



UHPLC-MS/MS测定人血浆中尿嘧啶与二氢尿嘧啶的浓度

童萃, 陈顺, 王志鹏, 高守红

UHPLC-MS/MS determination of uracil and dihydrouracil in human plasma

TONG Cui, CHEN Shun, WANG Zhipeng, GAO Shouhong

在线阅读 View online: <http://yxsj.smmu.edu.cn/article/doi/10.12206/j.issn.1006-0111.202102011>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

UPLC-MS/MS法测定人血浆中丙硫氧嘧啶的含量

Determination of propylthiouracil in human plasma by UPLC-MS/MS

药学实践杂志. 2020, 38(4): 350-353, 378 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202001063

用LC-MS/MS法测定大鼠血浆中大蒜皂苷PIEB的浓度及其体内药动学研究

Study on determination and pharmacokinetics of garlic saponins PIEB in the rat plasma by LC-MS/MS

药学实践杂志. 2019, 37(1): 37-41 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2019.01.009

UHILIC-MS/MS法同时测定复方三维右旋泛酸钙糖浆中5种维生素的含量

Simultaneous determination of 5 B-vitamins in compound trivitamin and calcium pantothenate syrup by UHILIC-MS/MS

药学实践杂志. 2018, 36(6): 512-517, 528 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.2018.06.008

用电感耦合等离子体质谱法测定钆特酸葡胺注射液中游离Gd³⁺的含量

Determination of the content of Gd³⁺ in gadoteric acid meglumine salt injection by ICP-MS method

药学实践杂志. 2020, 38(2): 124-128 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.201908132

用LC-MS法测定人血浆中顺式阿曲库铵的浓度

Cisatracurium assay in human plasma by LC-MS

药学实践杂志. 2020, 38(2): 148-151 DOI: 10.3969/j.issn.1006-0111.201909001

离心超滤结合超高效液相色谱串联质谱法测定人血浆中替考拉宁游离浓度

Assay of unbound teicoplanin in human plasma by centrifugal ultrafiltration combined with ultra performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry

药学实践杂志. 2020, 38(6): 547-551 DOI: 10.12206/j.issn.1006-0111.202003184



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

· 研究报告 ·

UHPLC-MS/MS 测定人血浆中尿嘧啶与二氢尿嘧啶的浓度

童 萃, 陈 顺, 王志鹏, 高守红 (海军军医大学附属长征医院药学部, 上海 200003)

[摘要] 目的 建立同时测定人血浆中尿嘧啶(U)和二氢尿嘧啶(UH₂)含量的超高效液相色谱串联质谱(UHPLC-MS/MS)方法。方法 在 Agilent 6460A 串联质谱仪上采用正离子检测模式,以氯尿嘧啶为内标,3%牛血清蛋白为代血浆基质,样本经乙酸乙酯液萃取后在 Agilent poroshell 120 SB-Aq (2.1 mm×100 mm, 2.7 μm) 色谱柱上采用梯度洗脱进行色谱分离。流动相为 5 mmol/L 醋酸铵水溶液和乙腈溶液;流速 0.3 ml/min;柱温为 30 °C;进样量为 5 μl。结果 尿嘧啶和二氢尿嘧啶的线性范围为 10.0~1 500.0 ng/ml,线性关系良好,其相关系数 $r>0.990$,日内与日间精密度偏差均<15%。结论 该方法操作简单、选择性好,可用于测定人血浆中尿嘧啶和二氢尿嘧啶的含量。

[关键词] 超高效液相串联质谱法;尿嘧啶;二氢尿嘧啶;含量测定

[中图分类号] R917 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1006-0111(2021)04-0348-04

[DOI] 10.12206/j.issn.1006-0111.202102011

UHPLC-MS/MS determination of uracil and dihydrouracil in human plasma

TONG Cui, CHEN Shun, WANG Zhipeng, GAO Shouhong (Department of Pharmacy, Changzheng Hospital Affiliated to Naval Medical University, Shanghai 200003, China.)

[Abstract] **Objective** To establish an UHPLC-MS/MS method for the determination of uracil (U) and dihydrouracil (UH₂) in human plasma. **Methods** A positive ion detection mode was adopted on the Agilent 6460A mass spectrometer. Chlorouracil was used as the internal standard. 3% bovine serum albumin was used as surrogate plasma matrix. The pretreatment of plasma sample was completed based on liquid-liquid extraction with ethyl acetate. The chromatographic separation was achieved on an Agilent Poroshell 120 SB-Aq (2.1 mm×100 mm, 2.7 μm) column with gradient elution. The mobile phase was 5 mmol/L ammonium acetate aqueous solution and acetonitrile solution. The flow rate was 0.3 ml/min. The column temperature was 30°C. The injection volume was 5 μl. **Results** The linear range of uracil and dihydrouracil was 10.0-1 500.0 ng/ml. Both of uracil and dihydrouracil had good linear relationship with correlation coefficient (r)>0.990. Both of inter- and intra-day precision was <15%. **Conclusion** The established method is simple, selective, and suitable for the determination of U and UH₂ in human plasma.

