

a. ウレアーゼ-インドフェノール法

【試薬】 ① ウレアーゼ試薬：EDTA-2Na 200 mg を精製水に溶かし、NaOH で pH を 7

前後に調整し、ウレアーゼ (Sigma type II) 粉末 50 mg を加え、精製水で 500 ml とする。

② フェノール試薬：フェノール (特級) 5.0 g とニトロプルシドナトリウム 25 mg を精製水に溶かして 500 ml とする。褐色瓶に入れ、氷室保存、数ヵ月安定。

③ アルカリ性次亜塩素酸試薬：水酸化ナトリウム 2.5 g を精製水約 300 ml に溶かし、ついで次亜塩素酸ナトリウム (和光純薬、有効塩素濃度 10%) 3 ml を加え、精製水を加えて全量 500 ml とする。褐色瓶に入れ、氷室保存、数ヵ月安定。

④ 30 mg/ml 尿素窒素標準液：乾燥した尿素 (特級) 6.43 g を秤量し、精製水を加えて 100 ml とする。第一化学、その他の製品がある。

⑤ 検量線：標準液を精製水で正確に希釈して 15, 30, 45, 60 mg/dl の標準液系列を作り、精製水 (盲検) および標準液系列をそれぞれ 10 μ l ずつ採取し、実施と同様にして吸光度を測定し、検量線を作成する。毎回の測定には精製水 (盲検) と 30 mgN/dl の標準液について実施すればよい。

【実施】 ① 3本の試験管 A, S, B を用意し、A に血清、S に 30 mg/dl 標準液、B (ブランク) に精製水をそれぞれ 10 μ l ずつとり、ついでウレアーゼ液 0.5 ml を加え、よく混和し、37°C に 15 分放置する (25°C の室温では 20 分、50~60°C では 5 分)。

② フェノール試薬 1.0 ml を加え、よく混和後、アルカリ性次亜塩素酸試薬 1.0 ml を加え、再び 37°C に 15~20 分放置する (室温では 30 分、50~60°C では 3~5 分)。

③ 精製水 7.0 ml を加え転倒混和する。このときの精製水の量は使用する分光光度計に応じ、吸光度目盛りの読みが 0.2~0.8 に入るようにする。

④ ブランクを対照に 560 nm で A, S の吸光度を測定し、それぞれ E_A , E_S とする。

【計算】 尿素窒素濃度 (mg/dl) = $(E_A/E_S) \times 30$

【注】 ① 発色はきわめて鋭敏であるから、精製水、試験管などの汚染に注意する必要がある。精製水を対照とした盲検の吸光度の読みが最大吸収波長 (625 nm) で、0.08 以上にならないようにする。

② 血漿でもよいが、抗凝固剤にアンモニウム塩を用いてはならない。

③ 黄疸血清 (ビリルビン 40 mg/dl 以下)、溶血血清の影響はほとんどない。

