

Ossaluria: tecnica di determinazione dell'acido ossalico con la cromatografia a scambio ionico

P. Rossi, L. Traversari

UO Nefrologia e Dialisi, USL 30, Siena

Il soggetto normale elimina giornalmente con le urine modeste quantità di ossalati; la quantità totale è data dalla somma della quota assorbita a livello intestinale con gli alimenti più quella derivata dal metabolismo dell'acido ascorbico e del gliossilato.

Si possono quindi distinguere due tipi di iperossaluria:

1) iperossaluria da aumentato assorbimento intestinale;

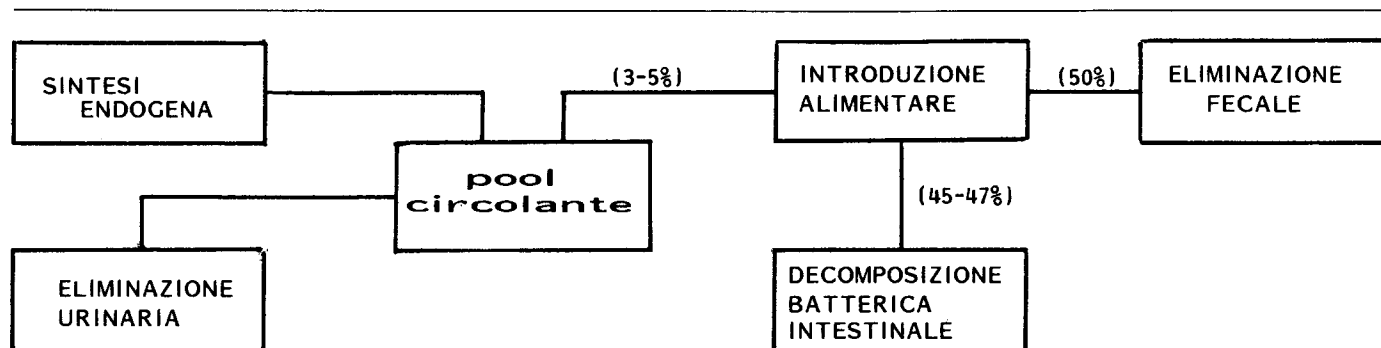
2) iperossaluria da aumentata produzione metabolica.

Gli ossalati di origine dietetica si trovano in numerosi alimenti di origine vegetale: radici, barbabietole, prezzemolo, rabarbaro, the, noci, fichi secchi, spinaci, ecc (1); normalmente l'iperossaluria puramente alimentare è abbastanza rara, più spesso è legata a patologie intestinali, che ne aumentano l'assorbimento (16):

- malattia di Crohn
- resezione ileale
- by-pass digiuno-ileale
- malattia celiaca
- malassorbimento dei grassi
- ingestione di fosfato di cellulosa.

In condizioni normali (Tab. I) l'intestino assorbe il 3-5% del totale degli ossali presenti negli alimenti, la restante quota viene rapidamente legata al calcio costituendo un complesso non assorbibile e facil-

TAB. I - METABOLISMO DELL'ACIDO OSSALICO



mente eliminabile con le feci. Le iperossalurie legate ad una iperproduzione metabolica rappresentano il capitolo più importante di questa patologia: gli ossalati costituiscono il prodotto terminale dell'ossidazione dell'acido ascorbico e del gliossilato. Gli ossalati non potendo essere ulteriormente metabolizzati dall'organismo vengono eliminati solo per via urinaria (1,2). L'ossidazione dell'acido ascorbico contribuisce in media al 35% della produzione degli ossalati ed anche un carico orale di acido ascorbico non produce valori molto superiori a questa percentuale. Più importante sembra, invece, essere l'alterazione legata al metabolismo dell'acido gliossilico: questa sostanza necessita di tre enzimi come catalizzatori, la glicolato-ossidasi, la xantino-ossidasi e la lattico-deidrogenasi che provocano la formazione di glicina in presenza di piridossina (17,18).

