

## 報 文

7-クロロ-4-ニトロベンゾフラザンによる  
尿中の尿酸の吸光光度定量

田口 清水, 坂口 武一\*

(1978年1月6日受理)

7-クロロ-4-ニトロベンゾフラザン (以下 NBD-Cl と略記) による尿酸の新発色反応を見だし、尿中の尿酸の吸光光度定量への応用を検討した。

尿酸を NBD-Cl と pH 8.20 で反応させた後、550nm で比色する。尿試料の空試験値は硫酸亜鉛の添加により、尿酸をマスクングすることにより求めた。検量線は尿酸濃度 0~0.125mg/10 ml の間でベールの法則に従った。見掛けのモル吸光係数は  $1.19 \times 10^4$  であった。平均値  $\pm 2 \times$  標準偏差は (157.0  $\pm$  1.54)mg/dl, (110.3  $\pm$  2.7)mg/dl 及び (20.3  $\pm$  1.6)mg/dl であり、本法とウリカーゼ法との相関係数は 0.994 であった。

## 1 緒 言

尿酸の定量法にはウリカーゼを用いる酵素法<sup>1)~3)</sup>、及びリンタングステン酸などを用いる酸化還元法<sup>4)5)</sup>がある。7-クロロ-4-ニトロベンゾフラザン (NBD-Cl) は、アミノ酸<sup>6)</sup>あるいはアミン<sup>7)</sup>のけい光試薬として用いられている。今回、NBD-Cl と尿酸がアルカリ性において特長のある赤紫色を呈する新発色反応を見だした。この反応を利用して尿酸の吸光光度定量法について検討を行い、尿中の尿酸の定量に應用しうることを確認した。

## 2 試薬及び装置

## 2.1 試 薬

NBD-Cl 溶液: NBD-Cl は Boulton ら<sup>8)</sup>の方法により合成した。このもの 0.5g をメタノールに溶かし 100 ml とする。数か月は安定である。

緩衝液: 0.1 M ホウ酸水溶液を 0.1 M 水酸化ナトリウム水溶液で pH 8.20 に調整する。

硫酸亜鉛溶液: 20 mM 硫酸亜鉛水溶液

ホウ酸ナトリウム溶液: 0.05 M ホウ酸ナトリウム

尿酸標準液: 尿酸 (メルク社生化学用) 50mg と炭酸ナトリウム (無水) 30mg を 60°C の温水約 100 ml に溶解後、水で正確に 250 ml とする。冷蔵庫に保存し、約 1 か月は安定である。なお正確に 50 倍に希釈し 292

nm における吸光度を調べ、尿酸の 292nm におけるモル吸光係数 12500<sup>1)</sup> より計算し、標準液の濃度を確かめた。

ウリカーゼ溶液: ウリカーゼ (2 mg/ml, 9 単位/mg) 溶液 (ベーリンガー社) をそのまま用いた。冷蔵庫に保存する。

試薬類は特記しない限り市販の特級品を用いた。水はすべてイオン交換水を蒸留したものを用いた。

## 2.2 装 置

吸光度の測定: 日立 UV-Vis 181 型 (10 mm ガラス又は石英セル) を使用した。

吸収スペクトルの測定: 日立 EPS-3T 自記分光光度計 (10 mm ガラスセル) を使用した。

pH の測定: 日立掘場 M-5 型を用いた。

恒温そう: 大洋科学工業インキュベーター MI02 型を黒ビニールシートでしゃ光して使用した。

## 3 定量操作

尿を水で 100 倍に希釈した検液 (尿酸として 2.5mg/dl 以下) 5 ml, 緩衝液 2 ml, 次いで NBD-Cl 溶液 0.5 ml を 10 ml のかっ色メスフラスコに採り、しゃ光下 60°C, 30 分間インキュベーション後、氷水に浸し室温付近まで冷やし、水で 10 ml とする。対照液として、同一希釈尿 5 ml, 緩衝液 2 ml, 硫酸亜鉛溶液 1 ml, ホウ酸ナトリウム溶液 0.4 ml, 次いで NBD-Cl 溶液 0.5 ml を順次 10 ml のかっ色メスフラスコに採り、前記と同様

