

# 利用SelexION®离子淌度质谱法同时测定五种阿糖胞苷代谢物和类似物

## Simultaneous determination of five cytarabine metabolites and analogs with SelexION Ion mobility Mass Spectrum

刘丹, 冷向阳, 荆莲艳, 李国庆

Liu Dan, Leng Xiangyang, Jin Liyan, Li Guoqing

SCIEX中国, 临床事业部

SCIEX China, Clinical Buessiness Unit

**Keywords:** Cytarabine, CTP, Ara-CTP, SelexION, LC-MS/MS

### 前言

阿糖胞苷 (Cytarabine, Ara-C) 是治疗急性淋巴细胞白血病和骨髓白血病的有力化疗药物, 是一种胞苷结构中核糖被阿拉伯糖取代的胞苷类似物。Ara-C通过载体介导进入细胞后, 必须相继代谢为单 (Ara-CMP)、双 (Ara-CDP) 和三磷酸 (Ara-CTP) 衍生物, 最终Ara-CTP通过干扰DNA, 抑制DNA合成聚合酶和终止DNA链延伸等过程, 发挥其抗肿瘤作用。然而, Ara-C的生物活性不仅取决于细胞内Ara-CTP的浓度, 而且还取决于内源性核苷酸: 三磷酸胞苷 (CTP) 和三磷酸脱氧胞苷 (dCTP) 的浓度。因为Ara-CTP与dCTP竞争DNA的结合, 而与CTP竞争RNA的结合。所以, Ara-CTP与dCTP (Ara-CTP/dCTP) 和Ara-CTP与CTP (Ara-CTP/CTP) 的浓度比值也可以作为疗效的预测指标。因此, 对样本中主要的阿糖胞苷代谢物及类似物定量, 对在临床药代动力学中确定合适的给药方案和检测耐药机制至关重要。三重四极杆质谱仪的MRM扫描模式凭借其高灵敏度、高选择性和高特异性被视作药代动力学评价的首选检测手段。

五种化合物的结构如图1所示。同时测定阿糖胞苷代谢物及类似物浓度具有一定挑战性, 一方面由于这几类核苷酸类似物的极性较大, 常规反相柱上色谱保留较差; 另一方面由于内源性CTP (图1e) 和Ara-CTP (图1c) 是一对同分异构体, 具有相同的分子量和相似的结构, 无论是色谱行为还是质谱的离子对差异都较小。想要准确分析两种异构体, 需要实现有效的分离。

差分迁移质谱 (DMS) 是根据气相淌度分离难以分离的离子的分析技术。通过在离子淌度池施加分离电压 (SV) 产生交替

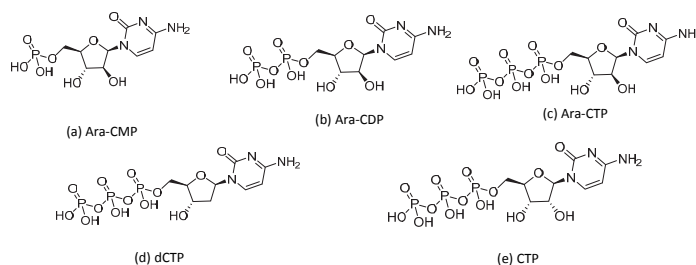


图1. 五种胞苷类似物结构式. (a) Ara-CMP (b) Ara-CDP (c) Ara-CTP.

的高场和低场, 使离子以不同的速率向两个电极中的一个迁移从而实现分离。通过施加另一个补偿电压 (COV), 纠正目标离子的迁移轨迹, 由于COV是化合物依赖性参数, 所以与目标分析物的迁移轨迹不同, 其他离子将向远离离子淌度池中心线的方向迁移。同时将挥发性试剂通过载气被引入到离子淌度池中, 在分析物离子与载气相互作用的DMS分离期间发挥化学修饰作用。在交替的电场变化下, 离子将经过聚簇和去簇的过程, 这种相互作用将会显著增加DMS离子淌度池的分离能力, 并且通过利用质子亲和力等化学性质, 增加了另一个维度的差分离子淌度效果。使用SelexION®技术的DMS增加了额外的选择性水平, 根据其化学性质和离子迁移率提供等压物质的气相分离, 增强了分析分离能力, 即使化合物拥有相同的分子量和色谱保留时间, 也可以将它们分离。离子淌度SelexION®结构如图2。

