

Urobilinogen に関する研究

第一編

Urobilinogen の Ehrlich 氏 aldehyde 反応 呈色物質の分光化学的研究

岡山大学医学部第一内科教室（主任：小坂教授）

桜井 浩

〔昭和33年11月1日受稿〕

緒言

1901年 P. Ehrlich は、病的尿に塩酸々性で p-dimeihyl amino benz aedehyde を作用させると強い赤色を呈する事を、次で1903年 O. Neubauer¹⁾ が本反応は尿中 Urobilinogen に基因する事を発表して以来、Urobilinogen の Ehrlich 氏 aldehyde 反応は、肝機能検査上最も鋭敏なものとして今日広く応用されている。処で Urobilinogen の Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色液に就ての分光化学的研究としては1925年 A. J. L. Terwen²⁾ が先づ吸収の極大は 550 乃至 570 $m\mu$ と 475 乃至 495 $m\mu$ にあるとし、後者は、Ursbilin に依るものであろうと報告し、次で1933年 L. Heilmeyer³⁾ が、mesobilinogen の Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色液に就て行つた吸収曲線の測定ではその吸収の極大は 557 $m\mu$ と 490 $m\mu$ にあるとし、後者は Urobilin に依るものであろうとしている。一方1953年の C. J. Watson⁴⁾ の報告に依れば、彼が結晶 Bilirubin より調製した mesobilinogen の Ehrlich 氏 aedehyde 反応呈色液に就き測定した吸収曲線の極大は、565 $m\mu$ と 490 $m\mu$ にあるとした。又教室の矢田の測定では Uobilinogen 即ち stercobilinogen 及び mesobilinogen の Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色液の吸収曲線の極大はすべて pH 0.3 より 3.9 の間では 560 $m\mu$ と 494 乃至 490 $m\mu$ であると報告した。処で Urobilinogen 中の stercobilinogen と mesobilinogen の Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色液の吸収曲線の極大に差異のない事に既に1934年 Heilmeyer & Krebs³⁾⁶⁾ が、次で1936年 Watson⁶⁾ が確認している。処で、一致した意見であるが上記諸家の発表にみる如くその吸収極大の記述に就ては夫々多少の相違を認めている。仍て著者

は之等の点を再検討する為尿及び尿より調製した Urobilinogen 溶液の aldehyde 反応呈色液に就き、Indole 及び結晶 Bilirubin より調製した mesobilinogen の aldehyde 反応呈色液を対照として、詳細に、特に pH に依る影響に注意し分光化学的観察を行つた。

実験方法

1. 実験材料

1. 1. 尿よりの Urobilinogen 溶液調製法

Gmelin 反応陰性で Urobilinogen 含量の多い尿を用い、先づ氷醋を以て pH 3 乃至 4 とし、等量以上の ether を加えてよく振盪し ether 抽出液を調製し、之を蒸溜水で数回洗滌した後、1/3 容量乃至等量の N/10 苛性曹達溶液を加えて振盪し、ether 屑を除去した後 N/10 塩酸で pH 7 乃至 7.2 に調製し、之を Urobilinogen 溶液とした。本溶液は主として stercobilinogen よりなり、Indol 反応は陰性であつた。

1. 2. 尿りの Urobilinogen 溶液調製法

C. J. Watson⁴⁾ (1953) の方法に依り潜血反応陰性の健康人尿 50 乃至 100 g を乳鉢の中で少量の蒸溜水を注加しながら攪拌し全量が 200 乃至 400 cc になる如く調製した後、之を 1.0 l 入りの Erlenmeyer の flask に入れ、新しく調製した 20% 硫酸第一鉄溶液を 100 乃至 200 cc 加えてよく混和し、更に同量の 10% 苛性曹達溶液を除々に注ぎ乍ら攪拌して泥状液となし、此の flask を密栓して暗所に 1 時間以上放置する。次で内容を遠沈後上清を分液漏斗にとり 4 倍量の petrol ether を加え、飽和醋酸曹達 1 部と氷醋酸 4 部の混液で弱酸性となして振盪し petrol ether 屑を分離した後、更に残渣に等量の

petrol ether を加えて同様の操作を2回以上繰返し抽出する。次で之等の petrol ether を集積し蒸留水でよく洗滌してから1/3容量乃至等量の N/10 苛性曹達溶液を加え、軽く振盪した後 petrol ether 層を除き之に N/10 塩酸を加えて pH 7 乃至 7.2 に補正したものを Urobilinogen 溶液とした。本溶液は stercobilinogen のみから成り Indole 反応は陰性であつた。

1. 3. 結晶 Bilirubin より Urobilinogen 溶液調製法

C. J. Watson⁴⁾ (1953) の方法に依り、結晶 Bilirubin 10 mg を N/10 苛性曹達溶液 1.0 cc に溶かし、之に蒸留水 9 cc を加えたものを flask に入れ、4% Na-amalgam 3 g を投入した後密栓し約1時間絶えず振盪すると褐色調は漸次薄れて黄色調となり、遂には僅かに黄色を呈する液となる。此の液を蒸留水で薄めて分液漏斗に入れ飽和醋酸曹達1部、永醋4部の混液で弱酸性になし、之に petrol ether を加えて抽出し蒸留水で洗滌した後、分離した petrol ether 濾液に N/10 苛性曹達溶液を加えてよく振盪し petrol ether 層を除いた溶液を N/10 塩酸で中性に補正し、之を mesobilinogen 溶液とした。

