

RP-HPLC 法测定人血液和尿液中草酸

刘宏胜, 吴胜群*

天津市第一中心医院 卫生部危重病急救医学重点实验室, 天津 300192

摘要: **目的** 建立 RP-HPLC 法测定人血液与尿液中草酸的质量浓度, 监测原发性高草酸盐尿症 (PH) 患者, 实施肝肾联合移植术前草酸质量浓度的变化。**方法** 采用 Agilent XDB C₁₈ (150 mm×4.6 mm, 5 μm) 色谱柱; Agilent Zorbax extend-C₁₈ (12.5 mm×4.6 mm, 5 μm) 为预柱; 流动相为甲醇-0.1 mol/L 醋酸铵水溶液 (15:85), 体积流量 1.2 mL/min; 紫外检测波长 314 nm; 柱温 26.3 °C; 进样量 50 μL; 以邻苯二胺为衍生剂, 与血液与尿液中草酸反应, 生成具有强紫外吸收化合物 2, 3-二羟基喹啉。**结果** 血液中最低检测草酸质量浓度为 0.3 mg/L, 线性范围为 1.953~125 mg/L, 平均回收率为 94.89%, 精密密度 RSD 为 4.1%; 尿液中草酸最低检测质量浓度为 0.5 mg/L, 线性范围为 1.953~125 mg/L, 平均回收率为 94.31%, 精密密度 RSD 为 3.2%。**结论** 该方法简便, 灵敏度高, 重复性好, 回收率高, 是临床检测草酸质量浓度的可信方法。

关键词: 尿草酸; 血草酸; 原发性高草酸盐尿症 (PH); 肝肾联合移植术; 邻苯二胺; 2, 3-二羟基喹啉; RP-HPLC

中图分类号: R286.02 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2014)20-2935-04

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2014.20.013

Determination of oxalate in human plasma and urine by RP-HPLC

LIU Hong-sheng, WU Sheng-qun

Key Laboratory of Emergency Medicine of Critical Disease, Ministry of Public Health, Tianjin First Central Hospital, Tianjin 300192, China

Abstract: Objective To establish a method of reversal phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC) for determining the mass concentration of oxalate in human plasma and urine and to monitor the variation of mass concentration of oxalate in the patients with primary hyperoxaluria (PH) before and after combined liver-kidney transplantation. **Methods** Agilent XDBC₁₈ (150 mm × 4.6 mm, 5 μm) column and Agilent Zorbax extend-C₁₈ (12.5 mm × 4.6 mm, 5 μm) guard column were used. Methyl alcohol and aqueous solution containing 0.1 mol/L ammonium acetate (15:85) were used as mobile phase. The flow rate was at 1.2 mL/min, ultraviolet determination wavelength was 314 nm, column temperature was at 26.3 °C, and injection volume was 50 μL. *o*-phenylenediamine was used as derivating agent, reacted with oxalate in human plasma and urine so as to obtain the compound with better ultraviolet absorption—2, 3-dihydroxy quinoxaline. **Results** The detection limit in human plasma was 0.3 mg/L, the linear range was 1.953—125 mg/L, the average recovery was 94.89%, and its RSD was 4.1%; The detection limit in urine was 0.5 mg/L, the linear range was 1.953—125 mg/L, the average recovery was 94.31%, and its RSD was 3.2%. **Conclusion** The method is believable for determining the mass concentration of oxalate with its simplicity, sensibility, repeatability, and better recovery rate.

Key words: oxalate in urine; oxalate in plasma; primary hyperoxaluria; combined liver-kidney transplantation; *o*-phenylenediamine; 2, 3-dihydroxy quinoxaline; RP-HPLC

原发性高草酸盐尿症 (PH) 的临床主要表现为肾结石、肾钙盐沉积及肾外组织钙盐沉积^[1]。因而, 高于人体正常的草酸质量浓度 (尿草酸定量正常 < 50 mg/L, 血草酸定量正常 < 5.4 mg/L) 在结石形成过程中起着重要作用, 因而监测人体尿液与血液中

草酸的质量浓度是必不可少的检测手段^[2-4]。本实验主要监测天津市第一中心医院收治的 6 例 PH 患者, 实施肝肾联合移植术后尿液与血液中原先高于正常人体草酸质量浓度的降低状况, 意在监测患者移植后的肝、肾功能的恢复状况。