本文选择了HILIC正相色谱方法改善核苷酸的色谱保留，同时用到离子淌度质谱，在不需要基线分离的情况下也可以实现同分异构体的有效分离，建立了一种基于离子淌度差分技术SelexION®和超高灵敏度QTRAP® 6500+质谱仪的可同时测定五种阿糖胞苷代谢物及类似物的分析方法。

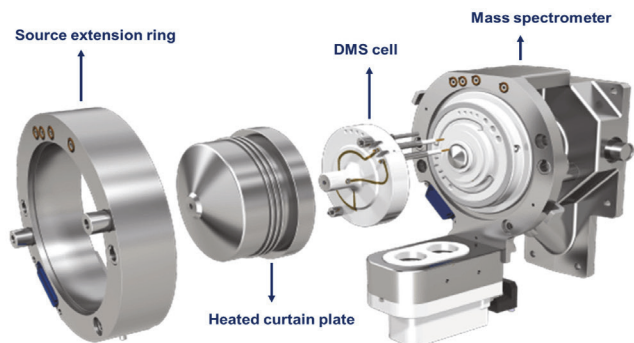


图2. 离子淌度SelexION®结构：离子通路组成部件，包含的主要部件为Source extension ring、Heated curtain plate、DMS cell。

## 实验部分

### 色谱条件

液相系统为SCIEX ExionLC™ AC高效液相色谱系统。色谱柱使用HILIC色谱柱进行分离，流动相选用50 mM乙酸铵水溶液（含0.2%氨水）作为A相，乙腈：水（90:10, V/V）（含0.2%氨水）作为B相。柱温设为40℃。进样体积为5 μL。进行梯度洗脱，液相梯度见表1。

表1. 液相梯度洗脱条件

Time min	流速 mL/min	A %	B %
0.00	0.25	70	90
1.3	0.25	70	90
1.9	0.25	20	59
7.9	0.25	5	52
8	0.25	5	90
10	0.25	70	90

### 质谱条件

质谱仪为SCIEX QTRAP® 6500+（DMS激活），采用负电喷雾

离子源（Electrospray Ionization, ESI-）和多反应监测（Multiple Reaction Monitoring, MRM）模式进行质谱扫描。离子源参数：加热气（GS1）和辅助加热气（GS2）分别为30和30 psi，脱溶剂气温度为500℃；气帘气（Curtain Gas, CUR）为20 psi，碰撞气（Collision Gas, CAD）为8 psi；喷雾针（Ionspray, IS）电压为-4500 V。DMS参数：DMS温度为low，分离电压（Separation Voltage, SV）3800 V，DMS电压（DMS Offset, DMO）为-20 V，DMS修饰剂为异丙醇。各化合物监测离子对的去簇电压（Declustering Potential, DP）、碰撞电压（Collision Energy, CE）和补偿电压（Compensation voltage, COV）、目标物定量离子对以及定性离子对等参数均经过系统优化，信息见表2。

表2. 磷酸阿糖胞苷类化合物的MRM离子通道参数。

化合物	Q1	Q3	驻留时间 Dwell Time (msec)	去簇电 压DP (V)	碰撞电 压CE (V)	补偿 电压 COV(V)
CTP	482.0	159.2 <sup>a</sup>	30	-60	-40	13.6
	482.0	383.8 <sup>b</sup>	30	-60	-30	13.6
Ara-CTP	481.9	159.2 <sup>a</sup>	30	-60	-40	16.3
	481.9	383.8 <sup>b</sup>	30	-60	-30	16.3
dCTP	466.0	159.0 <sup>a</sup>	30	-100	-35	16.0
	466.0	368.0 <sup>b</sup>	30	-100	-30	16.0
Ara-CDP	401.9	158.9 <sup>a</sup>	30	-70	-30	9.8
	401.9	384.0 <sup>b</sup>	30	-70	-25	9.8
Ara-CMP	322.0	79.0 <sup>a</sup>	30	-80	-70	7.8
	322.0	97.0 <sup>b</sup>	30	-80	-27	7.8

