

反相高效液相色谱分析人尿中假尿嘧啶核苷

胡凤祖 宋娅莉 师治贤

(中国科学院西北高原生物研究所, 西宁, 810001)

摘 要

尿样经苯硼酸亲和柱处理, 以尿嘧啶核苷为内标物用反相高效液相色谱法测定了几例正常人和癌症病人尿样中的假尿嘧啶含量, 色谱柱 Bondpark C₁₈, 流动相 0.02mol/L 磷酸二氢胺 + 5% 甲醇 (pH = 5.0), 检测波长 254nm。线性范围 0.009 ~ 0.072mg/L, 平均回收率为 94.2%, 相对误差 (RSD) 为 0.85%。

关键词: 假尿嘧啶核苷; 尿样; 反相高效液相色谱

假尿嘧啶核苷 (Pseudouridine 简称假尿苷) 为尿嘧啶核苷的异构体, 存在于核糖核酸 (RNA) 中, 是 tRNA 降解的最终产物, 不能被机体重新吸收而全部从尿中排出 (Palmisanof, 1989)。尿中假尿苷含量变化往往是某种疾病的征兆, 正如 Borek 等 (1977) 提出的尿中假尿苷含量的增加不是细胞坏死所致, 而是因肿瘤组织中 tRNA 的高转变率所引起, 并指出, 尿中假尿苷可作为肿瘤的诊断指标。因此, 准确检测尿液中的假尿苷含量在临床上具有明显的意义。目前用高效液相色谱法测定人尿或血清中的假尿苷的方法较多, 但因样品的前处理方法不大理想, 使检测方法的回收率和重复性较差, 作者用苯硼酸亲和柱处理尿样, 并建立了用反相高效液相色谱测定人尿中假尿苷, 检测了几例正常人和癌症病人尿液中假尿苷的含量。结果表明: 经苯硼酸亲和柱处理过的尿样, 可除去其他杂质, 使样品中的核苷类物质得到纯化, 提高了样品检测的灵敏度和选择性, 也提高了回收率和精确度。为临床观察和检测人尿液或人血清中假尿苷的含量提供了较为方便的分析方法。

实验部分

1. 仪器和试剂

仪器: Toyo-sado Lc-803A 型高效液相色谱仪, 配有 770 型可调波长紫外检测器及 Cp-8 型数据处理系统。

试剂: 假尿苷和尿嘧啶标准品 (购自 Sigma 公司); 苯硼酸亲和填料 (购自 Sigma 公

司);甲酸、磷酸二氢胺(A.R北京化工厂);甲醇、醋酸胺(A.R西安化学试剂厂)。

2. 样品制备

(1)样品的来源:正常人尿液由本所职工提供,癌症病人的尿样由青海医学院附属医院肿瘤科提供,尿样均在早晨空腹收集,经过滤后冰箱贮存。

(2)样品纯化

取约0.5~1.0g苯硼酸亲和填料,用水浸泡后,湿法装柱(4×80mm)先用25ml 0.25mol/L的醋酸胺溶液(pH=8.8)平衡,然后准确量取0.5ml尿样加在苯硼酸亲和柱上,先用0.25mol/L的醋酸胺溶液5ml洗脱,弃去不用,再用0.01mol/L甲酸5ml洗脱,并收集洗脱液,过滤后冰箱贮存。

3. 标准溶液和内标溶液的制备

分别准确称取0.0100g的假尿苷和尿嘧啶各置于10ml的容量瓶中,用0.01mol/L的甲酸溶解后,用去离子水定容。

4. 色谱分析条件

色谱柱: Bondapak C₁₈ 250×4.6mm I.D, 流动相 0.01mol/L 磷酸二氢胺 + 5% 甲醇 pH为5.0; 流速: 1.0ml/min; 紫外检测、254nm。假尿苷与尿苷色谱的分离图见图1。

结果和讨论

1. 样品前处理方法的研究

因尿样中含的成分比较多,在上机分析前先要进行样品处理,将尿样中的杂质除去。按常规处理方法 Kuo(1978),操作步骤复杂,样品需量大,所用的试剂多。如按胡永师等(1997)的血清样品处理方法虽很简便,但没有除去杂质,不仅污染色谱分析柱而且分离时间较长。本文选用苯硼酸亲和柱对尿样处理后便可除去尿样中的杂质,使样品得到纯化,从而大大提高样品中检测假尿苷的灵敏度,缩短分析时间,减少对色谱柱的污染。

2. 色谱分离条件的选择

在本实验中,为准确无误的检测假尿苷的含量,选用尿嘧啶为内标物,而假尿苷和尿嘧啶是异构体,在反相柱上仅用磷酸盐洗脱系统难以将二者分离。另一方面,尿样虽经前处理后,除去了大部分杂质,但尿样中核苷类的物质仍存在。经过实验比较,选择0.02mol/L磷酸二氢胺+5%甲醇、pH为5.0组成的流动相系统,尿样中的假尿苷便可达到了最佳分离(图2)。

3. 方法学研究

(1)线性范围

将假尿苷配成0.009~0.072mg/ml系列浓度的标准溶液,依照选择的色谱条件进行测定,以假尿苷的浓度和相应的峰面积进行回归处理,得回归方程 $Y=23778.9-51.74x$,

