

【临床评价】

人血浆中枸橼酸HPLC测定方法建立及其在连续性肾脏替代疗法患者行局部枸橼酸钠抗凝中的应用

印登阳¹, 黄继勋¹, 陈凯霞¹, 郑 鹏², 赵广玉^{1*}

1. 靖江市人民医院(扬州大学第七附属医院) 临床药学科, 江苏 靖江 214500

2. 靖江市人民医院(扬州大学第七附属医院) 重症医学科, 江苏 靖江 214500

摘 要: **目的** 建立测定人血浆中枸橼酸浓度的HPLC方法, 探讨连续性肾脏替代疗法(CRRT)患者行局部枸橼酸钠抗凝(RCA)中滤器前、滤器后和滤过液血浆中枸橼酸浓度相关性。**方法** 血浆样品用甲醇沉淀蛋白, 测定枸橼酸的条件: 色谱柱为Eclipse Plus C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm); 流动相为0.1%磷酸水溶液-甲醇(98:2); 柱温: 35℃; 进样体积: 20 μL; 体积流量: 0.6 mL·min⁻¹; 检测波长: 215 nm。采用建立的HPLC方法对40例使用RCA的CRRT患者的滤器前、滤器后和滤过液血浆中的枸橼酸浓度进行测定。采用Pearson相关性分析对滤器前、滤器后和滤过液血浆中枸橼酸浓度进行相关性分析, 记录每位患者枸橼酸泵速, 观察滤器的凝血程度, 根据血液净化治疗后透析器和管路的凝血情况进行分级。**结果** 建立的HPLC方法检测血浆中枸橼酸浓度的专属性良好, 基质效应为90.25%~101.23%, 回收率在89.90%~97.00%, 日内精密度RSD在2.60%~8.94%, 日间精密度RSD在2.48%~7.31%, 样品在室温下放置0、12、24 h及4℃下放置1、2、3、4周, 稳定性均良好。滤器前血浆枸橼酸浓度为(2.93±0.97) mmol·L⁻¹, 滤器后血浆枸橼酸浓度为(2.42±0.77) mmol·L⁻¹, 滤过液血浆中枸橼酸浓度为(2.89±0.81) mmol·L⁻¹; 滤过液血浆中枸橼酸浓度与滤器前、滤器后血浆枸橼酸浓度的Pearson相关系数分别为0.672 (P=0.00)、0.734 (P=0.00)。40例患者滤器凝血情况: 0~1级32例, 2级7例, 3级1例。**结论** 建立的HPLC分析方法符合生物样品含量测定要求, 可用于血浆中枸橼酸的浓度检测。在RCA应用于CRRT患者时, 滤过液血浆枸橼酸浓度可代替滤器后血浆枸橼酸浓度评价滤器抗凝效果, 减少反复检测导致的诊断性失血。

关键词: 枸橼酸; 连续性肾脏替代疗法; 局部枸橼酸钠抗凝; 高效液相色谱; 相关性分析

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2023)02-0384-06

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2023.02.020

Establishment of HPLC method for determination of citric acid in human plasma and its application in local sodium citric acid anticoagulation in patients with continuous renal replacement therapy

YIN Dengyang¹, HUANG Jixun¹, CHEN Kaixia¹, ZHENG Peng², ZHAO Guangyu¹

1. Department of Clinical Pharmacy, Jingjiang People's Hospital, the Seventh Affiliated Hospital of Yangzhou University, Jingjiang 214500, China

2. Department of Intensive Care Unit, Jingjiang People's Hospital, the Seventh Affiliated Hospital of Yangzhou University, Jingjiang 214500, China

Abstract: **Objective** To establish a high performance liquid chromatography (HPLC) method for the determination of the concentration of citric acid in human plasma, and to investigate the correlation between the concentration of citric acid in the pre-filter, post-filter and filtered plasma in patients undergoing local sodium citric acid anticoagulation (RCA) in continuous renal replacement therapy (CRRT). **Methods** Plasma samples were precipitated with methanol, and the conditions for determination of citric acid were as follows: The chromatographic column was Eclipse Plus C₁₈ column (250 mm × 4.6 mm, 5 μm), the mobile phase was 0.1% phosphoric acid solution-methanol (98:2), column temperature was 35℃, injection volume was 20 μL, volume flow

