薬 学 雑 誌
YAKUGAKU ZASSHI
86 (8) 678 ~ 682 (1966)

UDC 543.422.5.062 : 547.495.6

110. 百瀬 勉,^{*1} 大倉洋甫, 今泉雄久^{*2}: ジアセチルモノオキシム-グルクロノ
ラクトン試薬による血液中の尿素窒素の微量定量 (有機分析 第63報^{*3})

Tsutomu Momose,^{*1} Yosuke Ohkura, and Toshihisa Imaizumi^{*3}: Micro-
determination of Urea Nitrogen in Blood with Diacetyl
Monoxime-Glucuronolactone Reagent.

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University^{*1} and
Clinical Laboratory, Kyushu Central Hospital^{*2})

A micromethod for determination of urea nitrogen in blood with diacetyl monoxime-glucuronolactone reagent was proposed using 0.02 ml. of sample without using any special equipment. Simplicity of the procedure and stability of the color produced permit analysis of a large number of samples at one time.

The outline of the procedure is as follows. To 0.58 ml. of water in a centrifuge tube, 0.020 ml. of blood or serum is added and mixed, 0.20 ml. of sodium tungstate solution (5%) is then added and mixed. To this mixture 0.20 ml. of aluminum potassium sulfate solution (4.8%) is added, mixed well, and centrifuged. From this solution, 0.50 ml. of the supernatant clear solution is pipetted into a test tube, 0.50 ml. of diacetyl monoxime-glucuronolactone solution (1% each in 5% acetic acid) and 3.0 ml. of phosphoric acid solution (550 ml./L.) are added successively, and mixed. The tube is heated in a boiling water bath for 40 minutes, cooled in running water, and the absorbance is read at 475 m μ against a reagent blank.

(Received September 15, 1965)

血液中の尿素窒素の微量定量法には、尿素にウレアーゼを作用させ発生するアンモニアをインドフェノール反応により発色させ比色する方法、¹⁻³⁾ α -イソニトロソプロピオフェノンにより発色させる方法、⁴⁾ およびジアセチルモノオキシムにより酸性で発色させる方法^{5,6)} などが報告されている。これらは在来の発色法を微量の試料で定量しうるように改良した方法で有用ではあるが、試薬の数が多く操作が繁雑であるか、呈色が不安定であるか、あるいは特殊な器具を必要とする。

著者等はさきにジアセチルモノオキシムによる尿素窒素の定量法において、D-グルクロノラクトンまたはグルクロン酸アミドをあらかじめ反応液に加え、リン酸酸性で反応を行なうと光線に安定で強度の強い呈色が得られることを知り、これを応用して血液、血清および尿中の尿素窒素の定量法を提出した。⁷⁾ 今回、この発色法を利用すると微量の尿素でも測定に十分な呈色強度が得られることがわかり、血液または血清 0.02 ml. を用いる微量法の検討を行なったところ、特別な器具を使用することなく目的が達せられることが判明した。

実 験 の 部

試 薬 ジアセチルモノオキシム-グルクロノラクトン液: ジアセチルモノオキシム (特級品をそのまま使用してもよいが、特級品を活性炭のクロマトグラフィーによって精製したものを使用した方が試薬溶液の保存

^{*1} Katakasu, Fukuoka.

^{*2} Kowaki, Shiobaru, Fukuoka.

^{*3} 第 62 報: 臨床検査 投稿中.

1) J. K. Fawcett, J. E. Scott: J. Clin. Pathol., **13**, 156 (1960).

2) R. L. Searcy, G. S. Gough, J. L. Korotzer: Am. J. Med. Technol., **27**, 255 (1961).

3) R. L. Searcy, F. M. Cox: Clin. Chim. Acta, **8**, 810 (1963).

4) G. V. de Nieves, R. L. Pike: Anal. Biochem., **2**, 174 (1961).

5) W. T. Caraway, H. Fanger: Am. J. Clin. Pathol., **26**, 1475 (1956).

6) M. L. Moore, C. D. West: Am. J. Med. Technol., **28**, 309 (1962).

