薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
107 (11) 876-882 (1987)

過酸化水素系高感度発色試薬の開発研究. 水溶性ロフィン誘導体の合成と
生体成分分析への適用性の検討¹⁾

斉藤仁俊,^{*,a} 粕谷武志,^a 佐々木栄子,^a 滝沢徳正,^b
西館和由,^b 由岐英剛^a
東邦大学薬学部,^a 株式会社ヤトロン^b

Syntheses and Evaluations of Water-Soluble Lophine Derivatives for Highly
Sensitive Colorimetric Determination of Hydrogen Peroxide Developed
in the Enzymatic Reaction of Biological Substances¹⁾

KIMITOSHI SAITO,^{*,a} TAKESHI KASUYA,^a EIKO SASAKI,^a NORIMASA TAKIZAWA,^b
KAZUYUKI NISHIDATE,^b and HIDETAKA YUKI^a

School of Pharmaceutical Sciences, Toho University,^a 2-2-1 Miyama,
Funabashi, Chiba, 274, Japan and Iatron Laboratories Inc.,^b
3-16-4 Yakuendai, Funabashi, Chiba, 274, Japan

(Received June 24, 1987)

New hydrogen donors, water soluble lophine derivatives, were synthesized for the determination of hydrogen peroxide developed in the enzymatic reaction of biological substances. These chromogens have high absorptivity; extinction coefficient is 40 000—50 000 upon oxidation with hydrogen peroxide in the presence of peroxidase. A single work reagent is used for the determination of uric acid in the serum; the reaction is complete in less than 5 min at 37°C. The blue dye is formed at 640 nm; a blank sample measurement is not needed. The standard curve for the method is linear for uric acid ranging from 2.5 to 25 mg/dl. Average analytical recovery of uric acid in the human sera exceeded 99%; within-run and between-run precision studies showed CV's ≤ 2.5 and $\leq 3.5\%$, respectively. The method correlated well with the standard uricase-ultraviolet method; the regression equation is $y = 0.988x + 0.426$ (mg/dl) and the correlation coefficient (r) is 0.977 ($n=11$).

Keywords—hydrogen donor; lophine derivative; water-soluble dye; uric acid; serum; uricase; hydrogen peroxide

序 論

生体成分に酵素を作用させ、生成した過酸化水素を適当な発色試薬を用いて定量することにより、目的とする生体成分の分析を行うことができる。例えば、プリン誘導体の代謝産物として知られ、臨床化学的に重要な尿酸は uricase (E.C. 1.7.3.3) の作用により過酸化水素とアラントイン²⁾ を生成するが、血清中における尿酸の濃度は約 300 μM と極めて低く、したがって微量に生成した過酸化水素を精度よく定量するための高感度な発色試薬の開発が待たれている。

一方, Silversmith^{3a)} 及び Blusy^{3b)} らは古くから化学発光試薬の 1 つとして知られている⁴⁾ ロフィン誘導体 **1a** が peroxidase (E.C. 1.11.1.7) の存在下、過酸化水素により酸化され、血清ブランクの必要のない波長領域 640 nm に吸収極大を持ち、しかも分子吸光係数が約 5 万と非常に高感度に発色する色素 **2** を与えることを報告している (Chart 1)。したがって、この化合物を用いれば、微量過酸化水素の定量に応用できるものと考えられるが、しかしながらこの化合物は水に対する溶解度が極めて低いため、現在までに dry film 法による血清コレステロール測定に応用されているにすぎない。⁵⁾ そこで我々は、過酸化水素系高感度発色試薬を開発する目的で水溶性ロフィン誘導体を合成すると共に、生体成分分析への適用性についても検討した。