Le iperossalurie da aumentata produzione metabolica comprendono:

- Iperossaluria ereditaria di tipo I;
- Iperossaluria ereditaria di tipo II;
- Iperossaluria da deficit di piridossina o vitamina B6;
- Iperossaluria da ingestione di glicole etilico;
- Iperossaluria da eccesso di metossiflurano (anestetico).

L'iperossaluria di tipo I è legata ad un deficit di gliossilato carboligasi, mentre in quella di tipo II, riscontrata in un unico nucleo familiare, si ha un'accelerata conversione dell'idrossipiruvato ad acido L-glicerico.

In queste forme, ereditate come carattere autosomico recessivo, l'escrezione di ossalati può giungere sino a 400 mg/24h e si associa ad escrezione di gliossilato nel tipo I e di acido L-glicerico nel tipo II (3-5). La forma congenita si manifesta nei primi anni di vita (2-10 anni) ed

è caratterizzata da un'elevata eliminazione di ossalato di calcio con le urine, formazione di calcoli e deposito di ossalato di calcio a livello renale (nefrocalcinosi) ed in vari tessuti (ossalosi) (2).

Le altre tre forme sono di minore importanza ed in particolare non è ancora chiara la vera entità del deficit di piridossina, descritto solo come quadro sperimentale.

In tutte le forme si può giungere ad un'insufficienza renale cronica che comporta un aumento dell'acido ossalico sierico a seguito della diminuita escrezione degli ossalati urinari.

Nel soggetto normale l'eliminazione degli ossalati presenta valori compresi fra i 20 e i 50 mg (mediamente 40 mg) e, secondo altri, 15 mg; tali diversità sono connesse alle varie metodiche utilizzate e testimoniano la difficoltà di individuare un sistema universalmente valido per la valutazione dell'ossaluria (18).

Metodi di determinazione degli ossalati nelle urine

I metodi usati per la determinazione degli ossalati nelle urine possono essere divisi in cinque gruppi principali (Tab. II).

Nel primo gruppo sono compresi metodi che si basano sulla *precipitazione diretta* dello ione ossalato in forma di ossalato di calcio: questo sale precipita in ambiente acido (pH 5-5.2) e, dopo alcuni lavaggi, viene titolato direttamente con per-

manganato di potassio oppure indirettamente con una titolazione iodometrica. In una comune soluzione acquosa non ci sono problemi di dosaggio anche per piccole quantità di ossalati; nelle urine, viceversa, una buona lettura del precipitato è resa difficile dalla presenza di sostanze interferenti quali il magnesio ed i fosfati che influenzano negativamente la reazione o dal citrato che reagisce con il permanganato (6); nel corso degli anni sono state proposte alcune varianti al metodo originale, fra cui l'ultima utilizza un enzima specifico per l'ossalato cioè l'ossalato decarbossilasi, ma molti dei problemi iniziali sono rimasti irrisolti (7).

Il secondo gruppo comprende i metodi di *estrazione* generalmente con etere esente da perossidi; tali tecniche eliminano in parte i problemi delle interferenze, ma le condizioni per un'estrazione quantitativa sono estremamente critiche ed inoltre le operazioni analitiche sono molto complesse (8).

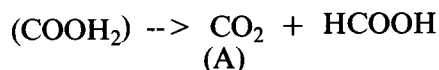
Le **TECNICHE CON RADIOISOTOPI** ed in particolare con C14 sono utilizzate quali controllo di altre metodiche in quanto consentono lo studio di tutti i parametri analitici (pH, tempo di precipitazione, temperatura ecc.); le particolari precauzioni per l'utilizzo del marcatore radioattivo e l'elevata complessità del procedimento rendono tale metodo estremamente indaginoso per la sua utilizzazione routinaria, per cui attualmente rappresenta solo un test di qualità

TAB. II - METODI PER LA DETERMINAZIONE DELL'OSSALURIA

Metodi che utilizzano la precipitazione diretta
Metodi che utilizzano l'estrazione con solvente
Tecniche radioisotopiche
Tecniche enzimatiche
Tecniche cromatografiche

per altre metodiche.

