

c. HPLCによる血清クレアチニン測定法 (日本臨床化学会勧告法, 臨床化学, 23:326-334, 1994)

【用途】 日常検査法の正確さの評価, 新規開発試薬の評価, 常用標準血清の値付け, 外部精度管理調査における配布試料の評価, などに用いるものとして設定されている。

【原理】 血清をトリクロル酢酸で除タンパクし, その上清中のクレアチニンを陽イオン交換クロマトグラフィで分離し, クレアチニンの吸収波長 234 nm で検出する。

【測定機器の性能基準】

紫外部検出器 バンド幅<8 nm, 波長精度< ± 0.5 nm, ノイズレベルおよびドリフトは 250 nm において $< \pm 1.5 \times 10^{-5}$ ABS および $< 1 \times 10^{-3}$ ABS/時であること。

HPLC 装置 送液ポンプ: 送液量 0.1~5 ml において, 流量正確さ<2%, 安定性<0.5%。カラム恒温槽: 精密度 $\pm 0.1^\circ\text{C}$ 以内。データ処理機構: クロマトグラムの面積積算機能を持ち, 分画した位置を確認できること。インジェクター: 20 μl のループ型での再現性が CV<1%。

カラム 強酸性陽イオン交換系のもので, クレアチニン分析で得られるクロマトグラムから求められる理論段数 $n = 5.54 \times (t_R / W_{1/2})^2 > 1,000$ のものを用いる (t_R =尿酸の溶出時間, W =ピークの半値幅の時間)。国産品の一例として, Shim-pack ISC-05/SO 504(島津製作所)がこの条件を満たしている。

【試薬】 すべて特級またはそれ以上の規格のものを用いる。

① 902 mmol/l トリクロル酢酸 (TCA) 溶液: TCA 147 g を精製水に溶解して 1 l にする。

② 溶離液: 100 mmol/l の硫酸ナトリウムを含む 10 mmol/l のリン酸緩衝液, pH 5.75。調製後メンブランフィルタ (ポアサイズ 0.45 μm) で濾過して冷蔵する。

③ 酢酸エチル。

④ クレアチニン標準原液 100 mg/l: NIST の SRM 914 を 50°C で恒量になるまで乾燥して 1.003 mg を秤量し, 0.1 mol/l の塩酸に溶解して 1 l にする。臨用時 0.1 mol/l の塩酸で 10 倍に希釈して用いる。

【実施】 ① 試料の前処理: 試料および試薬の採取にはホールピペットを用いる。血清または標準液を 1.00 ml 採取し, これに TCA 溶液 2.00 ml をミキサー上で加えて混和し, 10 分間放置後 1,400 G 以上で 10 分間遠心して上清 1 ml を別の試験管に採取する。これに酢酸エチル 2 ml を加えて強く混和し, 30 分静置後, 上層の酢酸エチルをアスピレータで除き, 下層を測定試料とする。

② 測定: 20 μl のループ型インジェクターを用いる。溶離液の流速 0.7 ml/分, カラム温度 40°C , 検出波長 234 nm を基準とする。装置の状態が十分に安定したところで測定試料 (試薬ブランク, 標準液, 血清試料) を, インジェクターのループ内が十分にとも洗いされる量を注入して分析し, 得られたクレアチニンのピーク面積を比較して値を算出する。

【注】 ① TCA は国内外の試薬特級品であれば使用可能である。吸湿性が高いため正確な濃度調製は容易でないが, 指定濃度の $\pm 10\%$ 以内であれば結果に影響しない。

② 1,000 mg/l の標準原液調製の際, 1,003 mg 秤量しているのは NIST の SRM 914 a の純度が 99.7% であることによる。

③ カラムの検定は, クレアチニン標準液のほか, L-チロシンとスルファニル酸の各 100 mg/l 液 (0.1 mol/l 塩酸溶液で溶解する) を用意し, これをそれぞれ 20 μl ずつ装置にインジェクトしてそれぞれのリテンションタイム t_c (クレアチニン), t_t (チロシン), t_o (スルファニル酸) を求め, 次式に従って分離係数 α を算出し, 得られた α が 3.7~4.7 であることが条件とされている。 $\alpha = K_c / K_t$ ($K_c = (t_c - t_o) / t_o$, $K_t = (t_t - t_o) / t_o$) なお, α および理論段数 n は溶離液の pH とイオン強度で変化する。

④ 試料の前処理で酢酸エチルで処理するのは, TCA 中の不純物または投与薬剤に起因すると考えられる物質のうちで, クレアチニンとリテンションタイムが重なるものを除くためである。

⑤ 標準液は測定のはじめ, 中ほど, 最後で各二重測定して計 6 回の平均値により各試料の計算を行う。なお, このときの標準液の変動係数が 2% をこえている場合は原因を追及して再度測定する。