

# 岡山医学会雑誌

第85巻5, 6合併号 (942, 943号)

昭和48年6月30日発行

## 間接 bilirubin と直接 bilirubin の Azo 色素の吸収曲線

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂淳夫教授)

近 藤 忠 亮  
広 畑 衛  
瀬 尾 憲 司

[昭和48年6月12日受稿]

### 緒 言

血液, 胆汁, 尿中の bilirubin 測定には Ehrlich 氏 diazo 試薬を用いて bilirubin-azo 色素を作成して比色する方法が一般に広く行なわれている。この際 diazo 試薬に対する態度から直接に反応する型の bilirubin と alcohol などの添加により反応する型のものがあり, 前者は直接 bilirubin, 後者は間接 bilirubin とよばれ, 注目されているが教室金田<sup>1)</sup>は, この2者の bilirubin-azo 色素の吸収極大には差があることを報告している。

一方, 直接 bilirubin には種々の抱合型があることが知られていて, その azo 色素の吸収極大についてはまだ詳細な報告はなされていない。また bilirubin-azo 色素の吸収極大に及ぼす水素 ion 濃度の影響について明らかにされたとはいいがたい。そこで直接 bilirubin を分画分離し, その bilirubin-azo 色素の性状について検討を行なった。

### 実験材料と実験方法

1. 健康者並びに肝胆道疾患患者より十二指腸ゾンデを用い Olive 油刺激により採取した胆汁を材料とした。

#### 2. 粗直接 bilirubin 調整法

胆汁を硫酸で飽和したのち濾別してえられた残渣を methanol で抽出し, 減圧乾固した。小牟田<sup>2)</sup>の成績より methanol-減圧乾固の過程を3回行なったものを粗直接 bilirubin とした。

#### 3. 直接 bilirubin の分画分離法

Bilirubin glucuronide 分画は Talafant<sup>3)</sup>, 並びに井沢<sup>4)</sup>の方法により acetone 末を用いた分画分離法で精製した。Bilirubin phosphate 分画は Billing<sup>5)</sup>の silicone 処理珪藻土を用い n-butanol・水・磷酸塩緩衝液 (pH 6.0)(50:45:5) の展開液で column chromatography を行なって Pigment II 分画を分離し, methanol 抽出したのち, 近藤ら<sup>6)</sup>の

paper column を用い展開液 n-butanol・ethanol・水 (4 : 1 : 2) で展開することにより, bilirubin phosphate 分画を分離した. Bilirubin sulfate 分画は Weber と Schalm<sup>7)</sup> の方法で alkali 処理後塩酸で pH 2 としたのち, chloroform 抽出したものを減圧乾固したのち, その水溶部分を用いた.

#### 4. Bilirubin sulfonate ならびに bilirubin dimethylester の調整法

Bilirubin sulfonate は Watson<sup>8)</sup> の方法により結晶 bilirubin に無水酢酸と硫酸の混液を加えて作成した. Bilirubin dimethylester は Küster<sup>9)</sup> の diazomethane を用いた方法により調整し, 井沢の方法により精製した. 結晶 bilirubin は第一化学製のものを使用した.

#### 5. Bilirubin-azo 色素の調製法

Ehrlich 氏 diazo 試薬の第 1 液 10ml に, 第 2 液 0.3 ml を加えて作成した混液を使用した. 結晶 bilirubin と bilirubin dimethylester は chloroform 溶液としたものを 1 ml とり, これに methanol 3.5 ml を加え diazo 混液 0.5 ml を加えて調整した. Bilirubin

diglucuronide, bilirubin phosphate, bilirubin sulfonate は水溶液 4.5 ml に diazo 混液 0.5 ml を加えて調整した. 酸性 azo 色素は diazo 反応液にさらに塩酸 1 ml を加えて生成した. Alkali 性 azo 色素は 5 N NaOH を 1 ml 加えて作成した. PH は東洋浜紙製 pH 試験紙で比色した. pH の補正は塩酸, または NaOH で行った.

#### 6. 吸光曲線測定法

高津製自記分光光度計 UV200 を用いて, 370~700 m $\mu$  の可視部で測定した.