收稿日期: 2022-05-15

基金项目: 江苏省药学会-奥赛康基金科研项目(A201941); 2019泰州市科技支撑社会发展指导性项目(SSF20190065)

第一作者: 印登阳, 女, 主管药师, 研究方向为临床药物分析。E-mail: 872040827@qq.com

*通信作者: 赵广玉, 男, 主任药师, 研究方向为医院药学与药品质量控制。E-mail: 1079391280@qq.com

was 0.6 mL·min⁻¹, detection wavelength was 215 nm. The established HPLC method was used to determine the concentration of citric acid in the pre-filter, post-filter and filtered plasma of 40 patients with CRRT using RCA. Pearson correlation analysis was used to analyze the correlation between the citric acid concentration in the pre-filter, post-filter and filtered plasma, the citric acid pump speed of each patient was recorded, the coagulation degree of the filter was observed, and according to the coagulation condition of the dialyzer and the pipeline after the blood purification treatment was graded. **Results** The specificity of the established HPLC method for the determination of citric acid concentration in plasma was good. The matrix effect was 90.25%—101.23%, the recovery rate was 89.90%—97.00%, the intra day precision RSD was 2.60%—8.94%, and the inter day precision RSD was 2.48%—7.31%. The samples were kept at room temperature for 0, 12, 24 hours and 4 °C for 1, 2, 3, and 4 weeks, with good stability. The citric acid concentration in pre-filter plasma was (2.93 ± 0.97) mmol·L⁻¹, the citric acid concentration in post-filter plasma was (2.42 ± 0.77) mmol·L⁻¹, and the citric acid concentration in filtered plasma was (2.89 ± 0.81) mmol·L⁻¹. The Pearson correlation coefficient between the concentration of citric acid in the filtered plasma and the concentration of citric acid in pre-filter, and post-filter was 0.672 ($P = 0.00$) and 0.734 ($P = 0.00$), respectively. Coagulation condition of filter in 40 patients: 32 cases were grade 0—1, seven cases were grade 2, one case was grade 3. **Conclusion** The established HPLC method meets the requirements of biological sample content determination, and can be used to determine the concentration of citric acid in plasma. When RCA is applied to patients with CRRT, the citric acid concentration of the filtered plasma can replace the citric acid concentration of post-filter plasma to evaluate the anticoagulant effect of the filter and reduce the diagnostic blood loss caused by repeated testing.

Key words: citric acid; continuous renal replacement therapy; local sodium citric acid anticoagulation; high performance liquid chromatography; correlation analysis

连续性肾脏替代疗法(CRRT)常用于危重症和血流动力学不稳定的急性肾损伤患者的治疗^[1]。在CRRT治疗期间,最重要的是使用抗凝剂防止体外或滤器中凝血。近几年,体外局部枸橼酸钠抗凝(RCA)技术越来越多地应用于CRRT中。Zheng等^[2]的研究发现枸橼酸蓄积可能会导致低钙血症和代谢性酸中毒,严重者甚至威胁生命。在CRRT中,由于输注的枸橼酸总负荷较大,血浆枸橼酸浓度的测定对其蓄积程度和抗凝效果的评估具有重大意义^[3]。然而,目前临床尚未常规开展枸橼酸血药浓度检测,而是通过测定滤器后血浆离子钙浓度、总钙与离子钙比率等指标间接判定枸橼酸蓄积程度和局部抗凝的效果。目前已有HPLC法测定体外样品中枸橼酸浓度的报道^[4],而血浆样品中枸橼酸的测定目前仍是空白,亟需开发新的检测方法。前期研究^[5]中通过对RCA中滤器前、滤器后和滤过液血浆中游离钙浓度的相关性进行分析,证明了滤过液血浆游离钙浓度可代替滤器后血浆游离钙浓度用于评价RCA疗效。而滤过液与滤器前、后血浆枸橼酸浓度是否也具有相关性仍是值得探讨的问题。本研究通过建立枸橼酸血药浓度检测的HPLC方法,研究滤器前、滤器后和滤过液血浆中枸橼酸浓度相关性,旨在探讨是否可以用滤过液血浆中枸橼酸浓度评价滤器的抗凝效果,减少CRRT患者血液的消耗和有创检查,促进RCA中枸橼酸的合理使用。

