胆汁色素に関する研究

第 二 編

胆汁中 Bilirubin 異性体の検討

岡山大学医学部第一内科(主任:小坂淳夫教授)

井 沢 徹 一

(昭和50年2月13日受稿)

緒 言

生体内の bilirubin は血色素を構造する protoporphyrin IX のa 位か期環して生ずる bilirubin IXa であることが一般にみとめられている.' しかしなが らβ 位、δ 位などでの開環の可能性については必ず しも否定されておらず,Gray, Petryka らは IXa 以外のものがクロム酸をもちいた酸化法ではみとめ られないとしながらも、Petryka⁴⁾ はその後 bili rubin の大量をもちいて検討し徴量の IXai以外の 型の bilirubin が生体内でも生成されることを認め た。1967年 Jackson らりは pyrrole とその関連物 質について mass spectrometry を用いた検討で, bilirubin についてもその解裂様式を記載した. 次い で1968年 Nichol ら いは哺乳類, 鳥類および海藻類 の胆汁色素について mass spectrometry をもちい て異性体構成の検索を行なっている.1971年近藤らりは oxyferrihem の IXα, IXβ 型を rat に用いた実験で IX8 型はあきらかに IXa 型に比して胆汁中に排泄 される量は極めて少量であること、また tetrapyrrole 構造となった際には IXa, IXB とも胆汁中に排泄 される量は差がないことを認めている。そこで著者 は発生機序の異なる各種肝疾患患者の胆汁中の bilirubin IX 異性体構造について Ostrow らりの方法で 精製した bilirubin をKuster'®) の方法で bilirubin dimethylester に合成し, thin layer chromatography でこれを分離,精製し mass spectrometry に導入し異性体の有無を確認しようと試みた.

I. 検索対象並びに検索動物

対象は岡山大学医学部第一内科入院中の患者でその構成は Table 1. の如くであり,診断は各種肝機能検査,腹腔鏡,肝生検などにより確定されたもの

Table 1. Materials

1.	Hepatitis acuta	2 cases
	Hepatitis chronica	4
	Liver cirrhosis	2
	Cholecystopathy	2
	Congenital jaundice	
	Gilbert's syndrome	1
	Dubin Johnson syndrome	1
	Normal	1
	total	13
2.	Gunn rat	5

である。実験動物として London 大学 B. H. Billing 博士より供用された Gunn rat の strain を使用し た

Ⅱ. 実験方法ならびに実験材料

1. 1) bilirubin 結晶

Bilirubin の standard として第一純正化学 製bilirubin を使用した.

1. 2) mesobiliverdin IXB dimethylester 英国, Cardiff 大学の A. H. Jackson 教授より供与されたものを試料とした.

2) 胆汁採取法

a) ヒト胆汁採取法

Meltzer-Lyon 法で行なった, すなわち被検者に 早朝空腹時に十二指腸 sonde を嚥下させ, X線透視 下に金属球が十二指腸下降脚に達するのを確認した 後, A胆汁の流出を確認し olive 油20 mlを注入し B胆汁排出後のC胆汁を採取し速やかに bilirubin の結晶化の試料に供した.

b) Gunn rat 胆汁採取法

Gunn rat を ether 麻酔下に開腹して総胆管へ polyethylene 管を挿入し,外胆汁瘻を作製し,流出 する胆汁を低温, 遮光下に貯溜し結晶化の試料に供した.

3) 胆汁中 bilirubin 結晶作製法 (Ostrow et al)

胆汁を撹拌し胆汁 1 ml につき20 mgの ascorbic acid を加え、胆汁の1/5量の5% lead acetate solution を追加し bilirubin を鉛塩として沈澱させ 遠沈後の上清を捨て沈澱を蒸溜水で1回洗滌し,さ らに ethanol で3回洗滌後, 4倍量の ethanol に 拡散し再び遠沈し上清を捨て3-4 mgの ascorbic acid を加え bilirubin 分画を4倍量の1規定 sodium hydroxide で20分間,室温(15-20℃),遮光下で 加水分解し, これを氷酢酸で pH 5.0 に調整し, 4倍 量の chloroform で遊離化した bilirubin を抽出す る. この際出来る中間層は分離し再び chloroform :氷酢酸 (3:1, V/V) で抽出液が無色になるま で抽出し、この chloroform 抽出液を合せ 1/5 量の 1% ascorbic acid 溶液で6回洗滌し更に等量の10 %食塩水で1回、次いで蒸溜水で4回洗滌してあら かじめ chloroform で湿らせた東洋沪紙 No. 6 で沪 過後, 減圧乾固し 1/2 量の methanol を加えchloroform を蒸発させると bilirubin は橙赤色針状に晶 出する.

