

# 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

彭婕<sup>a</sup>,葛卫红<sup>a</sup>,谈恒山<sup>a</sup>,孙西钊<sup>b</sup>(南京大学医学院附属鼓楼医院 a.临床药理学室, b.泌尿外科,南京 210008)

**摘要:**目的 建立 HPLC同时测定人尿草酸和枸橼酸含量的方法。方法 采用 Agilent SB C<sub>18</sub> (250mm × 4.6mm, 5μm)色谱柱; Agilent zorbax extend-C<sub>18</sub> (4.6mm × 12.5mm, 5μm)为保护柱;以 0.018mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钾(含 0.010mol·L<sup>-1</sup>四丁基硫酸氢铵和 2.69 × 10<sup>-5</sup> mol/L EDTA, pH2.4 ~ 2.5)为流动相;检测波长 210nm;流速 1.5mL·min<sup>-1</sup>;柱温 25℃;进样量 20μL;以 50mg/mL磺基水杨酸沉淀尿蛋白。结果 草酸最低检测限为 0.4μg·mL<sup>-1</sup>。线性范围为 1.563 ~ 100μg·mL<sup>-1</sup>,平均回收率为 97.66%,日内及日间精密度 RSD < 13.50%。枸橼酸最低检测限为 0.8μg·mL<sup>-1</sup>。线性范围为 3.125 ~ 200μg·mL<sup>-1</sup>,平均回收率为 97.71%,日内及日间精密度 RSD < 8.25%。结论 该方法简便,灵敏度高,重复性好,可用于尿路草酸钙结石成因的研究。

**关键词:**草酸;枸橼酸;高效液相色谱法;人尿液

中图分类号: R917.720.1 文献标识码: B 文章编号: 1007-7693(2007)01-0072-03

## Simultaneous Determination of the Contents of Oxalate and Citrate in Human Urine by RP-HPLC

PENG Jie<sup>a</sup>, GE Weirhong<sup>a</sup>, TAN Hengshan<sup>a</sup>, SUN Xi-zhao<sup>b</sup> (a. Department of Clinical Pharmacy, b. Department of Urology Surgery, the Affiliated Drum Tower Hospital of Nanjing University Medical School, Nanjing 210008, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To establish a method of simultaneously determining the contents of oxalate and citrate in human urine by reversed phase high performance liquid chromatography. **METHODS** To observe the normal value of oxalate and citrate in human urine, they were determined by Agilent SB C<sub>18</sub> (250mm × 4.6mm, 5μm) column and Agilent zorbax extend-C<sub>18</sub> (4.6mm × 12.5mm, 5μm) guard column; an aqueous solution containing 0.018mol·L<sup>-1</sup> potassium dihydrogenphosphate, 0.010mol·L<sup>-1</sup> tetrabutylammonium hydrogensulphate and 2.69 × 10<sup>-5</sup> mol/L EDTA at pH 2.4 ~ 2.5 was used as mobile phase. Flow rate was 1.5mL·min<sup>-1</sup> at 25℃. Injection volume was 20μL. All separation was at UV 210nm. Deproteinization of urine samples was carried out by well mixing 0.5 mL urine sample with 25 mg crystalline sulfosalicylic acid at 4℃ for 30 min. **RESULTS** The detection limit of oxalate and citrate was 0.4μg·mL<sup>-1</sup> and 0.8μg·mL<sup>-1</sup>, respectively. The linear range of oxalate was 1.563 ~ 100.00μg·mL<sup>-1</sup>, its average recovery was 97.66% and RSD of intra-day and inter-day were less than 13.50%. The linear range of citrate was 3.125 ~ 200.00μg·mL<sup>-1</sup>, its average recovery was 97.71% and RSD of intra-day and inter-day were less than 8.25%. **CONCLUSION** The method is simple, sensitive and reproducible for quantifying oxalate and citrate in human urine and the research of formation of uric calcium oxalate stone.