\* 千葉大学薬学部: 千葉県千葉市弥生町 1-33

にインキュベーションし、定容とした後、遠沈管に移し 5000 回転で 5 分間遠心分離し、その上澄液を対照液として 550nm で吸光度を測定する。あらかじめ作成した検量線より尿酸濃度を求め、その値を 100 倍し、原尿中の尿酸濃度とする。

#### 4 定量条件の検討

##### 4.1 吸収スペクトル

尿酸と NBD-Cl の発色の吸収スペクトルは Fig. 1 に示すように pH により変化し、アルカリ性では赤紫色、弱酸性では青緑色、又強酸性では赤色を示し、少なくとも 3 段階の平衡状態をとることをうかがわせる。尿試料の定量条件下における発色の吸収スペクトルは Fig. 2 に示す。測定波長は空試験液の吸収の少ない 550 nm を選定した。

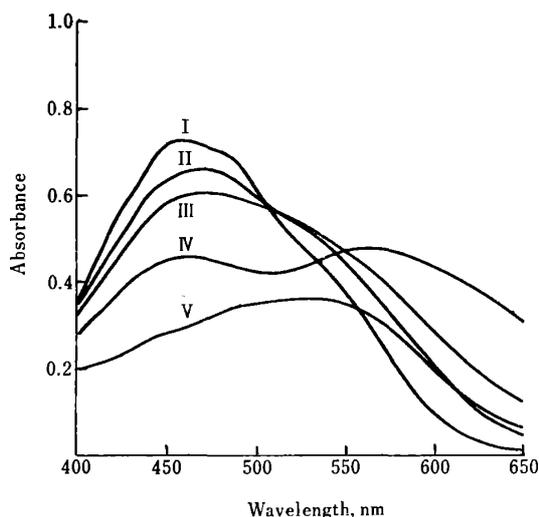


Fig. 1 Absorption curves of reaction mixtures between uric acid and NBD-Cl

Reaction was done by the proposed procedure, but concentration of uric acid was 15 times to NBD-Cl in molarity. After the reaction pH was adjusted. pH—I: 11.50, II: 8.20, III: 7.57, IV: 4.29, V: 2.25; Reference: Water

##### 4.2 NBD-Cl 濃度と反応時間

反応温度を 60°C とし、pH 8.20 で NBD-Cl 濃度の変化による反応時間と発色の状態は Fig. 3 に示すように、尿試料及び尿酸溶液ともに NBD-Cl 濃度 0.3 g/dl では 50 分経過しても一定の発色を示さないが、0.5 g/dl では (25~40) 分間で一定値を示した。定量条件としては NBD-Cl 濃度 0.5 g/dl で 60°C, 30 分間反応することとした。

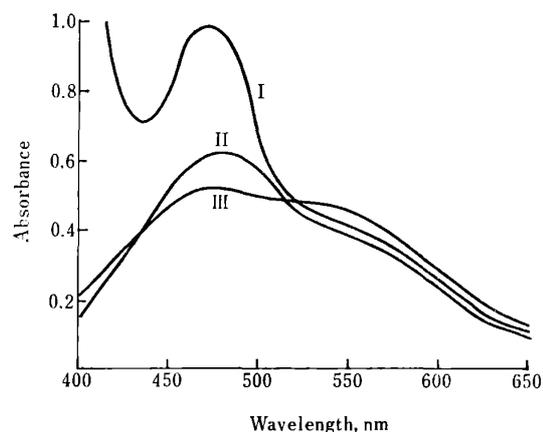


Fig. 2 Absorption curves of reaction mixture between urine and NBD-Cl

I: Urine, reference: water; II: The same sample of curve I; III: Uric acid 1.26 mg/dl; Reference for II and III; Blank solution prepared by the proposed procedure