4) Bilirubin dimethylester の合成法(Küster)

Bilirubin dimethylesterの合成は diazomethane を使用する Küster の方法をもちいた。

a) Diazomethane ether 溶液作製法

Nitrosomethyl urea 3gを100mlの ethyl ether に浮游させ50% potassium hydroxide を5ml商下し鹼化を行ない,30℃の水溶中で緩和に撹拌しながら発生する黄色の diazomethane を氷冷 ether 中に蒸溜した。

b) Bilirubin O methylation

Bilirubin 100mg (第一純正化学製) を50 mlの chloroform に懸濁し diazomethane ether 溶液を bilirubin 1 mgに対し計算量の10%過剰に加え室温, 遮光下に15分間放置後, 減圧乾固し橙色の粗 bilirubin dimethylesterを得る.疾患例の胆汁より生成した bilirubin については, この方法を scale down して methylation を行なった.

5) 粗 bilirubin dimethylester \mathcal{O} thin layer chromatography (T. L. C)

T. L. C. による粗 bilirubin dimethylester の精製は Merk 製 Kieselgel G nach Stahl(Art. 7731)

を吸着剤として glass plate 20×20 cmに厚さ 1 mm の薄層を作製し120℃で 2 時間活性化した後,粗 bilirubin dimethylester を 2 mlの chloroform 溶液として線帯状(幅 5 mm)に吸着させ,室温, 遮光下でbenzene: ethanol(100: 8, V/V)で15 cm一次元展開し分離された各帯状部分を glass plate より吸着剤とともにかきとり chloroform で溶出し,東洋沪紙 No. 6 で沪過後減圧乾固し,同様の T. L. C を再び行なって単一 band であることを確認した. なお粗 bilirubin dimethylester の T. L. C. による収率は各 band をかきとり, chloroform で抽出し,えられた抽出液の溶液の濃度を比色法で求め, molar extinction coefficient: max (CHCl,) nm (ε), 405 (55800) より bilirubin dimethylester 量を算定した.

6) Bilirubin dimethylester の結晶化

T. L. C. で分離した bilirubin dimethylester 分画を少量の chloroform 溶液とし等量の petroleum ether (b. p. 60-70℃)を加え0℃に放置すると bilirubin dimethylester は橙赤色針状に晶出する, ここで母液を除去し petroleum ether で結晶を2回洗滌し乾燥後遮光下に保存した.

- 7) Bilirubin dimethylester の同定法
- a) 融点

融点測定器(薬局方型)を用いて測定した.

b) 吸光曲線

日立 EPS-Ⅲ型自記分光光度計を用いた.

c) 赤外線吸収スペクトル

日立 EPI-G2型赤外分光光度計を使用し、KBr disk にして測定した。

- d) 元素分析
- C. H. N. コーダーは柳本製 MT-2型で, OX コーダーは柳本製 MOX-10型で測定し2回の平均値で示した.
 - e) Mass spectrometry

JMS-01 SG mass spectrometer (日本電子製)を使用し、イオン化電圧75 eV、イオン化電流50-100μA、加速電圧7.0 KV で試料温度200-250℃で直接導入法""で測定した。

f) Nuclear magnetic resonance (N.m.r.)
Varian HA-100, N.m.r. (100MHz) を使用し
tetramethylsilane (TMS) を基準物質とし、溶媒は deutrochloroformを用い測定した.

Ⅲ. 実験結果

1) Bilirubin IXa dimethylester の分離, 精製

Bilirubin IXa を Küster の方法で methylation しその反応終末産物を T. L. C. で分離, 精製する際 Rf 0.00, Rf 0.22 (0.20-0.26), Rf 0.31 (0.28-0.35), Rf 0.41 (0.36-0.45), Rf 0.69 (0.65-0.77), Rf 0.94 (0.92-0.96) の 6 つの分離帯が得られ, 精製過程での収率は Table 2 & 3 に示す如く, 対照 bilirubin IX (第一純正化学製) よりの粗 bilirubin IXa dimethylester では平均87.18% (76.90-94.37%)で,疾患例の胆汁中 bilirubin の

