

a. Jaffé 法 (Bonsnes and Taussky : J. Biol. Chem., 158 : 518, 1945)

【原理】 クレアチニンは、アルカリ性溶液中でピクリン酸と反応して橙赤色の creatinine picrate となる (Jaffé 反応)。クレアチニンは、ピクリン酸とともに加熱して脱水し、クレアチニンに変化させ、脱水後の総クレアチニン濃度とクレアチニン濃度との差からクレアチニン濃度を求める。

【試薬】 ① 0.04 mol/l ピクリン酸溶液：再精製したピクリン酸 12.5 g を 2 l 容の三角フラスコに入れ、精製水で溶かして全量 1 l とし、24 時間以上放置後、その上清 900 ml と精製水 300 ml を混ぜて作る。

② 0.75 N NaOH 溶液

③ 10% タングステン酸ナトリウム溶液 (464 頁)

④ 2/3 N 硫酸溶液 (464 頁)

⑤ 100 mg/dl クレアチニン標準溶液 (第一化学)：クレアチニン 100 mg を 0.1 N 塩酸で溶かし、全量 100 ml とする。

⑥ 使用標準液：標準液を精製水で正確に 500, 200, 100 倍に希釈して 0.2 mg/dl (S_1), 0.5 mg/dl (S_2), 1 mg/dl (S_3) の使用標準液を作製する。これらはそれぞれ 2, 5, 10 mg/dl の血清クレアチニン濃度に相当する。

① 血清クレアチニン

① 血清 1.0 ml と精製水 8.0 ml を混ぜ、これに 10% タングステン酸ナトリウム液 0.5 ml を加え、よく振りながら 1 滴ずつ 2/3 N 硫酸を加え混和後、沝過する。

② 4 本の試験管 A, S_1 , S_2 , B を用意し、A に沝液、 S_1 , S_2 に使用標準液の S_1 , S_2 を B (盲検) に精製水をそれぞれ 5.0 ml ずつ採取する。

③ 各管を 25°C の温浴につけ、ピクリン酸溶液 2.0 ml と 0.75 N NaOH 溶液 2.0 ml ずつ混和後、再び 25°C に 15 分浸す。

④ 光電光度計で、盲検を対照に 515 nm で試料と標準液の吸光度を求め、 E_A , E_{S_1} , E_{S_2} とする。

⑤ 計算：クレアチニン濃度 (mg/dl) = $(E_A/E_{S_1}) \times 2$ または $(E_A/E_{S_2}) \times 5$

【注】 ① クレアチニンのみを定量するときは全体を縮小して行ったほうが血清が少なくすむ。すなわち、血清 0.5 ml + 精製水 2.0 ml + 除タンパク試薬 2.5 ml で除タンパクし、その沝液 2.5 ml にピクリン酸試薬と NaOH 液を 1.0 ml ずつ加える。

② 血清クレアチニンが異常高値を示すとき、クレアチニン以外の物質が類似呈色をしていることがある。したがって、下記のようにクレアチニンのみを沈殿させ、Jaffé 反応を実施し、確認することが望ましい。

沈殿法：除タンパク沝液 5.0 ml に飽和シュウ酸アンモニア溶液 (約 4%) 0.5 ml を混和し、ついで小刀尖 (約 50~100 mg) の Lloyd 試薬 (和光純薬) を加え、栓をして激しく振とう混和 (約 10 分間ときどき振とう) したのち、2,000 rpm 10 分間遠心、上清を捨て、沈殿に精製水 5.0 ml および上記ピクリン酸溶液と NaOH 溶液の各 2.0 ml を加え、10 分間ときどき振とう混和したのち比色する。

② 血清クレアチン

① 除タンパク沝液 5.0 ml を 7 ml に目盛りのある硬質試験管にとり、ピクリン酸溶液 2 ml を加え、栓をゆるくし、激しく沸騰している水槽中に 45 分間入れる。

② ついで室温に放冷後、25°C の温浴につけ精製水を加えて 7.0 ml とし、0.75 N NaOH 溶液を 2.0 ml を加え、25°C の温浴に 15 分間放置する。

③ 盲検および標準液は、クレアチニン測定用のものをそのまま用いて吸光度を求める。

④ 計算：クレアチン (mg/dl) = $[(\text{総クレアチン}) - (\text{クレアチン})] \times f \times 1.16$

本法ではクレアチンの 80% がクレアチニンに変化するから、補正係数 f を 1.25 とする。

1.16 はクレアチンとクレアチニンとの分子量の差による補正である。

血球中には、クレアチニン以外の Jaffé 反応物質があるから溶血に十分注意する。

③ 尿クレアチニン

① 蓄尿にはトルオールを防腐剤として用い、24 時間尿量によって希釈する。

24 時間尿量 500 ml 1,000 ml 2,000 ml

希釈法 1 : 500 1 : 250 1 : 100

② 希釈尿 5.0 ml および使用標準液 S_2 , S_3 を各 5.0 ml ずつとって、血清クレアチニン実施②以下とまったく同様に行う。

③ 計算：

1 日尿中クレアチニン排泄量 (mg) = $E_A \times \frac{0.025}{E_{S_2}}$ (または $\frac{0.05}{E_{S_3}}$) $\times \frac{D}{5} \times V$

(V : 尿量 ml, D : 尿希釈倍数)

④ 尿クレアチン

① 尿を希釈し、5 ml 中の総クレアチニン量が 0.05 mg 以下になるようにすすめる。

② 煮沸時間のほかは、血清クレアチンと同様に行う。

③ 煮沸水浴中に約 90 分放置する。この pH 条件では、クレアチンは 100% クレアチニンに変化するので計算のとき f は不要となる。沸騰中に槽内の水分が蒸発し試験管内液面より低下し、加水分解が不完全になることがある。