I METODI ENZIMATICI si basavano inizialmente sull'uso dell'ossalato decarbossilasi; la reazione da esso determinata comporta la liberazione di anidride carbonica (A) la cui determinazione, con tecniche manometriche o colorimetriche o di variazione del pH, dà il valore degli ossalati (9):



Più preciso sembra però il metodo che utilizza quale enzima di reazione la formiato deidrogenasi con successiva determinazione di ossalato in base all'aumento dell'assorbanza misurata a 365, 340 o 334 nm (10).

Queste metodiche enzimatiche sono ottime per il controllo degli ossalati in soluzioni acquose inerti, ma diventano più imprecise quando si tratta di liquidi biologici, in

quanto le sostanze in essi disciolte possono agire quali inibitori o induttori degli enzimi utilizzati e, conseguentemente, determinare approssimazioni per difetto o per eccesso anche di una certa entità (3). Tutti i metodi sopra descritti, al di là della loro complessità o maneggevolezza e della loro maggiore o minore precisione, presentano come punto critico la fase di precipitazione legata a molteplici fattori: il pH urinario, il cui valore ottimale di precipitazione varia notevolmente dall'uno all'altro metodo; il tempo di precipitazione; la temperatura ecc.

Una nota a parte merita il METODO DI MAUGERI costituito dalla determinazione dell'ossalato per titolazione con iposolfito di sodio; questo metodo analitico può essere utilizzato in laboratori che non dispongono di particolari attrezzature, essendo esclusivamente manuale; tale metodo però è impreciso per

valori bassi di ossaluria ed in presenza di discrete quantità di urati dà delle false positività (1, 2). Una ulteriore annotazione merita la determinazione dell'iperossaluria con lo SPETTROFOTOMETRO AD ASSORBIMENTO ATOMICO che attualmente è impiegato da alcuni laboratori (15); pur essendo una tecnica ad alta specificità come la cromatografia ionica presenta, però, alcuni svantaggi rispetto a questa. Il notevole costo dell'attrezzatura, una maggiore indagine nella preparazione del campione e nel calcolo dei risultati ed, infine, la sua lettura a monocanale, che permette l'identificazione di un solo ione per volta rappresentano i maggiori inconvenienti: a differenza della cromatografia con la quale vengono letti, calcolati e presentati otto ioni contemporaneamente. L'ultimo gruppo di analisi comprende i METODI CROMATOGRAFICI: in generale permettono

