

直接蛋白沉淀-超高效液相色谱法测定 氟尿嘧啶血药浓度

袁文博, 丁永娟*, 徐静静

(无锡市第四人民医院, 无锡 214000)

摘要 建立直接蛋白沉淀-超高效液相色谱法测定血浆中微量氟尿嘧啶的方法。以 6% 高氯酸为沉淀剂, 5-氯尿嘧啶为内标物, 样品经涡旋振荡等处理后, 高速离心获取上清液作为供试液。供试液测定采用 Acquity HSS T₃ 色谱柱, 水-乙腈为流动相, 流速为 0.2 mL/min, 进样量为 5 μ L, 柱温为 20 $^{\circ}$ C。方法的专属性、准确度、精密度、线性等指标经验证后完全符合定量测定要求, 与传统的测定方法相比, 可显著缩短进样分析时间、降低试剂成本。本方法已经被成功用于临床病人的血药浓度检测, 具有良好的临床应用前景。

关键词 蛋白沉淀; 超高效液相色谱; 5-氟尿嘧啶; 含量测定

中图分类号 R917 **文献标志码** A **文章编号** 1000-5048(2015)01-0081-04

doi:10.11665/j.issn.1000-5048.20150111

Determination of 5-fluorouracil in serum by direct protein precipitation-ultra performance liquid chromatography

YUAN Wenbo, DING Yongjuan*, XU Jingjing

The Fourth People's Hospital of Wuxi, Wuxi 214000, China

Abstract A method based on direct protein precipitation-ultra performance liquid chromatography was established for the determination of trace 5-fluorouracil in serum. The samples were pretreated with 6% perchloric acid as the precipitant and 5-chlorouracil as the internal standard, and the supernatant separated after vortex mixing and high speed centrifugation was used as the test sample. The separation was carried out with an Acquity HSS T₃ column and the mobile phase consisting of water and acetonitrile, and the flow rate was 0.2 mL/min; the injection volume was 5 μ L, and the column temperature was 20 $^{\circ}$ C. The key parameters of this method such as specificity, accuracy, precision and linearity, were validated. Compared with other methods, this method can complete the analysis with significantly reduced time and cost. The established method is useful for therapeutic drug monitoring of 5-fluorouracil plasma concentration and it has been successfully applied in clinical cases.

Key words protein precipitation; ultra performance liquid chromatography; 5-fluorouracil; determination

This study was supported by the Guidance Planning for the Development of Wuxi Medical Science & Technology (No. CSZON1311)

氟尿嘧啶(5-fluorouracil, 5-FU)是临床上常用的抗代谢类化疗药之一^[1]。由于 5-FU 价格低廉, 在体内能显著干扰并阻断 DNA、RNA 及蛋白质合成, 对消化道肿瘤及其他实体瘤有良好疗效, 因此被广泛运用于临床^[2-4]。

国内外相关研究显示: 由于患者体内代谢酶的

活性存在差异, 个体对 5-FU 的代谢速率差异较大。在按常规体表面积计算 5-FU 的用量时, 较难掌握剂量。同样的剂量因血药浓度偏低而影响疗效, 或因血药浓度偏高而不可耐受的现象常有发生^[5-6]。对于个体化调整 5-FU 用药剂量, 从而进一步提高联合化疗的疗效, 血药浓度检测工作具有重要的

意义^[7]。

目前,文献报道的5-FU血药浓度测定方法主要有液相色谱法、气相色谱法和紫外分光光度法等^[8-9]。这些方法适用范围不同且各有优缺点。本文提出的是一种将直接沉淀蛋白与超高效液相色谱联用的技术,可提高检测效率,降低检测成本。该技术不仅经过了方法学验证,而且被成功地用于15例病人的血药浓度检测。

1 材料

1.1 试剂

5-FU化学标准品(中国食品药品检定研究院,批号:100187-201203);5-氯尿嘧啶化学标准品(J&K化学技术有限公司,批号:LG90J03);高氯酸(国药集团化学试剂有限公司);乙酸(南京化学试剂有限公司);乙腈(色谱纯,美国Merck公司);甲醇(色谱纯,江苏汉邦科技有限公司),水为双蒸水。