[Key words] UHPLC-MS/MS; uracil; dihydrouracil; content determination

嘧啶类化疗药物在肿瘤治疗中的地位越来越重要,其代表药物 5-氟尿嘧啶及其口服前药卡培他滨更受到了广泛关注,体内二氢尿嘧啶脱氢酶(DPD)是此类药物代谢的限速酶之一^[1],前瞻性评价 DPD 的总体活性有利于提高药物疗效及减少患者的毒副反应,对临床具有重要意义。内源性物质尿嘧啶(U)是体内 DPD 的天然底物,在此酶的催化下生成二氢尿嘧啶(UH₂),并最终通过尿液排出体外。测定血浆中 U 和 UH₂ 的含量,并通过 (UH₂)/ (U) 比值计算,可从代谢物的角度评价 DPD 的活性^[2]。临床上常用评价 DPD 酶活性的方法是测定患者的

基因表型,DPD 的编码基因 DPYD 序列中包含了多达 7 600 个多态位点,使得 DPD 酶的活性在人群中是高度可变的^[3]。不同的突变位点及不同位点的组合给临床检测带来了极大的困难。到目前为止,也只有 DPYD*2A 的多态性被用于临床实践,用来筛选出 5-氟尿嘧啶代谢严重不良的患者,避免严重的毒副反应^[4]。单一应用基因的多态性来评价 DPD 酶的活性在临床上存在一定的困难,基因的多态性并不能直接同下游的酶的活性联系起来,两者并没有完全对等的关系。基因需通过转录、翻译和蛋白的修饰之后才能发挥作用。基因多态联合下游代谢物的含量测定更能准确的评价 DPD 酶的活性^[5]。目前常应用液相色谱-串联质谱联用法对人血浆或干燥唾液中 U 和 UH₂ 浓度进行检测^[6-11],但所报道的方法均有一些复杂或难以重现。本研

[基金项目] 上海市科委医学引导项目(17411972400)

[作者简介] 童 萃,药师,Email: 705802791@qq.com

[通信作者] 高守红,副主任药师,研究方向:药物分析与临床药学,Email: gaoshouhong@126.com

究成功的建立了一种灵敏、高效、准确、重现性好,且能同时测定人血浆中U和UH₂浓度的UHPLC-MS/MS方法,为体内DPD总体活性提供更客观有效的评价途径。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与耗材

1290-6460A超高效液相色谱-串联质谱仪,包含G4220A二元泵、G4226A自动进样器、G1316C柱温箱、MassHunter数据处理工作站(美国Agilent);调速涡旋混合器(美国Labnet);SK7200H超声仪(上海科导超声仪器有限公司);BSA124S-CW分析天平(德国赛多利斯);5810R型低温高速离心机、移液器(德国Eppendorf公司)。

1.2 药品与试剂

尿嘧啶、二氢尿嘧啶和氯尿嘧啶(内标)对照品(纯度>99%,大连美仑生物有限公司);乙酸铵(美国赛默飞世尔科技);甲醇、乙腈、乙酸乙酯、异丙醇(色谱纯,德国默克公司);屈臣氏蒸馏水(广州屈臣氏食品饮料有限公司);牛血清白蛋白(BSA)(上海博光生物科技有限公司);生理盐水(长征医院药学部自制)。

1.3 色谱分离条件

色谱柱为Agilent poroshell 120 SB-Aq-柱(2.1 mm×100 mm, 2.7 μm),流动相为5 mmol/L乙酸铵水溶液(A)和乙腈(B),流速为0.3 ml/min,梯度洗脱:0~0.3 min, 100% A; 0.3~1.0 min, 100%~10% A; 1.0~2.5 min, 10% A;柱温为30℃,洗脱时间2.5 min,进样量5 μl。

1.4 质谱分离条件

采用ESI离子源,多重反应监测(MRM)进行一/二级质谱分析,用于定量分析的检测离子为:U[M+H]⁺ *m/z* 113.0→40.1,检测模式为正离子模式;UH₂[M+H]⁺ *m/z* 115.0→55.1,检测模式为正离子模式;氯尿嘧啶(IS)[M-H]⁻ *m/z* 145.0→42.1,检测模式为负离子模式。雾化温度为300℃,雾化气压为40 psi,干燥气流速为10 L/min,鞘气温度300℃,鞘气流速12 L/min,解离电压为4 000 V。