7) T. Momose, Y. Ohkura, J. Tomita: Clin. Chem., **11**, 113 (1965).

性がよい) 5.0 g., D-グルクロノラクトン 5.0 g., AcOH (特級) 25 ml. を H_2O に溶かして 500 ml. とし遮光して保存する.

リン酸液: H_3PO_4 (特級, 85~90%) 550 ml. を H_2O でうすめて 1000 ml. とする.

ダングステン酸ナトリウム液: $Na_2WO_4 \cdot 2H_2O$ (特級) 5.0 g. を H_2O に溶かして 100 ml. とする.

硫酸アルミニウムカリウム液: $KAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$ (特級) 4.8 g. を H_2O に溶かして 100 ml. とする.

操作法 遠心沈降管に H_2O 0.58 ml. を入れ, これに血液または血清 0.020 ml. を Sahli のピペットを用いて加え溶解させる. つぎに Na_2WO_4 液 0.20 ml. を加えてふりまぜ, ついで $KAl(SO_4)_2$ 液 0.20 ml. を加え, 遠心沈降管の底をたたきながら均一になるまでふりまぜたのち, 遠心分離する. 上澄液 0.50 ml. を試験管 (15×150 mm.) にとり, ジアセチルモノオキシム-グルクロノラクトン液 0.50 ml., H_3PO_4 液 3.0 ml. を加えてふりまぜたのち, 沸騰水浴中で 40 min. 加熱する. 流水で冷却後, H_2O 0.50 ml. を除蛋白上澄液と同様に処理して得たブランクを対照として 475 m μ で吸光度を測定し, 検量線より尿素窒素量を求める.

検量線の作成 乾燥した尿素 429 mg. を H_2O に溶かして 1000 ml. とし, 尿素窒素として 200 μ g./ml. の液を得る. この液を希釈し, 1, 2, 3, 5, 10, 15 および 20 μ g./ml. の尿素窒素液を作る. この液各 0.50 ml. につき上記操作法における除蛋白上澄液と同様に発色操作および吸光度の測定を行ない, 検量線を作る. 血液中の尿素窒素量 (mg./dl.) は尿素窒素液の μ g./ml. の数値の 5 倍となる (Fig. 1).

結果および考察

まず発色条件の検討の結果について述べる.

本法の呈色液の吸収スペクトルは Fig. 2 に示すように 475 m μ に吸収極大を有するかなり鋭い曲線である. ジアセチルモノオキシム濃度の発色におよぼす影響については, Fig. 3 に示すように尿素窒素量が増加するにつれて, その影響は次第に大きくなるが, 通常血液に見いだされる量では試薬濃度の影響はほとんどない. したがって尿素窒素量が大きいときの最適濃度である 1% を採用することにした. 安定な呈色を得るに必要な D-グルクロノラ

Fig. 1. Calibration Curve

Fig. 2. Absorption Curves

1. 0.50 ml. of urea nitrogen solution (20 μ g./ml.) was treated in the same way as the preparation of calibration curve.
2. 0.50 ml. of H_2O was treated as above for the blank.

クトンの濃度もジアセチルモノオキシムの場合と同様に 1% が最適で, 尿素窒素量が大きくなるにつれてその影響も大きくなる (Fig. 4).

上記の事実からわかるように試薬溶液中のジアセチルモノオキシムおよび D-グルクロノラクトン濃度はともに多少変動しても通常検査室で遭遇する尿素窒素量では呈色液の吸光度のバラツキはほとんどない. このことは検量線の再現性がきわめてよいことの一原因であると思われる. またこの試薬溶液はきわめて安定で, 14 か月経過した試薬溶液について調べたところ, 遮光保存したものについては, ブランクの水に対する吸光度が新たに調製した試薬のそれに比較し 10% 程度大きくなるだけで発色能力の減退は認められなかった. 室内散光下に 14 か月放置したものは, かすかに黄色を呈しており, ブランクが遮光保存したものと比較し約 2 倍となるが, 発色能力の低下はまったく認められなかった.

