

# 超高效液相色谱 - 三重四极杆质谱联用检测人血浆中克拉屈滨、克罗拉滨、奈拉滨

## LCMSMS-291

**摘要：**本文建立了一种使用岛津超高效液相色谱和三重四极杆质谱联用技术测定人血浆中克拉屈滨、克罗拉滨、奈拉滨的方法。人血浆样品经乙腈沉淀后，可在 6 min 内快速、准确地测定其中的克拉屈滨、克罗拉滨、奈拉滨。本文考察了方法的线性、定量限、重复性、基质效应、残留；结果表明：克拉屈滨、克罗拉滨在 0.05~10 ng/mL 范围内线性良好，奈拉滨在 0.05~5 ng/mL 范围内线性良好，相关系数均大于 0.995；方法定量限为 0.05 ng/mL；低、中、高浓度 QC 样品连续进样 6 次，其精密度与准确度分别在 3.33~9.39% 与 87.69~108.00% 之间；克拉屈滨、克罗拉滨、奈拉滨低、中高浓度样品基质效应在 94.22~117.57% 间，内标基质效应为 94.87%。使用高灵敏度的 LCMS-8050 系统，可以简化前处理过程，在提高分析效率的同时，显著降低成本。

**关键词：**克罗拉滨 克拉屈滨 奈拉滨 超高效液相色谱 三重四极杆质谱

慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 是临床较常见的成人白血病，发病率约占所有白血病的 5%；且 CLL 男性发病率高于女性，50 岁后发病率呈显著增加趋势。核苷类似物在慢性淋巴细胞白血病 (CLL) 中疗效确切，目前在临床治疗 CLL 使用较多的化疗药物为核苷类似物药物克拉屈滨、克罗拉滨、奈拉滨等。核苷类似物能模拟天然核苷来干扰 DNA、RNA 合成、DNA 修复或者抑制有核苷 (酸) 参与的生物过程，从而阻碍癌细胞快速生长，继而达到抗癌效果。克拉屈滨、克罗拉滨、奈拉滨进入

人体后，克拉屈滨和克罗拉滨通过脱氧胞苷激酶活化为单磷酸盐形式，而奈拉滨经鸟嘌呤核苷激酶活化；之后这 3 种药物转化为有活性的三磷酸盐而抑制 DNA 合成。

本文旨在建立一种人血浆中克罗拉滨、克拉屈滨、奈拉滨含量的检测方法，为研究人体内克拉屈滨、克罗拉滨、奈拉滨代谢过程提供一种快速、灵敏、简便的检测方法，以契合合作机构\*进一步同时分析人血浆中克拉屈滨、克罗拉滨、奈拉滨及其活性代谢物含量的需求。

## 实验部分

### 1.1 仪器

本实验使用岛津超高效液相色谱仪 LC-30A 与三重四极杆质谱仪 LCMS-8050 联用系统。具体配置为 LC-30AD×2 输液泵，DGU-20A<sub>5</sub> 在线脱气机，SIL-30AC 自动进样器，CTO-20A 柱温箱，CBM-20A 系统控制器，LCMS-8050 三重四极杆质谱仪，LabSolutionsLCMS Ver.5.85 版色谱工作站。

### 1.2 分析条件

液相条件

液相色谱条件

色谱柱：Shim-pack GISS Column(2.1 mm I.D.

×100 mm L., 1.9 μm,P/N 227-30048-02)

流动相：A 相 -0.025 % 甲酸 -2 mM 乙酸铵水溶液；

B 相 - 乙腈

流速：0.45 mL/min

进样体积：5 μL

柱温：30°C

样品温度：6°C

洗针液：R0-50% 甲醇水溶液；

R1：80% 乙腈水溶液

洗针模式：进样前后洗针，External&Internal(进样针内外壁清洗)