**KEY WORDS:** oxalate; citrate; HPLC; human; urine

尿路结石是我国的常见病、多发病,其中以草酸钙结石最为多见。高草酸尿症是草酸钙结石的重要病因,而枸橼酸及其盐是泌尿系结石的重要抑制因子。准确测定尿液中的草酸和枸橼酸,是判断尿草酸结石病必不可少的工具。目前国内常用比色法测定尿液中枸橼酸含量<sup>[1]</sup>,方法灵敏度低,专属性差,无法对尿液样品中微量的枸橼酸进行准确的定量分析。而现有的高效液相色谱法测定草酸的方法<sup>[2-3]</sup>在前处理时往往需要将样品中的草酸沉淀出来方可测定,对于样品中不能沉淀的枸橼酸则无法同时测定其含量。笔者在国内未见应用高效液相色谱法同时测定尿液中草酸和枸橼酸报道。国外使用的离子色谱法<sup>[4]</sup>和毛细管电泳技术<sup>[5]</sup>可以同时测定尿液中的草酸和枸橼酸,但在国内因仪器不易获得而受到限制。笔者对现有的高效液相色谱法测定草酸的方法加以改进,建立了 HPLC同时测定尿液中草酸和枸橼酸的方法,从而可对尿液中草酸和枸橼酸这两种至关重要的结石风险因子一次采样,同时进行评估。笔者同时测定了 27

名健康人尿草酸和枸橼酸的含量,为从病因学角度定量研究尿草酸、枸橼酸与草酸钙结石的关系提供了依据。

### 1 材料

#### 1.1 仪器

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。雷磁 PHS-3C型精密 pH计,上海雷磁仪器厂。台式离心机 TGL-16G,上海安亭科学仪器厂。AG204精密电子天平,瑞士产。

#### 1.2 试剂

草酸、枸橼酸、磷酸二氢钾、四丁基硫酸氢铵、磺基水杨酸为分析纯试剂。实验用水为二次蒸馏水。

#### 1.3 色谱条件

色谱柱: Agilent SB C<sub>18</sub> (250mm × 4.6mm, 5μm),保护柱为 Agilent Zorbax Extend-C<sub>18</sub> (4.6mm × 12.5mm, 5μm)。流动相为 0.018mol·L<sup>-1</sup>磷酸二氢钾(含 0.010mol·L<sup>-1</sup>四丁基硫酸氢铵和 2.69 × 10<sup>-5</sup> mol/L EDTA, pH2.4 ~ 2.5)。检测波

长: 210nm。流速: 1.5 mL · min<sup>-1</sup>。柱温: 25℃。进样量: 20μL。

## 2 方法与结果

### 2.1 方法的专属性

在上述色谱条件下,测得尿液中草酸和枸橼酸的色谱图,草酸的保留时间为 6.0min,枸橼酸的保留时间为 5.5min,空白尿液中含有内源性代谢的草酸和枸橼酸色谱峰,其余内源性物质不干扰两者的测定。

### 2.2 标准贮备液的配制

精密称取分析纯草酸(纯度 >99.8%)适量,加水定容稀释成 10mg · mL<sup>-1</sup>的草酸标准贮备液。精密称取分析纯枸橼酸(纯度 >99.8%)适量,加水定容稀释成 20mg · mL<sup>-1</sup>的枸橼酸标准贮备液。25℃室温备用。

### 2.3 尿液的预处理

取健康人的新鲜尿液,按照尿液:浓盐酸 = 100:1的比例加入浓盐酸酸化,然后以 0.22μm 孔径的微孔滤膜滤过。取续滤液 0.5mL,加入 25mg 磺基水杨酸溶解,混匀,4℃放置 30min 后,12 000 r · min<sup>-1</sup>离心 10min,上清液供进样。