收稿日期: 2014-06-16

作者简介: 刘宏胜 (1966—), 女, 主任药师, 从事中药制剂、精油提取及中药单体成分体外抑制肿瘤细胞增殖的有关分子生物学等研究。

E-mail: lhwmg@sina.com

*通信作者 吴胜群 (1957—), 男, 主任医师, 从事临床医学、高效液相色谱分析等研究。

本实验采用 RP-HPLC 法,以邻苯二胺为衍生剂,与尿液与血液中草药反应,生成具有强紫外吸收化合物 2,3-二羟基喹啉。此衍生物与草酸具有一一对应的浓度关系,因而能准确测定人体尿液与血液中草药质量浓度。

1 仪器与材料

Agilent 1100 型高效液相色谱仪,包括四元泵、在线脱气机、VWD 检测器、色谱工作站(安捷伦科技有限公司);AE240 精密电子分析天平,梅特勒-上海托利多仪器;HGC-12D 氮吹仪,天津市恒奥科技发展有限公司。

草酸对照品,天津市津科精细化工研究所,质量分数不少于 99.9%,批号 20120306;邻苯二胺(OPD)、磷酸二氢钾(分析纯)、醋酸铵(色谱纯),天津市致远化学试剂有限公司;甲醇(色谱纯)、乙腈(色谱纯),德国 Merck 公司;浓盐酸、氢氧化钠、液体石蜡,天津市欧博凯化工厂品销售有限公司;实验用水为二次纯化水,天津市第一中心医院药厂提供。

2 方法与结果

2.1 尿液的预处理

收集 24 h 尿,按照尿液-浓盐酸(100:1)酸化尿液。置于冰箱备用。

2.2 血的预处理

禁食 12 h 后抽上肢静脉血 3 mL,肝素抗凝,立即以 2 300 r/min 于 4 °C 离心 10 min,取血浆 1 mL 加入 1 mL 乙腈和 50 μ L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0),混旋,2 000 r/min 离心 15 min,37 °C N_2 气流将上层液中的乙腈蒸发掉,用去离子水补足液体至 1 mL。

2.3 衍生反应

取尿样 1 mL 于带盖离心管中,加入 5 μ L 浓盐酸,0.5 mL OPD 标准液(10 g/L)^[5],旋紧盖子于 140 °C (采用液体石蜡升温,注意离心管中液体绝不能溢出)加热 30 min,室温冷却,用 5 mol/L NaOH 调节 pH 5~6,2 300 r/min 离心 15 min,上清液过 0.22 μ m 微孔滤膜,取 50 μ L 滤液上机测定。

取血浆上清液 0.5 mL 于带盖离心管中,加入 5 μ L 浓盐酸,0.5 mL OPD 标准液(10 g/L),旋紧盖子于 140 °C (采用液体石蜡升温,注意离心管中液体绝不能溢出)加热 30 min,室温冷却,用 5 mol/L NaOH 调节 pH 5~6,2 000 r/min,离心 15 min,上清液经 0.22 μ m 微孔滤膜滤过后取 50 μ L 即可上机

进行测定。

2.4 色谱条件

色谱柱为 Agilent XDB C₁₈ 柱(150 mm×4.6 mm, 5 μ m),Agilent Zorbax extend-C₁₈ (12.5 mm×4.6 mm, 5 μ m) 为预柱。流动相为甲醇-0.1 mol/L 醋酸胺水溶液(15:85),体积流量 1.2 mL/min;紫外检测波长 314 nm;柱温 26.3 °C;进样量 50 μ L。

2.5 工作曲线的制备

2.5.1 尿草酸工作曲线的制备 取正常人的尿液,按尿液-浓盐酸(100:1)的比例酸化尿液。用尿液配成质量浓度为 1 g/L 的草酸对照液,经衍生后,倍比稀释成质量浓度为 125、62.5、31.25、15.625、7.813、1.953 mg/L 草酸溶液;空白尿液也同时经衍生处理。经 2 300 r/min 离心 15 min,上清液过 0.22 μ m 微孔滤膜后取 50 μ L 滤液进行色谱分析。以峰面积(A)对质量浓度(C, mg/L)进行线性回归,得工作曲线: $A=11.343 C+56.599$, $r=0.999 3$ 。可见在 1.953~125 mg/L,峰面积与草酸质量浓度呈良好的线性关系。按照信噪比 3:1,最低检测质量浓度为 0.5 mg/L。