内壁洗针程序：分析开始后 4 min 进行清洗，内壁洗针体积 300 μL；平衡时间 0.5 min。

外壁洗针体积：600 μL

洗脱方式：采用梯度洗脱，B 相初始浓度为 2 % 时间程序见表 1

表1 梯度洗脱时间程序

Time(min)	Module	Command	Value
1.00	Pumps	Pump B Conc.	2
2.00	Pumps	Pump B Conc.	90
2.00	Pumps	Total Flow	0.45
2.01	Pumps	Total Flow	0.6
4.30	Pumps	Pump B Conc.	90
4.30	Pumps	Total Flow	0.6
4.35	Pumps	Pump B Conc.	2
4.35	Pumps	Total Flow	0.45
6.00	Controller	Stop	

## 质谱条件

离子化模式: ESI, 正离子模式分析

离子源接口电压: 4.5 kV

雾化气: 氮气 3.0 L/min

加热气: 干燥空气 10.0 L/min

干燥气: 氮气 10.0 L/min

碰撞气: 氩气

DL 温度: 200°C

加热模块温度: 400°C

扫描模式: 多反应监测 (MRM)

驻留时间: 30 ms

延迟时间: 3 ms

MRM 参数: 见表 2

表2 MRM参数

名称	CAS	前体离子	产物离子	Q1 Pre	碰撞能量	Q3 Pre
		[M+H] <sup>+</sup>	(m/z)	Bias (V)	CE(V)	Bias (V)
克拉屈滨 Cladribine	4291-63-8	286.05	170.05*	-14.0	-15.0	-18.0
			134.00	-14.0	-35.0	-23.0
克罗拉滨 Clofarabine	123318-82-1	304.00	170.05*	-12.0	-27.0	-12.0
			134.00	-11.0	-36.0	-27.0
奈拉滨 Nelarabine	121032-29-9	298.05	149.00*	-14.0	-34.0	-26.0
			166.10	-11.0	-18.0	-11.0
邻甲苯海拉明 Mephenamine	341-69-5	270.15	181.10	-15.0	-16.0	-15.0

\*代表定量离子对

## 1.3 标准品与试剂

克罗拉滨、克拉屈滨、奈拉滨标准品: 含量 99.7%, 4°C 保存。

邻甲苯海拉明 (内标): 含量 99.5%, 4°C 保存。

甲醇 / 乙腈: Merck 公司, 色谱级, 室温保存。

实验用水: 由 Milli-Q Plus 水净化系统经去离子与二次净化制得。

甲酸: 购自安谱公司, 色谱级, 纯度 98%, 室温保存。

乙酸铵: 购自安谱公司, 色谱级, 纯度 99%, 室温保存。

#### 1.4 对照品溶液及内标溶液的配制

克拉屈滨、克罗拉滨、奈拉滨标准储备液：取适量克拉屈滨、克罗拉滨、奈拉滨标准储备液 (50% 甲醇水溶解，浓度均为 100 μg/mL)，用 50% 甲醇水稀释至 1.0 μg/mL，至适宜容器中于 -20℃ 冰箱保存，备用。

克拉屈滨、克罗拉滨、奈拉滨工作溶液：吸取适量克罗拉滨、克拉屈滨、奈拉滨储备液，用 50% 甲醇水溶液分别配制成浓度为 2、5、10、20、40、80、160、300、400 ng/mL (克拉屈滨、克罗拉滨)、浓度为 2、2.5、5、10、20、40、80、150、200 ng/mL (奈拉滨) 工作液；临用时等体积混匀，得到克拉屈滨、克罗拉滨、奈拉滨混合工作浓度分别为 1/1/1、2.5/2.5/1.25、5/5/2.5、10/10/5、20/20/10、40/40/20、80/80/40、150/150/75、200/200/100 ng/mL；至适宜容器中于 4℃ 冰箱保存，备用。

邻甲苯海拉明 (内标) 标准储备液：精密称定 1.02 mg 用甲醇溶解并定容至 1 mL 混匀，至适宜容器中于 -20℃ 冰箱保存备用。

邻甲苯海拉明 (内标) 标准工作溶液：用甲醇配制浓度为 10 ng/mL 标准工作液，临用前配制。

#### 1.5 样品制备

标准曲线样品：取人血浆 95 μL，加入 5 μL 标准混合对照工作液、10 μL 内标工作液、涡旋混合 30 s 后加入 300 μL 乙腈涡旋混合 1 min，于 14000 rpm 离心 10 min；取上层清液 200 μL，用 200 μL 纯水稀释，以 5 μL 进样 LC-MS/MS 分析。