Table 2. Fractionation of bilirubin dimethylester (Daiichi pure chemical Co.
Ltd.) by thin layer chromatography
total coefficiant: 7.10 (14.55 mg/dl)

Experiment	No. 1	No. 2	No.3	aver	average(%)		
fraction number Rf							
1. 0	0.01	0.03	0.01	0.02	(0.28)		
2.0.20-0.26	0.10	0.16	0.07	0.11	(1.53)		
(0, 22)							
3.0.28-0.35	0.10	0.20	0.34	0. 21	(2.96)		
(0.31)							
4.0.36-0.45	0. 56	0.83	0.72	0.70	(9.85)		
(0.41)							
5.0.65-0.77	5.80	4.05	5. 10	4. 98	(70.14)		
(0.69)							
6.0.92-0.96	0.13	0. 19	0. 19	0. 17	(2.39)		
(0.94)							
total	6.70	5.46	6. 43	6. 19	(87. 17)		
% recovery	94. 37	76.90	90. 56	87. 18			

Table 3. Fractionation of crude bilirubin dimethylester from the patients with liver diseases by thin layer chromatography

Experiment	No.	1 No.	2 No.	3
total optical density	2. 48	4. 60	13. 56	average(%)
fraction number				
1.	0.09	0.12	0.08	2. 27
2.	0. 22	0. 26	0. 19	5. 89
3.	0.32	0.51	0.70	9. 95
4.	0.63	0.71	2. 69	20. 70
5.	0.95	2.89	9.400	56. 90
6.	0.18	0.21	0.34	4, 80
total	2.39	4.71	12. 90	
% recovery	96. 37	102. 28	95. 80	98. 17

粗 bilirubin dimethylester でも平均98.17% (95.80-102.28%) であった.

2) Bilirubin IX dimethylester の同定

T. L. C. で 6 つの Rf 値を示す分離帯をそれぞれ分 取し、物性的検索を行なったところ Rf 0.69の分離 帯が chloroform 溶出,再結晶後の融点204℃を示 し、Küster'®の記載と一致するものであった。また chloroform 溶液中の吸光極大は405mμ を示し、そ のヂアゾ化合物の吸光極大は chloroform 溶液中で 560 mμ (555-565 mμ) で有地¹²⁾ の成績と一致した. さらに元素分析を行なった結果は C:68.56%, H: 6.66%, O: 16.65%, N: 9.13%, でほぼ bilirubin dimethylester の理論値と一致するものであり、赤 外線吸収スペクトルの成績は Fig. 1. に示す如くで ある. すなわち1) 3.00μ に OH, NH, の伸縮振動 υOH, υNH. に依る吸収帯を1個の吸収帯として認 める. 2) 5.76 μ に ester の C=0 伸縮振動 υC-Oに依る吸出帯を認める.3)6.03μに vinỳl 基 (-CH-CH₂) の C=C 伸縮振動 υC-C に依る吸 収帯を認める. 4) 6.12 μ, 6.34 μ に共軛二重結合 に依る吸収を認め、これは根の吸収によると思われ る. 5) 10.08 μ と 10.85 μ に vinyl 基の C-H 面外 変角振動 & CH に依る吸収帯を認める,などの所見 が得られ、これも有地(*)の成績と一致するものであ り, N. m. r. では Table 4. の如く3.70 p. p. m. (singlet, 6 H)の Caおよび Ca2位のプロピオン酸エス テル側鎖の carbomethoxy group などの所見は Kuenzle ")の成績とよく一致し,また mass spectrum (別述)を含めた成績より、Rf0.69の分離帯の物性 は bilirubin IXa dimethylester であることが証明 された.

3.1) Bilirubin IX α dimethylester $\mathcal O$ mass spectrum

Bilirubin IXa dimethylesterの mass spectrum は Table 5. に示す如くで、この測定条件では molecular ion (M⁺)は出現しなかったが,bilirubin IXa dimethylester の中央の methylene bridge の 解裂による fragment ion を m/e 314, m/e 300に認め,さらにこれより一CO. OCH,の解裂 beam を m/e 227にみとめる.