Chart 1

結果及び考察

水溶性ロフィン誘導体の合成

ロフィン誘導体 **1a** に水溶性基を導入するためには、その被酸化部位の影響を考慮すれば、N-アルキル側鎖上に導入する方が良いものと考え Chart 2 に示したようなカルボン酸塩 (**1d, e**), スルホンアミド (**1f, g**), 及びスルホン酸 (**1h, i**) 誘導体を合成した。ここでスルホン酸エチルエステル **4c, d** までの合成法は Krutak ら⁶⁾ の方法, ジアルキルアニリン **4** よりベンジル **5** の合成は Tüzün ら⁷⁾ の方法, 更に芳香族アルデヒドとの環化縮合は Silversmith ら³⁾ の方法に準じ, 適時改変して行った (実験項参照)。得られた最終目的物 **1d—i** は元素分析, 赤外吸収 (IR) 及び質量 (MS) スペクトルによりそれらの構造を確認した。

4, 5

- a: $R^1=Et, R^2=CH_2CO_2Et$
 b: $R^1=Et, R^2=(CH_2)_2SO_2NMe_2$
 c: $R^1=Me, R^2=(CH_2)_2SO_3Et$
 d: $R^1=Et, R^2=(CH_2)_2SO_3Et$

1

- a: $R^1=R^2=Me, R^3=H$
 b: $R^1=Et, R^2=CH_2CO_2Et, R^3=H$
 c: $R^1=Et, R^2=CH_2CO_2Et, R^3=OMe$
 d: $R^1=Et, R^2=CH_2CO_2Na, R^3=H$
 e: $R^1=Et, R^2=CH_2CO_2Na, R^3=OMe$
 f: $R^1=Et, R^2=(CH_2)_2SO_2NMe_2, R^3=H$
 g: $R^1=Et, R^2=(CH_2)_2SO_2NMe_2, R^3=OMe$
 h: $R^1=Me, R^2=(CH_2)_2SO_3H, R^3=OMe$
 i: $R^1=Et, R^2=(CH_2)_2SO_3H, R^3=OMe$

Chart 2

- i) R^1NHPh , ii) $R^1NHPh, HNMe_2/Et_3N$ or $EtONa/EtOH$, iii) $(COCl)_2-AlCl_3/CS_2$,
 iv) $HO-\langle \begin{smallmatrix} R_3 \\ \diagup \diagdown \\ CHO \end{smallmatrix} \rangle$, $AcONH_4/AcOH$, rfx 4h.

色素の発色能と安定性

6 種の新規化合物の水に対する溶解性はカルボン酸塩 (**1d, e**), スルホン酸 (**1h, i**) に関しては満足すべき結果が得られた。しかしながら、古くから医薬、殺虫剤、除草剤などの分野で⁶⁾ 水溶性基として導入されているスルホンアミド誘導体 (**1f, g**) に関してはアルカリ性での溶解度は良好であったが、中性-弱酸性下での溶解性に問題があった。

そこで、これらの化合物を pH 5—8 の各種緩衝液に溶解し, peroxidase (POD)- H_2O_2 で酸化して発色させた場合の吸収スペクトルとその極大波長における経時的な変化を測定した。その結果、どの化合物も吸光係数が 4—5 万と十分な発色が得られたが (Table I), カルボン酸塩 **1d** ではその吸収極大が 730 nm と長波長にあるた

TABLE I. Sensitivity and Stability of Chromogen **1d**—**i** upon Oxidation with POD-H₂O₂ System

Compounds	$\lambda_{\max}$ (nm)	$\epsilon_{\max}$	Stability
2d	730	45 000	80%/0.5 h
2e	630	45 000	95%/1.0 h
2f ^{a)}	640	47 000	95%/0.3 h
2g ^{a)}	640	51 000	Good
2h	640	42 000	Good
2i	630	41 000	Good
2a ^{a)}	640	49 000	Good

a) Containing 0.5% Triton-X 100.

