势与防控策略[J]. 北京警察学院学报, 2019(3): 109-115.
- [11] 刘志民. 芬太尼及其衍生物的滥用与管制: 危害与挑战[J]. 中国药物依赖性杂志, 2017, 26(4): 274-276.
- [12] 国家食品药品监督管理总局, 中华人民共和国公安部, 中华人民共和国国家卫生和计划生育委员会. 精神药品目录[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2013.
- [13] 周漪颖, 崔巍, 张鑫, 等. 新精神活性物质分类现状与管制展望[J]. 中国药物滥用防治杂志, 2020, 26(6): 311-317.
- [14] 李超, 王继芬, 徐多麒, 王燕燕. 超高效液相色谱-高分辨质谱法检测合成大麻素 JWH-073 在人肝微粒体中的 I 相代谢产物[J]. 理化检验(化学分册), 2019, 55(8): 869-875.
- [15] 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, 35(3): 286-289.
- [16] 施妍, 强火生, 刘伟, 向平, 沈保华, 沈敏. 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.
- [17] 吴健美, 乔宏伟, 刘文婧, 彭珑, 陈捷. 人毛发中 36 种芬太尼类物质的 HPLC-MS/MS 检测方法[J]. 中国司法鉴定, 2021(1): 48-53.
- [18] 郭项雨, 马麟, 尚宇瀚, 白桦, 马强. 芬太尼类新精神活性物质检测技术研究进展[J]. 分析测试学报, 2020, 39(12): 1548-1555.
- [19] Freni, F., Moretti, M., Radaelli, D., et al. (2020) Determination of Fentanyl and 19 Derivatives in Hair: Application to an Italian Population. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **189**, Article ID: 113476. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2020.113476>
- [20] 石忠波, 赵德璋, 蒋君好, 谢宝刚, 李燕, 于超. 同时测定人肝微粒体中 9 种 CYP450 酶活性的 LC-MS/MS 方法[J]. 第三军医大学学报, 2021, 43(3): 211-217.
- [21] 陈瑞, 周维, 张丽, 朱高峰, 黄静, 汤磊. 树豆酮酸 A 对人肝微粒体中 5 种常见细胞色素 P₄₅₀ 酶的体外抑制作用研究[J]. 中国药房, 2021, 32(2): 195-200.
- [22] 薛莹, 赵怡博, 王子腾, 蔡卫民, 刘帅兵. 替格瑞洛的体外代谢及其与他汀类药物的相互作用研究[J]. 中国药理学杂志, 2020, 55(23): 1962-1968.
- [23] 燕瑾, 花镇东, 贾薇, 刘翠梅. 芬太尼类化合物的质谱特征[J]. 法医学杂志, 2019, 35(2): 216-223.