质控样品：取人血浆 95 μL，加入 5 μL 克拉屈滨、克罗拉滨、奈拉滨的质控工作液、10 μL 内标工作液、其余处理过程同标准曲线样品。

基质样品：人血浆 95 μL，300 μL 乙腈涡旋混合 1 min，加入 5 μL 克拉屈滨、克罗拉滨奈拉滨的标准工作液、10 μL 内标工作液，其余处理过程同标准曲线样品。

工作液样品：取纯水 95 μL，加入 5 μL 克拉屈滨、克罗拉滨、奈拉滨标准工作液、10 μL 内标工作液、其余处理过程同标准曲线样品。

$$\text{基质效应}(\%) = \frac{\text{基质样品峰面积}}{\text{工作液样品峰面积}} \times 100\%$$

## 结果讨论

### 2.1 标准样品一级质谱图与产物离子扫描质谱图

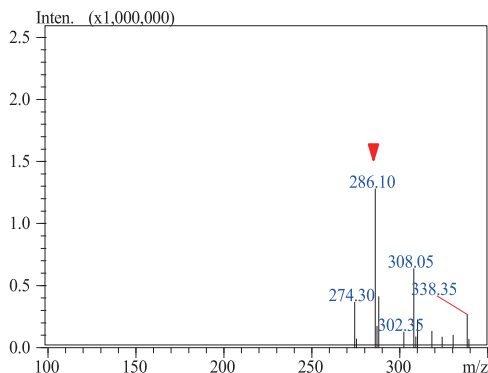


图1 克拉屈滨一级质谱图

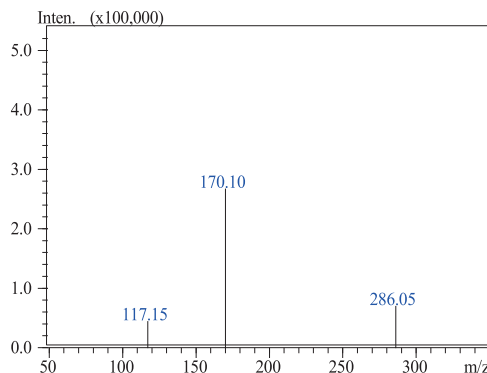


图2 克拉屈滨产物离子质谱图

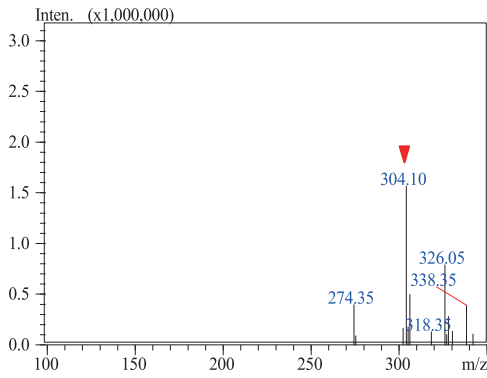


图3 克罗拉滨一级质谱图