### 実験成績

#### 1. Azo 色素の吸収極大

表 1 のごとく pH 2 前後での azo 色素の吸収極大は間接 bilirubin で 540~550 m $\mu$  で, 直接 bilirubin のうち bilirubin diglucuronide と bilirubin phosphate は 555~560 m $\mu$  に極大をみとめ, bilirubin sulfonate (合成物) と bilirubin sulfate (胆汁) との極大は 540 m $\mu$  と同一であった. Bilirubin dimethylester の吸光極大は 545 m $\mu$  であった.

#### 2. 酸性 azo 色素の吸収極大

酸性 azo 色素の測定はすべて pH 1.0 で行った. 間接 bilirubin は 575~580 m $\mu$  に極大を認め, Bilirubin diglucuronide と bilirubin phosphate では, それぞれ 560~570, 555~560 m $\mu$  にみとめ bilirubin sulfate と bilirubin dimethylester では 565~575 m $\mu$  に極大を認めた.

#### 3. Alkali 性 azo 色素の吸収極大

間接 bilirubin では pH 11.5, Bilirubin diglucuronide と bilirubin phosphate では pH 13.2 で測定し, その吸収極大は 585 m $\mu$  であった. また bilirubin sulfonate では pH 12, 13, bilirubin dimethylester では pH 12 で測定し, その吸収極大は 590 m $\mu$  であった. なお Alkali 性 azo 色素は褪色しやすいため調整後は可及的速やかに, 5 分以内に測定を終った.

### 総括と考察

間接 bilirubin と ester 型直接 bilirubin の azo 色素の吸収極大は, それぞれ異なることが教室金田<sup>1)</sup> により, また bilirubin dimethylester については有地<sup>10)</sup> によってすでに報告されている. しかし直接 bilir-

Table. 1 Absorptions maximum of bilirubin-azo pigment

	Acid-azo pigment	Azo pigment	Alkali-azo pigment
1. Indirect bilirubin	575-580 m $\mu$	540-550 m $\mu$ (pH 2.2)	590 m $\mu$ (pH 11.5)
2. Direct bilirubin			
a) Bilirubin diglucuronide	560-570 m $\mu$	555-565 m $\mu$ (pH 2.4)	585 m $\mu$ (pH 13.2)
b) Bilirubin sulfonate	565-575 m $\mu$	535-545 m $\mu$ (pH 2.0)	590 m $\mu$ (pH 12)
c) Bilirubin sulfate (natural)	565-575 m $\mu$	535-545 m $\mu$ (pH 1.6)	590 m $\mu$ (pH 13)
d) Bilirubin dimethylester	565-575 m $\mu$	540-550 m $\mu$ (pH 2.0)	590 m $\mu$ (pH 12)
e) Bilirubin phosphate	555-565 m $\mu$	550-560 m $\mu$ (pH 1.6)	585 m $\mu$ (pH 13)
Original solution (solvent)			
1.	445-450 m $\mu$	chloroform	
2. a)	406 m $\mu$	(pH 5.0) H <sub>2</sub> O	
b)	452 m $\mu$	(pH 2.8) H <sub>2</sub> O	
c)	452 m $\mu$	(pH 3.2) H <sub>2</sub> O	
d)	400 m $\mu$	(pH 2.4) chloroform	
e)	410-420 m $\mu$	(pH 4.8) H <sub>2</sub> O	

ubin について bilirubin glucuronide, bilirubin sulfate, bilirubin phosphate の分画別の検討はなされていない。

そこでこれらの直接 bilirubin 分画の azo 色素を調整し、その吸光極大が pH によりどのように変動するかについて検討を加えた。

その結果、bilirubin diglucuronide および bilirubin phosphate よりの azo 色素は pH 2, pH 1, pH 11.5 と変動させても、ほとんど両者は同一の吸光極大をそれぞれ示すのに対し、bilirubin sulfate よりの azo 色素はその試料が胆汁より分離されたものと、化学的に合成されたものとは全く同一で pH 2, pH 1, pH 11.5 のいずれの pH においても前二者とは異なり、間接 bilirubin に methanol を加えて調整した azo 色素の上述の pH における吸光極大に近似している。一方 Küster-井沢の方法で調整した bilirubin dimethylester の chlorform 溶液に diazo 試薬を加えて調整した azo 色素は有地の実験の通りその吸光極大は pH 2 で  $560m\mu$  を示し、bilirubin diglucuronide のそれに一致するが pH の変