### 2.4 标准曲线的制备

尿样品按照“2.3”项下的方法预处理。取续滤液 5.0 mL,加入 250mg 磺基水杨酸溶解,混匀,4℃放置沉淀 30min 后,吸取 1mL,分别加入 10mg · mL<sup>-1</sup>草酸标准贮备液 10μL 和 20mg · mL<sup>-1</sup>枸橼酸标准贮备液 10μL,即同时含 100μg · mL<sup>-1</sup>草酸和 200μg · mL<sup>-1</sup>枸橼酸尿液;按照倍比稀释的方法配制同时含草酸和枸橼酸分别为 100 和 200, 50 和 100, 25 和 50, 12.5 和 25, 6.25 和 12.5, 3.125 和 6.25, 1.563 和 3.125μg · mL<sup>-1</sup>尿液。并另取空白尿液按照“2.2”项下的方法预处理。各浓度含草酸和枸橼酸尿液以 12 000 r · min<sup>-1</sup>离心 10min,上清液供进样。分别以草酸峰面积 A<sub>oxa</sub>对浓度 C<sub>oxa</sub>(μg · mL<sup>-1</sup>),枸橼酸峰面积 A<sub>cit</sub>对浓度 C<sub>cit</sub>(μg · mL<sup>-1</sup>)进行线性回归,得草酸工作曲线:

$$A_{\text{oxa}} = 4.8929C_{\text{oxa}} - 3.5819 \quad r = 0.9991$$

可见在 1.563 ~ 100μg · mL<sup>-1</sup>内,草酸峰面积与草酸浓度呈良好的线性关系。

枸橼酸工作曲线:

$$A_{\text{cit}} = 0.4498C_{\text{cit}} + 1.43 \quad r = 0.9990$$

可见在 3.125 ~ 200μg · mL<sup>-1</sup>范围内,枸橼酸峰面积与枸橼酸浓度呈良好的线性关系。

### 2.5 最低检测限和最低定量限

在选定的色谱条件下,按信噪比为 3/1 测定草酸的最低检测限为 0.4μg · mL<sup>-1</sup>,枸橼酸的最低检测限为 0.8μg · mL<sup>-1</sup>。按信噪比为 10/1 测定草酸的最低定量限为 0.8μg · mL<sup>-1</sup>,枸橼酸的最低定量限为 3.125μg · mL<sup>-1</sup>。

### 2.6 精密度和回收率试验

按照“2.4”项下配制同时含草酸 100, 25, 3.125μg · mL<sup>-1</sup>和枸橼酸分别为 200, 50, 6.25μg · mL<sup>-1</sup>尿液各五份,在上述色谱条件下,分别测定峰面积,计算日内、日间精密度和回收率。结果见表 1 和表 2。

表 1 草酸在人尿液中的日内、日间精密度和回收率 (n = 5)

Table 1 Result of precision and recovery test of oxalate in urine (n = 5)

加入草酸浓度 /μg · mL <sup>-1</sup>	测得浓度 /μg · mL <sup>-1</sup>	方法回收率 /%	日内精密度 RSD/%	日间精密度 RSD/%
100	101.6 ± 2.3	101.6 ± 2.3	1.2	2.2
25	23.1 ± 1.8	92.0 ± 7.0	4.0	8.0
3.125	3.1 ± 0.3	98.9 ± 10.2	10.5	13.5

表 2 枸橼酸在人尿液中的日内、日间精密度和回收率 (n = 5)

Table 2 Result of precision and recovery test of citrate in urine (n = 5)

加入枸橼酸浓度 /μg · mL <sup>-1</sup>	测得浓度 /μg · mL <sup>-1</sup>	方法回收率 /%	日内精密度 RSD/%	日间精密度 RSD/%
200	200.9 ± 2.3	100.5 ± 1.2	2.5	1.1
50	47.3 ± 2.4	94.5 ± 4.8	6.2	4.8
6.25	6.1 ± 0.8	98.1 ± 12.3	7.2	8.2

### 2.7 稳定性试验

尿液样品按照“2.3”项下的方法预处理后,分别在 0, 4, 8, 12, 24h 测定,草酸峰面积的 RSD 为 3.38%,枸橼酸峰面积的 RSD 为 4.72%。24h 内样品稳定。

