

Bestimmung von Citrat und Oxalat in Urin mit IC

S.Marten, J.Harms, Wissenschaftliche Gerätebau Dr. Ing. H.Knauer GmbH

Einleitung:

In den letzten Jahren hat die Ionenchromatographie (IC) eine große Akzeptanz erreicht. Eine der wichtigsten Anwendungen der IC im klinischen Bereich ist die Analyse anorganischer und organischer Ionen in physiologischen Flüssigkeiten, wie Urin, Plasma und Serum. Durchschnittlich 3 g werden täglich an verschiedenen Säuren wie Oxalsäure, Citronensäure und freien Aminosäuren mit dem Urin ausgeschieden. Angeborene Stoffwechselerkrankungen wie die primäre Hyperoxalurie und entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn gehen mit einer Erhöhung der Oxalatkonzentration im Urin einher und begünstigen so die Entstehung von kalziumhaltigen Steinen. Ein Anstieg der Oxalatkonzentration im Urin kann ein Indiz für kommende Harnsteinbildung sein. Citronensäure dagegen gilt als wichtiger Hemmstoff der Kalziumoxalat- und Kalziumphosphat-kristallbildung. So werden Alkalicitrate heute sehr effektiv in der Therapie eingesetzt. Der Hauptwirkungsmechanismus bei der Behandlung von Harnsteinen ist die Erhöhung des Harn-pH-

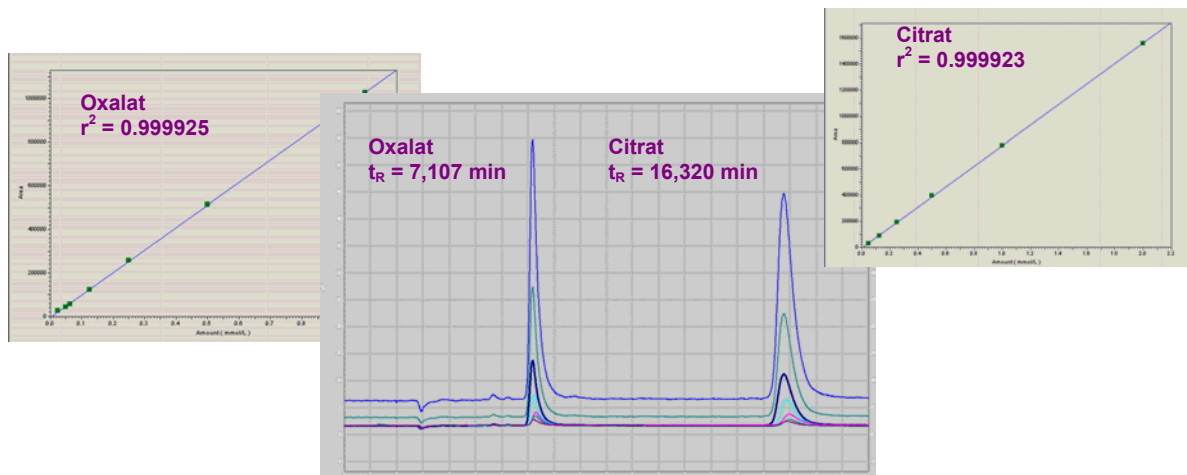
Wertes und der damit verbundenen Steigerung der renalen Citratausscheidung. Die Citronensäure im Harn resultiert sowohl aus der Bildung im Körper als auch aus der Zufuhr bestimmter Nahrungsmittel. Ein hoher Konsum von tierischem Eiweiß bzw. Kaliummangel führen zur Abnahme der Citratausscheidung. Bei 50 % der Kalziumoxalat-Steinpatienten ist eine verringerte Citratausscheidung (< 2,5 mmol in 24 h) nachweisbar. Um die Entstehung, der überwiegend aus Kalziumoxalat bestehenden Harnsteine zu verstehen und eine Behandlung zu überwachen, ist eine spezifische und empfindliche Methode zur Citrat- und Oxalatbestimmung nötig. Mit dem Smartline IC-System von Knauer kann eine unkomplizierte und schnelle Analyse von Oxalat und Citrat in Gegenwart von Sulfationen mit Hilfe einer Anionenaustauschersäule durchgeführt werden. Das IC-System besteht aus der Smartline Pumpe 1000, dem Leitfähigkeitsdetektor 650 mit Suppressor, dem Autosampler 3900, dem Manager 5000 mit Degassereinheit und Interface sowie dem Säulenofen 4000.