1. 4. mesobilinogen dimethylester 合成法

mesobilinogen dimethyl ester の合成は先づ Bilirubin dimethyl ester 調製より始めた。即ち此の調製は木村¹⁴⁾の方法に依つた。即ち、Ether 20 cc 中に Nitroso methyl 尿素 2.5 g を投じ、之を氷冷しながら50%苛性加里水溶液 6.0 cc を除々に加え、水浴上で摂氏30度迄漸次加熱し、氷冷 ether 10 cc 中に蒸溜して diazo methan-ether 溶液 25 cc を得た。一方 merk 製結晶 Bilirubin 40 mg を 60 cc の chloroform 中に溶解しておき、上記調製の diazo methan ether 溶液 10 cc を加え、20分間振盪反応させると、帯黄緑褐色の濁液は帯赤褐色の清澄な溶液となつた。本液に10%炭酸曹達 20 cc を加えて未反応の結晶 Bilirubin を除き、過剰の分解を図つたが、木村の場合と同様未反応の結晶 Bilirubin は殆んどなく、炭酸曹達水溶液への移行は見られなかつた。次で此の chloroform-ether 溶液を2回蒸留水で洗滌し、無水硫酸曹達で脱水し更に一部をとり N/10 苛性曹達水溶液を加えて之に移行しない事を確認した。一方此の chloroform-ether 溶液を水素瓦斯気流中で減圧蒸発させ粉末とし、之に醋酸 ethyl 30 cc を加えて再び溶解させた後、後記する palladium carbon 0.7 g を触媒として之に加え水

素瓦斯にて接触還元を行つた。約2時間乃至2時間30分で水素の吸収は停止したので接触還元を終り、東洋濾紙 No. 6 で触媒を濾過して淡黄色透明の mesobilinogen dimethyl ester を得た。

1. 5. Palladium Carbon 触媒剤の調製法¹⁵⁾

活性炭に10%硝酸を加えて2~3時間水浴上で加熱し水洗後乾燥させる。この活性炭 41.5 g を 2 l 入りの Bieker に 600 cc の水と共に入れ 80°C に加熱する。別に、塩化 palladium 4.2 g 濃塩酸 10 cc 更に水 25 cc を加え完全に溶解清澄となる迄水浴上で熱する。此の溶液を上記活性炭に加え更に37% formalin 4 cc を加えて十分に混和し30%苛性曹達溶液を lithmus 試験紙が青変する迄加え更に5分間混和する。之を Buchner 吸引瓶にて吸引濾過し 125 cc の水にて繰返し洗滌してから乾燥して保存し、使用に供する。

2. Ehrlich's aldehyde 試薬調製法

Ehrlich's aldehyde 試薬は、Hildebrandt の処方に依る。即ち、p-dimethylamino benz aldehyde 2g を乳鉢にとり、濃塩酸 50 cc を除々に滴加して溶解した後、蒸留水 50 cc を追加して全量を 100 cc として後、東洋濾紙 No. 6 に濾過した。

3. 主要なる定性反応及び定量方法

3. 1. Urobilinogen 定量法⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾

L. Heilmeyer & W. Krebs 法に準じた。

3. 2. Urobilin 定量法及び定性法

定量法は、A. T. L. Terwen²⁾ 法に準じた。定性法は、W. schlesinger¹¹⁾ 法に依つた。

3. 3. Indole 反応

Saekswski-北里法¹²⁾ に依つた。即ち、被検液 10 cc に0.02%亜硝酸加里溶液 0.1 cc を加え、次で濃硫酸 3 乃至 4 滴を加えてよく混和する。若し Indole が存在すれば、5分間位で赤乃至赤紫色が現われる。

4. 被検液の吸光係数曲線描写法^{3), 13)}

吸光係数は、島津製 Q B - 50 型 Beckman 式光電分光々度計を用いて測定した。測定波長は可視部のみを使用し、測定に当つては、被検液を液槽 10 mm の水晶吸収槽に納め、対照には被検液の溶媒を置き吸光係数曲線を描いた。又米国 Beckman 製 D K 型自記分光々度計も併用した。

5. 水素 ion 濃度測定法

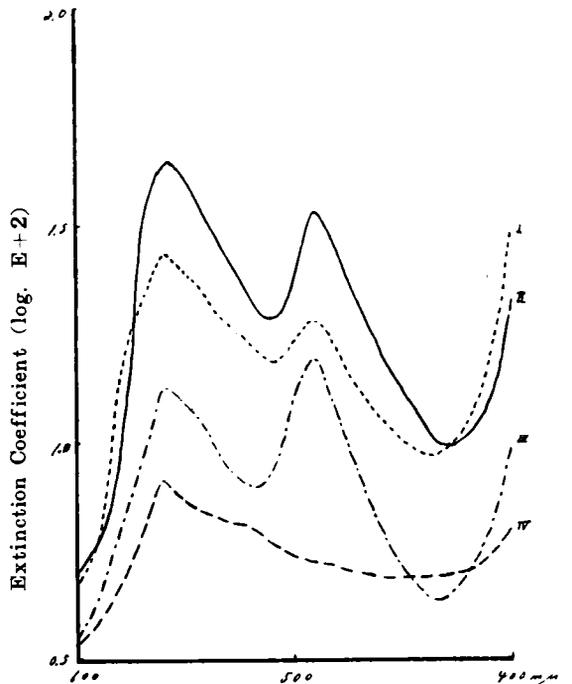
水素 ion 濃度測定には、東洋濾紙製 pH 試験紙並びに島津製 G U - 1 型硝子電極 pH meter を使用した。

実験成績並びに考按

1. Urobilinogen の Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色物質水溶液の吸光曲線及びその pH による影響

尿, 尿及び結晶 Bilirubin より調製した, 濃度 1.31 mg%, 1.39 mg %及び 0.88 mg %の Urobilinogen 溶液 5 cc に aldehyde 試薬 0.5 cc 宛加えて呈色させ, 反応の終結を待つて最終 pH 1.8, 2.2 及び 1.8 で吸光曲線を画くと, 第 1 図の様になる. 尚 Indole の夫は, 濃度 1.0 mg %の水溶液 5 cc に,

