

Biliverdin の赤外部分光化学的研究

第 1 編

市販の Biliverdin の性状とその赤外部吸収像に関する研究

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂教授)

仲 原 節

〔昭和 34 年 9 月 28 日受稿〕

緒 論

Biliverdin の赤外部吸収像の研究は教室の進藤の研究があるのみである。biliverdin については市販のそれにつき若干検討されたが、その粗材そのものに難点がある。即ち英国 Light 会社より輸入された biliverdin について検討した諸性状は

結晶 無定形

色調 緑黒色

溶媒に対する溶解度

メタノール	極く僅かに溶解
ether	不 溶
酸 (塩酸, 硫酸)	不 溶
アルカリ (種々の濃度)	不 溶
融 点	不 明

の如くで, R. Lemberg らにより明らかにされた諸性状と著しく異なる。この性状が如何なる理由によつて生じたものかは、その製造過程が明らかにされていない現況においては不明、不純なものとして再結晶その他の処置も考慮されたが、各種溶媒への溶解度が著しく低いため困難である。そこで著者は先ずその赤外部吸収像を描写し、2, 3 の処置を施した結果その本態につき興味ある成果を得たので報告する。

実験材料並びに方法

1) 市販 biliverdin L. Light 会社製のもの

2) spectrum の測定装置並びに方法

赤外 spectrum の測定装置は、塩野義製薬研究所の御厚意に依り、同所に設備せられた岩塩 prism 使用の米国製 perkin-Elmer 12 C 型自記赤外分光光度計及び光研 DS 301 自記赤外分光光度計を、紫外並びに可視部吸収 spectrum は、同じく同研究所

に設備の米国製 Beckman D-U 型分光光度計を使用、後者は 200~350 m μ は hydrogen lamp を、350~1000 m μ は tungsten lamp を用いるが、内 600~1000 m μ には CS-OX phototube を使用した。

赤外部吸収 spectrum 測定には 2~15 μ に固有吸収の少ない点から chloroform を溶液とし、液体 cell を使用して測定した。

Nujol-paste 法は資料を約 5 mg を乳鉢にとり paraffin oil の 1 滴を落して充分搗合せて paraffin oil 中に資料を懸濁せしめ、spatula で食塩板上にその 1 滴を落し、厚さ 0.01~0.02 mm の金属箔の窓を置いて、その上より更に食塩板を重ねてこれを挟み、均一なる薄層として測定に用いた。

3) 等電点測定の為の資料及び方法

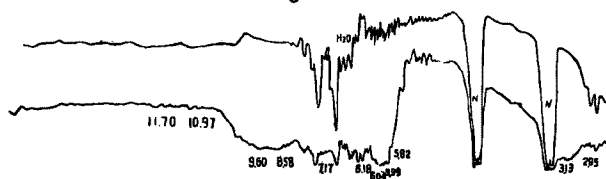
等電点測定の為の資料としては、L. Light 会社製のものを使用せず、R. Lemberg らの方法によつて得られた biliverdin を使用した (この詳細については第 2 編に記載した)。その方法として、緩衝溶液を使用しこの緩衝溶液のイオン濃度 μ を一定の 0.1 にした。そして濾紙は英国製 whatman 1 を使用し、濾紙の巾を 3 cm とした。陽極と陰極との間隔を 45 cm とし、泳動時間は 24 時間、5~6°C の恒温室中で泳動を行なつた。尚電極の電圧を 400 volt にし電流の強さはほぼ 0.1 mA であつた。

実験成績

1) 市販 biliverdin の赤外部吸収について biliverdin を Nujol-paste 法により測定すると図 1 のようになる。

- 2.95 μ 並びに 3.13 μ に O-H と N-H の伸縮振動 ν OH, ν NH による吸収帯を認む。
- 5.82 μ に carboxyl 基の VC=O を認む。
- 6.04~6.20 μ に vinyl 基の C=O 伸縮振動