リン酸濃度の影響については, Fig. 5 に示すように尿素窒素量が低いところでは特級リン酸の 50~55% の間でほぼ同一の吸光度を与えるが, 窒素量が大きくなるにつれて影響は大きくなり, 55% がもっとも強い呈色を与えるようになる.

したがって 55% を採用することにした. 加熱時間については, 窒素量の低いところでは 40 分で最強の呈色を与えるが, 30~50 分の間では事実上吸光度の差はない. 窒素量が大きくなるにつれて 50 分が最適となる. しかし血液中の尿素窒素量が 50 mg./dl. 以上となることは比較的少ないので 40 分を加熱時間として選んだ.

Fig. 3. Effect of the Concentration of Diacetyl Monoxime on the Color Development

- 1: 20 µg./ml. urea nitrogen
- 2: 15 µg./ml. urea nitrogen
- 3: 10 µg./ml. urea nitrogen
- 4: 5 µg./ml. urea nitrogen
- 5: 3 µg./ml. urea nitrogen
- 6: 2 µg./ml. urea nitrogen
- 7: 1 µg./ml. urea nitrogen
- 8: blank

Fig. 4. Effect of the Concentration of D-Glucuronolactone on the Color Development

- 1: 20 µg./ml. urea nitrogen
- 2: 15 µg./ml. urea nitrogen
- 3: 10 µg./ml. urea nitrogen
- 4: 5 µg./ml. urea nitrogen
- 5: 3 µg./ml. urea nitrogen
- 6: 2 µg./ml. urea nitrogen
- 7: 1 µg./ml. urea nitrogen
- 8: blank

Fig. 5. Effect of the Concentration of Phosphoric Acid on the Color Development

- 1: 20 µg./ml. urea nitrogen
- 2: 15 µg./ml. urea nitrogen
- 3: 10 µg./ml. urea nitrogen
- 4: 5 µg./ml. urea nitrogen
- 5: 3 µg./ml. urea nitrogen
- 6: 2 µg./ml. urea nitrogen
- 7: 1 µg./ml. urea nitrogen
- 8: blank

a) The concentration of commercial phosphoric acid (JIS special grade) was taken arbitrarily as 100%.

Fig. 6. Effect of the Heating Time on the Color Development

- 1: 20 µg./ml. urea nitrogen
- 2: 15 µg./ml. urea nitrogen
- 3: 10 µg./ml. urea nitrogen
- 4: 5 µg./ml. urea nitrogen
- 5: 3 µg./ml. urea nitrogen
- 6: 2 µg./ml. urea nitrogen
- 7: 1 µg./ml. urea nitrogen
- 8: blank

上記のように発色するとき $2 \mu\text{g./ml.}$ の尿素窒素 (血液中では正常人平均尿素窒素量である 10 mg./dl. に相当) で吸光度が約 0.13 で測定には十分である。

呈色の安定性については, 前報の場合と同様に, 明るい室内散光下で 1 時間にほぼ 1.5% の割合で吸光度が低下するが, 普通の室内散光では實際上吸光度の低下は測定誤差の内に含まれ, 多数の検体の吸光度を連続して測定するのに支障はない。なお, 遮光すると 2 時間までは吸光度の低下はまったく認められなかった。

つぎに血液および血清について検討した結果を述べる。

試料の除蛋白は前報と同様にタングステン酸ナトリウムと硫酸アルミニウムカリウムの組合わせ⁸⁾で行ない, その使用量は操作法のところで記した量が最適であった。

尿素窒素量既知の血液あるいは血清に尿素窒素の一定量を加えて回収試験を行なった結果を Table I に示す。この表から明らかなように尿素の回収率は良好である。

TABLE I. Recovery of Added Urea (Mean urea nitrogen value of triplicate determinations)