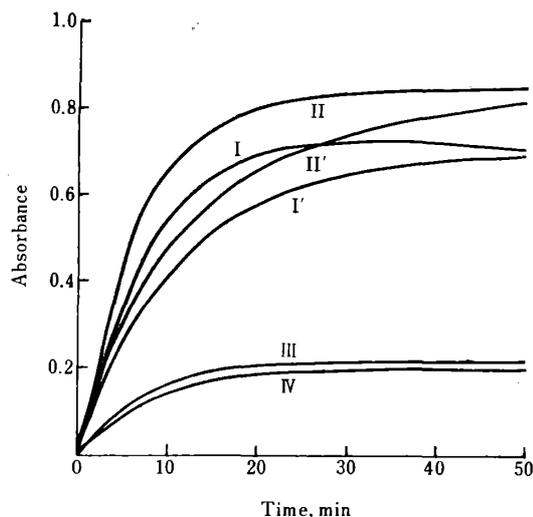


Fig. 3 Effect of reaction time and concentration of NBD-Cl

I: Uric acid 1.5 mg/dl, NBD-Cl 0.5 g/dl; I': Uric acid 1.5 mg/dl, NBD-Cl 0.3 g/dl; II: Urine, NBD-Cl 0.5 g/dl; II': Urine, NBD-Cl 0.3 g/dl; III: Urine, NBD-Cl 0.5 g/dl; IV: Uric acid 0.38 mg/dl, NBD-Cl 0.5 g/dl

##### 4.3 pH の影響

定量操作の条件で、pH のみを変化させ発色の変化を調べると Fig. 4 に示すように、pH 8.00 以上では吸光度は一定値を示した。pH が高まると空試験値が高くなり、又発色の安定性も悪くなるので、定量操作は pH 8.20 で行った。

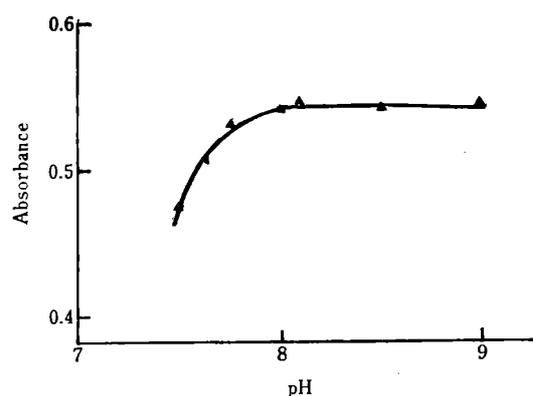


Fig. 4 Effect of pH  
Uric acid : 1.9 mg/dl

#### 4.4 硫酸亜鉛濃度と尿の空試験値との関係

尿を種々の緩衝液でろ紙クロマトグラフィーを行い NBD-Cl との発色を調べると、尿酸のスポット以外に赤紫色の発色は認められないが黄かっ色の発色をするものは認められる\*。測定波長を 550nm としても空試験値の影響は無視できない。尿酸は亜鉛塩の生成により定量操作の条件下では完全に発色が阻害されることを確認したので、尿試料につき亜鉛濃度と発色の低下を調べると、Fig. 5 に示すように亜鉛量が一定量以上では一定の吸光度を示した。この一定値を尿の空試験値とした。定量法としては 100 倍希釈尿 5 ml につき 20 mM 硫酸亜鉛 1 ml を加え、又 pH の調整のため 0.05 M ホウ酸

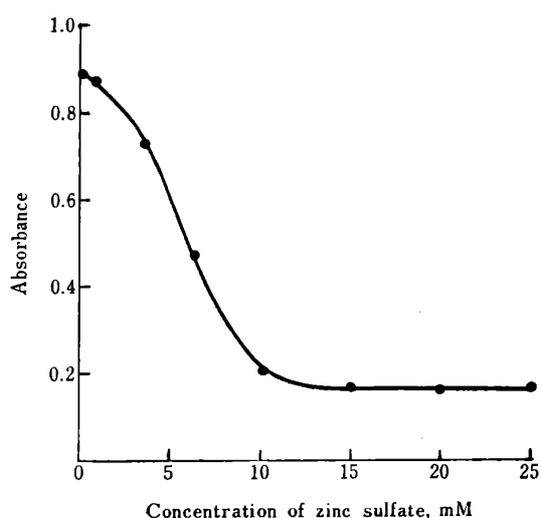


Fig. 5 Effect of zinc sulfate for urine  
Absorbances was obtained by the proposed procedure for the blank solution. Reference : Water

