

b. HPLC による血清尿酸測定法 (日本臨床化学会勧告法, 臨床化学, 22:300-307, 1993)

本法は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】 血清を過塩素酸で除タンパクし, その上清中の尿酸を逆相クロマトグラフィーで分離し, 尿酸の吸収波長 284 nm で検出する。

【測定機器の性能基準】 紫外検出器, 送液ポンプ, カラム恒温槽, データ処理機構, などはクレアチニンの勧告法と同様である。インジェクターは 50 μ l のループ型, カラムは ODS 系で尿酸のクロマトグラムから求められる理論段数 $n=5.54 \times (t_R/W_{1/2})^2$ が 1,500 以上のものを用いる (t_R =尿酸の溶出時間, W =尿酸のピークの半値幅の時間)。

【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 0.3 mol/l 過塩素酸: 過塩素酸 (純度 60%以上) 33 ml に水を加えて 1 l にする。

② 0.2 mol/l リン酸二ナトリウム溶液: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 71.7 g を水に溶解して 1 l にする。

③ 0.5 mol/l リン酸溶液: リン酸 (純度 85%以上) 35 ml を水で 1 l にする。

④ 溶離液 (メタノールを含むリン酸緩衝液, pH 2.2): ②の溶液 70 ml と③の溶液 120 ml を 1 l のメスシリンダーにとり, 水を加えて 1 l にし, ポアサイズ 0.45 μ m のメンブランフィルタで汙過する。これに, 尿酸の保持時間が 5~10 分になるようメタノールを加え (メタノールの添加は保持時間を短縮する) 低温に保持する。

⑤ 尿酸標準原液 1,000 mg/l: NIST の SRM913 をデシケーター内で恒量になるまで乾燥して 100.3 mg を秤量し, 0.01 mol/l の炭酸リチウム溶液に溶解して 100 ml にする。臨用時 0.01 mol/l の炭酸リチウム溶液で 10 倍に希釈して用いる。

【実施】 ① 試料の前処理: 血清または標準液 0.2 ml を遠心管にとり, これに 0.3 mol/l 過塩素酸 0.2 ml ミキサー上で加えて混和, 氷水中で 30 分間放置したのちさらに混和して 3,000 rpm, 10 分間遠心し, 上清を別の試験管に移して再度 3,000 rpm, 10 分間遠心し, その上清 0.3 ml を HPLC 用サンプルカップにとる。これに 0.2 mol/l Na_2HPO_4 溶液 0.3 ml を加え, 混和したものを, HPLC への試料とする。

② 測定: 50 μ l のループ型インジェクターを用いる。溶離液の流速 1.0 ml/分, カラム温度については指定がないが 35~40°C で一定にし, 検出波長を 284 nm 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 100 μ l ずつインジェクトして得られた尿酸ピークの面積を比較して値を算出する。

【注】 ① 過塩素酸は国内外の試薬特級品であれば使用可能である。

② 1,000 mg/l 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 ODS カラムは使用前に, 水と溶出液でそれぞれ 30 分間以上洗浄し, ベースラインが安定したところを確認後分析を開始する。分析終了後はカラム水, 10%メタノール液でそれぞれ 30 分間洗浄する。カラムを使用せず, 長期間保存するときは 60%メタノールで置換しておく。

④ カラムの検定は, 尿酸標準液による理論段数のみにて行う。

⑤ 標準液は測定のはじめ, 中ほど, 最後で各二重測定して 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。