め、通常の測定に向かず、また退色も 30 分で 20% 生じていた。この **1d** のメトキシ誘導体 **1e** では退色も 1 時間で 5% とわずかであったが、しかしながらこの色素は試薬ブランクが高いという欠点があり、いずれの場合でもカルボン酸塩は実用的には改良の余地を残すものと考えられる。

一方、スルホン酸及びそのアミド誘導体の呈色反応の至適濃度について検討し、その結果を Fig. 1 に示した。2.5 mM H₂O₂ に対し、スルホン酸類 (**1h**, **i**) の至適濃度が 200 μ M 付近であったのに対し、スルホンアミド類 (**1f**, **g**) では約 1/4 の 50 μ M 付近であり、後者では高濃度による呈色反応の阻害が見られた。Fig. 2 にはそれぞれ至適濃度の色素 (**1f**—**i**) を用いた発色反応の経時変化を示した。いずれの色素を用いても 5 分以内に酸化反応による呈色が完結し、その後の色素の安定性も満足な結果が得られた。前述したごとくスルホンアミド **1f**, **g** は弱塩基性の方が呈色の度合いが大きい、この条件下では同時に退色の度合いも大きいという欠点を有しているため、比較的安定な呈色を示す pH 6 付近で反応させた。但し、この場合、**1a** と同様可溶化剤として Triton-X 100 を 0.5% 添加して均一反応とした。

微量過酸化水素の定量

スルホン酸及びそのアミド誘導体は発色能並びに発色後の安定性も良好な結果が得られるため、この 4 種の化合物を用いて微量過酸化水素の定量を行った。また Fig. 2 より明らかなようにスルホンアミド **1f** が発色後 20 分で 5% 退色するため、反応時間は 37°C、5 分とした。Fig. 3 には過酸化水素の検量線を示したが、**1g** は 25 nmol までの、それ以外はいずれの色素を用いても過酸化水素量として 40 nmol までの原点を通る直線性が得られ、微量過酸化水素の定量に十分な検出能を有していることが明らかとなった。

尿酸定量への応用

微量過酸化水素定量が可能となったので、次に実際の生体試料分析への応用として尿酸定量を試みた。ここではスルホン酸アミドは前述したごとく溶解度の点で問題を有していたので、2 つのスルホン酸 (**1h**, **i**) を用いて検討した。色素 **1h** 又は **1i** 200 μ M と 1 U/test POD を含む溶液に 0.5 U/test の uricase を加え、25 mg/dl 尿酸標

Fig. 1. Correlation between Concentration and Ability of Color Development of Chromogen **1a** and **1f**—**i**

After preincubation of various concentration of chromogens, **1a**; $\blacktriangle$, **1f**; $\bullet$, **1g**; $\bullet$, **1h**; $\circ$, **1i**, with 1U/test POD in 3 ml of borate buffer (pH 6.1) for 5 min at 37°C, 20 μ l of 2.5 mM H₂O₂ was added and further incubated for 10 min. The absorbance at 640 nm was measured.

Fig. 2. Time Courses in the Color Development of Lophine Derivatives upon Oxidation with POD-H₂O₂ System

Fifty μ M (—, **1a**; ---, **1f**; ·····, **1g**) or 200 μ M (— · —, **1h**; — — —, **1i**) of chromogens and 1U/test POD were preincubated at 37°C in 3 ml of borax buffer (pH 6.1), and then oxidized by the addition of 20 μ l of 2.5 mM H₂O₂. In the cases of sulfonamides (**1g** and **1f**) and **1a**, 0.5% of Triton X-100 was added.

Fig. 3. Calibration Curves for Hydrogen Peroxide

Fifty μM ($\blacktriangle$, 1a; $\bullet$, 1f; $\circ$, 1g) or 200 μM ($\bullet$, 1h; $\circ$, 1i) of chromogens and 1U/test POD were incubated for 5 min at 37°C in 3 ml of borax buffer (pH 6.1). Twenty microliter of 0.1–2.5 mM of H_2O_2 was added and incubated for further 5 min. Absorbance at 640 nm was measured.