1.5 样本采集

选取8名血浆样品指标正常的成年人,于当日清晨8时空腹状态下静脉采血3 ml,EDTA-3K管抗凝,离心后分离上层血浆,于-80℃冰箱冻存。

1.6 样本预处理

取100 μl样本,加10 μg/ml氯尿嘧啶(IS)10 μl,加乙酸乙酯3 ml,涡旋5 min,1710×g离心10 min,

取上层有机相2.7 ml,45℃氮气挥干仪挥干,用10%甲醇溶液100 μl复溶,涡旋1 min,取上清液进样分析。

1.7 标准溶液配制

用含有3%牛血清白蛋白作为空白基质代替血浆配置标准曲线样品。取100 μg/ml的尿嘧啶和二氢尿嘧啶各100 μl,加800 μl水,制成10 μg/ml标准混合液,置于-20℃备用。取10 μg/ml标准混合液适量,用3%牛血清白蛋白稀释制成10、20、50、100、200、500、1000、1500 ng/ml系列浓度样品,然后按照上述“1.6”项下样品的处理方法配制。

2 结果

2.1 专属性考察

U和UH₂的出峰时间以及峰型良好,代替血浆经过前处理后,对待测组分的测定没有干扰,内标对分析物的测定也没有干扰,且能很好分离,结果见图1。

2.2 标准曲线和线性范围

U和UH₂的线性范围是10.0~1 500.0 ng/ml,以空白BAS中U和UH₂的浓度为横坐标(*X*),U和UH₂与内标化合物氯尿嘧啶的峰面积比为纵坐标(*Y*),进行最小二乘法加权(权重系数为1/*χ*²),U和UH₂的线性回归方程分别是 $Y=0.27X+0.0022$ 、 $Y=0.58X+0.0380$,*r*均>0.990,表明线性关系良好。

2.3 精密度和准确度

取定量下限、低、中、高标准添加血浆样本按照前处理方法进行处理,每个浓度样品平行制备5份进行分析,连续3 d重复操作,根据当天的标准曲线计算当天实测样本浓度,计算样本在低、中和高浓度下的日内、日间精密度和准确度,结果显示,精密度和准确度的偏差均在15%左右。准确度相对偏差在20%范围内时,最低定量下限精密度偏差不大于20%,结果见表1。

2.4 基质效应和提取回收率

取低、高2个浓度的样本进行基质效应和提取回收率考察,结果显示,U、UH₂及内标氯尿嘧啶的基质效应和提取回收率良好,结果均较稳定,结果见表2。

2.5 样品稳定性

考察低、高2个浓度的血浆样品经历3次冷冻与解冻循环的稳定性、血浆样品在室温(25℃)放置6 h后经样品处理后稳定性和血浆样品经样品处理后室温放置24 h的稳定性,结果显示,3次冻融、6 h室温(25℃)条件下和24 h放置自动进样器中的稳