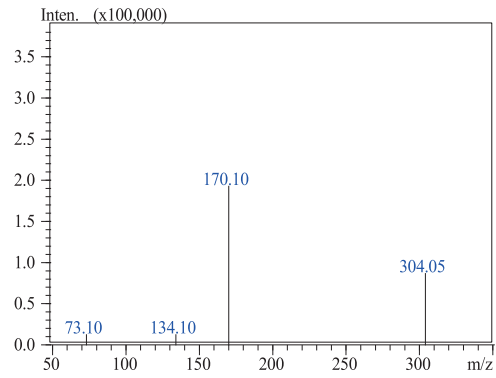


图4 克罗拉滨产物离子质谱图

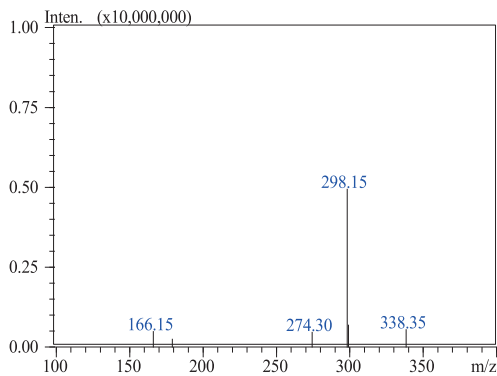


图5 奈拉滨一级质谱图

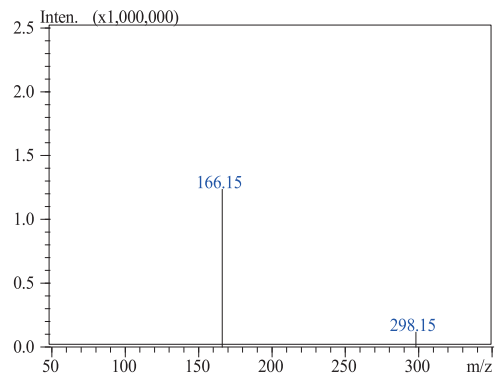


图6 奈拉滨产物离子质谱图

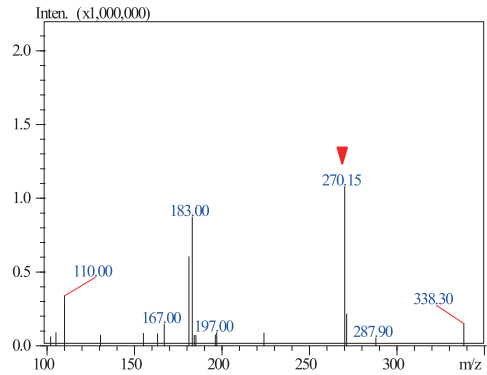


图7 内标-邻甲苯海拉明一级质谱图

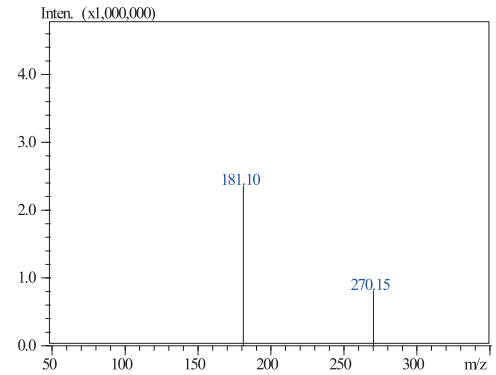


图8 内标-邻甲苯海拉明产物离子质谱图

## 2.2 标准曲线

取空白人血浆匀浆 100  $\mu$ L，按照样品处理方法制备，结果如图 9~16 所示。结果显示，人空白血浆中目标化合物克拉屈滨、克罗拉滨、奈拉滨及内标的通道均不干扰定量限样品的检测。

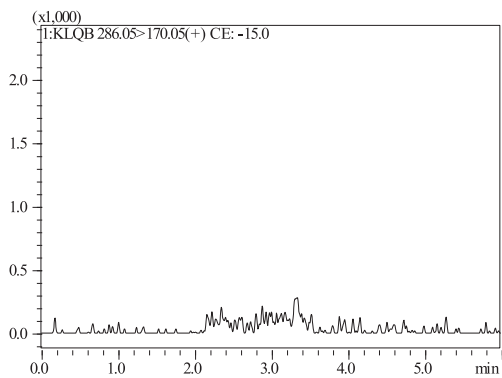


图9 空白血浆MRM谱图-克拉屈滨

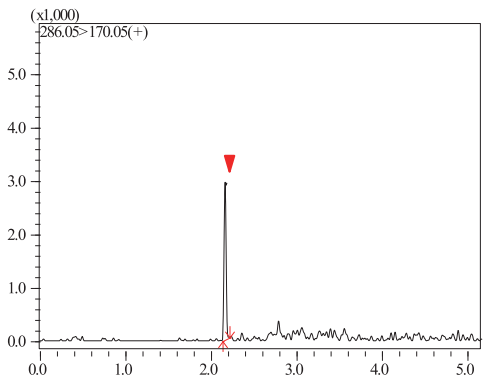


图10 血浆样品MRM谱图-克拉屈滨(0.05 ng/mL)

