

# 高效毛细管电泳法检测尿液中的假尿嘧啶核苷\*

程明刚 梁 统 周克元 凌光鑫

(广东医学院生化教研室 湛江 524023)

**提 要** 假尿嘧啶核苷( $\psi$ )主要来自 tRNA 的降解,已证实癌症患者尿液中排泄量异常,可以作为肿瘤诊断的极有用的标志物之一。用高效毛细管电泳法快速测定了人尿中的  $\psi$ ,用涂层柱(24cm  $\times$  25 $\mu$ m i.d.)及硼酸盐缓冲液,在线 200nm 检测,可在 4min 内使  $\psi$  与尿苷等及尿中其它内源物质完全分离。方法的日内、日间变异系数均小于 4.0%,用磺基水杨酸作内标,以  $\psi$  浓度对相应的峰高或峰面积比定量得标准曲线( $r > 0.9990$ ), $\psi$  最低检测限为 4 $\mu$ mol/L。样品处理简单、重复性好、消耗低、全自动化,为假尿嘧啶核苷临床应用价值的探讨提供了一种有效的手段。

**关键词** 高效毛细管电泳法,假尿嘧啶核苷,人尿液,肿瘤标志物

**分类号** O658/Q5

## 1 前言

假尿嘧啶核苷主要存在于 tRNA 中,是尿液中含量最高的一种修饰碱基,是尿嘧啶核苷(U)的异构体。早在 70 年代, Pinkard 等<sup>[1]</sup>就报道恶性肿瘤病人尿液中  $\psi$  浓度高于正常人,随后研究人员<sup>[2-4]</sup>发现多种恶性肿瘤如肝癌、肺癌、白血病等病人的血清、尿液中  $\psi$  的浓度均升高,现已公认  $\psi$  是肿瘤标志物之一,对恶性肿瘤的诊断、预后及肿瘤治疗的疗效检测有极大的临床价值<sup>[5]</sup>。

已报道的  $\psi$  检测方法很多:放射免疫或酶联免疫法、气相或液相色谱法等。虽然放免或酶免法灵敏度高,但特异性差,且放免法要接触同位素,有一定的危险性。气相色谱法需要衍生,操作繁琐。高效液相色谱法虽灵敏、特异,但柱平衡、分析时间长(一个尿样需 2h 左右<sup>[6]</sup>)。鉴于此我们探讨了毛细管电泳(CE)法分析  $\psi$  的条件,以寻求一种简便、灵敏、全自动的检测方法。

## 2 材料与方法

### 2.1 试剂

U 和  $\psi$  标准品(Sigma 公司),磺基水杨酸、四硼酸钠为国产分析纯。所有试剂均用三蒸水配制并经减压抽滤。

### 2.2 仪器

BioFocus<sup>TM3000</sup>型毛细管电泳仪,配有二极管阵

列检测器。用 BioFocus 3.01 积分仪和光谱软件处理数据。采用 25 $\mu$ m i.d.  $\times$  24cm 涂层毛细管柱(BioRad 公司)。

### 2.3 色谱条件

恒压 - 16kV, 恒温 25 $^{\circ}$ C, 压力进样 68.95kPa $\cdot$ s, 负极进样, 正极检测, 检测波长 200nm, 电泳缓冲液 0.1mol/L, pH 8.6 的硼酸盐缓冲液。

### 2.4 尿样处理

新鲜晨尿 25 $\mu$ L, 加 60mg/L 磺基水杨酸内标 25 $\mu$ L, 离心, 直接进行毛细管电泳分析。

## 3 结果

### 3.1 pH 值对 $\psi$ 迁移时间的影响

$\psi$  是一种弱酸( $pK_a = 9.2$ ), 酸性与苯酚相似。在 pH 8.2~9.0 范围内其迁移时间随 pH 值的增高而降低, pH 8.6 时,  $\psi$  可与 U、5-氟尿嘧啶(5-FU)、5-氯尿嘧啶(5-CU)基线分离(图 1); 且在该条件下尿样中无干扰  $\psi$ 、内标测定的物质(图 2)。

### 3.2 峰定性

通过添加标准品并根据  $\psi$  的顺式-OH 结构有特征紫外吸收, 可用二极管阵列检测器在 190~320nm 范围内作紫外扫描证实尿中的  $\psi$  峰(图 3)。