Fig. 1. Absorption Curves of the Aldehyde Reactants of Urobilinogen

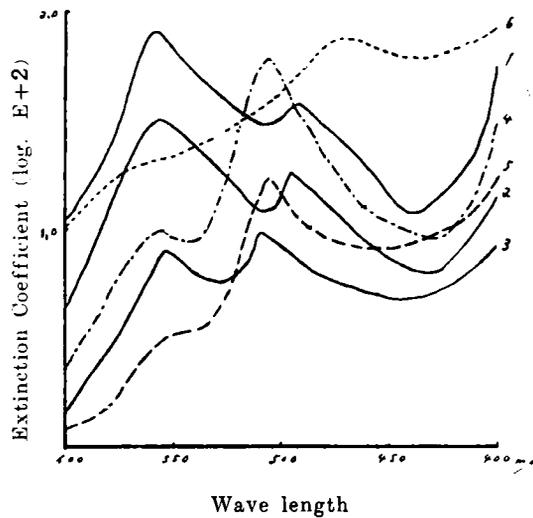


Absorption maxima	Wave length
I. 558, 492 mμ	
II. 558, 490 mμ	
III. 558, 490 mμ	
IV. 560 mμ	

- I. The reactant of Urobilinogen which was extracted from urine. pH 1.8, concentration 1.31 mg. %
- II. The reactant of Urobilinogen Which Was extracted from feces. pH 2.2, concentration 139 mg. %
- III. The reactant of Urobilinogen with was derived from crystalline bilirubin. pH 1.8 0.88 mg. %
- IV. The aldehyde rectan of thea aqueous solution of Indole. pH 3.8 concentration 1 mg. %

aldehyde 試薬 0.5 cc を加え最終 pH 3.8 で描いたものである. 此の結果 Indole の吸収の極大は, 560 mμ にあり単一な曲線であるが尿, 尿よりの Urobilinogen 呈色液は何れも 558 mμ と 492乃至 490 mμ と二つの極大を持ち, 結晶 Bilirubin よりの mesobilinogen 呈色液も全く同様である. 此の 558 mμ の極大は, Indole の夫に近似するが, 調製液中には Indole は含まれないから, Urobilinogen の aldehyde 反応呈色物の夫れによるものと考えられ, 492 乃至 490 mμ の極大は, stercobilin 乃至 Urobilin IXα の夫れに一致する. 次に各呈色液の pH を変じて吸光係数曲線の極大の移動を観察した. 図 2 に示す様に, 先づ pH 4.0 以下強酸性に於ては

Fig. 2. Absorption Curves of the Aldehyde Reactants of Urobilinogen at various pH Values.



- 1) pH 0.8 Ext. 0.37 max. 558, 492 mμ
- 2) pH 4.8 Ext. 0.24 max. 556, 496 mμ
- 3) pH 7.4 Ext. 0.17 max. 554, 508 mμ
- 4) pH 8.2 Eyt. 0.33 max. 555, 506 mμ
- 5) pH 9.4 Ext. 0.38 max. 506 mμ
- 6) pH 10.6 Ext. 0.45 max. 506 mμ

Urobilinogen の呈色液によると思われる吸収の極大は, 558 乃至 560 mμ にあり, Urobilin と思われる極大は 490 乃至 492 mμ にあり, 何れも余り移動しない. pH 4.2 に於ては 560 及び 494 mμ に極大がある. 併し, 更に pH が大となるにつれ Urobilinogen 呈色液によると思われる極大は 556 乃至 554 mμ と僅か短波長側に移動し, Urobilin と思われる吸収の極大は可成大きく移動し, pH 6.0 に於ては 496 mμ 更に alkali 性側では 510 mμ 迄長波長側に移動する, pH 9.0 以上に於ては最早 Urobilino-

gen 呈色液によると思われる極大は消失し, Urobilin と思われる極大も亦平坦となり, 逆に短波長に移動する. 又呈色液の Urobilinogen 濃度は勿論重要な要素で, 濃度の低い場合は pH 4.0 に於て既に Urobilin と思われる極大は長波長に移動し, pH 6.0 に於ては Urobilinogen の呈色液と思われる極大は消失し, Urobilin と思われる極大は平坦且短波長に移動する. 此の吸光係数曲線に於て尿及び尿より調製した溶液には全く差異を認めず, 更に Bilirubin より調製した mesobilinogen との間にも有意の差は認められなかつた. 処で mesobilinogen の Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色々素の吸収の極大の波長は L. Heilmeyer に依れば 557 $m\mu$ 及び 490 $m\mu$, C.J. Watson に依れば 565 $m\mu$ 及び 490 $m\mu$ 更に矢田に依れば pH 2.6 に於て 560 $m\mu$ 及び 494 $m\mu$ とし, 僅かではあるが著者の測定の結果と相違している. 此の原因は, 使用した光度計の種類や Ehrlich 試薬の調製法及びその添加量更に呈色液の pH 等, 測定条件の差異に依るものと思われる.