3.2) Mesobilirubin IXβ dimethylester Φ mass

Jackson 教授より供与された試料について IX8 型の mass spectrum を検討した結果は従来の報告通りの m/e 614 (molecular ion), m/e 360 (fragment

Fig. 1

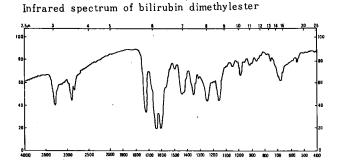


Fig. 2 Main fragmentation process of bilirubin dimethylester

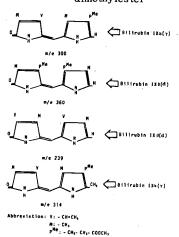


Table 4. N.m.r. assignment of bilirubin dimethylester in deutrochloroform Chemical shift (P. P.m.) (shape of signal, relative area)

		assignment
1. 75 (s, 1 H) 1. 96 (s, 2. 03 (s, 2. 06 (s, 2. 08 (s,		Methyl groups on $C-2$, $C-7$, $C-13$ and $C17$
2.67 (A ₂ B ₂ , 8 H)	······································	Ethylene groups of propionic ester side chains on $C\!-\!8$ and $C\!-\!12$
3.70 (s, 6 H)		Carbomethoxy groups of propionic ester side chains on C8 and C12
4.16 (s, broad, 2 H)		Methylene protons on $C-10$ (central methylene bridge)
4.72-6.70 (m, 8 H)		Vinyl groups on $\text{C}3$ and $\text{C}18$ and vinyl protons on $\text{C}5$ and $\text{C}15$
		Amine and amide protons on ring nitrogen atoms let. A,B, multiplet of A,B, system.

ion) を認めた!*)

4) 健康成人男子の胆汁中 bilirubin 異性体構成の検討.

健康成人男子の胆汁中 bilirubin についてその dimethylester の異性体構成を mass spectrum で検索した結果は Table 5. に示す如く, bilirubin $IX\alpha$ 以外の beam, すなわち m/e 360 (bilirubin $IX\beta$, $IX\delta$), m/e 239 (bilirubin $IX\beta$) は認められずその解裂様式は bilirubin $IX\alpha$ (第一純正化学製) と同様の態度を示した.

5) 肝疾患胆汁中 bilirubin の異性体構成の検討. 各種肝疾患患者の胆汁中の bilirubin の dimethyl ester について mass spectrum を比較した成績 は Table 5.の如くで,急性肝炎,慢性肝炎,肝硬変症,胆のう症,先天性黄疸(Gilbert's syndrome,Dubin Johnson syndrome)のいずれも同一で,それらの胆汁中の bilirubin と対照の第一純正化学製bilirubin および健康成人男子の胆汁中 bilirubin との間には解裂様式に有意の差を示す beam は認められなかった。

6) Gunn rat 胆汁中 bilirubin の異性体構成の 検討

先天性黄疸ネズミ Gunn rat 胆汁中の bilirubin の dimethylester の mass spectrum to Table 5. に示す如く IXαの場合にみられた beam 以外のbeam は認められなかった.

Table 5. Mass spectra of bilirubin dimethylester from various liver diseases

origin of	Nor.	В. 🛚 Х.	н. А.	н. с.	L. C.	Chole.	Gilb.	D-J.	Gunn.
product	*		,	"	,		*	*	+
m√e		relative	intensity	of signal	(% of the	base pea	k)		
612	_	_	_		_	-	_	_	
374	_	_	-	_	_	-	_	_	_
360	_	-	_	-	_	_	_	_	_
314	28	27	30	29	32	35	28	31	26
300	100	100	100	100	100	100	100	100	100
285	20	23	18	20	22	20	16	19	18
269	30	28	26	29	27	24	26	25	29
253	9	11	10	12	11	13	10	12	9
241	29	30	33	29	29	33	28	34	31
239	32	30	31	35	32	29	29	30	34
227	99	97	92	93	100	98	96	95	100
213	42	50	38	40	53	46	48	47	51

