

## Determinación de ácido oxálico en plasma por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia\*

E. Jerez

Fundación Jiménez Díaz  
Unidad Metabólica  
Avda. Reyes Católicos, 2  
28040 Madrid

(Recibido el 6 de noviembre de 1985)

E. JEREZ. *Determination of Plasma Oxalate by Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography*. Rev. esp. Fisiol., 42 (4), 441-448, 1986.

A new specific and sensitive method for determination of oxalic acid in plasma by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) is described. The plasma sample is deproteinized by ultrafiltration. The oxalic acid in the ultrafiltrate is purified by precipitation with  $\text{CaCl}_2$ , new dilution of calcium oxalate precipitate, oxalic acid extraction with diethyl-ether and total dryness of the sample. The losses of oxalic acid during this process are evaluated by the addition of oxalic acid ( $\text{U-}^{14}\text{C}$ ) before the precipitation step. The dried samples are redissolved in mobile phase ( $\text{o-H}_3\text{PO}_4$ , 0.05 M) and injected into a HPLC chromatograph, with reversed phase column (Lichrosorb RP-8, Merck). Oxalate peak is detected spectrophotometrically at 220 nm with a retention time of 3.20 minutes. The method shows a mean recovery value of 82.11, with an intra-run and between-run CV values of 2.54 and 6.95 respectively. The oxalic acid measured in plasma by this method is  $291 \pm 89 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$  plasma ultrafiltrate, in 16 normal subjects.

**Key words:** Oxalate, High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

La determinación de ácido oxálico en plasma constituye una prueba clínica de gran ayuda para establecer la etiología de la hiperoxaluria, ya que los niveles se encuentran aumentados en las hiperoxalurias de origen endógeno.

La dificultad de la determinación de los niveles de ácido oxálico en plasma radica en disponer de una técnica suficientemente sensible y específica, para determinar con fiabilidad los bajos niveles presentes, generalmente, en la sangre. Los métodos hasta ahora publicados presentan una gran discrepancia en los valores de oxalemia, los cuales varían desde 3-5  $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$  plasma, determinados por dilución isotópica (18), a 558-2.340  $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$

\* Trabajo subvencionado con una ayuda económica de la «Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica» (n.º 1021/81) del Ministerio de Educación y Ciencia. (España).

plasma determinados por cromatografía de gases (7).

El objeto de este trabajo es la adaptación de un método desarrollado recientemente (12) de determinación de ácido oxálico en orina por Cromatografía Líquida de Alta Eficacia (HPLC), que debido a su alta sensibilidad ha sido adaptado a las determinaciones en plasma.

### Material y Métodos

**Aparatos.** Sistema de cromatografía líquida de alta presión Waters, equipado con bomba M-45, inyector universal U6K, detector espectrofotométrico Lambda Max 480, registrador integrador Data Module y columna cromatográfica Lichrosorb RP-8, 10  $\mu\text{m}$ , 250  $\times$  4 mm (Merck).

**Reactivos.** El ácido oxálico U-C<sup>14</sup> (88 mCi/mmol) procede de Amersham. El resto de los reactivos utilizados son de grado analítico (Merck). El líquido de centelleo empleado es el Normascit Cocktail 22 (Scharlau).

**Recta estándar.** Se prepara una disolución de 50 mg/l de ácido oxálico en *o*-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M, la cual se conserva una semana a 4°C. A partir de ella, diariamente, se preparan disoluciones estándar de concentraciones de 25, 12,5, 6,25, 3,12 y 1,56 mg/l en *o*-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M.

**Fase móvil.** Se prepara una disolución de *o*-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 0,05 M en agua obtenida a partir de un sistema de purificación Milli-Q (Millipore). Esta fase móvil se conserva a temperatura ambiente durante 2 semanas. Antes de ser utilizada en el sistema de HPLC, se filtra a través de filtros HA 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore) y se sonica durante 10 min (Ultrasons mod. 513, P-Sellecta).

**Selección de muestras.** Se determinan los niveles plasmáticos de ácido oxálico en

16 sujetos normales, de ambos sexos, que presentan unos niveles de ácido oxálico en orina inferiores a 40 mg/24 horas. No se estableció ningún régimen dietético especial anterior a la toma de las muestras.