2. Urobilinogen の Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色物質の methanol 溶液の吸光曲線及びその pH による影響

尿より調製した stereobilinogen 溶液及び結晶 Bilirubin より調製した mesobilinogen 溶液各 50cc に Ehrlich 氏 aldehyde 試薬 5 cc を加えて呈色させ, 同量以上の chloroform を加えて振盪すると呈色物質は殆ど凡て chloroform 層に移行する. 此の抽出液を減圧蒸発させた後 methanol を加えて, 小試験管に分注し, 各々の pH を変じて吸収の極大の推移をみると図 3 の如くなる. 先づ stereobilinogen に就て pH 1.6 に於て吸収の極大は, 552 $m\mu$ 及び 492 $m\mu$ にあり, pH 5.4 に於ては 550 $m\mu$ 及び 490 $m\mu$ に, 更に alkali 性側に傾くにつれ水溶液の場合と同様に stereobilinogen の呈色液によると思われる極大は消失し, stereobilin と思われる極大は長波長に移る. mesobilinogen も同様な傾向を示すが酸性乃至弱酸性の場合, UrobilinIX α と思われる極大は, stereobilin の夫に比し 1~3 $m\mu$ 長波長にある. 繰返し実験を行つて各 pH 別に極大値の平均値をとると図 4 の如くなる. 即ち methanol 溶液中にて aldehyde 反応呈色液の吸収の極大は, stereobilinogen と mesobilinogen との間には差異はみられず, 水溶液時に比較して各々 4~6 $m\mu$ 短波長に移る. 処で (G. Niemann¹⁶) に依れば methanol 溶液で mesobilinogen 呈色液の吸収の極

Fig. 3. Absorption Curves of Reactants in Methanol

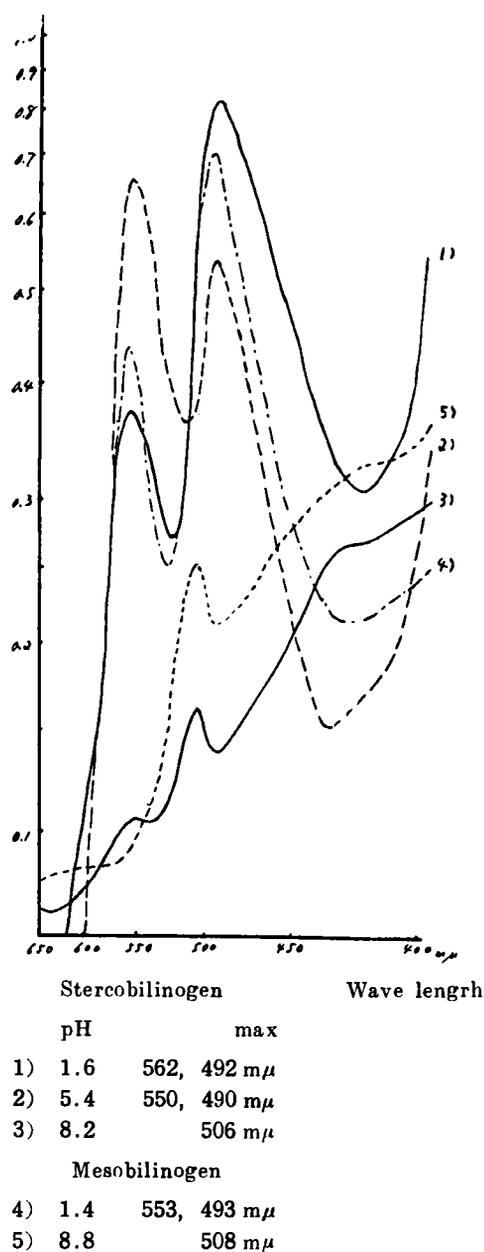


Fig. 4. Comparison of the two Reactants in Methanol at various pH Values.

ph	Stereobilinogen	Mesobilinogen
0.6~2.0	552, 492 $m\mu$	553, 493 $m\mu$
2.1~4.0	552, 490	552, 492
4.1~6.0	550, 490	550, 491
6.1~8.0	550, 489	550, 490
8.1 or more	504~508	504~508

大は 556 乃至 556.5 $m\mu$, 教室矢田に依れば stereobilinogen 呈色液の夫れは pH 6.0 乃至 6.4 に於て

550 m μ 及び 490 m μ としており、著者の成績は矢田の夫れと一致し、G. Niemaun の夫れと僅かに異なるが、測定条件の相違に由るものと思われる。

3. Urobilinogen の塩及び Ester の吸光曲線及びその pH に依る影響

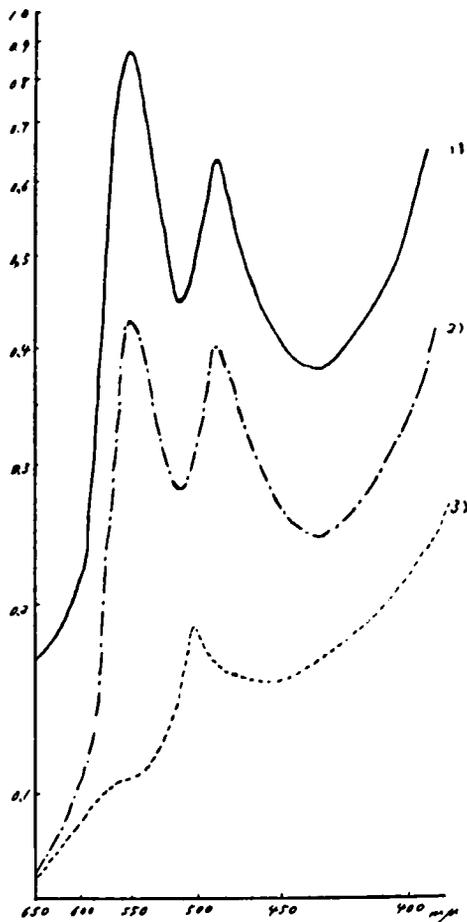
教室の野呂¹⁸⁾ 依れば、生体内 Urobilinogen には Bilirubin と同様間接型及び直接型の二型があり、前者は酸基遊離の化学構造を有し、後者はその ester 及び塩であるとしている。そこで酸基遊離の Urobilinogen 及びその塩と ester を調製し吸光曲線上極大に差異があるか否やを追求してみた。