\* 日本薬学会第 97 年会において一部発表。

ナトリウム溶液 0.4 ml を加えた後 NBD-Cl を加え反応させ、沈殿を遠心分離しその上澄液を空試験液とした。この空試験値の採用は、後述するウリカーゼ法との良好な相関を示すことから妥当であるといえる。

#### 4.5 発色の安定性

**4.5.1 経時変化** 定量操作後の検液を室温で暗所に放置し、発色の安定性を調べると、Fig. 6 に示すように反応後 30 分間は吸光度の変化は認められなかった。

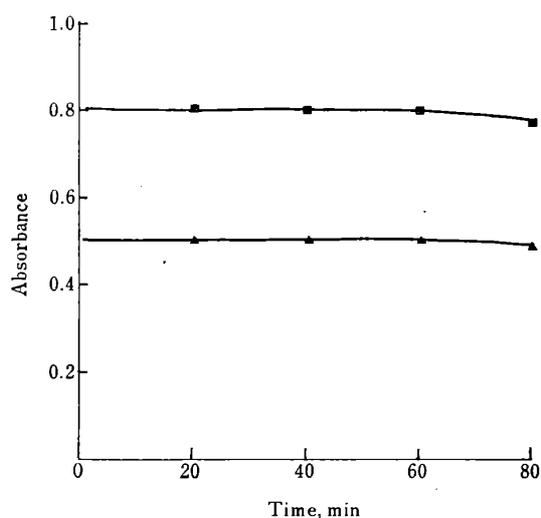


Fig. 6 Stability of the coloration  
—■— Uric acid 2.25 mg/dl; —▲— Uric acid 1.4 mg/dl

**4.5.2 光による影響** 定量操作中又は操作後もしゃ光しない場合はしゃ光した場合に比べ吸光度の低下が認められたので、定量操作は黒ビニールシートでしゃ光するなどして、できるだけ光を避けた状態で操作した。

#### 4.6 精度及び回収率

尿試料につき繰り返し実験 (各例につき 10 回) の平均値  $\pm 2 \times$  標準偏差は (157.0  $\pm$  1.54) mg/dl, (110.3  $\pm$  2.7) mg/dl 及び (20.3  $\pm$  1.6) mg/dl であった。尿に尿酸を 60 mg/dl, 30 mg/dl 及び 15 mg/dl 添加した場合の回収率は (98~103)% であった。

#### 4.7 障害物質の検討

原尿中にアスコルビン酸 5 mg/dl, クレアチニン 0.5 g/dl, 牛血清アルブミン 0.5 g/dl, 尿素 5 g/dl, アデニン, グアニン, キサンチン, ヒポキサンチン, ウラシル及びシトシン各 10 mg/dl, アラントイン 5 mg/dl 以下の添加に対して障害は認められなかった。

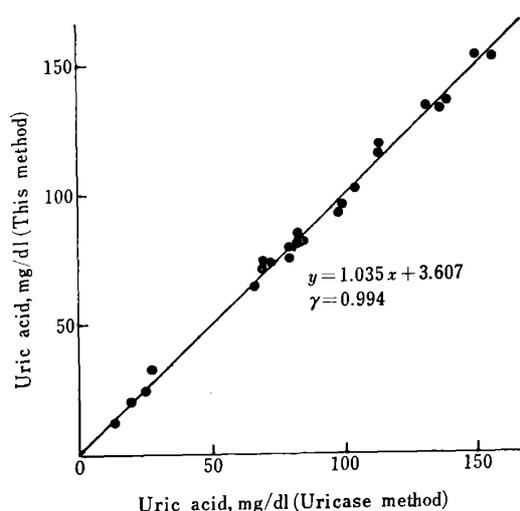


Fig. 7 Correlation between results obtained by this method and the uricase method for urines