### 2.8 样品测定

收集 27 名健康人的 24h 新鲜尿液样品,按照“2.3”项下的方法预处理后进样测定草酸浓度。测得健康人 24h 尿液中的草酸含量平均值为 (31.00 ± 23.40) mg (89.27 ~ 1.98 mg),枸橼酸含量平均值为 (402.28 ± 323.44) mg (1218.96 ~ 25.58 mg)。其中 24h 尿酸含量异常者有 6 人,24h 尿枸橼酸含量异常者有 14 人;24h 尿酸和尿枸橼酸含量均异常者有 3 人。

## 3 讨论

### 3.1 流动相条件的选择

草酸和枸橼酸作为有机阴离子而非结构化合物,在 C<sub>18</sub> 色谱柱上保留时间较短。笔者曾试过在磷酸二氢钾流动相中加入不同浓度的乙二胺和三乙胺,虽然枸橼酸均可以在 5.5min 左右出峰,但草酸在 1.5 ~ 2.2min 之间出峰,与尿样的前部杂峰重合,导致草酸无法定量测定。流动相中加入四丁基硫酸氢铵后,尿液中的枸橼酸峰位仍在 5.5min 左右,却可以使草酸峰位推迟到 6.0min。加入 2.69 × 10<sup>-5</sup> mol/L EDTA,有助于改善峰形,减少拖尾,使样品中的草酸与枸橼酸峰达到良好分离。在有 EDTA 的条件下,流动相中四丁基硫酸氢铵达到 0.0075 mol · L<sup>-1</sup> 时,草酸和枸橼酸峰可以基线分离,且随着加入的量增大,两者分离越明显。考虑到流动相中含盐量少有利于延长色谱柱寿命,所以确定四丁基硫酸氢铵的量为 0.010 mol · L<sup>-1</sup>。

### 3.2 样品处理方法

尿样前处理中最重要的是除去尿样中少量的蛋白等杂质。参考文献方法<sup>[6]</sup>,以磺基水杨酸作为沉淀剂按照 50mg / mL 尿样,置 4℃ 放置 30min 后蛋白基本沉淀完全,离心可见

试管底部少许红棕色沉淀,杂峰数量可明显减少。新鲜尿液加入浓盐酸酸化的目的是为了防止尿液中的维生素 C 在中性和碱性的条件下转化为草酸而影响测定<sup>[2]</sup>。

### 3.3 健康人尿草酸和枸橼酸含量

我国是世界上泌尿系结石的三个主要流行地区之一<sup>[7]</sup>。尿石中,以草酸钙结石最为多见,草酸代谢异常所致的高草酸尿在结石形成上具有重要意义<sup>[8]</sup>。枸橼酸是尿路结石的重要抑制因子,枸橼酸根离子由于其特殊的空间结构,不但能与钙离子强烈配位,抑制草酸钙等尿石矿物的成核和生长,还可以碱化尿液,使酸性类结石如尿酸结石和胱氨酸结石的溶解度增加<sup>[9]</sup>。低枸橼酸尿症的人群患尿石症的危险性是尿枸橼酸水平正常人群的 1.5 倍多<sup>[10]</sup>。本实验建立的高效液相同时测定尿草酸和枸橼酸含量的方法无疑为尿石症病因的研究打下了良好的基础。

经测定 27 名健康人尿草酸和枸橼酸,24h 尿草酸平均含量为  $(31.00 \pm 23.40) \text{ mg}$  ( $89.27 \sim 1.98 \text{ mg}$ ); 24h 尿枸橼酸平均含量为  $(402.28 \pm 323.44) \text{ mg}$  ( $1218.96 \sim 25.58 \text{ mg}$ )。可见从本实验测试的小样本来看,健康人的 24h 尿草酸和枸橼酸含量差别均可有十倍之多。