動によってはその吸光極大は移動しないので、methanol を加えて調整するとその azo 色素では pH の変動により、間接 bilirubin よりの azo 色素と同一の吸光極大の変動を示した。

これらの事実は、生体内に存在する直接 bilirubin のうち、bilirubin diglucuronide および bilirubin phosphate に対し、bilirubin sulfate は bilirubin に対する抱合基の結合部位を異にする結果と解され興味ある所見と考えられた。

## 結 論

生体内に存在する直接 bilirubin のうち bilirubin diglucuronide, bilirubin phosphate, bilirubin sulfate をそれぞれ分画分離し、各々の azo 色素を調整して pH によるその吸光極大の変動を観察すると、前二者では同一であったが、後者とは異なり、後者は間接 bilirubin に methanol を加えて調整した azo 色素のそれに近似した。これらのことは bilirubin への抱合基の結合部位の違いによる構造上の差異によるものと解した。

## 文 献

1. 金田皎太郎：Bilirubin-azo 色素に関する研究。第 2 編 数種 bilirubinoid の diazo 反応の分光化学的研究。岡山医学会誌, 75, 125-137, 1962
- 第 3 編 黄疸尿より分離した直接 bilirubin における diazo 反応について。岡山医学会誌, 75, 139-144, 1962.
2. 小牟田清敦：尿中 bilirubin に関する研究。第 1 編 黄疸尿中の ester 型 bilirubin に属する直接 bilirubin 分画について。医学研究, 29, 2764-2777, 1959.
3. Talafant, E. and Appelt, J. : Preparation of bilirubin-diglucuronide concentrates from dog bladder bile. Clin. Chem. 14, 208-211, 1968.
4. 井沢徹一, 山本武彦, 近藤忠亮：Bilirubin glucuronide 分画抽出法 (Talafant) 法の検討。日消誌, 67, 756-760, 1970.
5. Cole, P.G., Lathe, G.H. and Billing, B.H. : Separation of the bile pigments of serum, bile and urine. Biochem. J., 57, 514-518, 1954.
6. Kondo, T., Kawai, T., Yamamoto, T. and Izawa, T. : Characterization of the ester form bilirubin fraction showing positive phosphate ester reaction. Gastroenterologia Japonica. 4, 217-222, 1971.
7. Weber, A.P. and Schalm, L. : Evidence against "Bilirubin sulphate." Acta Med. Scand., 177, 519-526, 1965.
8. Watson, C.J. : Color reaction of bilirubin with sulfuric acids: a direct diazo-reacting bilirubin sulfate. Science 128 : 142-143, 1958.
9. Küster, W. : Über den Bilirubindimethylester. 15 Mitteilung. Über Gallenfarbstoffe. Z. physiol. Chem. 141, 40-54, 1920.
10. 有地澄郎：Monomethoxy-bilirubin dimethylester 及び dimethoxy bilirubin dimethylester の性状に関する研究。第 1 編 化学的性状について、岡山医学会誌, 71, 7065-7072, 1959.

**Absorptions spectra of indirect and direct bilirubin.**

by

**Tadasuke KONDO, Mamoru HIROHATA. and Kenji SEO.**

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

**abstract**

Direct bilirubins in vivo was fractionated into bilirubin diglucuronide, bilirubin phosphate and bilirubin sulfate. Influence of pH concentration on the absorptions maximum of each azo-pigment was studied. The schift of absorptions maximum was the same in the former two direct bilirubins and the latter moved as nearly as the indirect bilirubin-azo pigment yielded after an addition of methanol. These results was supposed to the difference was based on the structural difference of bilirubin due to the conjugation type of bilirubin.