TABLE II. Recovery of Uric Acid Added to Serum

Chromogen	Uric acid		Recovery (%)
	Added (mg/dl)	Found (mg/dl)	
1h	0	3.32	
	1	4.31	98.80
	5	8.07	97.78
	10	13.10	94.97
	15	18.13	89.73
		Mean	97.56
1i	0	3.67	
	1	4.70	103.50
	5	8.55	97.62
	10	13.01	102.36
	15	18.64	99.80
		Mean	100.80

標準液及び正常血清 20 μl を添加した際の呈色の経時変化を測定した。その結果、正常血清、標準液とも 3 分以内に反応は完結し、その後の色素の安定性も良好であった。実際の検体測定には測定上の安全性を考慮し、5 分間の加温が適するものと判断し、この条件下で尿酸の標準曲線を作成した。その結果、尿酸濃度 2.5–25 mg/dl までの直線性が得られた (Fig. 4)。以上よりこの色素 200 μM (終末濃度)、1 U/test POD、0.5 U/test uricase を有するホウ酸緩衝液 3 ml (pH 6.1) 中に試料検液 20 μl を混和し、5 分間 37°C で反応させるという条件で血清中の尿

Fig. 4. Calibration Curve for Uric Acid Determined by Uricase-Lophine method

To the solution of 1U/test POD and 200 μM of 1h ($\bullet$) or 1i ($\circ$) was added 0.5 U/test uricase and 20 μl of various concentrated uric acid standard. The mixture was incubated for 5 min at 37°C, and then its absorbance at 640 nm was measured.

TABLE III. Precision of Uric Acid Determination

		Chromogens	
		1h	1i
Within-assay $n=10$	Mean (mg/dl)	3.43	3.40
	SD (mg/dl)	0.081	0.109
	CV (%)	2.38	3.20
Between-assay $n=0$	Mean (mg/dl)	3.44	3.39
	SD (mg/dl)	0.126	0.134
	CV (%)	3.68	3.93

Fig. 5. Comparison between the Standard Uricase-4AAP-ESPT Method and Uricase-Lophine Method Using 1i as Chromogen

Eleven patients sera were analyzed for uric acid by the uricase-water soluble lophine (1i) method. The standard uricase-(4AAP)-(N-ethyl-N-sulfopropyl-m-toluidine) method was also carried out (uric acid determination kit). $n=11$, $r=0.97715$, $y=0.4263+0.988x$.

酸定量が可能である事を見い出すことができた。

次に本定量法を用いた際の添加回収と分析精度について検討した。2種の色素(1h, i)に対して正常血清に1—15 mg/dlの尿酸を加えたときの添加回収率をTable IIに示してあるが、それぞれ97.56% (1h), 100.82% (1i)と満足すべき結果が得られた。またTable IIIには正常血清の同時再現性及び測定間誤差における精度を示した。同時再現性については変動係数(CV%), 2.38 (1h), 3.20 (1i)であり、測定間誤差についても同様に3.63 (1h), 3.93 (1i)といずれも良好な結果が得られた。

更に、11検体の患者血清につき、本法のスルホン酸1iを用いた方法と、市販品標準キットの4-aminoantipyrine (4AAP)-ethanesulfonyl-*m*-toluidine (ESPT)法を用いて尿酸定量を行った。その結果をFig. 5に図示してあるが、双方の測定間の相関係数が0.977と良い相関性が得られた。

最後に本法と既法であるAAPとフェノール誘導体⁸⁾の酸化的カップリングを用いるuricase-ultraviolet法とを比較検討した。反応の至適pHはどの方法もほぼ変りないが(pH 5—7)、測定波長は既法に比較して本法は約100 nm長波長にあり、したがって血清ブランクの必要性がまったくない。また、吸光係数も既法の約3—4倍の約4万と非常に高感度なのが特徴であり、本法を用いれば必要とする血清量も20 μ lで済むという微量定量化が可能になったという長所を有している。

実験の部

水溶性ロフィン誘導体の合成 *N*-Ethyl-*N*-phenylglycine Ethyl Ester (4a) クロル酢酸エチル (23.8 g, 0.2 mol), *N*-エチルアニリン (16.4 g, 0.2 mol) 及び乾燥粉末無水酢酸ナトリウム (16.4 g, 0.2 mol) の混合物を135—145°Cで約6時間攪拌しながら加熱する。室温まで戻ったら、水を加えて固体を溶解し、分離した有機層(A)を水洗する。水層は炭酸水素ナトリウムで飽和させ、次いで2—3 mlの10%水酸化ナトリウム水溶液を加えたのちエーテルで抽出する。エーテル抽出物と(A)を合わせ、無水芒硝で乾燥後、溶媒を減圧除去し、残渣を減圧蒸留して4aを得た。収率33.4 g (81%)。沸点150—152°C/15 mmHg。