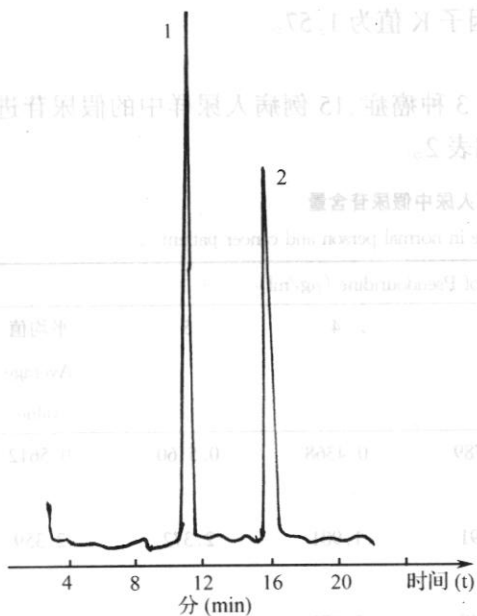


图1 标准假尿苷和内标物尿嘧啶的色谱分离图

1. 假尿苷 2. 尿嘧啶

Fig.1 chromatogram of standard pseudouridine and instandard uracil

1. Pseudouridine 2. Uracil

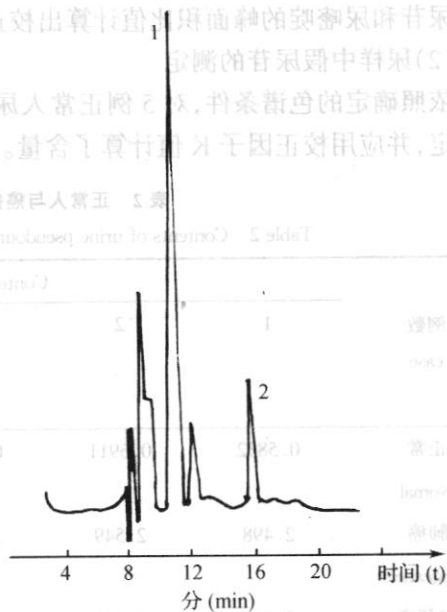


图2 人尿中假尿苷的色谱分离图

1. 假尿苷

Fig.2 chromatogram of person urine

1. Pseudouridine

相关系数 $r=0.9999$ 。

(2) 回收率和精确度

取正常人尿样 0.5ml 加不同浓度的标准假尿苷溶液按上述的样品处理方法进行操作,测定了回收率和精确度。如表 1。

表 1 回收率和精确度

Table 1 Recovery and Precision

样号 No.	加标量 Addition amount (ug)	实测值 Determination value (ug)	回收率 Recovery (%)	相对标准偏差 RSD (%) (n=6)
1	10.0	8.67	86.7	1.00
2	20.0	19.2	96.0	0.78
3	30.0	26.2	87.0	0.53
4	40.0	40.8	102.4	0.68
5	50.0	49.5	99.07	1.24

4. 人尿中假尿苷的含量

(1) 校正因子 K 值的测定

用已配好的假尿苷和尿嘧啶的混合标准液(浓度 0.02mg/ml)在选定的色谱条件下,

以假尿苷和尿嘧啶的峰面积比值计算出校正因子 K 值为 1.57。

(2) 尿样中假尿苷的测定

依照确定的色谱条件,对 5 例正常人尿和 3 种癌症、15 例病人尿样中的假尿苷进行了测定,并应用校正因子 K 值计算了含量。如表 2。

表 2 正常人与癌症病人尿中假尿苷含量
Table 2 Contents of urine pseudouridine in normal person and cancer patient

例数 case	Contents of Pseudouridine ($\mu\text{g/ml}$)					平均值 Average value
	1	2	3	4	5	
正常 Normal	0.5832	0.6911	0.5789	0.4368	0.5160	0.5612
肺癌 Lungcancer	2.498	2.549	2.391	1.981	2.372	2.359
宫颈癌 Ovariancancer	2.966	3.641	3.248	2.972	2.718	3.109
食道癌 Esophaguscancer	3.680	3.871	2.978	2.874	3.571	3.395

从表 2 数据可以明显看出,癌症病人尿液中的假尿苷含量远远高于正常人的 5~6 倍,与 Ku(1978)的结果一致。

参 考 文 献

胡永师,汤秋华,刘标生,1997. 高效液相色谱测定人血清中假尿苷的浓度. 色谱,15(4):349~351.
Borek E, Balga Bs, Gesrk DS, 1977. Cancer Res, 37:3362~3365.
Kuo. C, Gehrke C. W, Mccune R. A, Waalkes. T. P., 1978. High Performance Liquid Chromatography of Pseudouridine in Urine, J. Chromatog., 145, 383~385.
Palmitan F, Roturmo T, Guerrieri A, 1989. J. Chromatog Bio Appl., 493:35~38.

ANALYSIS OF PSEUDOURIDINE IN PERSON URINE BY
REVERSED HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

Hu Fengzu Song Yali Shi Zhixian

(Northwest Plateau Institute of Biology the Chinese Academy of Sciences, Xining, 810001)

Abstract

A Specific, sensitive and rapid method to measure pseudouridine in person urine is described. This method shows that pseudouridine can be directly measured in urine using a remarkably sensitive and selective chromatographic method and less sample.

The data concerning the recovery and the precision analysis of pseudouridine determination are reported. The recovery range is between 86.7% to 102.4%, and good precision (mean R. S. D) range is between 0.53% to 1.24%. (see table 1)

Key words: Pseudouridine; Urine; HPLC