Fig. 1



VC=O による吸収帯及び共軛二重結合の吸収を認める。

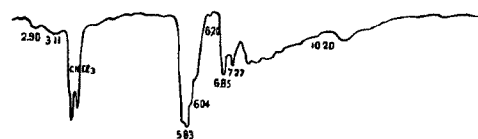
d) 5.82 μ ~6.20 μ に亘る中の広い吸収は carboxylate ion の吸収と思われる。

e) 10.33 μ に vinyl 基の C-H 面外変角振動 δ C-H による吸収を認む。

f) 7.20 μ 以上の吸収に関しては、赤外部吸収像上充分解明し得ない。

2) 市販 biliverdin を 5% 苛性加里アルコールに溶解し、煮沸水中で 5 分間加熱した後、この溶液を直ちに冷却し N/10 塩酸で pH 4.6 附近に調整し ether を加えて振盪すると容易に ether に抽出される。この抽出層を分離し、ether を常温のまままで減圧吸引すると緑色の色素が得られる。この色素を chloroform 法によりその赤外部吸収像を求めてみると、図 2 の如くなる。即ち

Fig. 2



a) 2.90 μ 並びに 3.11 μ に O-H と N-H 伸縮振動 ν OH 及び ν NH による吸収を認む。

b) 5.83 μ に carboxyl 基の C=O 伸縮振動 VC=O による吸収帯を認む。

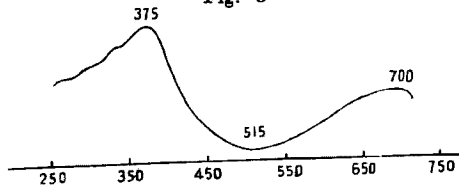
c) 6.04 μ ~6.30 μ に広い vinyl 基及び共軛二重結合の弱い吸収がみられる。

d) 6.85 μ 及び 7.27 μ に C-H の変角に起因する δ C-H の振動の可成り強い吸収を認む。

e) 7.20 μ 以上のものについては充分解明し得ない。

3) 2 に依りえた ether 抽出物質の諸性状。先ず

Fig. 3



ether 抽出物質を氷醋酸にとかし、その吸光曲線を求めてみると、図 3 の如く 375 m μ に鋭い山と 700 m μ に極大をもつ比較的なだらかな山を認めた。

次にこの氷醋酸溶液に 0.25% の亜硝酸ソーダ水溶液を少量加えると、色調

は緑青色、青色、紫色、赤色、オレンジ色と変化し、Gmelin 反応と同一過程を追う。次に氷醋酸溶液に 15% sodium dithionite 水溶液を加えると緑黄色より黄色に変化するが、その際直ちに chloroform を加えて抽出を行なうと黄色色素は chloroform に移行する。この色素は Gmelin 反応、Diazo 間接反応陽性、Ehrlich 氏 aldehyde 反応、Schlesinger 反応陰性で、間接 bilirubin が考えられる。

4) 2 に依りえた ether 抽出物質の物理及び化学的諸性質は次のようである。

メタノール	易 溶
ether	可 溶 (醋酸酸性にて)
chloroform	可 溶
酸 (塩酸、硫酸)	不 溶
アルカリ (種々の濃度)	可 溶
融 点	275°C 附近
結 晶	無定形
色 調	緑 色

5) biliverdin の電気泳動結果

a) veronal 塩酸による緩衝溶液を pH 9.8 に調整し前記の条件で泳動すると biliverdin は陽極へ約 5.3 cm 移動する。

b) phosphate buffer を pH 7.2 にして泳動を行なうと陽極へ 2.4 cm 移動する。

c) phosphate buffer を pH 6.8 にして泳動を行なうと陽極へ 1.9 cm 移動する。

d) phosphate buffer を pH 5.2 にして泳動を行なうと全く移動しない。

e) 更に低い pH にすると資料が全くとけず又泳動を行なつても、陽極へも又陰極へも全く移動しない。以上により pH が低くなるにつれて緩衝溶液にとけにくく、陽極には移動するが陰極には移動しないなどから明らかな等電点を測定することは不可能であつたが、等電点は pH 4.8~5.2 附近に存するのではないと思われた。