3. 1. 濃度 118 mg% の尿 100 g を原料とし、Watson 法に依り調製し、野呂の方法で酸基遊離と認められた stercobilinogen 水溶液に N/10 苛性曹達、苛性加里及び ammonia 水を各々 4 cc 宛加之 stercobilinogen の Na, K 及び NH₄ 塩を調製し之

に aldehyde 試薬を加えて吸収の極大を測定すると図5の如く図2の遊離型に比し全く差異が認められなかつた。更に N/10 苛性曹達水溶液を以てその pH を変じ吸収の極大の推移を観察すると、遊離型と全く同様であり、Na, K 及び NH₄ 塩の間にも差異は認められなかつた。因みに Urobilinogen 100 mg に対し塩を形成するに要する計算量は、苛性曹達、苛性加里及び ammonia 何れの場合にも各 N/10 溶液 3.4 cc であつた。

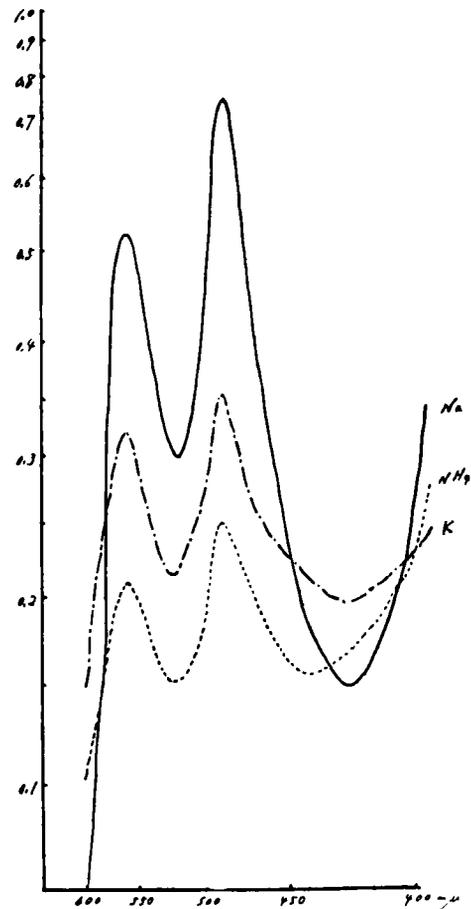
3. 23.1 に於て用いた stercobilinogen 水溶液に N/10 苛性曹達水溶液 15 cc を加え、後 aldehyde 反応を行い吸収の極大を求めると図6の如く 556 m μ 及び 490 m μ あり 3.1 の結果に比し stercobilinogen の極大は 2 m μ 短波長に移行するに過ぎなかつた。

Fig. 5. Absorption Curves of the Reactants of Urobilinogen Na Salt at various pH Values.



- 1) pH 1.0 max 558, 490 m μ Wave length
- 2) pH 3.2 558, 492 m μ
- 3) pH 8.2 509 m μ

Fig. 6. Absorption Curves of the Reactants of Urobilogensalt adding excessive NaOH, KOH, and NH₄OH.

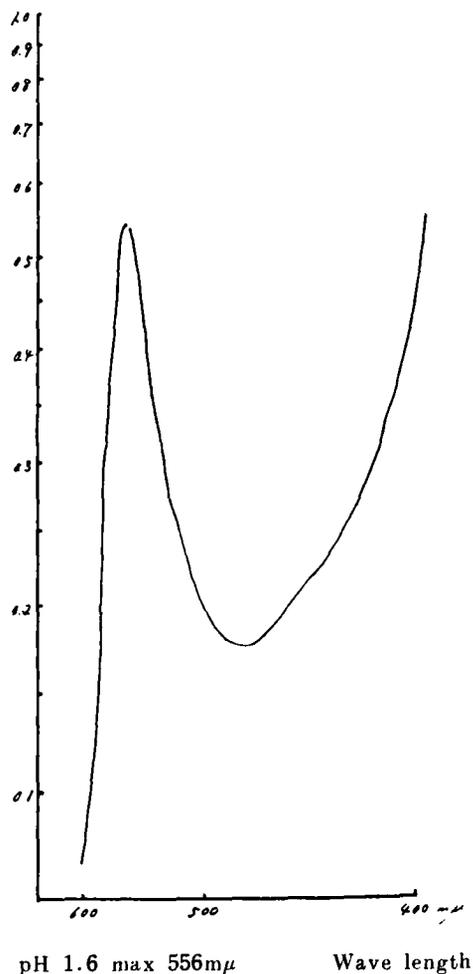


pH 1.4 max 556, 490 m μ Wave length

3. 3. stercobilinogen 調製時石油層より stercobilinogen を苛性曹達溶液中に抽出するが、その際爾後の操作を行わず、直ちに N/10 容量の aldehyde

試薬を加え呈色させ、反応直後自記分光々度計を用い吸光曲線を描写すると図7に示す如く最終 pH1.6 に於て 556 m μ に極大を有する単一な曲線を得、490 m μ 附近に全く隆起を欠いた。

Fig. 7. Absorption Curves of the Reactants which is extracted from alkaline Stercobilinogen Solution. (not added N/10 HCl)