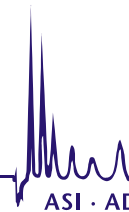
Methodenparameter:

Säule:	Novosep A2, 250 x 4 mm
Eluent:	isokratisch, 15 mmol Na ₂ CO ₃
Flussrate:	1 ml/min
Temperatur:	Säule: 50 °C / Detektorzelle: 45 °C
Injektionsvolumen:	5 µl
Detektion:	Leitfähigkeit mit Suppression

Die Kalibrierlösungen für Citrat und Oxalat wurden im Konzentrationsbereich zwischen 0,025 mmol/L und 2 mmol/L angesetzt. Die Standardlösungen für diesen Kalibrierbereich sind täglich neu herzustellen, da die Haltbarkeit der Lösungen begrenzt ist. Die Stammlösungen sind über mehrere Tage stabil und einmal wöchentlich zu erneuern. Um für den gesamten Konzentrationsbereich auswertbare Messergebnisse zu erhalten, wurde ein Empfindlichkeitsbereich von 5 µS ausgewählt. Dazu

wurden die Proben mit destilliertem Wasser im Verhältnis von 1:20 verdünnt und anschließend mit einem 0,45 µ-Filter filtriert. Das Injektionsvolumen betrug bei Standard- und Probenlösungen jeweils 5 µl. Da die Stabilität der Probelösungen begrenzt ist, sollte die Messung innerhalb von 24 h nach der Probenaufarbeitung abgeschlossen sein. Um irreversible Ablagerungen aus den Urinproben auf der Anionenaustauschersäule zu vermeiden, ist die Verwendung von einer Vorsäule unerlässlich.





Ergebnisse:

Die Analytik von Oxalat und Citrat mittels Ionenchromatographie kann sehr genau und reproduzierbar durchgeführt werden. Durch die Wahl der Pufferkonzentration (Einstellung auf 15 mmol Na₂CO₃) des Eluenten kann die Retention der beiden Säureanionen deutlich beschleunigt werden, ohne eine Überlagerung des Oxalatpeaks mit dem im Urin im Überschuss vorhandenen Sulfatpeak zu erhalten. Soll eine simultane Bestimmung der anorganischen Anionen durchgeführt werden, so ist dies durch die Erniedrigung der Pufferkonzentration möglich. Allerdings erhöht sich dadurch deutlich die Retentionszeit für die beiden organischen Säureanionen. Die durchschnittliche Konzentration von Oxalat im Urin liegt zwischen 0,05 und 0,3 mmol/L. Ein höherer Gehalt deutet eine mögliche Harsteinbildung an. Die maximale Sulfatkonzentration, welche noch ohne Probleme injiziert werden kann, liegt bei 300 mg/L. Geht man von einer durchschnittlichen Sulfatkonzentration im Urin von 1700 bis 2700 mg/L aus, so ist eine Verdünnung im Bereich zwischen 10 bis 20 praktikabel. Zusätzlich kann während der Probenvorbereitung eine Sulfatfällung unter Zugabe von BaCl₂ durchgeführt werden. Der sich bildende schwerlösliche BaSO₄-Niederschlag lässt sich leicht abzentrifugieren. Allerdings kann eine Chlorid-Bestimmung mit dieser Lösung nicht mehr durchgeführt werden. Bei Störungen des Oxalatpeaks durch hohe Sulfatkonzentrationen stellt diese Art der Probenvorbereitung eine praktikable Alternative dar. Das Detektionslimit liegt für Oxalat unter den gegebenen Bedingungen bei 0,006 mmol/L, für Citrat bei 0,03 mmol/L. Legt man die 1:20 Verdünnung zugrunde, ergibt sich eine Detektionsgrenze für Oxalat von 0,125 mmol/L und für Citrat von 0,6 mmol/L im Urin. Da ein Injektionsvolumen von 5 µl ausgewählt wurde, gibt es noch Spielraum für die Erhöhung der Empfindlichkeit. Die aus den gemessenen Standardlösungen erhaltenen Kalibrierkurven zeigen über den gesamten Bereich eine sehr gute Linearität ($r^2_{\text{Oxalat}} = 0,999925 / r^2_{\text{Citrat}} = 0,999923$). Die Probanden, die den Urin spendeten unterlagen keiner Krankheit, so dass bei den untersuchten Urinproben keine erhöhten Oxalatwerte zu erwarten waren. Dies wurde durch die Analyse bestätigt. Der Konzentrationsbereich für Oxalat schwankte zwischen 0,1 mmol/L und 0,4 mmol/L. Der Citratgehalt lag erwartungsgemäß deutlich höher. Es konnten Werte im Bereich von 0,9 mmol/L bis 3,6 mmol/L ermittelt werden. Die Reproduzierbarkeit

dieser Methode wurde durch 5 Wiederholungsinjektionen überprüft. Dabei wurde eine relative Standardabweichung von 2,8 % ermittelt.

