DOI: 10.16016/j.1000-5404.1997.01.045

高效液相色谱法测定血和尿中的草酸

Determination of oxalate in plasma and urine by high-performance liquid chromatography

张惠静 张世德 任建敏 牟绍洪 (第三军医大学检验系分析化学教研室) 重庆, 630038

血和尿中草酸浓度的测定是临床检验工作中一个很重要的指标。草酸浓度的测定方法很多[1-4],但多数繁琐、费时,特别是血草酸的测定,由于其浓度较低,测定尤为困难[1]。近年来,高效液相色谱法(HPLC)作为一种高灵敏、高选择性的分析方法,在临床检验中的应用日益增多,解决了不少测定中的难题。本研究应用这种方法,以邻苯二胺为衍生剂,与血和尿中草酸反应,生成具有强紫外吸收化合物——2,3-二羟基喹喔啉,通过反相 C_{18}柱分离,进行血和尿中草酸的测定。方法简单,取得满意效果。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

美国 Beckman黄金系列高效液相色谱仪,配 167紫外检测器,PHS-10C数字酸度/离子计。

草酸、邻苯二胺(OPD)、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、醋酸铵,甲醇等试剂均为分析纯。

1.2 样品收集与处理

1.2.1 尿 收集 24 h尿,用浓 HCl酸化至 pH= 1.0左右,置于冰箱保存。

1.2.2 血 抽上肢静脉血 3 ml,肝素抗凝,立即以 2000 r/min于 4℃离心 10 min。取血浆 1 ml加入 1 ml乙腈和 50 μl磷酸盐缓冲液(pH= 7.0),混旋,2000 r/min离心 10 min,于 37℃用 N_2流将上层液中的乙腈蒸发掉。

1.3 衍生

取尿样 2 ml或血浆上清液 0.5 ml,于带盖离心试管中,加入 5 μl浓 HCl, 0.5 ml OPD标准液(10 g/L),旋紧盖子于 140℃加热 30 min,室温冷却,用 10 mol/L NaOH调节 pH至 5.0~6.0, 2000 r/min离心 10 min, 50 μl上清液即可进入色谱柱。

1.4 色谱条件

流动相:甲醇:0.1 mol/L醋酸铵水溶液= 15:85,流速: 1.2 ml/min,色谱柱: 4.6 mm× 15 cm ODS C_{18}柱,紫外检测波长: 314 nm。

2 结果

2.1 色谱分离图

分别对草酸标准液,正常人血浆和尿样进行色谱分离,结果见图 1、2、3。从图中可以看出:草酸的分离均能达到基线分离,且血和尿样中草酸的测定无明显杂质干扰。

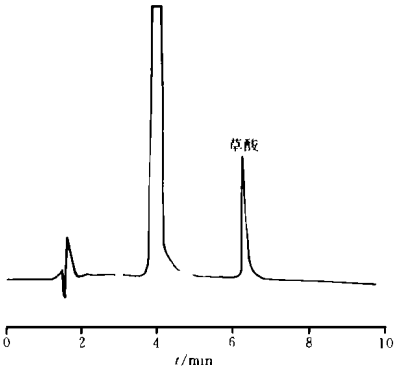


图 1 草酸标准液色谱图

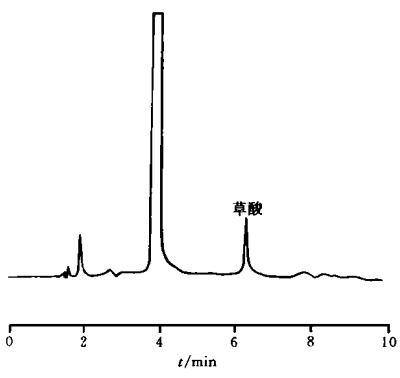


图 2 正常人血浆色谱图

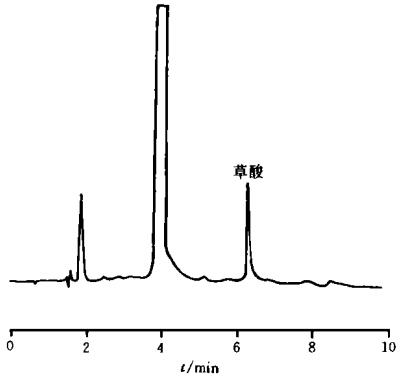


图 3 正常人尿样色谱图

2.2 工作曲线

尿 取同一份尿样,等分成 6小份,每小份 1.90 ml,分别加入草酸标准液(1.0 g/L)0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 ml,用双蒸水调至每份 2.00 ml。

血 取同一份血浆,等分成 6小份,每小份 0.80 ml,分别加入草酸标准液(100 mg/L)0、0.01、0.02、0.04、0.08、0.16 ml,用双蒸水调至每份 1.00 ml。

按样本处理,经衍生后进行色谱分析,以样品管峰高减空白管峰高之差值对浓度作回归方程计算。回归方程分别为:

尿 $Y = 18.7X + 3.2$ $r = 0.9989$

血 $Y = 3.9X + 5.2$ $r = 0.9990$

结果表明尿样在(10~76) mg/L,血在(1~10) mg/L范围内,峰高对浓度具有良好的线性关系。

2.3 精密度和回收率实验

按工作曲线方法操作,对血、尿样本进行重复性实验(n =

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

5),并经统计学处理,结果表明:无论是批内还是批间,测定重现性均较好,见表 1。血、尿样本中分别加入一定量的草酸标准物,并上柱检测,计算样本的平均回收率分别为 85.3%和 93.9%,见表 2。

表 1 血、尿精密度实验(n= 5)

	批内			批间		
	$\bar{x}$ (mg/L)	s (mg/L)	RSD (%)	$\bar{x}$ (mg/L)	s (mg/L)	RSD (%)
	1.21	0.08	6.3	1.19	0.10	8.4
血	2.56	0.15	5.8	2.48	0.19	7.7
	5.18	0.28	5.4	5.22	0.38	7.3
平均			5.8± 0.5			7.8± 0.6
	9.27	0.39	4.2	9.18	0.52	5.7
尿	28.14	1.10	3.9	28.17	1.52	5.4
	56.53	1.92	3.4	56.62	2.72	4.8
平均			3.8± 0.4			5.3± 0.5

表 2 血、尿回收率实验

血			尿		
加入量 (μg)	平均测得量 (μg)	回收率 (%)	加入量 (μg)	平均测得量 (μg)	回收率 (%)
2	1.67	83.5	20	18.48	92.4
4	3.41	85.2	60	56.16	93.6
8	6.97	87.3	100	95.70	95.7
平均		85.3	平均		93.9

2.4 最低检出浓度

在 2倍信噪比下,对于血浆的最低检出浓度为 200μg/L,尿的最低检出浓度为 550μg/L。

3 讨论

草酸是有机体内的代谢产物,正常人血样和尿样中均含有一定量的草酸,经色谱分离均会产生一定的草酸峰。为了定性判断草酸峰位置,我们采用了标准物添加法定性,观察峰高变化,从而断定草酸色谱峰的保留时间为 6.27 min,此峰高与浓度具有良好的线性关系。

为了达到最佳分离效果,通过反复筛选,选用了甲醇∶醋酸铵水溶液洗脱体系,草酸保留时间适中,分离效果可满足要求,适合临床检测。采用本方法对 10名健康人血、尿中草酸进行测定,其平均值分别为:(1.2± 0.4) mg/L和(27± 3)mg/L。测定方法简单快速,准确可靠,为研究某些疾病,尤其是泌尿系统疾患的病因,提供了一种有效的检测手段。

关键词 高效液相色谱法;草酸

中图法分类号 R446.1

参考文献

1 Jeremlah C, Douglas M L. Determination of oxalate concentration in blood. Clin Chem, 1988; 34(8): 1540

2 沈 敏,袁倚盛,张 训.高效液相色谱——修辞电极法测定血和尿中草酸.中华医学检验杂志, 1989; 12(2): 73

3 Hagen L, Walker V R, Sutton R A L. Plasma and Urinary oxalate and glycolate in healthy subjects. Clin Chem, 1993; 39(1): 134

4 Michele P, Eugenio C, Martino M *et al*. Ion-chromatographic determination of plasma oxalate reexamined. Clin Chem, 1993; 39(3): 537

(收稿: 1996-04-08;修回: 1997-01-15)

(编辑 汪勤俭)

戴镜法治疗弱视初探

Preliminary study of treating amblyopia with glasses

陈 莉 王 一 (第三军医大学附属西南医院眼科)重庆, 630038

随着医学的发展和社会的进步,儿童弱视防治日益引起眼科界和家长重视。为寻求简便可靠的治疗方法,我们对单纯戴镜治疗屈光不正所致弱视进行了疗效观察,报道如下。

1 资料与方法

对象:屈光不正患儿 126例,经戴矫正眼镜一月后,而矫正视力仍低于 0.9者。年龄 4~ 11岁,男 72例,女 54例。双眼 120例,单眼 6例。

方法:1%阿托品眼膏涂眼,3次/d, 3 d后行视网膜检影法验光。屈光不正者均予配镜矫正,戴眼镜半年或一年后重新验光配镜。

弱视定义、程度、分类及疗效评价,按中华医学会眼科学会全国儿童弱视斜视防治学组所定标准[1]。屈光程度:轻度± 3D以下,中度± (3~ 6) D,高度± 6D以上。复性散光度数以球镜与柱镜之和为屈光度,混合散光度数以负柱镜度计算。

2 结果

2.1 屈光状态分布

近视 30眼(12.2%),远视 210眼(85.4%,其中复性远视散光 180眼占远视的 85.7%),混合散光 6眼(2.4%)。

2.2 屈光程度分布

高度 60眼(24.4%),中度 108眼(43.9%),轻度 78眼(31.7%)。近视高中轻分别占 20%、40%、40%;远视则分别占 25.7%、42.9%、31.4%。混合散光 6眼均为中度。

2.3 弱视类型

屈光不正性 168眼(68.3%),屈光参差性 78眼(31.7%)。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net