### 3.3 标准工作曲线的制作

在  $\psi$  浓度为 6.25~200 $\mu$ mol/L 的范围内, 采用磺基水杨酸作内标, 用  $\psi$  与内标的峰高比( $X_1$ )或峰

\* 此课题获广东省重点学科经费资助  
本文收稿日期: 1996-06-26, 修回日期: 1996-09-01

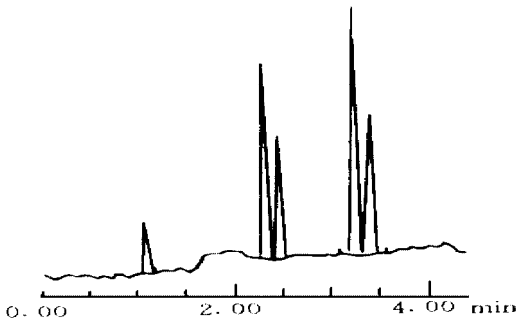


图 1 4 种嘧啶类衍生物的毛细管电泳图谱  
Fig. 1 Electropherogram of a standard mixture of the derivatives of pyrimidine

峰依次为: 内标、5-FU、5-CU、U、 $\psi$ 。

Peak (in turn): internal standard, 5-FU, 5-CU, U,  $\psi$ 。

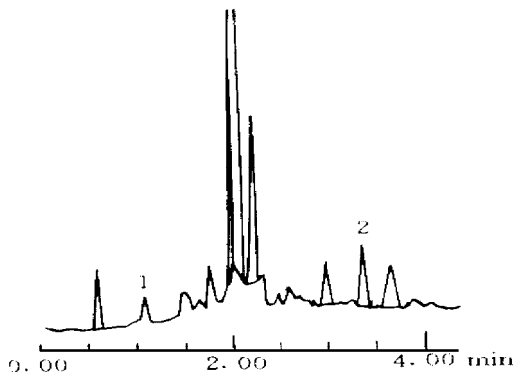


图 2 尿样中  $\psi$  的毛细管电泳图

Fig. 2 Electropherogram of  $\psi$  in urine

峰: 1. 内标, 2.  $\psi$ 。

Peak: 1. internal standard, 2.  $\psi$ 。

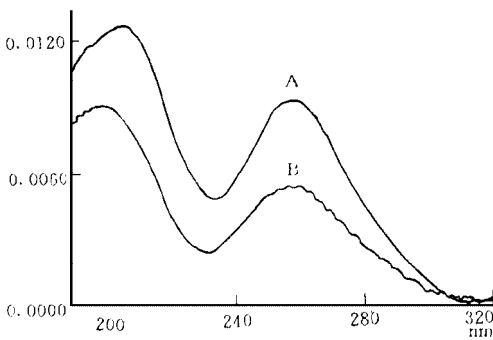


图 3 标准及尿样中  $\psi$  的吸收光谱

Fig. 3 Spectrum of standard and urinary  $\psi$

A. 标准  $\psi$  (standard), B. 尿液中的  $\psi$  (in urine)。

面积比( $X_2$ ) 对相应的  $\psi$  浓度( $Y$ ) 得标准曲线分别为:

$$Y = 102.50X_1 + 2.81 \quad (r = 0.9994);$$

$$Y = 84.59X_2 + 3.75 \quad (r = 0.9993).$$

### 3.4 精密度

测定浓度为  $50\mu\text{mol/L}$  和  $200\mu\text{mol/L}$  的  $\psi$ , 日内平行测定 5 次, 得日内精密度分别为 2.38%, 1.92%; 日间精密度 ( $n = 3$ ) 分别为 3.7%, 2.4%。

### 3.5 干扰实验

在本条件下常用的抗肿瘤药物 5-FU、氨甲喋呤 (MTX)、阿糖胞苷等以及 U 均不干扰  $\psi$  的测定。

## 4 讨论

$\psi$  与 U 是异构体, 分子量 (244.2) 相同, 在某些条件下其核质比也相同, 但由于二者的尿嘧啶与核糖的连接方式不同 (分别为 C-C 和 C-N 相连), 故可通过优化 pH 值来增加 CE 对二者分离的选择性。