考 按

L. Light 会社製の biliverdin は各種溶媒に難溶であり、R. Lemberg の記載した biliverdin の性状

とは異なることが注目された。そこで Nujol-paste 法を用いその赤外部吸収像を描いてみると、教室進藤が Theodor 会社製及び L. Light 会社製の biliverdin に就いて描いたと同様の成績がえられ、H. Fischer 及び R. Lemberg らにより明らかにされた結晶 biliverdin の化学構造式に一致しない。即ち注目すべきは 5.82~6.20 μ に巾の広い carboxylate ion (COO⁻) の吸収像をみることである。

処で教室山本(芳)は家兔胆汁中には ether 抽出可能な biliverdin と 5% 苛性加里アルコールによる 5 分間煮沸又は 10% 苛性加里液を作用させることにより、前者はすべて、後者は一部 ether 層に抽出され、又間接、直接 bilirubin を酸化して調整した biliverdin では前者は ether 抽出可能、後者は不可能であることから、ether 抽出可能な biliverdin を間接 biliverdin、抽出不能なそれを直接 biliverdin と命名した。

そこで上記の biliverdin の製造課程は不明であるが、5% 苛性加里アルコールに難溶ではあるが、一部溶解するので、その溶液と難解なものとを併せ、山本(芳)の方法で処理し、溶媒を pH 4.6 附近に酸性に調整し、ether を加えて抽出を試みると、始めて容易に緑色の色素が多量に抽出された。その ether 層を分離し、水洗後、醋酸酸性となし、亜硝酸ソーダで酸化すると Gmelin 反応と同様な酸化過程が識別され、又 sodium dithionite で還元し chloroform で抽出すると間接 bilirubin が証明された。又 ether 抽出液を氷醋酸に溶かし、可視部と紫外部の吸光曲線を描写すると、700 $m\mu$ 及び 375 $m\mu$ に極大を認め、従つて ether 抽出の色素は biliverdin の諸性状と完全に一致する。

そこでこの色素につき chloroform 法で赤外部吸収像を求めてみると、L. Light 会社製の biliverdin のそれとは次の点において明らかに異なつた。即ち a) 2.90 及び 3.11 μ に O-H 及び N-H の伸縮振動 ν OH, ν NH と思われる吸収を認めた。b) 5.83 μ に carboxyl 基 (COOH) の C=O 伸縮振動 ν C=O による吸収帯を認めた。c) 6.04 μ 附近に vinyl 基 (OH=CH₂) の C=C 伸縮振動 ν C=C による吸収帯を僅かに認めた。d) 6.20 μ 附近に共軛二重結合による吸収を僅かに認めた。

従つて 5% 苛性加里アルコールによる加熱操作により carboxylate ion は carboxyl 基に変化し、進藤が bilirubin 結晶において認めた如く ν OH, ν NH と思われる吸収を明瞭に認め、又 vinyl 基の吸収

帯と共軛二重結合の吸収を認めたが、共軛二重結合の吸収は 6.20 μ 附近のみで bilirubin に認めた 6.37 μ の吸収は認められなかつたが、これは bilirubin では共軛系が中間 methylene 基で中断されているが、biliverdin では中断されていない為と思われる。進藤は会社製の biliverdin につき bilirubin と比較して 3.02 μ の 1 つの吸収と vinyl 基と共軛二重結合が 1 つの吸収として表われることを構造上の特長の如く考えたが、carboxyl 基をもつ biliverdin では上記の如き共軛二重結合の吸収を除けば bilirubin のそれと一致している。

即ち L. Light 会社製の biliverdin には carboxyl 基の ion 化と vinyl 基及び 1 つの amino 基に何らかの結合が推測されるもので、それ故に各種溶媒に対し難溶性を示したものと考えられる。