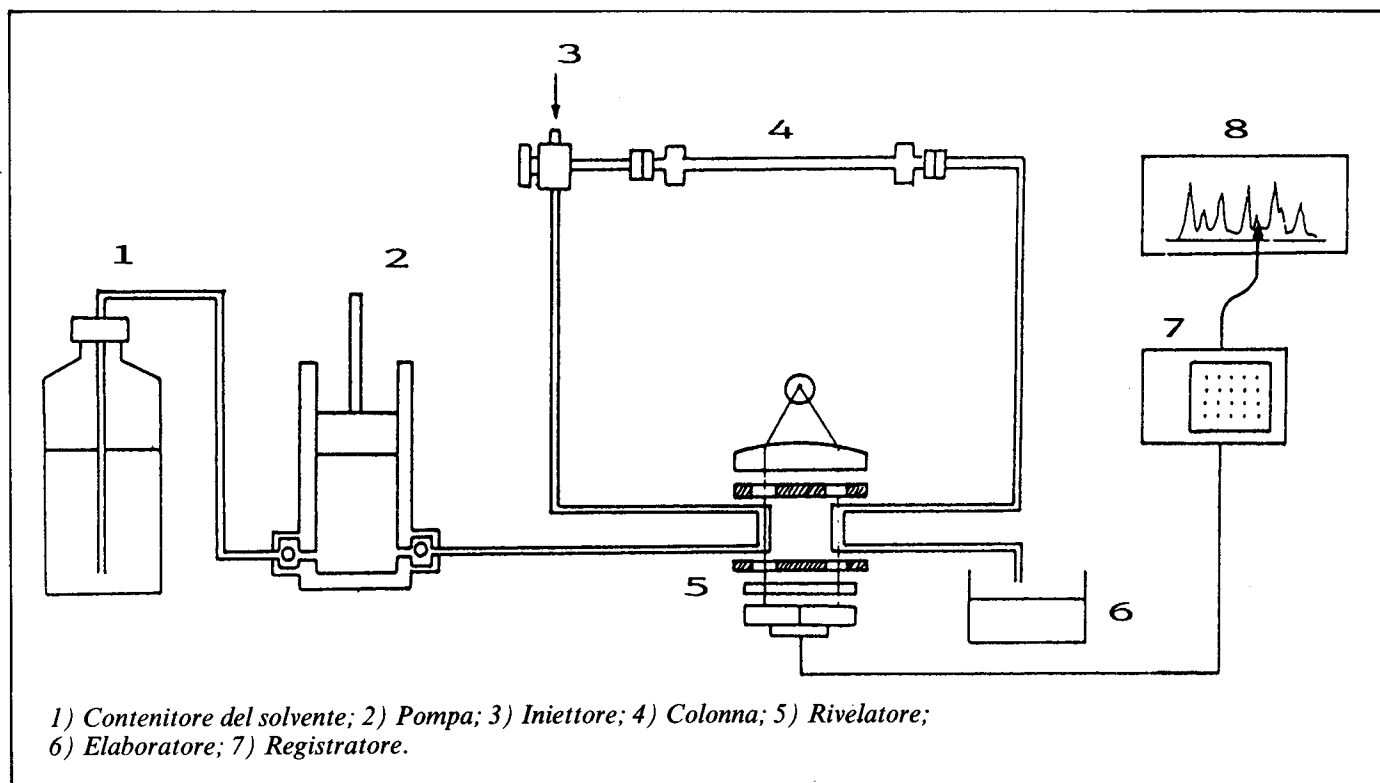


Fig. 1 - Schema generale di un cromatografo in fase liquida. (da Amandola-Terreni)

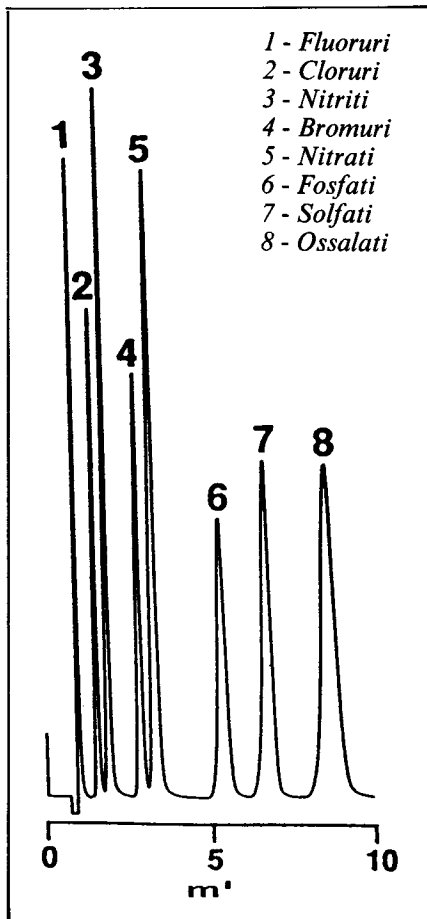


Fig. 2 - Grafico finale di una cromatografia ionica.

la separazione degli anioni inorganici e degli acidi organici con varie metodologie (Fig. 1).

In una fase liquida, come le urine, l'analisi routinaria può comprendere vari anioni inorganici e più precisamente fluoruri, cloruri, nitriti, bromuri, nitrati, fosfati, solfati ed ossalati che, se presenti, compaiono tutti sul grafico finale (11) (Fig. 2).