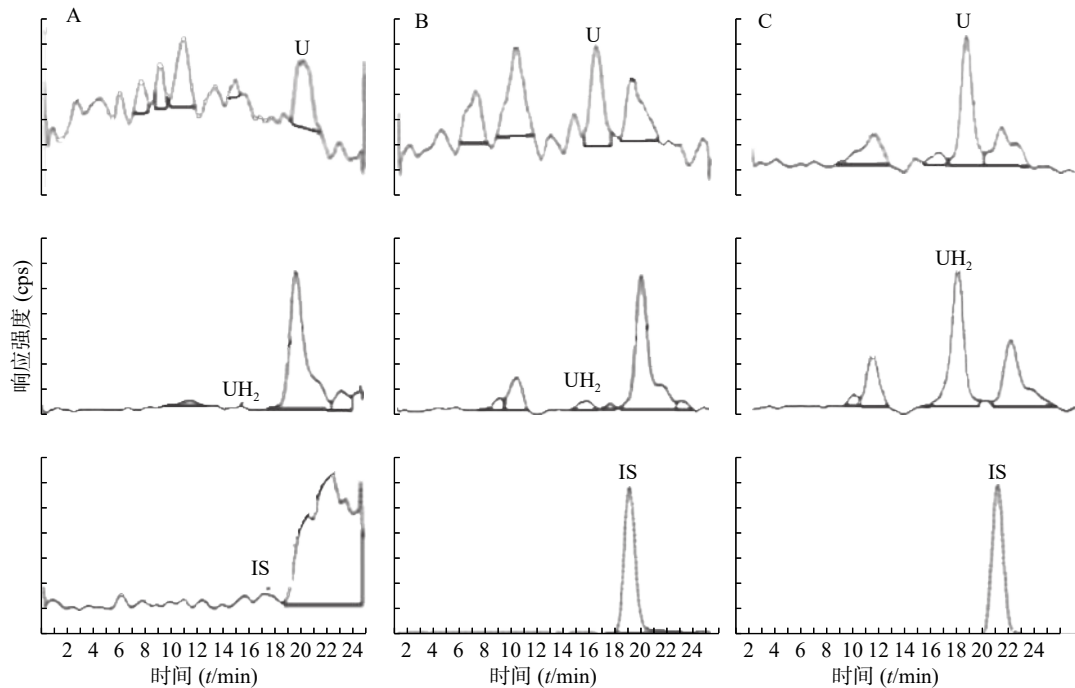


图1 尿嘧啶和二氢尿嘧啶及内标质谱多反应监测色谱图

A.空白 BSA; B.空白 BSA 添加内标样本; C.定量下限(LLOQ)标添样本。

表1 尿嘧啶和二氢尿嘧啶的精密度 ($n=5$)

分析物	标示浓度 (ng/ml)	日内			日间		
		测定浓度 (ng/ml)	精密度(CV%)	准确性(RE%)	测定浓度 (ng/ml)	精密度(CV%)	准确性(RE%)
尿嘧啶	10	10.2±0.38	3.74	2.58	10.12±0.78	7.70	1.18
	20	20.63±1.21	5.87	3.15	19.97±1.35	6.74	-0.16
	500	529.73±4.64	0.88	5.95	484.32±35.72	7.37	-3.12
	1000	1093.33±25.10	2.30	9.33	1098.25±25.16	2.29	9.82
二氢尿嘧啶	10	10.32±0.71	6.86	3.18	10.28±0.65	6.37	2.77
	20	19.98±2.19	10.95	-0.12	19.86±1.85	9.31	-0.72
	500	517.51±10.69	2.07	3.50	515.66±10.36	2.01	3.13
	1000	1079.83±17.91	1.66	7.98	1080.11±24.50	2.27	8.01

表2 尿嘧啶和二氢尿嘧啶的基质效应和提取回收率

分析物	标识浓度 (ng/ml)	基质效应		提取回收率	
		平均基质效应CV(%)	平均回收率CV(%)	平均回收率CV(%)	平均回收率CV(%)
尿嘧啶	1000	101.00	6.15	94.98	9.01
	20	99.99	3.63	100.01	7.64
二氢尿嘧啶	1000	85.72	2.07	106.47	1.58
	20	93.58	4.53	99.54	9.77

表3 样品的稳定性 (RE%)

分析物	冻融3次		室温放置6 h		置自动进样器24 h	
	低	高	低	高	低	高
尿嘧啶	100.71	98.34	93.49	106.60	108.20	107.99
二氢尿嘧啶	92.67	92.64	93.61	107.26	106.97	107.15

本测定的准确度。U 和 UH₂ 浓度测定结果见图 2。

定性均符合要求,结果见表 3。

2.6 样本检测

应用本研究所建立的方法,对 8 名健康成人的血浆样本测定分析,在样本实测过程中,同时插入已知浓度的随行质控样本(QC 样本),随时监控样

3 讨论

3.1 空白基质的选择

U 和 UH₂ 是人体内常见的两种物质,且同核酸的代谢密切相关,由于 U 和 UH₂ 均为人体内源性物质,故不能采用人源的基质进行方法学的开发

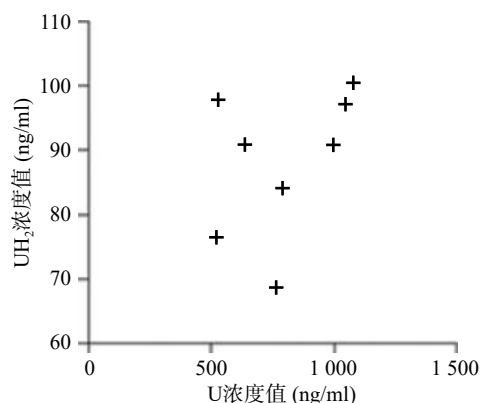


图2 实测8名健康成人内源性U和UH₂浓度值

及验证,通过查阅资料,选择了不含U和UH₂的3%牛血清蛋白作为基质进行方法学的开发^[12]。也有文献报道采用去除U和UH₂的人源血浆基质进行方法学实验^[9],但基质的来源较珍贵,不适合方法的普及,所以选用3%牛血清蛋白作为替代基质。