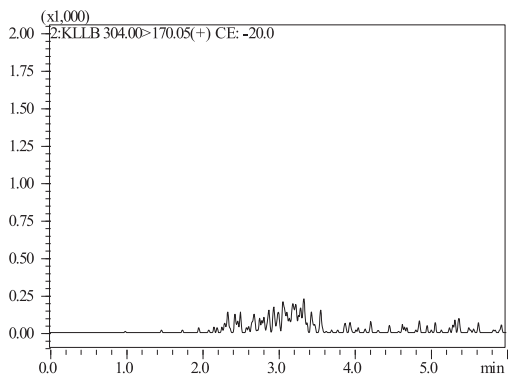


图11 空白血浆MRM谱图-克罗拉滨

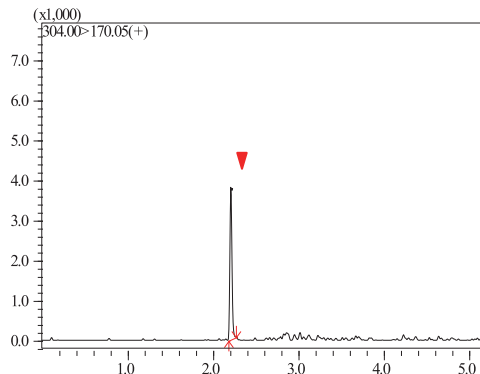


图12 血浆样品MRM谱图-克罗拉滨(0.05 ng/mL)

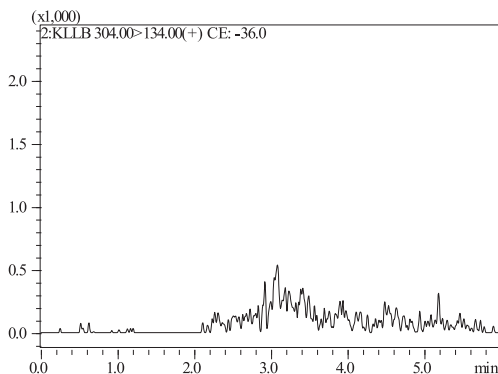


图13 空白血浆MRM谱图-奈拉滨

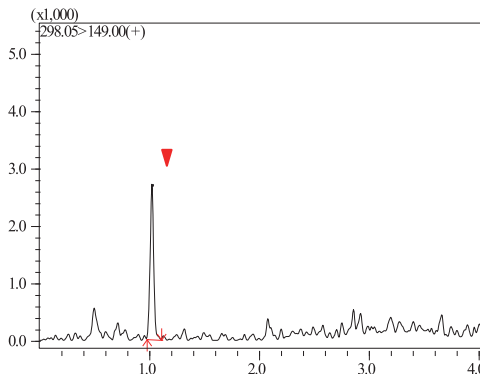


图14 血浆样品MRM谱图-奈拉滨(0.05 ng/mL)