**Método experimental.** A los individuos en ayunas se les extraen 10 ml de sangre con aguja heparinizada que inmediatamente se centrifuga a 3.000 r.p.m. durante 15 min, para separar el plasma y prevenir la posible síntesis *in vitro* de ácido oxálico (1). El plasma obtenido es sometido a ultrafiltración en conos Centriflo CF 25 (Amicon), a 3.000 r.p.m. durante 30 min, a temperatura ambiente. Una alícuota de 2,5 ml de plasma desproteinizado se recoge en tubos cónicos de cristal de 50 ml de capacidad con tapón esmerilado. A continuación se adicionan 50  $\mu\text{l}$  (50 nCi) de una disolución de ácido oxálico U-C<sup>14</sup> (1  $\mu\text{Ci/ml}$ ), 0,5 ml de una disolución de CaCl<sub>2</sub> 2 % (p/v) y etanol absoluto en una proporción del 75 % del volumen total. El contenido del tubo se agita suavemente y se deja reposar a 4°C durante 8 horas. Transcurrido este tiempo, los tubos se centrifugan a 3.000 r.p.m. durante 5 min, y el precipitado se disuelve en 1 ml de HCl 0,3 M. A cada tubo se adicionan 10 ml de éter etílico previamente destilado y saturado con HCl 0,3 M, y se agitan durante 3 min. La fase orgánica que contiene el ácido oxálico se pasa a matraces en forma de corazón de 25 ml de capacidad, llevándola posteriormente a sequedad en atmósfera de nitrógeno. La fase acuosa restante se vuelve a extraer con éter 3 veces más, de modo similar. Una vez que la muestra se encuentra perfectamente seca, se redisuelve en 1 ml de fase móvil y se filtra a través de filtros Millex-HV4, 0,45  $\mu\text{m}$  (Millipore). Una alícuota de 50  $\mu\text{l}$  de esta muestra se inyecta en el cromatógrafo de alta presión a un flujo de 0,8 ml/min (500 psi), a temperatura ambiente. La absorbancia del oxalato se determina a 220 nm, con una sensibilidad del detector de 0,10 AUFS, y a una velocidad de registro gráfico de 0,5 cm/min.

Para obtener el blanco del proceso, 2,5 ml de agua destilada se someten por duplicado al mismo tratamiento aplicado al plasma desproteinizado.

La cuantificación del pico del ácido oxálico y el porcentaje de ácido oxálico perdido durante la preparación de las muestras se realiza según se ha descrito previamente (12).

**Cálculo de los resultados.** El valor del ácido oxálico presente en las muestras de plasma se calcula mediante la siguiente expresión:

$$\frac{\mu\text{g ácido oxálico}}{100 \text{ ml plasma ultrafiltrado}} = n \times 1/v \times 1/p \times 10^4,$$

en donde: N = ácido oxálico determinado en la muestra a partir de la recta de calibrado (mg/ml); v = volumen de plasma ultrafiltrado utilizado en el análisis (ml); p = porcentaje de ácido oxálico U-C<sup>14</sup>recuperado al final del proceso de preparación de la muestra; y, 10<sup>4</sup> = factor de conversión de las unidades.

**Resultados**

La figura 1 muestra el perfil cromatográfico obtenido por HPLC de una muestra de plasma procesada de la forma anteriormente descrita. El ácido oxálico eluye a los 3,20 min, siendo el tiempo de análisis de 15 min.

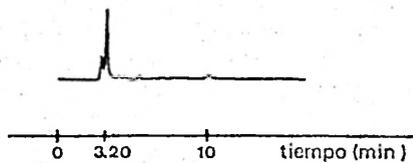


Fig. 1. Cromatograma obtenido por HPLC de una muestra de plasma normal. El pico del ácido oxálico eluye a un t<sub>R</sub> = 3,2 min.

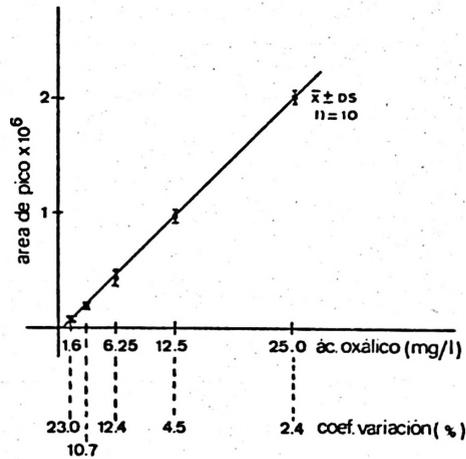


Fig. 2. Recta de calibrado de las disoluciones estándar de ácido oxálico ( $y = 83838x - 57092$ ,  $r = 0,9998$ ).