1 材料

1.1 仪器

1260 高效液相色谱仪(美国 Agilent 公司,包含 G7115A 二极管阵列检测器、G7129A 自动进样器、G7111B 四元泵); Sartorius 纯水仪(德国 Sartorius 公司); Sartorius 十万分之一分析天平(德国 Sartorius 公司)。

1.2 药品及试剂

枸橼酸对照品(批号:100396-201603,质量分数 100%),购自中国食品药品检定研究院;甲醇为色谱纯;磷酸为分析纯;水为超纯水。

2 方法与结果

2.1 溶液配制

精密称取枸橼酸对照品 16.12 mg,置 1 mL 量瓶中,加水溶解并稀释至刻度,摇匀,配制成质量浓度为 16 mg·mL⁻¹ 的枸橼酸对照品储备液,4 °C 避光保存。

2.2 样本采集

选择 2020 年 1 月—2021 年 1 月在靖江市人民医院接受 CRRT 治疗并采用 RCA 的重症患者共 40 例,每例采集滤器前、滤器后和滤过液血液于 EDTA 抗凝管中,离心(3 000 r·min⁻¹, 10 min),取上层血浆用于枸橼酸浓度检测。本研究已得到靖江市人民医院伦理委员会批准(伦审号:2019-01-33)。

2.3 样本前处理方法

取患者血浆样本 100 μL,加入 200 μL 甲醇,涡旋 30 s,于 14 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,取上清液,再

加入2倍体积的水,涡旋30 s,于14 000 r·min⁻¹离心10 min,取20 μL上清液进样检测。

2.4 色谱条件

色谱柱为Eclipse Plus C₁₈柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm);流动相为0.1%磷酸水溶液-甲醇(98:2);柱温:35 °C;进样体积:20 μL;体积流量:0.6 mL·min⁻¹;检测波长:215 nm。

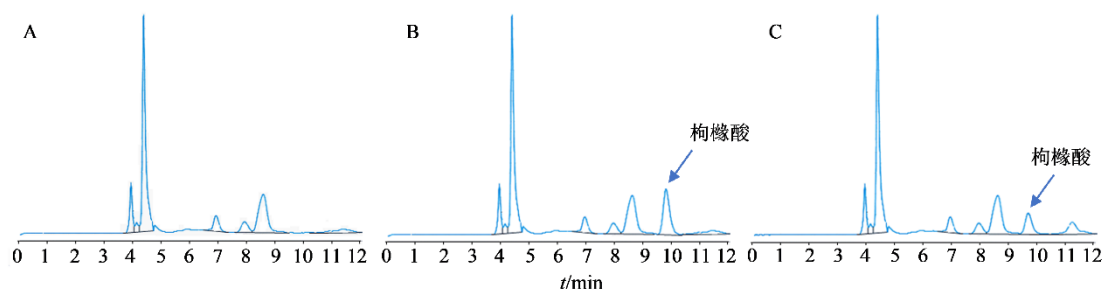


图1 空白血浆(A)、空白血浆+枸橼酸对照品(B)和滤过液血浆样品(C)HPLC色谱图

Fig. 1 HPLC Chromatograms of blank human plasma (A), reference substance added to blank human plasma (B), and filtered plasma sample (C)

