



## HPLC を用いる血清クレアチニンの測定勧告法

日本臨床化学会  
試薬専門委員会

## 序 文

本法は血清クレアチニン測定勧告法として日本臨床化学会関東支部試薬委員会含窒素グループによって提案され、試薬専門委員会で検討、承認されたものである。

諸外国における血清クレアチニンのレファレンス法は Center for Disease Control (CDC) よりイオン交換クロマトグラフィーと Jaffe 反応系を組み合わせた方法が報告<sup>1)</sup>されている。この方法に準じて高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にて検討したが、Jaffe 反応をポストカラム誘導体化して利用した場合、検出感度が低く十分な精密さが得られなかった。そこで紫外部でのクレアチニンの吸光係数が充分大きいため、これを利用する方法を選択した。同様な検出法を採用した Candidate Reference Method<sup>2)</sup> や HPLC 法によって分離したクレアチニン分画を酵素法で測定する Candidate Reference Method<sup>3)</sup> も提案されている。後者の方法は紫外部検出の特異性を向上させているが、分画の凍結乾燥による濃縮を必要とし、非常に操作が複雑な方法である。血清の除タンパク方法としては、トリクロロ酢酸 (TCA) による方法が<sup>14</sup>C 標識クレアチニンを用いた回収試験にて正確に回収<sup>4)</sup>されており、これを採用した。また分離機構はイオン交換、分配、サイズ排除の原理の異なる方法で比較検討したが、イオン交換を原理とした強酸性陽イオン交換樹脂を用いた方法<sup>5)</sup>が、最も優れた分離能を示した。これを HPLC と組み合わせることで、レファレンス法の条件を十分に満たし、正確度の高い測定値が得られることを確認したので、血清クレアチニン測定勧告法として提案する。

## 測定原理

血清をトリクロロ酢酸にて除タンパクし、その上清のクレアチニンをイオン交換クロマトグラフィーで分離し、紫外部にて検出する。

クレアチニンは pH 5.75 の弱酸性緩衝液中で陽性に荷電し、強酸性陽イオン交換樹脂の交換基 (-SO<sub>3</sub>H) と結合し、平衡に達する。クレアチニンと他の夾雑成分は選択係数の差によって分離することができる<sup>6)</sup>。

クレアチニンの標準物質には National Institute for Standards and Technology (NIST SRM 914a) を一次標準として用い、クロマトグラム上のピーク面積から濃度を算出する。

## 測定操作法

## 1. 血清除タンパク操作と酢酸エチル処理

除タンパクの操作法を図 1 に示した手順で実施する。実施に際しては試料用、試薬用のホールピペットは共洗いを充分にして、同一器具を用いる。

5ml 以上の試験管に試料, 884.9 $\mu$ mol/l (100.0 mg/l) クレアチニン標準液を 1.0ml のホールピペットで各試験管に採取し、それぞれに 2.0 ml のホールピペットで 901.8mmol/l TCA 液を良く混合しながら加える。室温に10分放置の後、1,400 g 以上で10分間遠心する。

遠心後の上清 1ml に酢酸エチルを 2ml 加え良く混合、室温に30分静置する。上層の酢酸エチルをアスピレーターで除き、下層を測定試料とする。注入にあたってはサンプルループ内を良く共洗いし、20 $\mu$ l をインジェクトする。

## 2. 測定

カラムと溶離液が規定の温度と流速に到達し