2-(*N*-Alkyl-*N*-phenylamino)ethanesulfonyl Fluoride (3) *N*-メチルアニリン (37.8 g, 0.35 mol), トリエチルアミン (38.9 g, 0.38 mol) を170 mlの無水ベンゼンに溶解し、これに28 mlの無水ベンゼンに溶解した β -クロルエタンスルホニルクロリド (57.1 g, 0.38 mol) を室温で滴下した後、一昼夜攪拌を続ける。反応後エーテルを加え、分離した有機層を水洗後、無水硫酸マグネシウムで乾燥する。溶媒を減圧除去した後残留物を減圧蒸留して*N*-メチル体(3a)を得た。収率58.3 g (69%)、沸点142—143°C/3 mmHg。同様に*N*-エチルアニリン (59.9 g, 0.49 mol), トリエチルアミン (54.3 g, 0.54 mol), β -クロルエタンスルホニルクロリド (79.8 g, 0.54 mol) より*N*-エチル体(3b)を得た。収率37.9 g (59.5%)、沸点120—125°C/25 mmHg。

2-(*N*-Ethyl-*N*-phenylamino)-*N,N*-dimethylethanesulfonamide (4b) 3b (8.3 g, 36 mmol) を20 mlのアセトンに溶解し加熱還流させる。この溶液中へ50%ジメチルアミン水溶液(3.6 g, 40 mmol)とアセトンの1:1溶液を滴下する。加えてから更に30分加熱還流を続けたのち冷却し、溶媒を減圧除去する。得られた残渣をシリカゲルカラム(流出液: ベンゼン)により分離、精製して淡黄色液体を得た。収率5.3 g (78%)。

Ethyl 2-(*N*-Alkyl-*N*-phenylamino)ethanesulfonate (4c, d) 3a (58.3 g, 0.27 mol) を45 mlの無水エタノールに溶解し、ナトリウムエタノレート溶液(金属ナトリウム6.3 g, 0.28 molと226 mlの無水エタノールより調製)を0—5°Cで滴下する。滴下後28°Cで更に2.5時間攪拌を続け、析出した沸化ナトリウムの沈殿を汙別後、汙液を減圧濃縮した。得られた残渣をベンゼンに溶解し、これを水で洗浄し、乾燥後濃縮するとはほぼ純粋の4cが得られた。収率49.8 g (76.6%)。

同様に、3b (37.9 g, 0.16 mol) を等モルのNaOEtで処理した後、得られた残渣を水-クロロホルム(2:1)混合液に溶解し、水層は更にクロロホルムで抽出した。有機層を無水芒硝で乾燥後、減圧除去して目的物を得た。収率30.7 g (73.6%)。

4,4'-Bis(dialkylamino)benzil (5) このFriedel-Crafts反応はすべて乾燥容器を用い、窒素気流下で行った。粉末にした無水塩化アルミニウム(2.9 g, 0.02 mol)を15 mlの無水二硫化炭素に懸濁させ、これに氷冷下滴下ロータよりエステル4a (20.7 g, 0.1 mol)を10分以内に加え、2 mlの無水二硫化炭素で滴下ロータを洗い流す。次いでこの混合物に5—10°Cで15 mlの無水二硫化炭素に溶解したオキザリルクロリド(2.1 g, 0.016 mol)を加え、固化した黒色物質を室温まで戻したのち100 mlの氷水を加えクロロホルムで抽出する。抽出物は8.5%塩酸で洗浄した後、乾燥、減圧濃縮する。得られたオイル状物質をアルミナカラムに乗せ、クロロホルムで流出させる。流出液を減圧濃縮し、次いで減圧蒸留して未反応物を留去させる。残渣をクロロホルムに溶解し、熱時で活性炭

TABLE IV. Products and Yields in the Friedel-Crafts Reaction of *N,N'*-Dialkylaniline with Oxarylchloride

Substrate (mmol)	Oxarylchloride (mmol)	Product (Yield)	mp (°C)
4a (100)	16	5a (5.2 g, 67% ^{a)})	— ^{b)}
4b (15)	8	5b (0.53 g, 12%)	— ^{b)}
4c (200)	40	5c (1.6 g, 8%)	173—179 (decomp.)
4d (120)	24	5d (0.64 g, 5%)	122—123 (decomp.)

a) Yield from oxarylchloride. b) Viscous liquid.