以上の3実験より stercobilinogen の塩の Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色々素の吸光極大は、苛性曹達、苛性加里乃至 ammonia を計算量の数倍量加える事に依り、僅かに 2 m μ 短波長側に移動した成績を得ているが、aldehyde 試薬中の塩酸の為反応終末 pH は 1.4~1.6 に止つており、従つて得られた aldehyde 反応呈色々素が尚塩のまゝに止つているか否か疑問で、従つて stercobilinogen の曹達、加里或は ammonia 塩の aldehyde 反応呈色々素の吸光曲線には塩解離の現象を含めて考慮しなければならない。次に stercobilinogen 乃至 mesobilinogen の Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色々素の吸光曲線

を描写すると、556 m μ 附近に極大の山以外に、490 m μ 附近の山を認めており、既にこの山は stercobilin 乃至 Urobilin IX α の山であろうと推定したが、C. H. Gray¹⁷⁾ に依れば stercobilin, Urobilin IX α の塩酸塩の吸収極大は 489 m μ , 491 m μ で従つてその推定が正しいものと考えられる。唯之等 Urobilin が Urobilinogen の Ehrlich 氏 aldehyde 反応の反応過程中に副反応として生ずるものであるか、Urobilinogen が酸化に対し不安定である為、反応前既に生じたものであるか、疑問である。処で上記の 3.1, 3.2 の反応では Urobilin の吸収が得られるに対し、3.3 では終末 pH に殆んど前2実験と差異がなかつたにも拘らず全く認められなかつた。そうすると、Urobilinogen の酸化を防ぎ、純粹のまゝで反応を行えば、Urobilin は生じないものと断定出来る。

4. Mesobilinogen dimethyl ester の Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色物質の吸光曲線及び m-sobilinogen dimethylester の化学的性状

mesobilinogen dimethyl ester を調製後直ちに減圧蒸発して粉末とし、之に methanol 30 cc を加えて溶解し、3 cc の aldehyde 試薬を加えて呈色させ mesobilinogen の aldehyde 反応呈色物質を対照とし自記分光々度計を用い吸光曲線を描き吸収の極大を観察すると、図8の如く pH 3.8 に於て 550 m μ 及び 488 m μ に極大があり、対照として pH の等しい遊離 mesobilinogen の methanol 溶液に於ける aldehyde 反応呈色物質の夫れは 552 及び 490 m μ に極大を認め、2 m μ 短波長に移動した。

次に、mesobilinogen を対照とし mesobilinogen-dimethylester の性状を検討した。先づ mesobilinogen-dimethylester の醋酸 ethyl 溶液を減圧蒸発させ、改めて石油 ether を加えると、良く溶解し、微かな淡黄色を呈する。次に各種溶媒への移行性を検討してみると図9の如く N/10 苛性曹達、10% 炭酸曹達及び飽和醋酸曹達には対照の mesobilinogen は移行するが、全く移行しなかつた、次に酸に対する移行性では差異は認めなかつた。次に、mesobilinogen dimethylester の醋酸 ethyl 溶液を減圧蒸発し、種々の有機溶媒を加えて溶解性を観察すると chloroform, 石油 ether, ethyl ether, acetone, 醋酸 ethyl, methanol, ethanol, propanol に易溶であり、氷醋酸, pyridin には少々難溶であり、水には不溶である。H. Fischer¹⁹⁾ に依れば bilirubin dimethyl ester は ether, 石油 ether には難溶

Fig. 8. Absorption Curves of the aldehyde Reactants of Mesobilinogendimethyl ester (methanol solution)

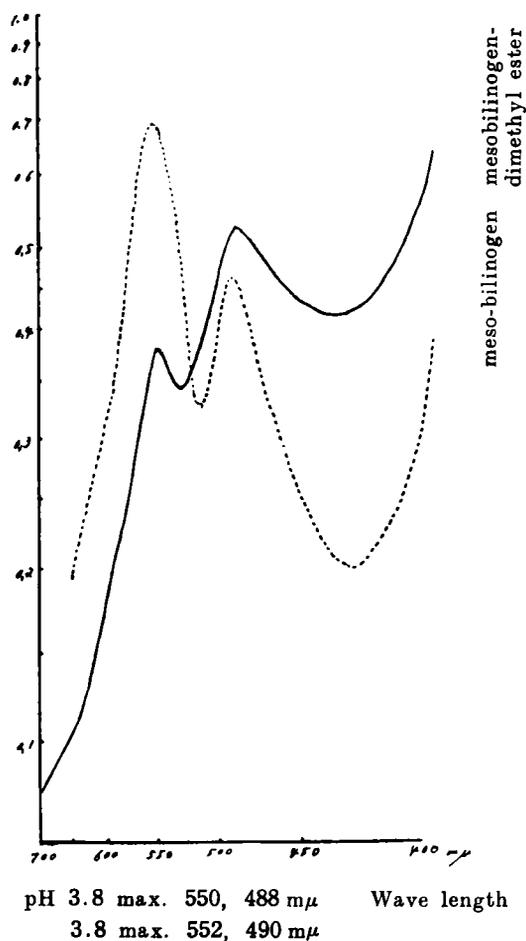


Fig. 9 Transferability of Mesobilinogen and Mesobilinogendimethylester from Petroleum Ether to various Solvents.

Solvent	material	Mesobilinogen	Mesobilinogen dimethyl ester
N/10 Na OH		(+)	(-)
10% Na ₂ CO ₃		(+)	(-)
conc. HCl		(-)	(-)
conc. H ₂ SO ₄		(-)	(-)
50% Na Acetate		(±)	(-)
sat. Na Acetate		(+)	(-)

であり、methanol には少々難溶であるが mesobilinogen dimethyl ester となると著しくその性質を異にしている。之等 mesobilinogen dimethyl ester を溶解した各種有機溶媒に 1/10 容量の aldehyde 対試薬を加え、aldehyde 反応を mesobilinogen を照として比較してみると、図10の如くであつて、両者共 chloroform, 石油 ether 及び Pyridin に於

Fig. 10. Ehrlich's Aldehyde Reaction in various organic Solvents.

