昆明医科大学学报 2012,(7):91~93
Journal of Kunming Medical University
CN 53 -1049/R

HPLC 法间接测定肿瘤患者外周血 DPD 的活性

周石桥
(曲靖市第五人民医院，云南 曲靖 655000)

［摘要］**目的** 建立高效液相色谱法（HPLC）间接测定肿瘤患者外周血二氢尿嘧啶脱氢酶（DPD）活性的方法. **方法** 采用 HPLC 法测定肿瘤患者血浆中内源性物质二氢尿嘧啶（H_2U）和尿嘧啶（U）的比值，间接估算 DPD 的活性. 色谱柱：Xterra RPC18（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇 –0.02 mol/L 磷酸二氢钠（pH4.0），比例为 5:95；流速为 1.0 mL/min，H_2U 和 U 检测波长分别为 204 nm、260 nm. **结果** H_2U 线性范围为 62.5 ~ 2 000 μg/L，线性方程为：$Y = 7.48 \times 10^{-4}X + 1.24 \times 10^{-1}$，$r = 0.999\ 7$（n = 6），批内 RSD 小于 7.7%，批间 RSD 小于 13.8%，方法学回收率为 99.63% ~ 103.02%；U 线性范围为 15.625 ~ 500 μg/L，线性方程为：$Y = 3.42 \times 10^{-3}X + 2.58 \times 10^{-2}$，$r = 0.999\ 3$（n = 6），批内 RSD 小于 8.3%，批间 RSD 小于 13.4%，方法学回收率为 98.38% ~ 109.08%. **结论** 本方法可用于肿瘤患者外周血 DPD 活性的常规监测.

［关键词］二氢嘧啶脱氢酶；尿嘧啶；二氢尿嘧啶；高效液相色谱法
［中图分类号］R446.11+2［文献标识码］A［文章编号］1003 – 4706（2012）07 – 0091 – 03

Determination of Dihydropyrimidine Dehydrogenase Activity in Blood of Cancer Patients by HPLC

ZHOU Shi – qiao
(The Fifth People's Hospital of Qujing, Qujing Yunnan 655000, China)

［**Abstract**］Objective To establish an HPLC method for determining dihydropyrimidine dehydrogenase activity in blood of cancer patients. Methods We determined the ratio of dihydrouracil（H_2U）and uracil（U）in blood of patients with cancer by HPLC, and predicted the activity of dihydropyrimidine dehydrogenase（DPD）indirectly. The liquid chromatography column was Xterra RPC18（250 mm × 4.6 mm, 5 μm）; the mobile phase was composed of 0.02 mol/L phosphate buffer（pH 4.0）and methanol（95:5）with a flow rate of 1.0 mL/min. The detection wavelength for H_2U was 204 nm, and for U was 260 nm. Results A linearity was obtained from 62.5 to 2 000 μg/L for H_2U. The calibration equation of H_2U was $Y = 7.48 \times 10^{-4}X + 1.24 \times 10^{-1}$, $r = 0.999\ 7$（n = 6）. The RSD within day and between days were less than 7.7 % and 13.8 % for H_2U. The recoveries of H_2U were 99.63% ~ 103.02%. A linearity was obtained from 15.625 to 500 μg/L for U. The calibration equation of U was $Y = 3.42 \times 10^{-3}X + 2.58 \times 10^{-2}$, $r = 0.9993$（n = 6）. The RSD within day and between days were less than 8.3% and 13.4% for U. The recoveries of U were 98.38% ~ 109.08%. Conclusion This method can be used for routine clinical determination of DPD activity in blood of cancer patients.

［**Key words**］Dihydropyrimidine dehydrogenase; Dihydrouracil; Uracil; HPLC

氟尿嘧啶（fluorouracil，5–FU）是目前在临床上应用最广泛的嘧啶类抗癌药物，对消化道肿瘤及其他实体瘤均有较好的疗效. 但是，临床上不同的肿瘤患者采用 5–FU 持续静脉滴注方案时，其疗效和毒性反应有明显的个体差异. 二氢尿嘧啶脱氢酶（dihydropyrimidine dehydrogenase，DPD）是 5–FU 代谢的限速酶之一，5–FU 在体内主要被 DPD 转化为无活性的 5– 氟二氢尿嘧啶排出体外[1]，因此，DPD 的量和活性高低很大程度的影响了血浆中 5–FU 的浓度. 体内内源性 U（uracil，U）也

［基金项目］云南省应用基础研究基金资助项目（2009CD085）
［作者简介］周石桥（1969 ~），男，云南曲靖市人，医学大专，主管检验师，主要从事临床检验工作.

通过 DPD 分解代谢为 H_2U（dihydrouracil，H_2U），DPD 活性高，则 U 代谢快，H_2U 浓度高，H_2U/U 高，因此，测定血浆中 H_2U/U 可以间接反映体内 DPD 活性[2]. 本研究采用 HPLC 法检测肿瘤患者化疗前外周血中 H_2U、U 的比值来反映 DPD 的活性，为 5-FU 的个体化给药提供实验依据.