注：a为定量离子对，b为定性离子对

## 结果与讨论

Ara-CTP与CTP由于羟基位置不一致，互为顺反异构体，在质谱当中MRM离子对也一致。利用SelexION®技术，优化两种化合物的最适DMS分离条件，最终分离效果如图3，分离电压SV固定3800V条件下，COV电压升高时，两种异构体显示出不一致的COV值：CTP（13.6V）和Ara-CTP（16.3V），从另外一个维度上实现了两种化合物的基线分离。

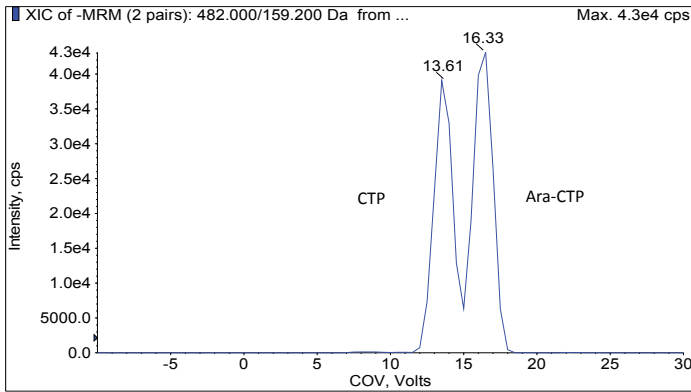


图3. Ara-CTP与CTP的优化DMS分离图。

为了确认特定的补偿电压COV条件下的分离效果，进行验证，分别采用Ara-CTP与CTP的单标进样，提取离子图。结果发现，当采用CTP单标进样时，仅提取CTP的提取离子图才有响应，而提取Ara-CTP没有响应（图4）；当采用Ara-CTP进样时，仅提取Ara-CTP离子图时才有响应，而提取CTP时没有响应（图5）。验证实验结果表明，使用SelexION® 技术，Ara-CTP与CTP在该DMS分离条件下得到了有效分离。

在最终优化的LC-DMS-MS/MS条件下，Ara-CMP、Ara-CDP、Ara-CTP、CTP和dCTP五种阿糖胞苷代谢物和类似物在0.25~20 μM 的范围内线性良好，相关系数r均大于0.995，线性及回归方程如表3。标准曲线样品中五个阿糖胞苷代谢物以及类似物的色谱图如图6，各化合物都实现了较好保留，且彼此基线分离（CTP与Ara-CTP为离子淌度分离），无相互干扰，峰形较好。