1.2 仪器

高速离心机(德国艾本德公司);Waters Acquity超高效液相色谱仪(美国Waters公司),配PDA检测器。

2 方法和结果

2.1 色谱条件

色谱柱:Acquity HSS T₃ (2.1 mm × 100 mm, 1.8 μm);流动相:水-乙腈(95:5)(用前需经0.45 μm微孔滤膜过滤);流速:0.2 mL/min;检测波长:265 nm,柱温:20℃。进样室温度:5℃,进样量:5 μL。

2.2 内标溶液和标准储备液的制备

内标溶液:精密称取5-氯尿嘧啶0.028 g于100 mL量瓶中,用甲醇定容成质量浓度为1.92 μg/mL的储备液。临用时用甲醇稀释10倍得到质量浓度为0.192 μg/mL的溶液作为内标溶液。内标溶液在8℃的冰箱中可以稳定保存2个月。

标准储备液:精密称取5-FU标准品0.1 g于100 mL量瓶中,用水稀释至刻度作为标准储备液。标准储备液在8℃下可稳定保存2个月,临用时逐级稀释为100,50,10,1 μg/mL的工作液。

2.3 样品预处理

精密吸取血清样品300 μL于10 mL尖底离

心管中,用100 μL平底进样针准确加入内标溶液50 μL后,将离心管中液体涡旋混匀。精确加入6%高氯酸溶液200 μL作为蛋白沉淀剂,并迅速涡旋5 min混匀。待样品充分混匀后,将样品4 000 r/min低速离心10 min,以促进沉淀相与上清液的分离。进样时,取经10 000 r/min高速离心后的上清液100 μL作为供试液。

2.4 色谱分离情况

由图1可见,空白血清色谱图在5-FU和5-氯尿嘧啶的出峰时间均未见明显的杂质干扰,5-FU和5-氯尿嘧啶的峰形分离均较好,5-FU的保留时间为1.8 min,5-氯尿嘧啶的保留时间为2.85 min。

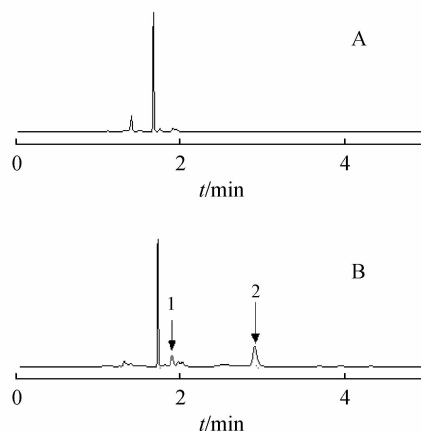


Figure 1 UPLC chromatograms of blank serum(A) and serum containing 5-fluorouracil and 5-chlorouracil (B)
1:5-fluorouracil;2:5-chlorouracil

2.5 专属性考察

取6份健康体检者的血清按照“2.3”项下处理方法预处理后进样,6份血清样本中在5-FU和5-氯尿嘧啶的保留时间处均无干扰,证明本法的专属性良好。

2.6 线性考察

取一定量健康人血清于尖底离心管中,用10 μg/mL 5-FU工作液配制成含0.5,2,4,5,10,30,50 μg/mL 5-FU的血清,按“2.1”、“2.3”项下方法测定。计算5-FU与5-氯尿嘧啶的峰面积之比(y)对5-FU血药浓度(x)进行线性回归,得到标准曲线 $y = 0.0848x - 0.0013$ ($r = 0.9998$)。

2.7 准确度和精密度考察

配制0.5,10,30 μg/mL 3个质量浓度的5-FU血清样本各5份,按照“2.1”、“2.3”项下方法,根据随行标准曲线计算样本的血药浓度,并计算相对

回收率。考察精密度时,将配制好的同浓度的样品 1 d 内 5 次连续进样,并计算日内精密度。再连续 5 d 每天进样 1 次,计算日间精密度。结果(表 1)表明,该法测定的准确度和精密度均符合要求。