Abbreviation: H.A.: Hepatitis acuta, H.C.: Hepatitis chronica,

L. C.: Liver cirrhosis, Chole: Cholecystopathy,

Gilb.: Gilbert's syndrome, D-J.; Dubin Johnson syndrome,

Gunn.: Gunn rat, Nor.: Normal control, B. IX.: Bilirubin IX dimethylester,

*: one case, ': mean of two cases, ": mean of 4 cases,

*: mean of 5 cases,

考 察

Bilirubin の異性体に関する報告をみると Petryka⁴)が early labelled bilirubin について酸化法で IXa 以外の異性体の存在を報告し、また Nichol らり が雄牛の胆 石及び emu eggs shell (Dromanius novaehollandiae)から抽出した bilirubinよりIXa 以外の徴量の異性体を mass spectrometry を使用 して検出している. この報告によると bilirubin dimethylesterの中央のmethylene bridgeが解裂し た際に出来るいわゆる dipyrrolic fragment ionを 検出している. すなわち IXα の fragment ion は m/e 314, m/e 300,とは別に 徴量の IXβ (δ) の fragment ion を m/e 374, m/e 360 に検出できるがその相 対強度はかなり低く,全体の2-5%であるという. 1971年近藤ら"が oxy-ferrihem の IXa および IXB 型をもちいた実験によると両者の胆汁中への排泄は IXa 型が IXB 型に比しはるかによく排泄されること とtetrapyrrole の構造をとった際には両型の排泄 量に余り差がないとしているが,そうするとヒト胆 汁中のbilirubinは tetrapyrrole構造を呈するもの であるからもし 生体内で IXa 以外の異性体が生成 されるならば当然胆汁中にも bilirubin IXa 以外の 異性体が排泄されるから,mass spectrum で定量 的に異性体構成比(相対強度)として表現されるこ

とになり、病因論なかんすく bilirubin 代謝の異なる各種黄疸を来す肝疾患患者の胆汁中 bilirubin の 異性体構成比は疾患により独特の pattern を呈する可能性が考えられる.

さて bilirubin dimethylesterの mass spectrum での解裂様式は molecular ion はその質量数を, dipyrrolic fragment ion の検出が異性体を固定し 定量する際の指標となる, すなわち m/e 314と m/e 300は IXα 型および IXγ 型より由来し, m/e 360と m/e 239は IXB 型および IXS 型より由来するもので ある (Fig. 2.). しかしながら 第一純製 化 学 製 bilirubin & 90 bilirubin dimethylester ON. m. r. spectrumでの3.70p.p.m. にみられる singletの6H はC.位およびC.のプロピオン酸エステル側鎖の carbomethoxy group を示しているので, m/e 300 および m/e 314の fragment ion は IXα 型の解裂に 由来したものと考えられる,また疾患例の bilirubin dimethylester でも N.m.r. spectrum では同様の chemical shift が同定出来るので, m/e 314, m/e 300,は IXa 成分と同定しうる. 実験成績では standard として用いた第一純正化学製 bilirubin およ び健康成人男子, Gunn rat, 各種肝疾患例の胆汁よ りえた bilirubin の間には何ら有意の差はなく、dipyrrolic fragment ion 12 m/e 300 & base peak & し, m/e 314, m/e 227, に認められすべての測定試

料の mass spectrum は同一の解裂様式を示し,その 再現性はよく保たれていた. 使用した mass spectrometer の分解能も Nichol らのそれと同一であ るので bilirubin IXa 以外の異性体が試料採取から mass spectrometer へ導入までの過程で逸脱する 可能性としてはまず第一に結晶化操作が考えられる が Ostrowら" の方法は bilirubin のイミノ基に lead acetate の鉛イオンを結合させて沈澱させるもので あり, 沈澱形成後の上清には diazo 反応陽性物質が なかったことにより結晶化操作での bilirubin IXa 以外の異性体を逸したとは考えられない。第二に bilirubin dimethylester 合成後の T. L. C. による 分離精製過程での異性体の逸脱の可能性についても、 粗 bilirubin dimethylester の T. L. C. での収率は かなり良く,他の Rf値を示す分離帯を溶出,結晶 化後の mass spectrum は bilirubin dimethylester に特徴的な fragment ion すなわち m/e 374, m/e 360, m/e 314, m/e 300, m/e 239, m/e 227, など が認められないので T.L.C. での IXa 型以外のbilirubin の異性体の逸脱の可能性も否定できる. した がってヒトおよび Gunn rat 胆汁中 bilirubinの異 性体には IXa 型以外のものは存在しないと考えてよ いように思われる. また各種肝疾患患者胆汁中の

bilirubin についても本検索方法では IXa 型以外の 異性体は存在しないといえる.

結 語

胆汁中 bilirubin を Ostrow ら*'の方法で精製し Küster'*'の方法でこれを bilirubin dimethylester とし T. L. C. で分離し, 再結晶後 mass spectrometryで直接導入法にて測定した結果, 次の様な結論を得た.