2.6 标准曲线、线性范围和定量限考察

精密量取16 mg·mL⁻¹的枸橼酸对照品储备液,依次用水稀释,制备成质量浓度为1.5、3.0、4.0、8.0、12.0、16.0 mg·mL⁻¹的线性枸橼酸对照品溶液。精密移取空白血浆90 μL,分别加入空白水溶液和上述线性枸橼酸对照品溶液各10 μL,混匀,经“2.3”项下样本前处理方法处理,得到枸橼酸对照品基底溶液和对照品进样质量浓度为0.017、0.033、0.044、0.089、0.133、0.178 mg·mL⁻¹的线性溶液,每个质量浓度平行3份,进样测定,以枸橼酸对照品终质量浓度为横坐标,各质量浓度峰面积与基底溶液峰面积差值(枸橼酸对照品实际峰面积)为纵坐标进行线性回归。结果显示,在0.017~0.178 mg·mL⁻¹线性关系良好,枸橼酸线性方程为 $Y = 1\,901.20 X + 0.76$, $r = 0.999\,8$,定量限为0.017 mg·mL⁻¹。

2.7 基质效应考察

按“2.6”项下方法制备低、中、高质量浓度分别为0.033、0.089、0.133 mg·mL⁻¹的枸橼酸对照品血浆样本,每个质量浓度平行配制6份,进样分析,记录峰面积(A);另用水制备成以上3个质量浓度的枸橼酸对照品溶液,每个质量浓度6份,进样分析,记录峰面积(B)。以A/B计算基质效应。结果表明,枸橼酸对照品在血浆中的基质效应为90.25%~101.23%,RSD<10%,符合生物样本测定要求。

2.5 专属性考察

通过考察空白血浆(取自正常人,无枸橼酸用药史)、空白血浆+枸橼酸对照品、滤过液血浆色谱图,分析判断血浆中其他内源性物质是否影响测定结果,确认本方法的专属性。结果如图1所示,血浆中的其他物质不影响枸橼酸的测定,本分析方法专属性良好。

2.8 回收率和精密度考察

按“2.6”项下方法制备低、中、高质量浓度为0.033、0.089、0.133 mg·mL⁻¹的枸橼酸对照品血浆样本,每个质量浓度平行配制5份,经“2.3”项下样本前处理方法处理,按“2.4”项下色谱条件进样,记录峰面积。取配制好的枸橼酸对照品溶液,依次稀释成0.033、0.089、0.133 mg·mL⁻¹的对照品溶液,每个质量浓度平行配制5份,按“2.4”项下色谱条件进样,记录峰面积,2个峰面积的比值为回收率(准确度以回收率计),计算5次峰面积RSD,求得日内精密度;连续3 d按上述方法进行操作,计算RSD,求得日间精密度。结果显示,本方法测定血浆中的枸橼酸的回收率在89.90%~97.00%,符合浓度测定要求;日内精密度RSD在2.60%~8.94%,日间精密度RSD在2.48%~7.31%,均符合要求。见表1。

2.9 稳定性考察

按“2.6”项下方法制备低、中、高质量浓度为0.033、0.089、0.133 mg·mL⁻¹的枸橼酸质控样本各3份,经“2.3”项下方法处理样品。在室温下分别放置0、12、24 h后进样分析,记录峰面积,用线性回归方程分别计算质量浓度;将制备的3个质量浓度的枸橼酸质控样本在4 °C下分别放置1、2、3、4周后,按“2.3”项下方法处理后进样分析,记录峰面积,计算质量浓度。结果表明,枸橼酸质控样本在上述条件下的稳定性良好,部分结果见表2。

表1 回收率和精密度结果($\bar{x}\pm s, n=5$)Table 1 Results of recovery rate and precision ($\bar{x}\pm s, n=5$)

质量浓度/ (mg·mL ⁻¹)	回收率/%	RSD/%	日内精密度		日间精密度	
			测定值/(mg·mL ⁻¹)	RSD/%	测定值/(mg·mL ⁻¹)	RSD/%
0.033	89.90±4.63	5.15	0.031±0.002	6.25	0.030±0.002	5.73
0.089	99.63±3.43	3.44	0.089±0.002	2.60	0.088±0.002	2.48
0.133	97.00±3.46	3.57	0.137±0.012	8.94	0.134±0.010	7.31