TABLE V. Products and Yields in the Cyclization Reaction of Benzil 5a—d with *p*-Hydroxybenzaldehydes and Ammonium Acetate

Benzils	Aldehydes	Products (Yields %)

5a (8 mmol)	R=H	1b (78)
5a (10 mmol)	OMe	1c (65)
5b (0.43 mmol)	H	1f (52)
5b (0.50 mmol)	OMe	1g (54)
5c (0.98 mmol)	OMe	1h (93)
5d (180 mmol)	OMe	1i (11)

処理して脱色後、濃縮してシリカゲルカラムにかける。ベンゼン-アセトン (10 : 1 w/w) で流出後、黄色の成分を集めて濃縮するとほぼ純粋の目的物 **5a** が得られる。同様にスルホンアミド (**4b**) 及びスルホンエステル (**4c, d**) よりベンジル **5b, c, d** を得たが、反応時のモル数、収率等を Table IV にまとめて掲げた。尚 **5b** は **5a** と同様に処理したが、**5c** と **5d** は反応後のクロロホルム抽出物の精製を次のごとく行った。すなわち粗精製物をフロリジカラムに乗せ、大量のクロロホルムで流出させ、流出物を濃縮後、クロロホルム-エーテルで処理して結晶の目的物を得た。

Water-Soluble Lophine Derivatives (1) ベンジル **5** のイミダゾールへの変換反応は Silversmith の方法^{8a)} に準じて行った。すなわち、各種ベンジル (**5a—d**)、3,3-dialkyl-4-hydroxybenzaldehyde、酢酸アンモニウム、及び氷酢酸を 1 : 1 : 10 : 1000 (モル比) の割合で混合し、2 時間加熱還流させる。**1b, c, f, g** 合成時にはこの酢酸溶液を 10 倍量の水に注ぎ、水をデカント除去した後の粘性残渣をクロロホルムに溶解する。クロロホルム層は乾燥後、濃縮し、次いでクロロホルム-エーテルで処理して固体となし、最後にベンゼン-アセトンより再結晶させて目的物を得た。一方 **1h, i** 合成時は反応の酢酸溶液を減圧濃縮し、残渣を少量のメタノールに溶解し、これをフロリジカラムに乗せ、メタノールで流出した。濃縮した流出物をメタノール-無水アセトン処理して目的物の結晶を得た。ベンジル **5a—d** の反応量及び得られた最終のロフィン誘導体の収率はまとめて Table V に示した。尚得られたスルホン酸及びそのアミド誘導体の出発物質よりの全収率、融点、及び元素分析値は次の通りである。⁹⁾ **1f**: 4.4%, 100—102°C. Calcd C₃₈H₄₄O₅N₆S₂: C, 59.27; H, 6.33; N, 12.57. Found: C, 60.81; H, 6.73; N, 11.96. **1g**: 4.0%. 158—160°C. Calcd C₃₅H₄₆O₇N₆S₂: C, 56.67; H, 6.64; N, 11.53. Found: C, 56.63; H, 6.48; N, 10.94. **1h**: 2.2%. 178°C (decomp.). **1i**: 2.4%. 165°C (decomp.). **1h** 及び **1i** は吸湿が大きいため正確な分析値を得ることができなかった。