このことは先に教室山本(芳)が胆汁中に認めた ether 難溶性 biliverdin の本態を解明し、更には直接 bilirubin の本態をも知りうる有力な手懸りを得たものと考えられる。

結 論

L. Light 会社製 biliverdin が各種溶媒に難溶である点に注目し、その赤外部吸収像を確め、特異的であるところから、これを 5% 苛性加里アルコールに溶解して煮沸水中 5 分間加熱した後、N/10 塩酸にて pH 4.6 附近迄酸性とすると ether に容易に抽出することが出来た。この ether 抽出物は緑色で、biliverdin の定性反応を満足させ、氷醋酸中で 700, 375 $m\mu$ に吸収極大を示した。

そこでこの ether 抽出可能な biliverdin の赤外部吸収と、先の会社製の biliverdin のそれと比較し、次の特長を認めた。

- 1) 2.90 及び 3.11 μ に OH, NH 基の吸収を認めた。
- 2) 5.83 μ に carboxyl 基の吸収を認めた。
- 3) 6.04 μ 附近に vinyl 基の吸収を認めた。
- 4) 6.20 μ 附近に共軛二重結合による吸収を認めた。

仍て ether 抽出の biliverdin は H. Fischer, R. Lemberg らにより明らかにされた biliverdin の化学構造を有する。一方会社製の biliverdin は carboxyl ion をもち、NH 基、vinyl 基が不明確であり biliverdin に何らかの結合基の存在が予測される。

(本研究には塩野義製薬研究所武田所長, 佐々木鑑三先生, 松井芳樹先生, 吉田信男先生, 並びに同製薬武田研究室, 中川研究室, 大塚研究室研究員諸

先生方より多大の御指導, 御便宜を賜つた。記して茲に深甚なる謝意を表する)。

主 要 文 献

- | | |
|---------------------------------|--|
| 1) 小坂: 東京医事新誌, 67巻, 11号 (昭25). | 5) 化学の領域: 増刊21号 (1956). 赤外部吸収スペクトル持輯, 南江堂 (昭31). |
| 2) 山岡: 日本内科学会誌, 42巻, 531 (昭28). | 6) 塩野義製薬研究所: ベックマン分光々度 DU型理論と応用テキスト. |
| 3) 進藤: 医学研究, 27巻, 1 (昭32). | |
| 4) 中西: 化学の領域, 7, 209 (1953). | |

Spectrochemical Studies on the Infrared Absorption Spectra of Biliverdin

Part 1. Studies on the Nature of Biliverdin on Sale and on its Infrared Absorption Spectra

By

Takashi Nakahara

The First Department of Internal Medicine, Okayama University, Medical School
(Director: Prof. K. Kosaka)

As L. Light company made biliverdin was hard to dissolve in the usual solvents, spectrochemical studies were made in which characteristic infrared absorption spectra were noted. L. Light company made biliverdin was dissolved in 5% potassium hydroxide alcohol and was acidified at about pH 4.6 with N/10 hydrochloric acid after 5's waterbath, and thus an ether extractable substance was obtained. This green colored ether extractable substance proved qualitative reaction for biliverdin and exhibited the absorption maximum at 700 and 375 m μ . in the glacial acetic acid. In the infrared absorption spectra of the ether extractable biliverdin, the following features were observed with that of L. Light company made biliverdin.

- 1) The OH, NH stretching vibration (VOH, NH) was observed at 2.90 and 3.11 μ .
- 2) The C=O stretching vibration of the carbonyl group (ν C=O) was observed at 5.83 μ .
- 3) The C=C stretching vibration of the vinyl group (ν C=C) was observed at about 6.4 μ .
- 4) Absorption band due to conjugated double bond aromatic ring vibration was observed at about 6.20 μ .

In consequence, the ether extractable biliverdin provided the chemical structure of biliverdin which was established by H. Fisher and R. Lemberg. On the other hand, L. Light company made biliverdin presumably had some combination radicals although it had carboxyl ion. It was not clear regarding NH and vinyl radicals.