Sample		Initial urea nitrogen (mg./dl.)	Urea nitrogen added (mg./dl.)	Total urea nitrogen found (mg./dl.)	Recovery (%)
Blood	1	8.3	{ 7.5	15.7	99
			{ 15.0	23.7	103
	2	12.0	{ 7.5	19.5	100
			{ 15.0	26.7	98
	3	9.0	{ 7.5	16.8	102
			{ 15.0	24.0	100
Serum	1	6.8	{ 7.5	14.5	103
			{ 15.0	22.0	101
	2	7.2	{ 7.5	14.8	101
			{ 15.0	22.2	100
	3	7.8	{ 7.5	15.0	96
			{ 15.0	23.0	101
	4	11.6	{ 7.5	19.0	99
			{ 15.0	26.7	101
	5	24.2	{ 7.5	31.7	100
			{ 15.0	39.5	102
	6	29.0	{ 7.5	36.3	97
			{ 15.0	44.0	100
mean					100

血液に存在するとされている物質を尿素窒素量既知の血液に加え, その発色に及ぼす影響を調べたところ, 以下のものは 250 mg./dl. の割合で血液に存在しても影響がなかった。すなわち, クレアチニン, クレアチン, 尿酸, アンモニア, ヒスタミン, コリン, コンドロイチン, グルタチオン, ニコチン酸, 乳酸, β -オキシ酪酸, 2-ケトグルタル酸, ブドウ糖, 果糖および 17 種のアミノ酸がこれである。アロキサン, アラントイン, シトルリンなどのウレイド化合物, およびトリプトファンは本法により弱い呈色を与えるが, その濃度を血液中 10 mg./dl. にするとその影響は認められなくなる。したがって事実上障害となる物質は発見されなかった。血液の凝固防止剤あるいは保存剤として用いられるシュウ酸塩, クエン酸ナトリウム, フッ化ナトリウムおよび EDTA は本法をまったく障害しないが, チモール, クレゾールなどのフェノール類は尿素の発色を妨害し少し低い値を与えるので使用することはできない。

本法を前法の 0.1 ml. の試料を用いる方法と平行試験を行なったところよく一致した値を与える (Table II)。

本法の精度を知るため, 血液および血清を用い, 各試料について 60 回定量を行なって標準偏差を求め, 変動係数を算出した。その結果を Table III に示す。本法は微量法にもかかわらず精度は良好である。

8) T. Momose, Y. Yano, K. Ohashi: Chem. Pharm. Bull., 11 968 (1963).

TABLE II. Parallel Tests with the Previously Established Method⁷⁾ (Mean urea nitrogen value (mg./dl.) of triplicate determinations)

Sample		Proposed method	Previously established method
Blood	1	8.5	8.5
	2	12.0	12.5
	3	9.0	9.5
	4	16.3	16.0
	5	33.8	34.0
Serum	1	7.5	7.3
	2	8.0	8.3
	3	7.0	7.3
	4	7.3	7.5
	5	11.6	11.3
	6	17.8	17.5
	7	21.8	21.0
	8	24.5	25.0
	9	34.0	34.0
	10	84.7	85.0

TABLE III. Precision of the Proposed Method for Urea Nitrogen (Calculated from the data of 60 determinations)

Sample		Mean value (mg./dl.)	Standard deviation	Coefficient of variation (%)
Blood	1	11.6	0.31	2.7
	2	33.0	0.38	1.2
Serum	1	6.3	0.24	3.8
	2	7.2	0.24	3.3
	3	7.8	0.24	3.1
	4	17.8	0.26	1.5
	5	21.3	0.32	1.5
	6	84.7	1.31	1.5

本法は上述のように微量の試料中の尿素窒素量を特別な器具を使用せず、簡単な操作で、かつ精度よく定量できるので、日常分析に適するものと思われる。

終わりに、一部実験に便宜をはかっていただいた九州中央病院 赤星一郎、山崎晴一郎の両博士、御協力を得た同病院検査室の諸氏、吸収スペクトルを測定された九州大学薬学部 松井久義、添田恭子の両氏、またグルクロノラクトンを提供された中外製薬株式会社に感謝します。

九州大学薬学部、九州中央病院検査室