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

标准品：H_2U（Alfa Aesar 公司，批号：D014S019，纯度 > 99%）、U（Alfa Aesar 公司，批号：F7892A，纯度 > 99%）、内标 5 - 溴尿嘧啶（5 - BU）（Alfa Aesar 公司，批号：J9813A，纯度 > 99%）；牛血清白蛋白（BSA）（Roche 公司，批号：10735078001）；甲醇为色谱纯；其他试剂为分析纯.

1.2 仪器

美国 Waters 公司高效液相色谱仪（包括 600 泵、2996 可变波长紫外检测器、717 自动进样器、Empower 色谱工作站），奥立龙 868 型 pH 酸碱计（上海热电仪器有限公司），电子天平（万分之一，AL104-IC，美国梅特勒 - 托利多公司）.

1.3 方法

1.3.1 色谱条件 色谱柱：Xterra RPC18（250 mm × 4.6 mm，5 μm）；流动相：甲醇 -0.02 mol/L 磷酸二氢钠（磷酸调 pH 至 4.0），比例为 5:95；流速为 1.0 mL/min，柱温为 20 ℃，H_2U 和 U 的检测波长分别为 204 nm、260 nm. 在 204 nm 波长条件下，H_2U、内标的保留时间分别为 3.52 min、6.97 min 左右（见图 1），在 260 nm 波长条件下，U、内标的保留时间分别为 3.85 min、6.95 min 左右（见图 2）.

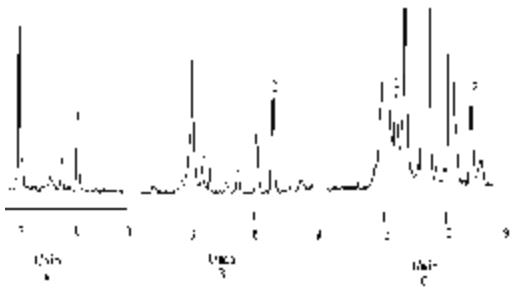

图 1 H_2U 色谱图

Fig . 1 HPLC chromatograms of H_2U

A:3%BSA 溶液；B:3%BSA 溶液 +H_2U 标准品；C:患者的血浆样品；1-H_2U；2- 内标.

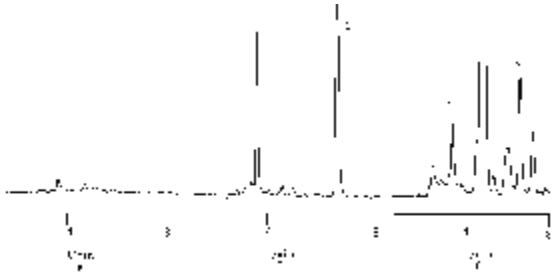

图 2 U 色谱图

Fig. 2 HPLC chromatograms of U

A:3%BSA 溶液；B:3%BSA 溶液 +U 标准品；C:患者的血浆样品；1-U；2- 内标.

1.3.2 样本处理 精密吸取待测血浆 200 μL 和浓度为（200 μg/mL）的内标溶液（5-BU）50 μL，置入 10 mL 具塞试管，涡旋混合 30 s，加入 1.5 mL 提取液（正丙醇：乙醚 =25:75），涡旋混合 5 min，3 000 r/min 离心 5 min，转移有机相，重复上述提取步骤，合并两次转移出的有机相，室温下氮气吹干；用 50 μL H_2O 复溶，涡旋混合 30 s 后，再加入 20 μL 二氯甲烷，涡旋混合 5 s，转移至 EP 管，12 000 r/min 离心 10 min；吸取上清液 20 μL 进样.

2 结果

2.1 标准曲线的制备

于 3%牛血清白蛋白（BSA）的水溶液中分别加入不同浓度的 H_2U 和 U 标准溶液，再加入内标溶液 50 μL，配制成 H_2U 浓度分别为 62.5、125、250、500、1 000、2 000 μg/L 和 U 浓度分别为 15.625、31.25、62.5、125、250、500 μg/L 的 3% BSA 的水溶液样品. 按“2.2”项方法进行操作，建立标准曲线. 以 BSA 的水溶液中 H_2U 和 U 的浓度为横坐标（X），H_2U 和 U 与内标的峰高比为纵坐标（Y）；分别计算得 H_2U 线性方程为：$Y = 7.48 \times 10^{-4}X + 1.24 \times 10^{-1}$，$r = 0.999\ 7$，在 62.5 ~ 2 000 μg/L 范围内具有良好的线性；U 线性方程为：$Y = 3.42 \times 10^{-3}X + 2.58 \times 10^{-2}$，$r = 0.999\ 3$，在 15.625 ~ 500 ug/L 范围内具有良好的线性.

2.2 精密度和回收率

分别配制低、中、高 3 个浓度的 H_2U、U 质控样品各 3 份，按“2.2”项方法处理后，每个浓度每天测定 5 次，连续测定 3 d，分别计算 H_2U、U 日内和日间精密度，并以测得值与加入值之比分别计算 H_2U 和 U 的方法回收率，结果分别见表 1.