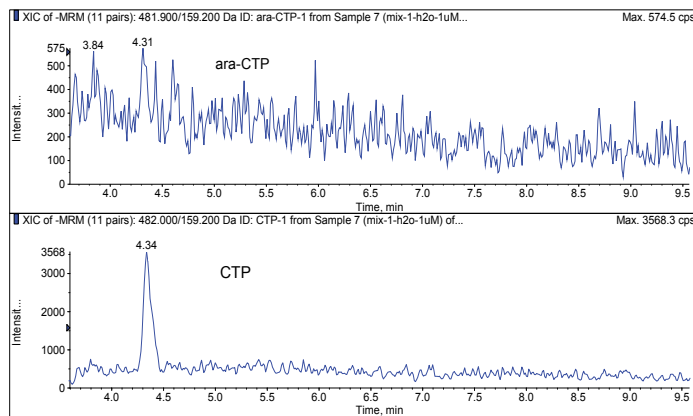


图4. CTP的单标溶液色谱图。

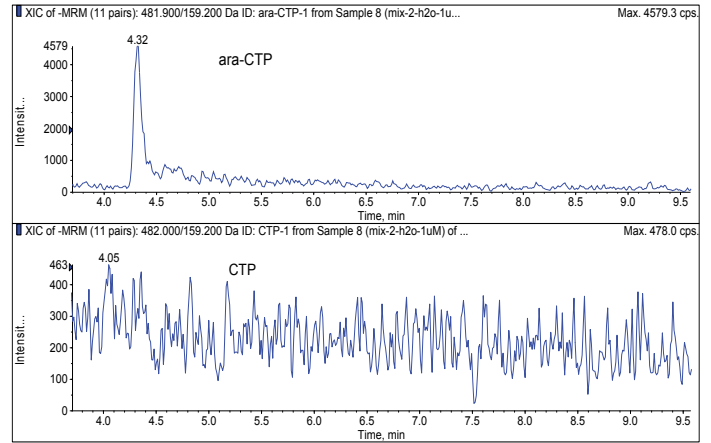


图5. Ara-CTP单标溶液色谱图。

表3. 各化合物的线性回归方程。

分析物	线性方程	相关系数r	权重	线性范围 (μM)
Ara-CMP	$y=5.4e4x-8.7e2$	0.9990	1/X2	0.25~20
Ara-CDP	$y=2.2e4x-6.7e2$	0.9987	1/X2	0.25~20
Ara-CTP	$y=1.9e4x-1.2e3$	0.9971	1/X2	0.25~20
dCTP	$y=2.1e4x-3.8e2$	0.9975	1/X2	0.25~20
CTP	$y=2.3e4x-2.8e3$	0.9972	1/X2	0.25~20

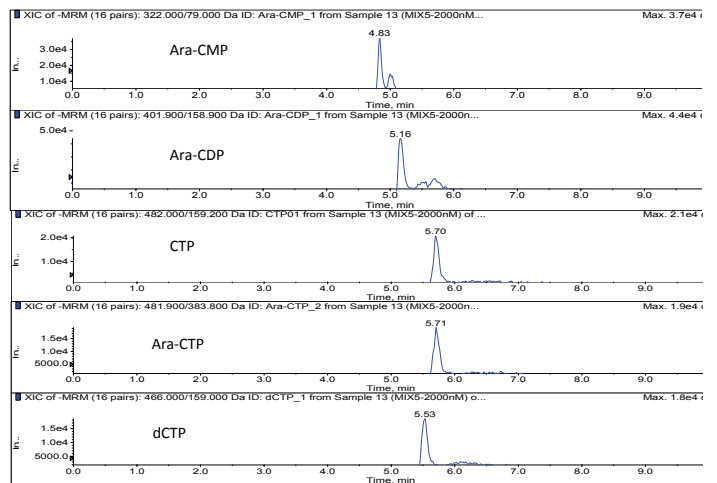


图6. 五种阿糖胞苷代谢物和类似物的色谱图。

## 总结

本研究建立了可同时分析测定Ara-CMP、Ara-CDP、Ara-CTP、CTP和dCTP的LC-DMS-MS/MS方法，质谱与离子淌度技术的结合，实现了手性异构体的分离，为异构体准确定量提供了新的思路。Ara-CTP和CTP，在不需较长分析时间来完成色谱分离的情况下，使用SelexION® DMS质谱技术，从另外的维度实现了二者分离，实现了阿糖胞苷类五种化合物的同时测定。

仅限专业展会等使用、仅向专业人士提供的内部资料

SCIEX临床诊断产品线仅用于体外诊断。仅凭处方销售。这些产品并非在所有国家地区都提供销售。获取有关具体可用信息，请联系当地销售代表或查阅<https://sciex.com.cn/diagnostics>。所有其他产品仅用于研究。不用于临床诊断。本文提及的商标和/或注册商标，也包括相关的标识、标志的所有权，归属于AB Sciex Pte. Ltd. 或在美国和/或某些其他国家地区的各权利所有人。

© 2020 DH Tech. Dev. Pte. Ltd. RUO-MKT-02-11943-ZH-A



### SCIEX中国

北京分公司  
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  
全国咨询电话：800-820-3488, 400-821-3897

上海公司及中国区应用支持中心  
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  
官网：[sciex.com.cn](http://sciex.com.cn)

广州分公司  
广州市天河区珠江西路15号  
珠江城1907室  
电话：020-8510-0200  
传真：020-3876-0835  
官方微信：[ABSciex-China](https://www.absciex.com.cn)