El valor de las áreas de los picos correspondientes a la inyección de 50 µl de cada una de las disoluciones estándar en el sistema de HPLC, y el coeficiente de variación de la medida en cada punto de la recta muestran una relación lineal en el intervalo de concentraciones medido (fig. 2). La variación que experimenta el área del pico del ácido oxálico con el volumen de muestra inyectado en el sistema de HPLC, es proporcional en el intervalo comprendido entre los 10 y 75 µl de la muestra (fig. 3).

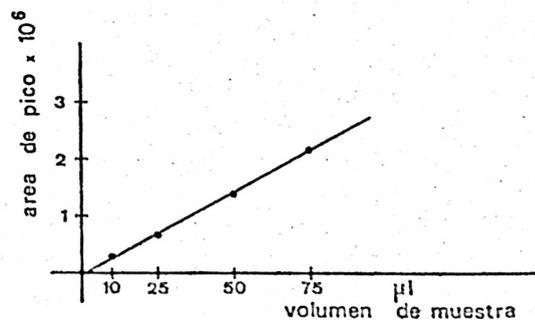


Fig. 3. Variación del pico del ácido oxálico con el volumen de muestra inyectado al sistema de HPLC.

Tabla I. Porcentajes de recuperación del método.

Acido oxálico ( $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$ )				
Inicial	Añadido		Encontrado	% recuperado
	teórico	real*		
362	1.125	1.013	1.170	79,76
362	2.250	1.937	1.998	84,46
				Media = 82,11

\* El valor real de la disolución de ácido oxálico añadida a la muestra, es el correspondiente al obtenido a partir de la recta de calibrado, al someter dicha disolución al mismo tratamiento que las muestras.

El estudio de la recuperación del método se ha realizado preparando un *pool* de plasma al que se han adicionado concentraciones conocidas de ácido oxálico (tabla I). La variabilidad intraanálisis del método se ha medido inyectando sucesivamente alícuotas diferentes de las mismas muestras. La variabilidad interanálisis se

ha medido inyectando una misma muestra en días consecutivos (tabla II).

Dada la escasa disponibilidad de volumen de plasma para procesar muestras por duplicado, se ha formado una muestra *pool* de plasmas en la que se ha analizado por triplicado el nivel de ácido oxálico. El valor medio medido en las 3 muestras, una vez corregidas las pérdidas durante el proceso de precipitación y extracción, ha sido de  $448 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$  plasma ultrafiltrado (DS = 54, CV = 12,05 %).

Tabla II. Variabilidad intra- e inter-análisis del método.

Acido oxálico*	n	C.V. (%)
<i>Variación intra-análisis</i>		
243 $\pm$ 13	3	5,35
363 $\pm$ 4	3	1,10
420 $\pm$ 5	3	1,19
		Media = 2,54
<i>Variación inter-análisis</i>		
152 $\pm$ 5	5	3,29
440 $\pm$ 33	3	7,50
375 $\pm$ 41	2	10,93
229 $\pm$ 14	2	6,11
		Media = 6,95

\*  $\mu\text{g}/100 \text{ ml}$  plasma ultrafiltrado (media  $\pm$  DS).

*Niveles de ácido oxálico en plasma.* Se han medido los niveles de ácido oxálico en plasma de 16 sujetos normales de ambos sexos. El valor medio de ácido oxálico hallado ha sido de  $291 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$  de plasma ultrafiltrado (DS = 89, intervalo = 158-450). La recuperación media del ácido oxálico- $\text{U-C}^{14}$  obtenida después del proceso de purificación y extracción de la muestra antes de someterla a HPLC, ha sido del 65 %.

## Discusión

El presente método de determinación de ácido oxálico en plasma por HPLC es sensible y específico, con unos parámetros de precisión, reproducibilidad y recuperación adecuados.

Tabla III. Valores normales medios de oxalemia medidos por técnicas diferentes. (Unidad = µg ácido oxálico/100 ml plasma).