表2 稳定性结果($\bar{x}\pm s, n=3$)Table 2 Results of stability ($\bar{x}\pm s, n=3$)

储存条件	理论质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	实测质量浓度/(mg·mL ⁻¹)	RSD/%
室温放置 24 h	0.033	0.030±0.002	5.15
	0.089	0.089±0.003	3.42
	0.133	0.130±0.006	4.80
4 °C放置 4 周	0.033	0.032±0.002	6.25
	0.089	0.085±0.004	4.24
	0.133	0.128±0.008	5.90

2.10 统计学处理方法

采用 SPSS 26.0 软件进行统计分析。计量数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,相关性采用 Pearson 相关性分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。绘制受试者工作特征曲线(ROC),比较各项指标对滤器凝血的判断价值,ROC 曲线下面积(AUC)比较采用 Z 检验。

2.11 枸橼酸 HPLC 测定方法在 CRRT 患者治疗过程中的应用及观察指标

2.11.1 CRRT 过程中枸橼酸的 HPLC 测定 运用上述建立的 HPLC 方法测定 CRRT 患者使用 RCA 时滤器前血浆、滤器后血浆和滤过液血浆中的枸橼酸浓度。具体结果见表 3。

2.11.2 滤器前、滤器后和滤过液血浆中枸橼酸浓度 Pearson 相关性分析 分析结果显示,滤过液血浆中枸橼酸浓度与滤器前、滤器后血浆枸橼酸浓度的 Pearson 相关系数分别为 0.672($P=0.00$)、0.734($P=0.00$),说明滤过液血浆枸橼酸浓度与滤器后血浆枸橼酸浓度相关性较高,采用 HPLC 法直接测定滤过液血浆中枸橼酸浓度,可作为替代方法评估滤器后血浆枸橼酸浓度,以减少诊断性失血。

2.11.3 枸橼酸抗凝效果观察 记录每个患者枸橼酸泵速,观察滤器的凝血程度,根据血液净化治疗后透析器和管路的凝血情况进行分级:0 级为无凝血或数条纤维凝血;1 级为部分凝血或成束纤维凝血;2 级为严重凝血或半数以上纤维凝血;3 级为滤器纤维几乎全部凝血。其中,0~1 级表示抗凝有

效;2 级表示抗凝效果欠佳,3 级表示抗凝无效^[6-7]。对 40 例患者滤器凝血情况进行判断分级。其中,0~1 级 32 例,2 级 7 例,3 级 1 例。比较各因素(滤器前、滤器后血浆和滤过液血浆中枸橼酸浓度,枸橼酸泵速)对滤器凝血程度的判断价值(ROC 曲线见图 2),ROC 曲线各因素分析结果见表 4。结果显示,滤器后血浆枸橼酸浓度判断滤器凝血程度的 AUC 最大(0.579),灵敏性和特异性均较高,分别为 72.0%和 53.3%。综合上述结果,由于滤过液血浆枸橼酸浓度与滤器后血浆枸橼酸浓度相关性较好,可通过直接测定滤过液枸橼酸浓度对应性评价滤器后血浆枸橼酸浓度,从而对其抗凝效果进行评估。

3 讨论

3.1 枸橼酸 HPLC 测定方法的建立

本实验建立了基于 HPLC 测定血浆样本中枸橼酸浓度的方法。由于生物样本中的成分较复杂,寻找有效的样本前处理方法是使目标物与其他物质分离的关键。本实验选用了较常用的蛋白沉淀法作为样本前处理方法。根据枸橼酸的理化性质,初步选择甲醇和乙腈作为蛋白沉淀剂,对比其出峰位置和回收率,考察和优化蛋白沉淀剂的选择和使用量。结果显示,甲醇作为蛋白沉淀剂且其与样本体积比为 2:1 时,枸橼酸的色谱出峰位置无其他基质的干扰且回收率较高。