表 1　H_2U、U 测定方法的批间、批内精密度和方法学回收率

Tab. 1 Presicion and recovery of H_2U and U

质控样品	浓度（μg/L）	RSD（%）		方法学回收率	
		批间	批内	实测浓度(μg/L)	回收率（%）
H_{2U}	62.5	13.8	7.7	64.4 ± 1.5	103.02
	500	11.2	4.6	526.3 ± 3.6	105.14
	2 000	9.4	5.2	1994.2 ± 34.5	99.63
U	15.625	13.4	8.3	16.2 ± 1.8	103.64
	125	10.5	6.9	136.4 ± 4.3	109.08
	500	8.7	5.8	492.7 ± 5.2	98.38

2.3　稳定性试验

分别配制低、中、高 3 个浓度的 H_2U、U 质控样品若干份，置 4℃冰箱保存，分别于 0、12、24、48 h 测定，考察样品放置稳定性；并于 -20 ℃反复冻融 3 次测定，考察样品冻融稳定性. 结果测得各质控样品浓度无明显变化，表明样品溶液 4 ℃放置稳定性和冻融稳定性良好.

2.4　临床血样测定

63 例肿瘤患者于 5-FU 治疗前取外周血 3 mL，经分析测定，DPD 活性（H_2U/U 比值）在肿瘤患者中变异较大，范围 1.51 ~ 6.67，标准差 1.28，平均和中位水平分别为 4.11 和 4.09.

3　讨论

3.1　检测波长的选择

由于 DPD 检测采用间接法，即测定 H_2U/U 的比值，通过对 H_2U 和 U 波长扫描（190 ~ 400 nm）. 结果发现：H_2U 在 204 nm 波长处有最大吸收，但在此波长时 U 受相邻杂质峰干扰，而 U 在 260 nm 处无杂质峰吸收，可实现基线分离. 因此，确定 H_2U 和 U 在不同波长条件下分别检测，波长为 204 nm 和 260 nm.

3.2　对配制标准溶液和质控样品介质的选择

由于 H_2U 和 U 为健康人血浆中的内源性物质，考虑到使用健康人血浆作为配制标准品介质，对测定有所干扰. 因此，笔者选用 BSA 溶液作为介质配制标准系列溶液和质控样品，BSA 溶液中蛋白含量和 pH 值环境与正常血浆基本一致，可使提取过程中样品与白蛋白结合程度以及提取的酸碱性环境与真实血浆保持一致[3].

3.3　色谱条件和提取液的选择

H_2U 和 U 在试验初先后选用甲醇、乙腈、水溶液多种组分和多种比例作为流动相，发现分离效果不好，于是在此基础上分别加入 0.01、0.02、0.03、0.04 mol/L 磷酸盐溶液，并在一定色谱条件下调整流动相 pH 值（3.0、4.0、5.0），最终确定 H_2U 和 U 流动相为甲醇 -0.02 mol/L 磷酸二氢钠水溶液（pH 至 4.0），比例为 5:95. 在此条件下，H_2U 和 U 均能很好的分离，且峰形较好，互不干扰. 本研究还考察了乙酸乙酯、正丙醇、乙醚在不同组合条件下对 H_2U 和 U 的提取效率和分离效果，其中以正丙醇 / 乙醚（25/75）为提取液时，提取效率较高，杂峰干扰较少，综合考虑，选用正丙醇 / 乙醚（25/75）作为提取液.

董秋美等[4]采用 HPLC 方法测定了 72 例结直肠癌患者 DPD 水平，范围 1.55 ~ 5.94，平均值 3.15 ± 1.09. 笔者共测定了 63 例肿瘤患者，发现 DPD 活性变异较大，范围 1.51 ~ 6.67，标准差 1.28，平均值为 4.11. 本研究结果表明，通过建立高灵敏度、简便易行的检测 DPD 活性方法，可以在癌症患者化疗前常规检测外周血中 DPD 活性，以便预测患者化疗时的毒副反应，实施个体化治疗.

[参考文献]

[1] JIANG W Q, LU Z H, HE Y J, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity in hepatocellular carcinoma: implication in 5-fluorouracil-based chemotherapy [J]. Clini Cancer Res, 1997, 3 (3): 395.

[2] 蔡乐, 叶敏, 朱珠, 等. HPLC法测定血浆中尿嘧啶和二氢尿嘧啶的含量 [J]. 中国药物应用和监测, 2008, 5 (6): 9 - 13.

[3] DEPORTE R, AMIAND M, MOREAU A, et al. High - performance liquid chromatographic assay with UV detection for measurement of dihydrouracil/uracil ratio in plasma [J]. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 2006, 834(1-2): 170 - 177.

[4] 董秋美, 何友谦, 李苏, 等. 结直肠癌患者DPD水平和5-FU 血药浓度、疗效及毒性的相关性研究[J]. 癌症, 2005, 24(4): 483 - 487.

(2012 - 04 - 03 收稿)