Autores	Año	Intervalo	Media	n	Método
Williams y Smith (18)	1968	3-5			dilución isotópica
Williams <i>et al.</i> (17)	1971		16,5		dilución isotópica
Hodgkinson y Wilkinson (11)	1974	11,8-14,3		3	dilución isotópica
Constable <i>et al.</i> (5)	1979	7,4-18,9	11,7	8	dilución isotópica
Zaremski y Hodgkinson (20)	1965	135-280		15	reducción a ác. glioxílico
Dagneaux <i>et al.</i> (8)	1976	117-250	180	20	reducción a ác. glicólico
Bennett <i>et al.</i> (2)	1979	46-141	96	6	radioenzimático
Cole <i>et al.</i> (4)	1981	29-77 (V)*	53	18	radioenzimático
		15-83 (H)	49	118	radioenzimático
Hatch <i>et al.</i> (10)	1977	73-199 (V)	131	26	oxalato decarboxilasa
		136-464 (H)	262	16	-formato -dgh
Sugiura <i>et al.</i> (16)	1980	60-410		50	oxalato oxidasa
Samsoondar <i>et al.</i> (15)	1983	980-1.940	1.430	15	oxalato oxidasa
Boer <i>et al.</i> (3)	1984	11-57	30	24	oxalato oxidasa
Chambers y Russell (7)	1973	558-2.340	1.449	20	cromatografía de gases
Nuret y Offner (14)	1978	104-184	144	20	cromatografía de gases
Gelot <i>et al.</i> (9)	1980	81-369	180	40	cromatografía de gases
Wolthers y Hayer (19)	1982	11-47	25	22	cromatografía de gases
Presente estudio	1985	158-450	291	16	HPLC

\* Intervalo calculado a partir de la media ± DS. (V) Varones. (H) Hembras.

Se ha realizado una revisión de 16 trabajos (2-5, 7-11, 14-20) publicados sobre las técnicas de determinación de ácido oxálico en plasma (tabla III), comparando los valores que proporcionan los métodos de dilución isotópica *in vivo* (5, 11, 17, 18), químicos (8, 20), radioenzimáticos (2, 4), enzimáticos (3, 10, 15, 16) y de cromatografía de gases (7, 9, 14, 19). No se ha encontrado en la literatura revisada ningún método de HPLC aplicado a la determinación de ácido oxálico en plasma. Se observa una gran variabilidad entre los valores medios proporcionados por los distintos métodos, que se extiende incluso a métodos que presentan el mismo fundamento, como en el caso del método de la oxalato oxidasa de BOER *et al.* (3) y el de SAMSOONDAR *et al.* (15), o en el de los métodos de cromatografía de gases de WHOLTHERS y HAYER (19) y el de CHAMBERS y RUSSELL (7). Hay que puntualizar que los

resultados del presente trabajo van referidos a volumen de plasma ultrafiltrado por lo que la comparación del valor medio de oxalemia determinado con el correspondiente a otros métodos, no se puede hacer en valor absoluto. El proceso de ultrafiltración lleva consigo un cambio en la concentración relativa del metabolito en estudio en el plasma ultrafiltrado respecto al plasma total, debido a la eliminación de las proteínas que quedan retenidas en el filtro, junto a un pequeño volumen de plasma residual.

Se ha descrito que la sangre, una vez extraída, genera espontáneamente ácido oxálico (1), por lo que es necesario mezclarla en el momento de su extracción con una disolución de inhibidores de la síntesis endógena de oxalato. Trabajos posteriores (3, 19) muestran que la utilización de inhibidores es cuestionable, ya que determinan niveles idénticos de oxalato en muestras

mantenidas a temperatura ambiente durante períodos de tiempo de hasta 4 horas. En el presente trabajo las muestras de sangre utilizadas fueron centrifugadas inmediatamente después de su extracción, y el plasma ultrafiltrado a continuación, para prevenir la posible síntesis *in vitro* de ácido oxálico.

En resumen, haciendo una valoración conjunta de los métodos utilizados en la determinación de ácido oxálico en plasma, se deduce que ninguno de ellos puede ser considerado como superior a los otros, existiendo varios factores causantes de la gran discrepancia entre las cifras de oxalemia que proporcionan: el tiempo transcurrido con anterioridad al análisis, la forma de almacenamiento de las muestras (13), el calentamiento o ebullición de las muestras durante su preparación, lo cual favorece la conversión de las sustancias oxalogénicas (2), y la posible existencia de ácido ascórbico en la sangre del paciente, ya que esta vitamina es interferente en el método de la oxalato oxidasa (6), y es posible que actúe como uno de los principales precursores del ácido oxálico durante el almacenamiento de las muestras (13).

La técnica de determinación de ácido oxálico en plasma que se describe presenta la ventaja de que parte de volúmenes de sangre (10 ml) inferiores a los utilizados en otras técnicas, debido a que la desproteínización de los plasmas tiene lugar a través de un proceso de ultrafiltración en el que teóricamente quedan retenidas el 97 % de las proteínas plasmáticas. Por otra parte, el método permite procesar de forma paralela, y en el mismo análisis, muestras de orina y plasma de pacientes hiperoxalúricos, facilitando el cálculo de los índices de aclaramiento, y contribuyendo al rápido diagnóstico del tipo de hiperoxaluria que presentan.