3.2 色谱柱的选择

U因其特殊的化学性质,在大部分的色谱柱上均没有保留。U和UH₂的LogP值分别为-0.707和-0.840,有较强的亲水性,决定了其不保留的性质。在定量方法的开发过程中,先后采用了Agilent Zorbax SB-C₁₈色谱柱,Agilent Zorbax Eclipse-C₁₈色谱柱,Waters Atlantis T₃色谱柱,Waters Xselect色谱柱,Waters Xbridge等色谱柱来进行条件摸索,但上述色谱柱对U和UH₂均没有保留。最后,采用Agilent Zorbax SB-Aq对U和UH₂进行定量分析,该色谱柱对强极性的化合物有较好的保留效果,同时,兼容100%的起始流动相也对保留产生了良好的结果。

3.3 样本预处理的优化

本研究还分别考察了几种常见的处理方法,包括甲醇和乙腈的蛋白沉淀、Waters Oasis HLB萃取板的固相萃取以及乙酸乙酯,甲基叔丁基醚,二氯甲烷/三氯甲烷,环己烷进行的液液萃取,结果发现乙酸乙酯对U和UH₂的萃取效果较好,同时,还分别考察了5%、10%、20%、30%、40%、50%的异丙醇、乙酸乙酯溶液对U和UH₂的萃取效果,结果发现,单纯的乙酸乙酯对待测化合物具有较好的提取效率。提取回收率均高于90%,且RSD<10%。另外对3%牛血清蛋白的基质效应进行了考察,结果发现平均基质效应在85%~101%之间,RSD<7%,说明该前处理方法对于基质的清除较为彻底,测定结果稳定,没有明显的基质干扰。

本研究虽重在方法开发,收集的样本数量较少,但从测定的U和UH₂浓度分布来看DPD对内源性U的代谢存在个体差异,建议临床应用5-氟尿嘧啶及其卡培他滨筛查DPD总体活性^[12-13],后续可进一步扩大样本数量进行深入研究。

4 结论

本实验建立了一种快速,稳定,高灵敏度的UHPLC-MS/MS方法,可用于测定人体内源性物质U和UH₂的含量,从代谢物的角度评价DPD酶的活性,从而协助临床医生制定化疗药物5-氟尿嘧啶及其口服前药卡培他滨合理的用量,以较低的毒副作用获得最大的临床疗效。

【参考文献】

- [1] SHARMA V, GUPTA S K, VERMA M. Dihydropyrimidine dehydrogenase in the metabolism of the anticancer drugs[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2019, 84(6): 1157-1166.
- [2] KOBUCHI S, AKUTAGAWA M, ITO Y, et al. Association between the pharmacokinetics of capecitabine and the plasma dihydrouracil to uracil ratio in rat: a surrogate biomarker for dihydropyrimidine dehydrogenase activity[J]. *Biopharm Drug Dispos*, 2019, 40(1): 44-48.
- [3] AMSTUTZ U, FROELICH T K, LARGIADÈR C R. Dihydropyrimidine dehydrogenase gene as a major predictor of severe 5-fluorouracil toxicity[J]. *Pharmacogenomics*, 2011, 12(9): 1321-1336.
- [4] DEENEN M J, TOL J, BURYLO A M, et al. Relationship between single nucleotide polymorphisms and haplotypes in DPYD and toxicity and efficacy of capecitabine in advanced colorectal cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2011, 17(10): 3455-3468.
- [5] SISTONEN J, BÜCHEL B, FROELICH T K, et al. Predicting 5-fluorouracil toxicity: DPD genotype and 5, 6-dihydrouracil: uracil ratio[J]. *Pharmacogenomics*, 2014, 15(13): 1653-1666.
- [6] ROBIN T, SAINT-MARCOUX F, TOINON D, et al. Automatic quantification of uracil and dihydrouracil in plasma[J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2020, 1142: 122038.
- [7] ANTUNES M V, RAYMUNDO S, CEZIMBRA DA SILVA A C, et al. Determination of endogenous concentrations of uracil and dihydrouracil in dried saliva spots by LC-MS/MS: method development, validation, and clinical application[J]. *Ther Drug Monit*, 2019, 41(3): 383-390.
- [8] CHAVANI O, JENSEN B P, STROTHER R M, et al. Development, validation and application of a novel liquid chromatography tandem mass spectrometry assay measuring uracil, 5, 6-dihydrouracil, 5-fluorouracil, 5, 6-dihydro-5-fluorouracil, α -fluoro- β -ureidopropionic acid and α -fluoro- β -alanine in human plasma[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2017, 142: 125-135.

(下转第365页)