- 1) ヒトおよび Gunn rat 胆汁中 bilirubin には IXa 型以外の異性体はみとめられなかった.
- 2) 各種肝疾患患者胆汁中 bilirubin についても同様で IXa 型以外の異性体はみとめられず, すべて standard として用いた第一純正化学製 bilirubin IXa と同様の解裂様式をとった.

謝 辞

稿を終わるにあたって御校閲下さった恩師小坂淳 夫教授,直接御指導下さった近藤忠亮講師,物性的 検索に御援助を下さった倉敷レーヨン中央研究所分 析センター岡昌也氏ならびに貴重なる資料をいただ いた A. H. Jackson 教授に感謝します.

文 献

- 1) H. Nakajima, T. Takemura, O. Nakajima and K. Yamaoka, J. Biol. Chem., 238 (1963) 3784.
- 2) Z.Petryka, D. C. Nicholson and C. H. Gray, Nature, 194 (1962) 1047.
- 3) C. H. Gray, D. C. Nicholson, C. H. Gray and R. A. Nicholaus, Nature, 181 (1958) 183.
- 4) Z. Petryka, Proc. Soc. Expl. Biol. Med., 123 (1966) 464.
- 5) A. H. Jackson, G. W. Kenner, H. Budizikiewicz, C. Djerassi and J. M. Wilson Tetrahedron, 23 (1967) 603.
- 6) A. W. Nichol and D. B. Morell, Biochem. Biophys. Acta., 184 (1969) 173.
- 7) A. W. Nichol and D. B. Morell, Biochem. Biophys. Acta., 177 (1969) 599.
- 8) T. Kondo, D. C. Nicholson, A. H. Jackson and G. W. Kenner, Biochem. J., 121 (1971) 601.
- 9) J. D. Ostrow, L. Hammaker and R. Schmid, J. Clin. Invest., 40 (1961) 1442.
- 10) W. Küster, Z. Phisiol. Chem., 141 (1924) 40.
- 11) J. F. Lynch, J. M. Wilson, H. Budikiewicz and C. Djerassi, Experientia, 19 (1963) 211.
- 12) 有地澄郎・岡山医学会雑誌, 71 (1959) 7065.
- 13) J. Fog, and E. Jellum, Nature, Lond., 198 (1963) 88.
- 14) C. C. Kuenzle, Biochem. J., 199 (1970) 395.
- 15) A. H. Jackson and G. W. Kenner, Biochemical · Society Symposia: Number 28. Porphyrins and related compounds. Academic Press, (1968) 3 P.

Studies on the bile pigment

Part 2. Mass spectroscopic analysis of bilirubin IX

dimethylester in various liver diseases

by

Tetsuichi IZAWA

(The first department of internal medicine, Okayama university medical school)
(Director: Prof. Kiyowo Kosaka)

As almost no study has been made on the mass spectroscopic analysis of bilirubin obtained from the bile collected from the patients with liver diseases and Gunn rat, it was attempted to determine the isomeric composition of bilirubins by the use of mass spectrometry. Bilirubin was crystallized from the bile by Ostrow's method. Bilirubin IXa dimethylester was yielded by Küster's method from the commercial bilirubin (Daiichi pure chemical Co. Ltd.), and was purified by thin layer chromatography. Photochemical natures of the fifth of six bands was coincided with that of bilirubin IXa dimethylester. The following results were obtained;

- 1. Mass spectra of bilirubin IX α dimethylester from bilirubin IX: No molecular ions were obtained by our method. The base peak at m/e 314, 300, or 227 was found and these peaks were derived from the cleavage of central methylene bridge of bilirubin IX α and IX γ dimethylester. No peaks, showing the exsistence of bilirubin IX β and IX δ dimethylester, appeared on the mass spectrum at m/e 360 and 239.
- 2. Mass spectra of bilirubin IX dimethylester from various liver diseases and from Gunn rat: Mass spectra of the bile bilirubin from various liver diseases and Gunn rat were observed at m/e 314 or 300 as the base peak and there was no significant peaks showing other isomers such as $IX\beta$ or $IX\delta$ dimethylester. These findings coincided with that of bilirubin $IX\alpha$ dimethylester standard.

From these results, the exsistence of other isomeric compositions except bilirubin $IX\alpha$ ($IX\gamma$) was not able to find in the bile of human being in health and various liver diseases.