#### 4.8 本法とウリカーゼ法との相関

尿試料につき本法とウリカーゼ法<sup>1)</sup>とによる 24 例についての結果の相関性を求めると、回帰式  $y=1.035x+3.607$ 、及び相関係数  $r=0.994$  で良好な相関を示した。

#### 4.9 検量線

標準尿酸溶液を 3 に述べた定量操作に従って検量線を求めると尿酸濃度 0~0.125 mg/10 ml の範囲で原点を通る直線を示した。検量線より求めた見掛けのモル吸光係数は  $1.19 \times 10^4$  であった。

### 5 結 語

尿酸と NBD-Cl との発色反応を応用して、尿中の尿酸の吸光光度定量法を確立した。本実験はほぼ健康体と見なせる人尿につき行ったものである。

本研究に当たり、実験の一部を御協力くださった鈴木葉子氏に謝意を表す。又、尿を快く提供くださった諸兄諸嬢に厚く御礼申し上げる。

(1976 年 10 月、本会第 25 年会において一部講演)

### 文 献

- 1) L. Liddle, J. E. Seegmiller, L. Lester : *J. Lab. Clin. Med.*, **54**, 902 (1959).
- 2) P. Kamoun, G. Lafourcad, H. Jerome : *Clin. Chem.*, **22**, 964 (1976).
- 3) R. M. White, R. E. Cross, J. Savory : *ibid.*,

**23**, 1538 (1977).

- 4) R. J. Henry, C. Sobel, J. Kim : *Am. J. Clin. Pathol.*, **28**, 152 (1957).
- 5) L. G. Morin : *Clin. Chem.*, **20**, 51 (1974).
- 6) P. B. Ghosh, M. W. Whitehouse : *Biochem. J.*, **108**, 155 (1968).
- 7) J. Monforte, R. J. Bath, I. Sunshine : *Clin. Chem.*, **18**, 1333 (1972).
- 8) A. J. Boulton, P. B. Ghosh, A. R. Katritzky : *J. Chem. Soc., (B)* **1966**, 1004.

☆

#### Spectrophotometric determination of uric acid in urine with 7-chloro-4-nitrobenzofrazane.

Kiyomi TAGUCHI and Takeichi SAKAGUCHI (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University, 1-33, Yayoi-cho, Chiba-shi, Chiba)

A characteristic color reaction between uric acid (UA) and 7-chloro-4-nitrobenzofrazane (NBD-Cl) was applied to the determination of UA in urine. The recommended procedure is as follows. Take 5 ml of 100 times diluted urine with water, 2 ml of 0.1 M borate buffer (pH=8.20) and 0.5 ml of 0.5% NBD-Cl methanolic solution into a 10 ml brown volumetric flask. Allow to stand for 30 min at 60°C under a light intercepting cover. Make up to 10 ml with water after chilling to room temperature and measure the absorbance at 550 nm in a 10 mm cell referring to the blank solution. The reaction mixture of the blank solution is prepared as mentioned for the sample solution except an addition of 1 ml of 20 mM zinc sulfate solution and 0.4 ml of 0.05 M borax solution before addition of the NBD-Cl solution. The reaction mixture is centrifuged after making up to 10 ml with water and the supernatant is used for the blank solution. The calibration curve followed Beer's law over the range 0~0.125 mg/dl of UA. The apparent molar absorptivity was obtained to be  $1.19 \times 10^4$  from the calibration curve. The coloration was stable within 30 min. Means  $\pm 2 \times$  standard deviations were (157.0  $\pm$  1.54) mg/dl, (110.3  $\pm$  2.7) mg/dl and (20.3  $\pm$  1.6) mg/dl. In comparison of this method with the uricase method, the regression equation was  $y=1.035x+3.607$  and correlation coefficient was 0.994. No interferences were observed below the concentration of 5 mg/dl of ascorbic acid, 0.5 g/dl of creatinine, 0.5 g/dl of bovine serum albumin, 5 g/dl of urea and 1 g/dl of glucose on a basis of undiluted urine.

(Received Jan. 6, 1978)

#### Keywords

7-Chloro-4-nitrobenzofrazane  
Spectrophotometry  
Uric acid  
Urine