Table 1 Recovery and accuracy of UPLC for the determination of 5-fluorouracil in human serum ($n=5$)

Concentration/ ($\mu\text{g/mL}$)	Average recovery/%	Precision/%	
		Intra-day	Inter-day
0.5	106.20	5.08	6.50
10	98.90	3.54	3.88
30	96.70	5.70	5.31

2.8 检测限考察

检测限是指检测信号为噪声信号的 3 倍时所对应的血样的浓度,本方法的检测限为 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 。

2.9 真实血样检测

利用本文建立的方法,检测了 15 例静脉注射 5-FU 病人的血药浓度。有文献报道,胃癌患者的 5-FU 血药峰浓度控制在 25.6 ~ 37.4 $\mu\text{g/mL}$ 时不良反应发生概率较小且疗效较好^[7],而 5-FU 的血药谷浓度大于 3 $\mu\text{g/mL}$ 时不良反应的发生概率较大^[10]。在本实验中,有 2 例患者的血药峰浓度小于 20 $\mu\text{g/mL}$,提示可能疗效较差;有 1 例患者的血药谷浓度大于 3 $\mu\text{g/mL}$,出现了严重的黏膜损害和骨髓抑制等不良反应。经过与临床医生的沟通,对治疗方案进行了适当调整,有效地减少了该患者后续化疗中出现的不良反应。

3 讨论

血液样本成分复杂,必须经过复杂的预处理,富集、浓缩,除去干扰物质,才能进行 UPLC 分析。直接蛋白沉淀法是一种快速、有效的预处理方法。常用的蛋白沉淀剂有乙腈、乙酸乙酯、硫酸铵溶液、高氯酸溶液等^[11-14]。经过预实验,最终采用 6% 高氯酸溶液,既可以去除内源干扰物又不影响 5-Fu 和内标的稳定性。 T_3 柱是一种可以耐受 100% 水相长时间冲刷的特殊色谱柱,对于水溶性药物的分离效果优于 C_{18} 柱。本实验采用 T_3 柱,样品的分离度和柱效均满足分析测定的要求。

真实血样定量检测过程中,必须与样本一起做随行标准曲线,以减少定量的误差。随行标准曲线的获得方法与“2.6”项下所述完全一致,只是与测定的样品一起平行预处理后进样。本实验中,真实血样检测共绘制了 3 条随行标准曲线,分别为 $y =$

$0.0812x + 0.0073$ ($r = 0.9995$), $y = 0.0806x + 0.0038$ ($r = 0.9996$), $y = 0.0863x - 0.0013$ ($r = 0.9995$)。其中, y 为氟尿嘧啶与 5-氯尿嘧啶的峰面积之比, x 为氟尿嘧啶的血药浓度。

超高效液相色谱技术是当前兴起的色谱新技术,利用小颗粒固定相,更低的系统体积,获得更高的柱效和分离效率^[15-17]。本研究所建立的直接蛋白沉淀-超高效液相色谱联用技术用于 5-FU 血药浓度测定,可以在 5 min 内完成整个进样分析过程,满足临床快速检测的需求。15 例临床血样的检测和后期临床干预的实践,充分显示了本法良好的临床应用前景。

参考文献

[1] Chu E. Clinical colorectal cancer: “ode to 5-fluorouracil” [J]. *Clin Colorectal Cancer*, 2007, **6**(9): 609.

[2] Shitara K, Matsuo K, Mizota A, *et al.* Association of fluoropyrimidines, platinum agents, taxanes, and irinotecan in any line of chemotherapy with survival in patients with advanced gastric cancer [J]. *Gastric Cancer*, 2011, **14**(2): 155 – 160.

[3] Leong T. Chemotherapy and radiotherapy in the management of gastric cancer [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2005, **21**(6): 673 – 678.

[4] Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, *et al.* Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicentre randomized trial [J]. *Lancet*, 2000, **3**(55): 1041 – 1047.