La cromatografia su colonne è una tecnica che non è condizionata da interferenze legate ai vari componenti urinari, come è stato detto per il metodo enzimatico, né è influenzata da altri fattori propri della reazione, come il pH e la temperatura; per tale motivo è entrata nella rou-

tine dell'analisi degli ossalati urinari in considerazione anche della sua alta specificità (12).

Cromatografia a scambio ionico

Fra i vari tipi di cromatografia, quella utilizzata dal nostro laboratorio è la cromatografia a scambio ionico su colonna.

Tale metodo è basato sulla differente affinità degli ioni per i componenti della colonna (impaccamento) che condiziona la velocità del passaggio di questi attraverso la colonna stessa (eluizione) durante un certo periodo di tempo (fase di stazionamento). La velocità di migrazione di uno ione, attraverso la colonna, è dipendente dal tipo e dalla concentrazione degli ioni nel mezzo (eluente) e nella colonna. Più precisamente ioni con bassa o modesta affinità per i costituenti della colonna sono i migliori eluenti (13). Più in particolare il metodo

prevede:

- 1) la raccolta dell'urina delle 24/h in un recipiente che contiene soluzione acida (acido cloridrico);
- 2) 0.5 ml di urina acida vengono trattati con 9.5 ml di acido boric; 3) si preparano poi due standard:
 - uno a bassa concentrazione: 9.25 ml di ac boric + 0.25 ml di acido ossalico 40 millimolare diluito all'1:100 con acqua distillata + 0.5 ml di solfati e fosfati;
 - uno ad alta concentrazione: 9 ml di acido boric + 0.5 di acido ossalico diluito (come sopra) + 0.5 ml di solfati e fosfati;
- 4) si effettua la lettura con Dionex DX 100 dopo aver effettuato la curva di calibrazione; il flusso attraverso la colonna è di 2 ml/min;
- 5) dopo 6'46" si ha l'uscita del picco degli ossalati sul grafico della stampante;
- 6) si calcola il valore della concentrazione dell'ossalato moltiplicando l'altezza del picco, riportato nel grafico, per la sua larghezza a metà

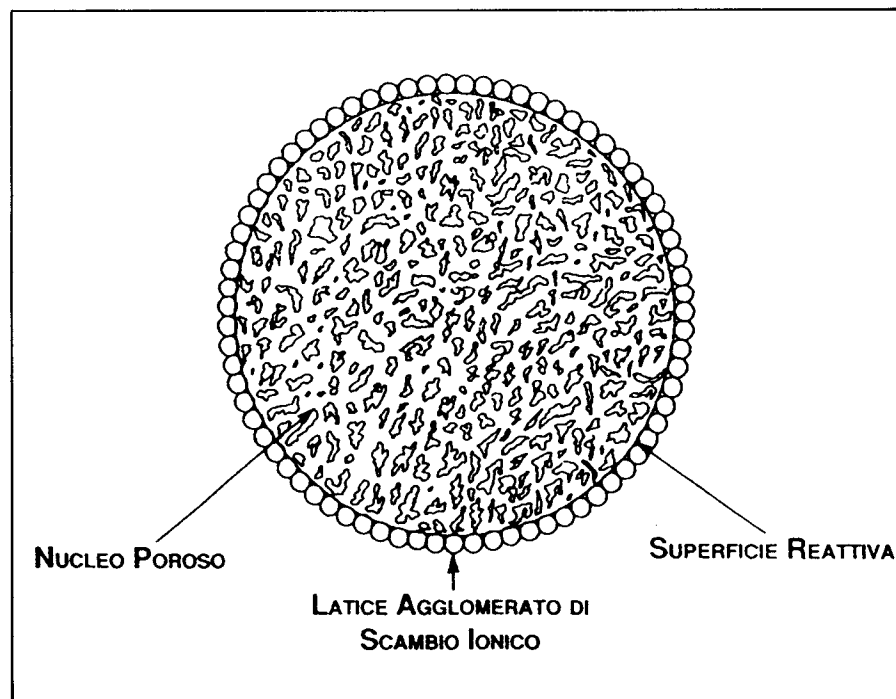


Fig. 3 - Sezione di una colonna per scambio ionico. (da Guida Omnipac)

picco.