	Mesobilinogen	Mesobilinogen dimethyl ester
CH Cl ₃	(±) yellow	(±) yellow
Pst-Ethen	(±) yellow	(±) yellow
Ethyl Ether	(++)	(++)
Ethyl acetate	(++)	(++)
Aceton	(++)	(+)
Eis acetic acid	(+)	(+)
Pyridin	(±) yellow	(-) slightly yellow
Methanol	(++)	(+) slightly turbid
Ethanol	(++)	(+) "
Propanol	(++)	(+) "

ては殆んど特有の呈色を示さず、僅かに黄変するのみであるが、ethyl ether 及び醋酸 ethyl に於ては原液は橙赤色となり境界面に特有の鮮紅色を示す、aceton, methanol, ethanol 及び propanol に於ては mesobilinogen は強陽性であり mesobilinogen dimethyl ester は陽性で、その程度を異にした。次に mesobilinogen dimethyl ester の石油 ether 溶液に aldehyde 試薬を加えて呈色させ、之に methanol を加え、次で減圧蒸発させ、改めて chloroform を加えて chloroform 呈色液を作り之を試料とし、mesobilinogen の aldehyde 反応呈色 chloroform 抽出液を対照とし、濾紙 schleicher & schüll 2043 Aを用い、methanol, 水 (1:2) を展開液とし、室温 21°C 下で一次元上昇法に依る濾紙 chromatograph 法を行つたが、mesobilinogen dimethyl ester に於て Urobilin IX α の dimethyl ester と思われる黄色斑が mesobilingen の夫れに比し、強く且大きく現われるのみで Rf 値に 差異は認められなかつた。そこで更に展開剤を種々変え対照との Rf の差異を検討したが遂に両者の差異を見出す事が出来なかつた。又 mesobilinogen dimethyl ester の調製時 urobilindimethyl estr IX α の生ずる事を恐れ慎重検討し、殆んどその操作に於て生ずる事を認めなかつたにも拘らず Ehrlich 氏 aldehyde 反応を行う操作過程に於て対照の mesobilinogen よりも urobilin をより多量に生じた事から mesobilinogen dimethyl ester は mesobilinogen に比し不安定であると思われる。この事は既に教室木村が bilirubin と bilirubin dimethyl ester に就て認めたと同様であつた。

結 論

尿及び尿より調製した urobilinogen 水溶液 (stercobilinogen) 並びに結晶 bilirubin を Na-amalgam で還元して調製した mesobilirubinogen 水溶液及びそれらより調製した塩及び mesobilinogen dimethyl ester の各々に就き Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色液を調製し、その分光化学的観察を行い、次の結果を得た。

1. 主として stercobilinogen を含む urobilinogen 液及び mesobilinogen の Ehrlich 氏 aldehyde 呈色液は何れも pH 4.2 に於て 560 m μ と 490 に吸収の極大を示す。

2. 上記の呈色液の水素 ion 濃度が 4.0 以下に於ては、558 m μ と 490 乃至 492 m μ に 2 つの極大を示し、両者共 pH に依る移動を殆んど示さない。

3. 呈色液の pH が 4.2 より大となるに従い、560 m μ の極大は 556 乃至 554 m μ と僅か短波長に移動するが、490 m μ のそれは 506 乃至 510 m μ 可成大きく長波長に移動し、更に alkali 性側に变化すると 560 m μ の極大は消失し、490 m μ のそれは逆に短波長に移行する。

4. 溶媒を水に代え methanol として測定すると何れの場合も pH 5.4 に於ては吸収の極大は 550 m μ 及び 490 m μ に認められる。而して stercobilinogen 及び mesobilinogen の Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色物質の間には pH を変じて差異は認められなかつた。

5. methanol 溶液中での urobilinogen の Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色物質は pH が酸性乃至弱酸性の場合、490 m μ の極大は、mesobilinogen の夫れが stercobilinogen の夫れより 1 乃至 3 m μ 長波長側に位置する。

6. stercobilinogen の Na, K 及び NH₄ 塩の

Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色物質は三者共に pH の変化に対し同じ極大を示すが、塩調製の為加える苛性曹達、苛性加里、ammonia 量を計算量の数倍として調製した場合は計算量の夫れを加えた場合及び stercobilinogen 自体の Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色物質の pH 1.4~1.0 に於ける吸収極大より 2 m μ 短波長に移動し極大は 556 m μ を示した。之等の結果は Ehrlich 氏 aldehyde 反応試薬中の塩酸に依る stercobilinogen 塩の解離を十分考慮した上で判定しなければならない。

7. 尿より stercobilinogen を調製する際石油 ether 層より苛性曹達に移行させる操作を行つた後直ちに Ehrlich 氏 aldehyde 反応を行つて吸収の極大を測定すると pH 1.6 に於て 556 m μ 極大のみ認め 490 m μ 附近の第 2 の極大を認めなかつた。従つて urobilinogen 調製時乃至操作時酸化を防げば 490 m μ の山は伴わないと考えられ、urobilinogen の Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色物質の吸収極大は 560 m μ 附近のもののみで 490 m μ 附近の夫れは urobilinogen の酸化した urobilin の吸収極大と考えられる。

8. mesobilinogen dimethyl ester を調製し、Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色物質の吸収極大を測定すると pH 3.8 に於て 550 及び 488 m μ であつた。

9. mesobilinogen dimethyl ester の各種溶媒に対する態度は bilirubin dimethyl ester と著しく異り、mesobilinogen より酸化に対し不安定である。