2.5.2 血草酸标准曲线的制备 取正常人禁食 12 h 血 8 mL,经上述血预处理与衍生处理后,用血浆制成质量浓度为 125、62.5、31.25、15.625、7.813、1.953 mg/L 草酸溶液;空白血浆也同时经衍生处理。经 2 300 r/min 离心 10 min,上清液经 0.22 μ m 滤过后进行色谱分析。以峰面积(A)对质量浓度(C, mg/L)进行线性回归,得工作曲线 $A=12.828 9 C+3.239$, $r=0.999 5$ 。可见在 1.953~125 mg/L,峰面积与草酸质量浓度呈良好的线性关系。按信噪比 3:1 得最低检测质量浓度为 0.3 mg/L。

2.6 色谱分离

2.6.1 尿液中草酸色谱分离 分别对草酸对照品溶液、人尿液进行色谱分离,结果见图 1。从图 1 中可见,草酸的分离均能达到基线分离,而且尿样

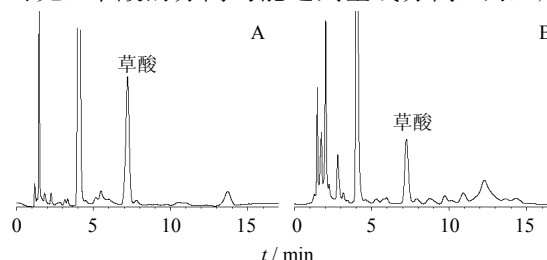


图1 尿草酸对照品(A)和人尿液(B)的HPLC图
Fig. 1 HPLC of oxalate reference substance (A) and human urine sample (B)

中草酸的测定无明显杂质干扰,草酸的保留时间为7.2 min。

2.6.2 血液中草酸色谱分离 分别对草酸对照品溶液、人血浆进行色谱分离,见图2。从图2中可见,草酸的分离均能达到基线分离,血中草酸的测定无明显杂峰干扰,草酸的保留时间为7.2 min。

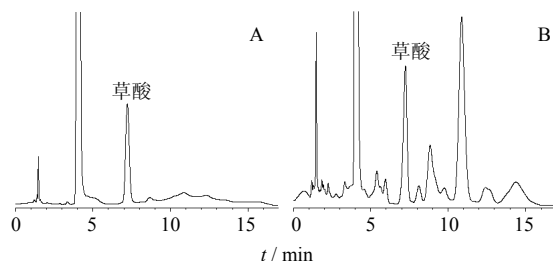


图2 草酸对照品(A)和人血浆(B)的HPLC图

Fig. 2 HPLC of oxalate reference substance (A) and human plasma sample (B)

2.7 精密度试验

2.7.1 尿液中草酸精密度试验 按样本处理法操作,对尿样本进行重复性试验,并经统计学处理。结果显示,样本中草酸测定精密度均较好,RSD为3.4% ($n=5$)。

2.7.2 血液中草酸精密度试验 按样本处理法操作,对血浆样本进行重复性试验,并经统计学处理。结果显示,样本中草酸测定精密度均较好,RSD为4.1% ($n=5$)。

2.8 重复性试验

2.8.1 尿液中草酸重复性试验 按样本处理法操作,对同一尿样本进行重复性实验,并经统计学处理,其RSD为1.49% ($n=5$)。

2.8.2 血中草酸重复性试验 按样本处理法操作,对同一血浆样本进行重复性试验,并经统计学处理,其RSD为1.56% ($n=5$)。

2.9 平均加样回收率试验

2.9.1 尿液中草酸平均加样回收率试验 在0.29 mL尿液中(检测其质量浓度为7.201 mg/L)加入0.1 mL质量浓度为50、100、150 mg/L的对照品溶液,进样测得其质量浓度,计算其回收率,结果平均回收率为94.31%,RSD为1.22%。

2.9.2 血液中草酸平均加样回收率试验 在0.29 mL血浆中(检测其质量浓度为7.150 mg/L)加入0.1 mL质量浓度为50、100、150 mg/L的对照品溶液,进样测得其质量浓度,计算其回收率,结果平均回收率为94.89%,RSD为0.72%。