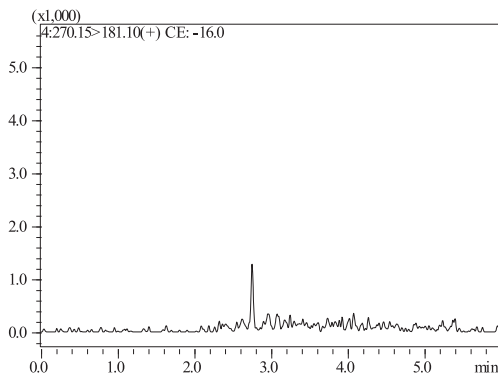


图15 空白血浆MRM谱图-邻甲苯海拉明

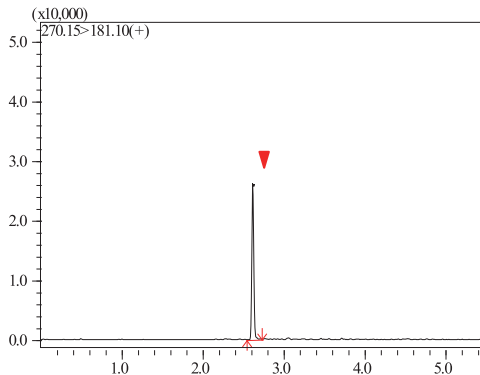


图16 血浆样品MRM谱图-邻甲苯海拉明

### 2.3 线性范围

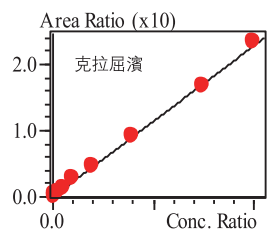


图17 克拉屈滨血浆校准曲线

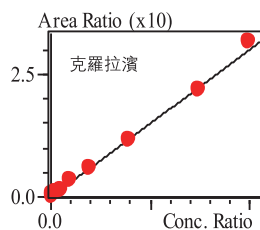


图18 克羅拉濱血浆校准曲线

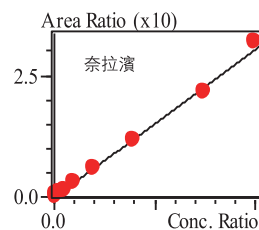


图19 奈拉濱血浆校准曲线

人血浆配制校准曲线样品浓度分别为 0.05 ng/mL、0.125 ng/mL、0.25 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、4 ng/mL、7.5 ng/mL、10 ng/mL( 克拉屈滨、克罗拉滨 ); 0.05 ng/mL、0.0625 ng/mL、0.125 ng/mL、0.25 ng/mL、0.5 ng/mL、1 ng/mL、2 ng/mL、3.75 ng/mL、5 ng/mL( 奈拉滨 )。标准曲线如图 17、18、19 所示, 线性方程及相关系数见表 3, 其中 y 值代表待测物质与内标物质峰面积的比值, x 值代表血浆中待测物质浓度比。

表3 克拉屈滨、克罗拉滨、奈拉滨校准曲线参数(线性回归, 权重为1/C)

名称	校准曲线	线性范围(ng/mL)	准确度(%)	相关系数 r
克拉屈滨	Y=2.35695X-0.0102252	0.05~10	92.8~108.5 %	0.9979
克罗拉滨	Y=3.01208X-0.025333	0.05~10	91.3~110.8 %	0.9987
奈拉滨	Y=6.09818X-0.160856	0.05~5	88.1~108.7	0.9987

#### 2.4 基质效应

基质效应考察结果如表 4 所示。

表4 基质效应(n=6)

浓度水平	基质效应					
	理论浓度 (ng/mL)	克拉屈滨	理论浓度 (ng/mL)	克罗拉滨	理论浓度 (ng/mL)	奈拉滨
LQC	0.0625	117.57	0.0625	101.27	0.0625	100.02
MLQC	0.4	96.14	0.4	102.62	0.25	109.29
MQC	5.0	94.22	5.0	100.53	2.5	107.68
HQC	7.5	103.49	7.5	101.27	3.75	100.35
内标						94.87

结果表明, 克拉屈滨、克罗拉滨、奈拉滨低、中、高浓度样品及内标的基质效应在 94.22~117.57% 之间。

#### 2.5 精密度与准确度

考察四个浓度水平质控样品的日内精密度, 结果如表 5 所示。

表5 方法精密度与准确度(n=6)

待测物质 样品浓度 (ng/mL)	精密度 RSD%	准确度 Accuracy%	待测物质 样品浓度 (ng/mL)	精密度 RSD%	准确度 Accuracy%	待测物质 样品浓度 (ng/mL)	精密度 RSD%	准确度 Accuracy%			
克	0.0625	6.66	91.00	克	0.0625	9.39	101.92	奈	0.0625	4.70	87.69
拉	0.4	8.51	108.00	罗	0.4	3.33	97.70	拉	0.25	5.35	97.21
屈	5.0	4.64	89.87	拉	5.0	4.68	89.00	滨	2.5	7.70	106.79
滨	7.5	4.34	99.14	滨	7.5	6.66	87.96		3.75	4.76	102.99