主 要 文 献

- 1) Neubauer, O. m \ddot{u} nch. Med. Wschr., 46, 1886 (1903)
- 2) Terwen, A. J. L. : Dtsch. Arch. Klin. Med., 149, 72 (1925)
- 3) Heilmeyer, L. : Medizinische Spektrophotometrie, Gustav Fischer (1933) Jena.
- 4) Watson, C. J. J. Biol. Chem., 200, 691, 697 (1953)
- 5) Heilmeyer, L. & Krebs, W. : Z. physiol. Chem., 228, 33 (1934)
- 6) Watson, C. J. : Am. J. clin. path., 6 458 (1936)
- 7) 矢田・医学研究, 第25巻, 第10号, (昭和30年) 1938.
- 8) Heilmeyer, L. & Krebs, W. Biochem. Z. 231, 393 (1931)
- 9) Heilmeyer, L. Z. exper. Med., 76, 220 (1931)

- | | |
|---|--|
| 10) Rudert, H. & Heilmeyer, L. · Bichem. Z. 261, 336 (1933) | 965 (1951) Longmans, Green Co. London. |
| 11) Schlesinger, W. Dtsch. Med. Ws hr. 29, 561 (1903) | 16) Niemann, G. : Z. physiol. Chem. 146, 181 (1925) |
| 12) 伝染病研究所学友会編 : 細菌学実習提要, 169 (昭26) | 17) Gray, C.H., The Bile Pigment 61 (1953) |
| 13) 齊藤 : 光電比色計による臨床化学検査法 (昭28) | 18) 野呂 医学研究, 第21卷, 第7号, 853 (昭26) |
| 14) 木村 : 医学研究, 23卷, 4号, 582 (昭28) | 19) Fischer, H. & Orth, H., : Die Chemie des Pyrrols II Band 637, Akademische Verlag, Leipzig (1937) |
| 15) Vogel, A. I. Practical organic Chemistry | |

Studies on Urobilinogen

Part 1. Spectrophotometric studies on the coloured substances of urobilinogen by the Ehrlich's aldehyde reaction

By

Hiroshi SAKURAI

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

Conclusions

The spectrophotometric studies were made on the coloured solutions prepared by the addition of the Ehrlich's aldehyde reagent into the urobilinogen solution (stercobilinogen) prepared from urine and stool, the mesobilirubinogen solution prepared from crystalline bilirubin by a reduction with sodium amalgam, and their salt and mesobilinogen dimethylester etc. And the results are as follows.

1. Both the urobilinogen solution in which stercobilinogen is mainly included and the mesobilinogen solution coloured with the Ehrlich's aldehyde reagent, display the absorption maxima at 560 $m\mu$ and 490 $m\mu$ at the pH 4.2.

2. When the hydrogen ion density of the above coloured solution becomes below 4.0, the absorption maxima display at 553 $m\mu$ and 490 $m\mu$ or 492 $m\mu$. Both of these absorption maxima are not moved by the change of pH.

3. In proportion as the pH of the coloured solution becomes high more than 4.2, the absorption maximum at 560 $m\mu$ shifts slightly to the short wave length and displays at 556 $m\mu$ or 554 $m\mu$, but the absorption maximum at 490 $m\mu$ shifts to the long wave length in a relatively prominent degree and displays at 506 $m\mu$ or 510 $m\mu$. As the pH of the coloured solution becomes showing a alkaline reaction, the absorption maximum at 560 $m\mu$ disappears and the absorption maximum at 490 $m\mu$ shows shifting to the opposite direction, the short wave length.

4. On the use of methanol, as a solvent, instead of water, both of them display the absorption maxima at 550 $m\mu$ and 490 $m\mu$ at the pH 5.4. And no differences are observed, on the change of the pH, between the coloured substances of stercobilinogen and mesobilinogen with the Ehrlich's aldehyde reagent.

5. As for the absorption maximum of mesobilinogen is observed shifting to the long wave length for 1 or 3 $m\mu$ more than that of stercobilinogen under the acid and weak acid condition of pH.

6. The coloured substances of the sodium-, potassium- and ammonium salts of urobilinogen with the Ehrlich's aldehyde reagent display the same absorption maxima by the change of the pH value, but the absorption maximum shifts to the short wave length for 2 $m\mu$ on the occasion of preparing the salts by adding several times of the computation dosis of caustic soda, caustic potash and ammonia more than on the occasion of preparing the salts by adding the computation dosis of them or the absorption maximum of the coloured substance of stercobilinogen itself with the Ehrlich's aldehyde reagent at the pH 1.4—1.0, and it displays at 556 $m\mu$.

7. When the Ehrlich's aldehyde reaction is obtained immediately after the process being moved into caustic soda from the petroleum ether stratum on the preparation of stercobilinogen from stool, the absorption maximum displays only at 556 $m\mu$ at the pH 1.6 without showing the absorption maximum around 490 $m\mu$. Therefore, it is thought that the absorption maximum at 490 $m\mu$ is not coexisted with the absorption maximum around 560 $m\mu$ when the oxidation is prevented on the preparation of urobilinogen or during its process, and that the absorption maximum of the coloured substance with the Ehrlich's aldehyde reaction displays only one around 560 $m\mu$ and the absorption maximum around 490 $m\mu$ belongs to that of the urobilin oxygenated from urobilinogen.

8. The coloured substance of mesobilinogen dimethylester with the Ehrlich's aldehyde reagent displays the absorption maxima at 550 $m\mu$ and 498 $m\mu$ at the pH 3.8.

9. The attitude of mesobilinogen dimethylester to various solvents is markedly different from that of bilirubin dimethylester, and mesobilinogen dimethylester is more unstable to an oxidation than mesobilinogen.