因为尿中  $\psi$  的临床价值需以肌酐为参照, 在本文条件下肌酐不出峰, 故需另外测定, 与 HPLC 法相比, 这是一个缺点。用本室建立的尿肌酐 CE 测定法 (分析时间 2.5 min) 分析一个样品的总时间只需 10 min 左右, 仍比 HPLC 法分析时间短。

本文用新型、高效的 CE 法测定  $\psi$ , 具有低消耗、需样量少、全自动化等优点, 可在临床实验测试中推广应用并为普查  $\psi$  的临床价值提供可能。

## 参 考 文 献

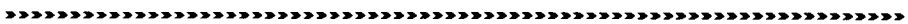
- 1 Pinkard K J, Cooper I A, Motteram R *et al.* J Natl Cancer, 1972; 49: 27
- 2 Salvatore F, Russo T, Colonna A *et al.* Cancer Detect Prev, 1983; 6: 531
- 3 Waalkes T P, Abeloff M D, Ettings D S *et al.* Cancer (phila.), 1982; 50: 2457
- 4 Heldman D A, Grever M R, Speicher C E *et al.* J Lab Clin Med, 1983; 101: 783
- 5 Itoh K, Konno T, Sasaki T *et al.* Clin Chim Acta, 1992; 206: 181
- 6 王科太, 弋昌厚, 刘平等. 色谱, 1992; 10(1): 48

## Determination of Human Urinary Pseudouridine by High Performance Capillary Electrophoresis

Cheng Minggang, Liang Tong, Zhou Keyuan and Ling Guangxin  
(Department of Biochemistry, Guangdong Medical College, Zhanjiang, 524023)

**Abstract** Pseudouridine, mainly as a degradation product of transfer ribonucleic acid, has been shown to be excreted in abnormal amounts in the urine of patients with cancer and can be used as one of the potentially valuable tumor markers. In this paper, a method for the rapid determination of human urinary pseudouridine by HPCE is reported. We used a 24cm × 25μm i. d. coated capillary and a borate buffer solution (0.1m ol/L, pH 8.6), and set the UV detection wavelength at 200nm. In this experiment, pseudouridine can be separated completely with uridine and antitumor drugs (5-fluouridine and methotrexation) and other endogenous substances in urine within 4 minutes. Assay precision was determined for concentrations of 50 μm ol/L and 200 μm ol/L as 2.38% and 1.92% for within-day CV, 3.7% and 2.4% for between-day CV respectively. Sulfosalicylic acid was used as internal standard. Linearity, between the concentrations of pseudouridine and the corresponding peak height or area ratios of pseudouridine and the internal standard, was demonstrated in the 6.25-200 μm ol/L range ( $r > 0.9990$ ). The detection limit of concentration for pseudouridine was 4 μm ol/L. This method, with simple sample preparation, good assay precision, lower cost and full-automation, is an effective means for the assessment of pseudouridine in clinical application.

**Key words** high performance capillary electrophoresis, pseudouridine, human urine, tumor marker



### 欢迎征订《分析测试学报》

《分析测试学报》是由中国分析测试学会主办的全国性学术刊物。刊登电子显微学、质谱学、光谱学、色谱学、波谱学及电化学等方面的分析测试新理论、新方法、新技术的研究成果,介绍新仪器装置及在医药、化工、商检、食品检验等方面实用性强的实验技术。适合科研院所、大专院校、医学、卫生以及厂矿企业分析测试工作和管理人员阅读。双月刊,国内外公开发行。国际标准刊号:ISSN 1004-4957,国内刊号:CN 44-1318/TH,国际刊名代码 CODEN:FCXES,国内邮发代号:46-104,单价:8.00 元/册。

本刊入选为中国自然科学核心期刊(第 69 名),并在《中国科技论文统计与分析》年度报告中入选被引用数最多的 100 种期刊之列(第 76 名)。在我国 1240 种主要科技期刊的影响因子排序中名列 13 位。1987 年以来多次入选美国化学文摘千种表。被美国科学引文索引(SCI)、英国皇家化学学会《分析文摘》(AA)及《质谱公报》(MBS)系统摘录。

未在邮局订到者可直接向本编辑部补订。补订办法:请从邮局汇款至广州市先烈中路 100 号《分析测试学报》编辑部(邮编:510070,电话:020-87759776),写明订户单位、详细地址、收刊人姓名、邮编及补订份数(全年或某期)。