一方、ベンジル **5c, d** はこの環化反応で同時にエステルが加水分解されて遊離のスルホン酸 **1h, i** が得られたが、カルボン酸エステル誘導体のベンジル **5a** からはエステル **1b, c** がそれぞれ得られたので、これを加水分解してカルボン酸塩 **1d, e** を得た。すなわちエステル **1b** (0.5 g, 0.8 mmol), 95% エタノール (10 ml), 及び 10% (w/w) 水酸化ナトリウム水溶液 (0.1 ml) の混合物を 2 時間加熱還流させる。室温まで冷却した後、溶媒を減圧除去し、得られた粘性残渣をアセトンで処理すると固体が得られるので、これを水-エタノール (1 : 1) で再結晶させて目的物 **1d** を得た。収率 0.42 g (85%)。同様にエステル **1c** (0.57 g, 1 mmol) より目的物 **1e** を 0.51 g (収率 92%) 得た。**1d, 1e** の出発物質よりの全収率、融点、及び元素分析値は次の通りである。⁹⁾ **1d**: 14.1%. >300°C. Calcd C₂₉H₂₃N₄O₇Na₂: C, 62.37; H, 5.02; N, 10.04. Found: C, 63.01; H, 5.21; N, 9.98. **1e**: 10.6%. >300°C. Calcd C₃₁H₃₂N₄O₇Na₂: C, 60.19; H, 5.18; N, 9.06. Found: C, 61.72; H, 5.32; N, 10.34.

分析実験 Uricase (0.92 U/mg) 及び POD (8×10⁵ U/mg) は Boehringer 製のものを、正常プール血清 (ネスコール X) は日本商事のものを、その他の分析試薬は市販特級品又はそれに準じたものを使用した。また分光光度計は Shimadzu UV-210A を用いた。分析には主として次の組成の試薬を調製した。

1) ホウ酸緩衝液 (pH 6.1)——ホウ砂 1.25 g, リン酸二水素カリウム 6.0 g を 500 ml の精製水に溶解し assay buffer とした。

2) 1 U/Test POD 溶液——POD 2.5 mg を 100 ml の assay buffer に溶解したものを保存液とし、用時 10 倍

希釈した。

3) 0.5 U/Test Uricase 溶液——Uricase 54.4 mg を 100 ml の assay buffer に溶解，用時調製した。

4) 色素溶液——色素の安定性及び過酸化水素の検量線作成までは 50 μ M になるよう，尿酸分析には終末濃度が 200 μ M になるよう調製した。

5) 10 mg/dl 尿酸標準液——尿酸 50 mg，炭酸リチウム 40 mg を 100 ml の精製水に溶解して 50 mg/dl 原液を調製し，これを用時 5 倍希釈した。

血清尿酸定量法 試薬 2), 3), 4) をそれぞれ等容積混合した溶液 3 ml を分取し，37°C で 5 分間予備加温した後，血清又は各種尿酸標準液 20 μ l を加え 37°C で 5 分間加温した後，640 nm の吸光度を測定した。

引用文献及び注

- 1) 本研究の一部はすでに日本薬学会第 101 年会に発表済みである。
- 2) 著者の一部は生成したアラントインを尿素窒素の定量試薬であるジアセチルモノオキシム-チオセミカルバジドで定量した血清尿酸定量法を開発している。H. Yuki, T. Yajima, H. Kawasaki, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 3375 (1980).
- 3) a) E. F. Silversmith, U.S. Patent, 3 297 710 (1967); b) B. Y. Blusy, 特許公報，昭 53-26188 (1978).
- 4) B. Radzizewski, *Ber.*, **10**, 321 (1877).
- 5) G. M. Dapper, *Clin. Chem.*, **28**, 1159 (1982).
- 6) J. J. Kruntak, R. D. Burpitt, W. H. Moor, J. A. Hyatt, *J. Org. Chem.*, **44**, 3847 (1979).
- 7) C. Tuzun, M. Ogliaruso, E. I. Becker, *Org. Syn., Coll. Vol.* **3**, 111 (1955).
- 8) フェノール，ジエチルメタトルイジン，ジエチルアニリン，及び *N*-エチル-*N*-スルホプロピルメタトルイジン等と比較した。
- 9) 得られた化合物は空気酸化を受け易く，そのため満足すべき元素分析値を得ることができなかった。