结果表明，克拉屈滨、克罗拉滨、奈拉滨低、中、高浓度样品日内精密度在 3.33~9.39% 之间；准确度在 87.69~108.00% 之间。

## 2.6 残留

在高浓度样品 (STD9) 后进样分析空白样品，结果克罗拉滨、克拉屈滨、奈拉滨及内标物质检测通道均无目标化合物干扰。

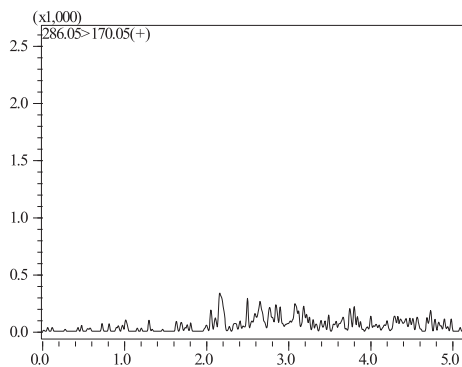


图20 克拉屈滨残留考察图谱

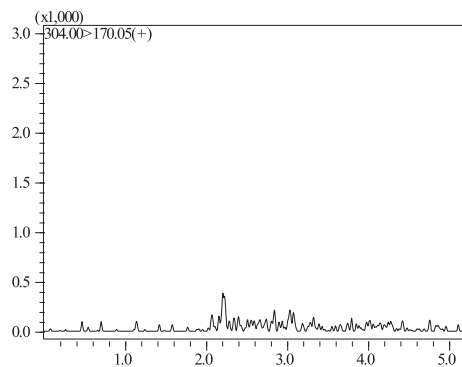


图21 克罗拉滨残留考察图谱

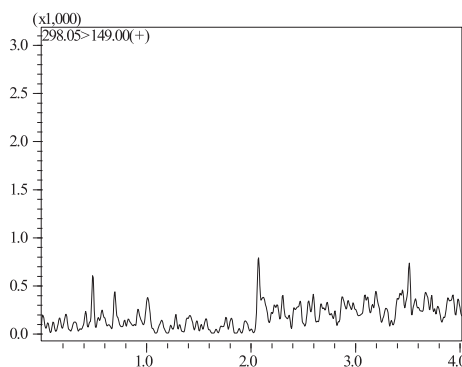


图22 奈拉滨残留考察图谱

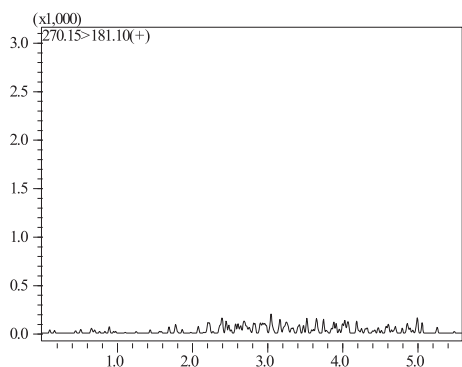


图23 邻甲苯海拉明残留考察图谱

## 结论

克拉屈滨、克罗拉滨在 0.05~10 ng/mL 范围内线性良好，奈拉滨在 0.05~5 ng/mL 范围内线性良好，相关系数均大于 0.995；方法定量限为 0.05 ng/mL；低、中、高浓度 QC 样品连续进样 6 次，其精密度与准确度分别在 3.33~9.39% 与 87.69~108.00% 之间；克拉屈滨、克罗拉滨、奈拉滨低、中高浓度样品基质效应在 94.22~117.57% 间，内标基质效应为 94.87%。使用高灵敏度的 LCMS-8050 系统，可以简化前处理过程，在提高分析效率的同时，显著降低成本；从而契合作机构进一步同时分析人血浆中克拉屈滨、克罗拉滨、奈拉滨及其活性代谢物含量的需求。