[5] Erick G, Remy D, Jacques J, *et al.* Individual fluorouracil dose adjustment based on pharmacokinetic follow-up compared with conventional dosage: results of a multicenter randomized trial of patients with metastatic colorectal cancer [J]. *J Clin Oncol*, 2008, **26**(28): 2099 – 2105.

[6] Peng RJ, Dong QM, Shi YX, *et al.* Correlative analysis between serum dihydropyrimidine dehydrogenase activity, concentration of 5-fluorouracil and adverse events in the treatment of advanced gastric cancer patients [J]. *Chin J Cancer (癌症)*, 2006, **25**(8): 1039 – 1043.

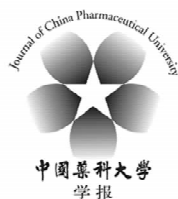
[7] Cai X, Xue P, Song WF, *et al.* The role of pharmacokinetic monitoring of fluorouracil in improvement of efficacy and reduction of adverse reactions for patients with advanced gastric cancer [J]. *Tumor (肿瘤)*, 2011, **31**(10): 930 – 936.

[8] Yu JX, Cai J, Shi LM, *et al.* Determination of fluorouracil concentration in tissues by HPLC [J]. *Chin J Drug Appl Monit (中国药物应用与监测)*, 2011, **8**(1): 21 – 23.

[9] Anderson D, Blesing DJ, Blesing C, *et al.* Simultaneous gas chromatographic-mass spectrophotometric determination of α -fluoro- β -alanine and 5-fluorouracil in plasma [J]. *J Chromatogr B*,

1997, **688**(1): 87-93.

- [10] Milano G, Roman P, Khater R, *et al.* Dose versus pharmacokinetics for predicting tolerance to 5-day continuous infusion of 5-FU [J]. *Int J Cancer*, 1988, **41**(4): 537-541.
- [11] Zhang FH, Guzha NE, Shen W, *et al.* Determination of 5-fluorouracil in human plasma by HPLC [J]. *Gansu Med J* (甘肃医药), 2009, **28**(5): 384-385.
- [12] Guo ZL, Fan J. Comparison study of solid-phase extraction and protein precipitation for the determination of vancomycin in human serum by HPLC [J]. *Chin Hosp Pharm J* (中国医院药学杂志), 2013, **33**(9): 745-747.
- [13] Yuran C, Jing Z. Development and validation of a new UPLC method for vancomycin and comparison to FPIA (TDx) [C/OL]// The 11th National Academic Symposium of Chemotherapeutic Pharmacology. Guiyang, 2012. [2014-10-09]. [http://cpfd.cnki.com.cn/](http://cpfd.cnki.com.cn/Article/CPFDTOTAL-ZGYS201207001014.htm)
- [14] Li HL, Qiao J, Cao M, *et al.* Comparison of six different precipitants for the determination of vancomycin and norvancomycin in human plasma [J]. *Shanxi Med J* (山西医药杂志), 2009, **38**(12): 1154-1155.
- [15] Jelena J, Hanna SS, Johan P, *et al.* Comparison of UPLC and HPLC for analysis of dietary folates [J]. *Chromatographia*, 2011, **73**(3/4): 219-225.
- [16] Asta O, Vilma O, Vida V, *et al.* UPLC a powerful tool for the separation of imidazolium ionic liquid cations [J]. *Chromatographia*, 2011, **73**(3/4): 17-24.
- [17] Quanyun AX, Reza K, Jay KT, *et al.* Quantitative determination of busulfan in human plasma by UPLC [J]. *Chromatographia*, 2009, **70**(9/10): 1505-1510.



中国药科大学学报

中国精品科技期刊 中国高校精品科技期刊
中国中文核心期刊 中国科学引文数据库核心期刊

传播医药科技创新研究成果的优秀媒体

药学前沿

提供药学领域的前沿信息 反映最新的药学研究进展

创新成果

展示医药科技最新成果 构建学术交流的平台

研究论文

科学研究原创论文 国家重大药学研究基金产出论文

邮发代号: 28-115, 欢迎订阅, 欢迎投稿!