据文献报道<sup>[8]</sup>,24h 尿草酸含量在 60mg 以上的人群有 80% 的可能产生尿路结石。本研究中,虽然 24h 尿草酸含量的平均值趋于正常,但含量在 60mg 以上的有 4 人,另有两例尿草酸含量在 55 ~ 60mg,共 6 人,占受试人数的 22.22%。可见有产生尿路结石倾向的人群数量不可低估。

一般而言轻度至中度低枸橼酸尿多与环境因素有关,例如,食用过量动物性蛋白和盐、饥饿等,此时尿中枸橼酸排泄量约为  $100 \sim 320 \text{ mg/d}$ <sup>[11]</sup>。本研究中尿枸橼酸排泄量低于  $320 \text{ mg/24h}$  的有 14 人,占受试人数的 51.85%。值得关注的是,3 人的 24h 尿草酸含量在 55mg 以上,同时 24h 尿枸橼酸含量低于  $320 \text{ mg/d}$ ,理论上较易形成尿路结石,占总受试人数的 11.11%。

来源于饮食肠道吸收的草酸,虽然仅占尿草酸总来源的 15 ~ 20%,但对尿草酸浓度变化的影响很大<sup>[12]</sup>。因此,提高人群健康意识,改变饮食习惯,控制草酸的摄入,同时增加进食富含枸橼酸的食物已非常必要。本实验尚属小样本研究,对国人饮食和排泄的草酸、枸橼酸的含量以及与尿路结石的

关系,还有待深入探索。

### 参考文献

- [1] YIN Y L, JIN J, ZHANG B, *et al.* Unprocessed rice bran in the treatment of hypercalciuric patients with urinary stone [ J ]. *Chin J Urol*(中华泌尿外科杂志), 1998, 19(9): 563-565.
- [2] ZHANG H J, ZHANG S D, REN J M, *et al.* Determination of oxalate in plasma and urine by high-performance liquid chromatography [ J ]. *Acta Acad Third Mil Med Univ*(第三军医大学学报), 1997, 19(1): 87-88.
- [3] CHEN Z Q, ZHANG X, YANG W M, *et al.* Calcium Oxalate Precipitation as a Pretreatment Method for Urine in Oxalate Setrmination by Means of Ion-Chromatography [ J ]. *Acta Univ Med Tongji*(同济医科大学学报), 2000, 29(6): 540-541, 544.
- [4] PFEIFFER K, BERG W, BONGARTZ D, *et al.* The direct determination of urinary oxalate by non-suppressed ion chromatography [ J ]. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 1997, 35(4): 305-308.
- [5] HOLMES R P. Measurement of urinary oxalate and citrate by capillary electrophoresis and indirect ultraviolet absorbance [ J ]. *Clin Chem*, 1995, 41(9): 1297-1301.
- [6] JANUZORIC L J, PRTENJAK G. Quantitative chemical analysis of calcium oxalate and calcium oxalate phosphate urinary stones [ J ]. *Clin Chem*, 1990, 36: 1164.
- [7] MI H, DENG Y L. Epidemiology Study on Urolithiasis: Urolithiasis [ M ]. Beijing: People's Medicine Press(泌尿系结石), 2003: 31-55.
- [8] MA T X, SUN G. Modern Urology [ M ]. Tianjin: Tianjin Science and Technology Press. 2000: 587-588.
- [9] OUYANG J M. Chemical Basis in Inhibition of Urinary Stones by Citric Acid and Its Sals [ J ]. *J Inorg Chem*, 2004, 20(12): 1377-1382.
- [10] HE Y N, CHEN X M, XU G H, *et al.* A case-control study of risk factors for urolithiasis [ J ]. *Chongqing Med*(重庆医学), 2003, 32(6): 659-660.
- [11] SUN X Z, GUO H Q, YE Z Q. Causation of the Urolith [ J ]. *J Clin Urol*(临床泌尿外科杂志), 2003, 18(6): 321-326.
- [12] WANDZAILAK T R, WILLIAMS H E. The hyperoxaluria syndromes [ J ]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 1990, 19: 851-853.

收稿日期: 2005-06-24