### Resumen

Se describe un nuevo método sensible y específico para la determinación de ácido oxálico en plasma por

cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC). La muestra se desproteíniza por ultrafiltración a través de membranas Centriflo CF 25. El ácido oxálico presente en el plasma ultrafiltrado se precipita con  $\text{CaCl}_2$ , se redisuelve en  $\text{HCl}$  0,3 M, se extrae con éter y se lleva a sequedad. Las pérdidas de oxalato producidas durante este proceso se evalúan mediante la adición de ácido oxálico- $\text{U-C}^{14}$ , a las muestras, al comienzo del mismo. La muestra desecada se resuspende en fase móvil ( $\text{o-H}_3\text{PO}_4$ , 0,05 M) y se inyecta en un cromatógrafo de alta presión, con columna de fase reversa de Lichrosorb RP8. El pico del ácido oxálico se detecta a 220 nm y eluye a un tiempo de retención de 3,20 min. La recuperación del método es de 82,11 % con unos coeficientes de variación intra e interanálisis de 2,54 y 6,95 % respectivamente. Los valores medios de ácido oxálico obtenidos son  $291 \pm 89 \mu\text{g}/100 \text{ ml}$  plasma ultrafiltrado, en 16 sujetos normales.

### Bibliografía

1. Ackay, T. y Rose, A.: *Clin. Chim. Acta*, **101**, 305-311, 1980.
2. Bennett, D. J., Cole, F. E., Frohlich, E. D. y Erwin, D. T.: *Clin. Chem.*, **25**, 1810-1813, 1979.
3. Boer, P., Van Leersum, L. y Endeman, H. J.: *Clin. Chim. Acta*, **137**, 53-60, 1984.
4. Cole, F. E., Snyder, S. y Bennett, K. M.: En «Urolithiasis: Clinical and Basis Research» (Smith, L. H., Robertson, W. G. y Finlayson, B., eds.). Plenum Press, Nueva York, 1981, pp. 767-773.
5. Constable, A. R., Joekes, A. M., Kasidas, G. P., O'Regan, P. y Rose, G. A.: *Clin. Sci.*, **56**, 299-304, 1979.
6. Crider, Q. E.: *Clin. Biochem.*, **17**, 351-355, 1984.
7. Chambers, N. M. y Russell, J. C.: *Clin. Biochem.*, **6**, 22-28, 1973.
8. Dagneaux, P. G. L. C. K., Elhorst, J. T. K. y Olthuis, F. M. F. G.: *Clin. Chim. Acta*, **71**, 319-325, 1976.
9. Gelot, M. A., Lavoue, G., Belleville, F. y Nabet, P.: *Clin. Chim. Acta*, **106**, 279-285, 1980.
10. Hatch, M., Bourke, E. y Costello, J.: *Clin. Chem.*, **23**, 76-78, 1977.
11. Hodgkinson, A. y Wilkinson, R.: *Clin. Sci. Mol. Med.*, **46**, 61-73, 1974.
12. Jerez, E., De la Piedra, C. y Traba, M. L.: *Rev. esp. Fisiol.*, **42**, 37-44, 1986.
13. Maguire, M., Fituri, N., Keogh, B. y Costello, J.: En «Urolithiasis: Clinical and Basis Re-

- search» (Smith, L. H., Robertson, W. G. y Finlayson, B., eds.). Plenum Press, Nueva York, 1981, pp. 963-967.
14. Nuret, P. y Offner, M.: *Clin. Chim. Acta*, **82**, 9-12, 1978.
  15. Samsouandar, J., Moore, R. W. y Kellen, J. A.: *Enzyme*, **30**, 273-276, 1983.
  16. Sugiura, M., Yamamura, H., Hirano, K., Ito, Y., Sasaki, M., Morikawa, M., Inoue, M. y Tsu-  
boi, M.: *Clin. Chim. Acta*, **105**, 393-399, 1980.
  17. Williams, H. E., Johnson, G. A. y Smith, Jr., L. H.: *Clin. Sci.*, **41**, 213-218, 1971.
  18. Williams, H. E. y Smith, L. H.: *Amer. J. Med.*, **45**, 715-735, 1968.
  19. Wolthers, B. G. y Hayer, M.: *Clin. Chim. Acta*, **120**, 87-102, 1982.
  20. Zaremski, P. M. y Hodgkinson, A.: *Biochem. J.*, **96**, 717-721, 1965.