È chiaro che l'elemento essenziale di tale processo è rappresentato dalle colonne costituite da un impaccamento polimerico che determina in molti casi un'alta velocità di reazione ed una notevole specificità. Le colonne da noi usate sono costituite da resine a scambio ionico distinte in tre regioni:

– un nucleo poroso chimicamente e meccanicamente stabile (Fig. 3);
– una regione contenente lattice agglomerato di scambio ionico;
– una superficie reattiva contenente delle particelle scambiatrici ioniche microscopiche dove avviene il processo cromatografico (14).

Tale configurazione concentra un vasto numero di siti di scambio ionico in uno strato molto sottile.

Il metodo prevede inoltre una ridotta manualità anche nel pretrattamento del campione, a differenza di quello che accade in tutti i metodi precedentemente elencati, la presenza di polimeri permette di poter utilizzare campioni con pH quanto mai vario (da 0 a 14) ed infine l'alta riproducibilità dei risultati rappresenta, insieme ai precedenti, un valido motivo di scelta della cromatografia ionica (13, 14).

Bibliografia

1. Sterpellone L. L'esame delle urine. Roma: Società Editrice Universo 1983.
2. Pasquinelli F, Porta F. Esame dei calcoli; In: diagnostica e tecniche di laboratorio vol IV; Firenze: Ed. Rosini 1988; 1650-5.
3. Wandzilak TR, Hanson FW, Williams HE. The quantitation of oxalate in amniotic fluid by ion-chromatography. *Clinica Chimica Acta* 1989; 185: 131-8.
4. Williams HE, Smith LH Jr. Primary oxaluria. In: *The metabolic basis of inherited disease* 5th ed. New York: McGraw Hill 1983; 204-28.
5. Dampurè CJ, Jennings PR. Peroxisomal alanina: glyoxylate aminotransferase deficiency in primary hyperoxaluria type I. *FEBS lett.* 1986; 201: 20-4.
6. Hodkinson A. Determination of oxalic acid in biological material. *Clin Chem* 1970; 16: 574.
7. Mayer GG, Markow D, Karp F. Enzymatic oxalate determination in urine; *Clin Chem* 1963; 9: 334.
8. Kock GH, Strong FM. Determination of oxalate in urine. *Anal Bioch* 1969; 27: 162.
9. Shimazono H, Hayaishi O. Enzymatic decarboxylation of oxalic acid. *J Biol Chem* 1957; 277: 151.
10. Costello H, Hatch M, Bourke E. An enzymatic method for spectrophotometric determination of oxalic acid. *J Lab Clin Med* 1976; 87: 903.
11. Cantwell FF, Puon S. Mechanism of chromatographic retention of organic ions on a nonionic absorbent. *Anal Chem* 1979; 51 (6): 623-32.
12. Weiss J. Handbook of ion chromatography. Dionex Co, Sunnyvale, CA, 1986.
13. Slingby RW, Pohl CA. Anion exchange selectivity in latex-based columns for ion chromatography. *J Chromatogr* 1988; 458: 241-53.
14. Pohl CA. New solvent resistant ion exchange material for analytical chemistry. Proceedings of international conference ION-EX 1990; North East Wales Institute Wrexham Clwyd UK July 1990; 9-11.
15. Fraser J, Campbell DJ. Indirect measure of oxalic acid in urine by atomic absorption spectrophotometry. *Clin Biochem* 1972; 5: 99.
16. Schrier RW. Nefrologia pratica. Ed. Piccin 1984; 140-1.
17. Williams DI, Smith LH. Scientific foundations of urology. London: W. Heinemann 1976.
18. Micali F, Porena M, Vespasiani G. La calcolosi urinaria; Ed. Wellcome 1979; 25-6.