本实验先后采用了水-乙腈、水-甲醇、0.01% 盐酸水溶液-甲醇、0.1% 磷酸水溶液-甲醇、0.2% 磷酸

表3 滤器前、滤器后和滤过液血浆中枸橼酸测定结果
Table 3 Results of citric acid in pre-filter, post-filter and filtered plasma

患者编号	枸橼酸/(mmol·L ⁻¹)		
	滤器前血浆	滤器后血浆	滤过液血浆
1	3.51	1.93	2.59
2	3.29	1.99	2.77
3	1.32	1.17	1.17
4	2.50	2.62	2.84
5	2.48	2.81	3.16
6	3.83	2.85	3.39
7	2.10	2.66	3.73
8	4.76	4.22	2.53
9	3.29	3.10	3.09
10	4.30	2.82	3.17
11	2.28	1.85	2.09
12	4.07	2.78	3.93
13	4.25	2.74	3.50
14	2.24	1.23	1.55
15	1.85	2.19	2.38
16	1.18	0.78	2.31
17	2.05	2.36	2.88
18	2.39	1.89	2.22
19	3.31	2.08	2.54
20	4.41	3.36	4.43
21	3.58	3.38	4.06
22	4.93	4.01	4.62
23	2.05	3.31	3.79
24	2.84	2.15	2.69
25	3.43	2.76	3.52
26	3.99	2.94	3.52
27	4.20	3.07	4.03
28	1.76	3.43	1.96
29	2.04	2.42	2.95
30	2.19	1.37	1.82
31	2.08	1.90	2.82
32	4.06	3.05	3.59
33	2.94	2.19	3.02
34	3.16	2.61	3.81
35	2.60	2.10	2.43
36	2.38	1.79	2.01
37	2.35	1.90	2.13
38	2.59	1.64	2.21
39	2.30	1.78	2.34
40	2.21	1.37	1.83

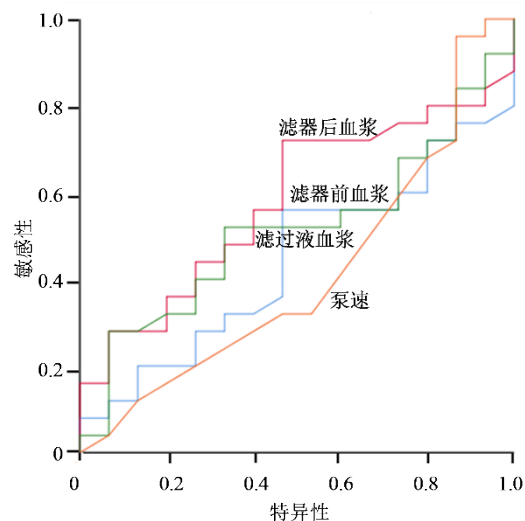


图2 各因素对滤器凝血功能影响的ROC曲线
Fig. 2 ROC curve of effect of factors on degree of clotting of filter

表4 ROC曲线中各因素对滤器凝血程度的影响
Table 4 Effect of factors in ROC curve on degree of clotting of filter

因素	AUC	灵敏度/%	特异度/%
滤器前血浆枸橼酸浓度	0.443	56.0	53.3
滤器后血浆枸橼酸浓度	0.579	72.0	53.3
滤过液血浆枸橼酸浓度	0.513	52.0	66.7
枸橼酸泵速	0.412	96.0	13.3

水溶液-甲醇作为流动相,结果显示,0.1%磷酸水溶液-甲醇作为流动相时,枸橼酸的色谱峰形较好。文献调研显示,枸橼酸在210 nm和214 nm处均有较强吸收^[8-9],进样分析发现选用215 nm作为检测波长时,样本中其他干扰峰较少。另外,本实验还对建立的HPLC方法的专属性、线性和范围、基质效应、稳定性、精密度和准确度进行了考察,结果均满足测定要求。