2.10 稳定性试验

2.10.1 尿液中草酸稳定性试验 按样本处理法操作,分别在0、4、8、12、24、48 h测定同一份尿样。结果草酸质量浓度的RSD为4.9%,48 h内样本稳定。

2.10.2 血液中草酸稳定性试验 按样本处理法操作,分别在0、4、8、12、24、48 h测定同一份血浆样本。结果草酸质量浓度的RSD为4.9%,48 h内样本稳定。

2.11 样本测定

2.11.1 尿液中草酸样本测定 测得天津市第一中心医院PH男性患者接受肝肾联合移植术前后草酸的变化。结果见表1。

表1 病人尿液中草酸的量

Table 1 Oxalate content in urine of patients

编号	年龄	尿草酸 / (mg·L ⁻¹)		
		手术前 24 h	治疗 2 个月后	治疗半年后
1	36	126.46	89.10	15.55
2	16	69.37	34.10	29.01
3	49	45.00	21.11	18.22
4	12	76.09	51.20	37.03
5	39	72.09	60.03	43.00
6	23	67.78	51.99	36.66

2.11.2 血液中草酸样本测定 测得本院肝病合并肾病男性患者治疗前后血浆中草酸质量浓度。结果见表2。

表2 病人血中草酸的量

Table 2 Oxalate content in plasma of patients

编号	年龄	血草酸 / (mg·L ⁻¹)		
		手术前	治疗 2 个月后	治疗 4 个月后
1	6	10.20	1.36	0.45
2	16	6.79	1.51	0.19
3	49	7.16	3.74	0.51
4	12	8.03	5.09	2.00
5	39	7.66	4.06	2.11
6	23	6.99	3.78	1.56

3 讨论

PH是一种罕见的常染色体隐性遗传病。由于PH患者肝特异性过氧化丙氨酸化一乙醛酸盐氨基转移酶(AGT),导致草酸产生过多并从尿液中排泄,反复发作的尿石症和肾钙质沉着是其特征。这

些草酸盐沉积造成的终末期肾病唯有肾移植才是医治此病的根本；同时 PH 患者由于肝脏的代谢缺陷引起的草酸盐沉积，也必须实施肝移植手术^[1-2]。本实验通过天津市第一中心医院收治 6 例患有 PH 的病人，应用 RP-HPLC 法监测患者实施肝肾联合移植术前草酸质量浓度的变化。据文献报道^[3-4]正常人体尿草酸值小于 60 mg/L，正常人血中草酸浓度为 1~10 $\mu\text{mol/L}$ 。上述实验结果显示，经过肝肾联合移植术，以及适当的口服用药等临床治疗，患者尿液与血液中的草酸浓度均趋于正常。表明患者移植术后肝肾功能的良好恢复状况，同时亦证明肝肾联合移植术对于 PH 患者的有效治疗。

本实验先采用一定浓度的磷酸二氢钾作为流动相，但结果不理想。杂峰较多，目标峰不明显，测定一个样本耗时较多（约 45 min）。后采用甲醇-醋酸铵水溶液洗脱系统，以临苯二胺为衍生剂，与尿液与血液中的草酸反应，生成具有强紫外吸收化合物 2, 3-二羟基喹啉啉，此化合物在 314 nm 有强吸收

峰。草酸的保留时间为 7.2 min，此峰高与浓度具有良好的线性关系^[5]。

本实验方法简单快速，数据准确可靠，为临床通过检测草酸浓度来诊治疾病提供了良好的检测手段。

参考文献

- [1] 孙 雁. 肝移植和肾移植治疗原发性高草酸盐尿症三例 [J]. 中华器官移植杂志, 2014, 35(4): 247-248.
- [2] Manoharan M, Schwille P O. Measurement of oxalate in human plasma ultrafiltrate by ion chromatography [J]. *J Chromatogr B*, 1997, 700: 261-268.
- [3] 彭 婕, 葛卫红, 谈恒山, 等. 高效液相色谱法测定人尿中草酸的含量 [J]. 中国医院药学杂志, 2006, 26(3): 299-301.
- [4] 吴义启, 陈志强, 叶章群. 离子色谱法测定血草酸浓度的研究 [J]. 临床泌尿外科杂志, 2007, 22(5): 374-378.
- [5] 张惠静, 张世德, 任建敏, 等. 高效液相色谱法测定血和尿中的草酸 [J]. 第三军医大学学报, 1997, 19(1): 87-88.