3.2 方法的应用

本实验共测定了40例行RCA的CRRT患者滤器前、滤器后和滤过液血浆中枸橼酸浓度。滤器前血浆枸橼酸浓度为 (2.93 ± 0.97) mmol·L⁻¹,滤器后血浆枸橼酸浓度为 (2.42 ± 0.77) mmol·L⁻¹,滤过液血浆中枸橼酸浓度为 (2.89 ± 0.81) mmol·L⁻¹,均可达到较好的体外抗凝水平^[10]。对患者滤器前、滤器后和滤过液血浆中枸橼酸浓度进行相关性分析,滤过液血浆枸橼酸浓度与滤器后血浆枸橼酸浓度相关性较高;比较各因素对滤器凝血程度的判断价值,滤器后和滤过液血浆中枸橼酸浓度AUC分别为0.579和0.513,均可较好地反映滤器管路凝血程度。

因此,在RCA应用于CRRT时,滤过液血浆枸橼酸浓度可代替滤器后血浆枸橼酸浓度评价滤器抗凝效果,减少反复检测导致的诊断性失血。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Kindgen-Milles D, Brandenburger T, Dimski T. Regional citrate anticoagulation for continuous renal replacement therapy [J]. *Curr Opin Crit Care*, 2018, 24(6): 450-454.
- [2] Zheng Y, Xu Z Y, Zhu Q Y, et al. Citrate pharmacokinetics in critically ill patients with acute kidney injury [J]. *PLoS One*, 2013, 8(6): e65992.
- [3] Oudemans-van Straaten H M, Bosman R J, Koopmans M, et al. Citrate anticoagulation for continuous venovenous hemofiltration [J]. *Crit Care Med*, 2009, 37(2): 545-552.
- [4] 樊蓉, 张纯, 关皓月, 等. HPLC测定封管用枸橼酸钠注射液中枸橼酸盐的含量 [J]. *药学实践杂志*, 2008, 26(5): 354-356.
Fan R, Zhang C, Guan H Y, et al. Content determination of citrate in sodium citrate injection for catheter locking by HPLC [J]. *J Pharm Pract*, 2008, 26(5): 354-356.
- [5] 郑鹏, 包磊, 王建江, 等. 滤过液血浆游离钙浓度评价CRRT患者局部枸橼酸钠抗凝的可行性分析 [J]. *江苏医药*, 2018, 44(10): 1139-1142.
Zheng P, Bao L, Wang J J, et al. Feasibility study on evaluating regional citrate anticoagulation in CRRT patients by concentration of ionized calcium in filtered plasma [J]. *Jiangsu Med J*, 2018, 44(10): 1139-1142.
- [6] 何长民, 张训. 肾脏替代治疗学 [M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 1999.
He C M, Zhang X. *Renal Replacement Therapy* [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Literature Publishing House, 1999.
- [7] 符霞. 血液透析护理实践指导手册 [M]. 北京: 人民军医出版社, 2013.
Fu X. *Hemodialysis Nursing Practice Instruction Manual* [M]. Beijing: People's Military Medical Press, 2013.
- [8] 彭婕, 葛卫红, 谈恒山, 等. 高效液相色谱法同时测定健康人尿液中草酸和枸橼酸的含量 [J]. *中国现代应用药学*, 2007, 24(1): 72-74.
Peng J, Ge W H, Tan H S, et al. Simultaneous determination of the contents of oxalate and citrate in human urine by RP-HPLC [J]. *Chin J Mod Appl Pharm*, 2007, 24(1): 72-74.
- [9] 伍小燕, 陈朝, 黄权芳, 等. HPLC法测定复方大黄灌肠液中枸橼酸的含量 [J]. *中医药通报*, 2013, 12(2): 58-60.
Wu X Y, Chen C, Huang Q F, et al. Determination of citric acid in Compound Rhubarb enema by HPLC [J]. *Tradit Chin Med J*, 2013, 12(2): 58-60.
- [10] Calatzis A, Toepfer M, Schramm W, et al. Citrate anticoagulation for extracorporeal circuits: Effects on whole blood coagulation activation and clot formation [J]. *Nephron*, 2001, 89(2): 233-236.

[责任编辑 刘东博]