

Urobilinogen に関する研究

第二編

Stercobilinogen と Mesobilinogen の Ehrlich 氏

Adehyde 反応呈色物質の Chromatography

による分離にて

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]

緒言

生体内 urobilinogen の大部分は stercobilinogen であるが、一部 mesobilinogen の混在が Baumgärtel, Tr. stich, H., Watson, C. J. 等に依り証明されている。彼等の検出法として採用した方法は mesobiliviolin 反応 (Fischer, H.), Pentdyopent 反応 (stich, W.), 施光性の有無等である。従つて stercobilinogen と mesobilinogen を分割分離することは、之等の方法では不可能であつた。Gohr, H. & Heinen, W. 及び stich, W. & kehl, X. 等は chromatograph 法を応用し、両者を分離しようと試みたが、その化学的不安定性の故か、目的を達するに至らなかつた。

著者は之等 urobilinogen の Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色物質の chromatograph 法に依る分離を試みた結果、両者の分離に成功すると共に、Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色物質に混在する Urobilin の分離にも成功したので、報告する。

実験方法

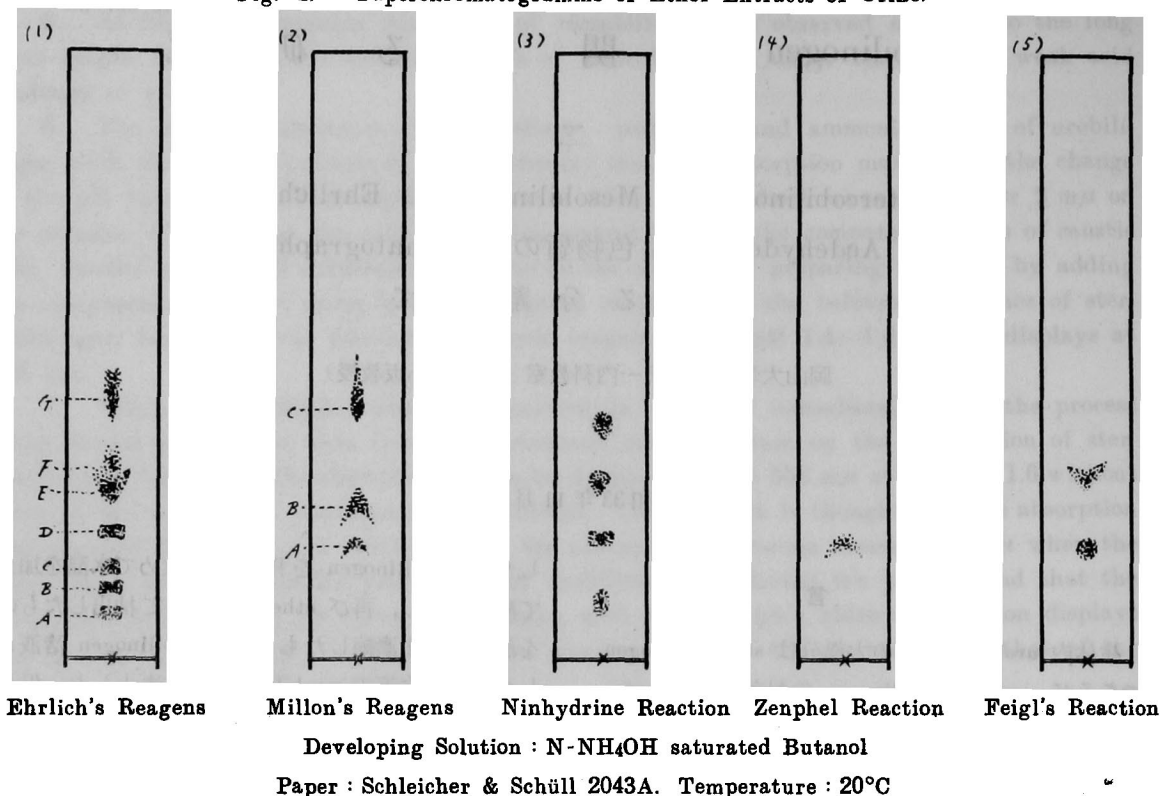
1. 実験材料

1. 1. 尿よりの urobilinogen 調製法

尿よりの urobilinogen 溶液の調製は、前篇と同様、Ehrlich 氏 aldehyde 反応強陽性、Gmelin 反応陰性の尿を用い、先づ氷醋酸を加えて pH 3 乃至 4 となし、同量の ether を加え、よく振盪し、ether 層を分離した後水洗を 2, 3 回繰返した後、ether 抽出液を減圧濃縮し、約 1 cc 以下となしたものと、及びこの ether 抽出層に更に 1/3 容量乃至等量に N/10 苛性曹達を加えよく振盪し、ether 層を除去

した後 urobilinogen を移行させ改めて氷醋酸を加えて酸性となし、再び ether を加えて抽出したものを前同様減圧濃縮したものを urobilinogen 溶液とした。但し之等の urobilinogen 溶液とした、但し之等の urobilinogen 溶液中には urobilinogen 以外に佐野³⁾の云う尿中 Ehrlich 氏 aldehyde 反応陽性物質の含有される恐れがあるので、両液に就き paperchromatography に依る検討を行い純度の検討を行つた。両溶液を便宜上前液、後液と呼称した。濾紙は schleicher & schüll に 2043 A を用い paperchromatography 法は後述の方法に依つた。先づ濾紙端より 4 cm の所に点状に試料を附着させ、1N-Ammonia 飽和 butanol を展開液として室温下一次元上昇法に依り約 17 cm 展開させ、展開後乾燥した後 Ehrlich 氏 aldehyde 試薬を噴霧すると、前液では図 1 の如く Rf 0.08 より 0.47 に至る約 7 種の多彩な発色斑を認めた。図中 A, D 及び G は帯青茶褐色、B は茶褐色、C は青紫色、E は青藍色、F は卵黄色であつた。次に同様に展開した濾紙に Ninhydrin^{5,6)} 及び millon 試薬を噴霧すると図中 (2), (3) の如く多数の発色斑を認めた。図 (2) の A 及び C は橙色、B は赤色にて前者に dopa 或は oxytryptophan, B は tyrosin と思われる。更に一級amins 基の検出法たる Zenphel 反応を行うと Rf 0.18 に黒斑を認め lysin 或は taurin かと思われる。又含硫 amino 酸の検出法として Feigl 氏反応を行うと、2 ケの日斑を認めた。斯くして前液中には尿中 amino 酸が多数証明され、Ehrlich 氏 aldehyde 反応陽性物質も 2, 3 に止まらない事を知りえた。佐野³⁾は尿中 aldehyde 反応呈色物質 26 種を報告し、それが殆んど Indikan 及び indika-

Fig. 1. Paperchromatograms of Ether Extracts of Urine.



noiden である事を明らかにしている。そうすると前液は urobilinogen 液として本実験に使用する事は不適當である。次に後液に就き前同様の実験を行つてみると、urobilinogen 以外は全く発色する物質を証明し得なかつた。即ち、尿中より urobilinogen 液調製に当つては、以後 urobilinogen 苛性曹達水溶液層を再び氷醋酸を加えて酸性となし、ether にて再抽出を行い、之を苛性曹達水溶液に移行させ中性となしたものを調製液として使用した。

1. 2. 尿よりの urobilinogen 溶液調製法

前篇と同様に調製した。この際本液の精度を知る為、1.1 と同様に paperchromatography に依る検討を行つたが、amino 酸の検出は行いえなかつた。

1. 3. 結晶 biliubin よりの urobilinogen 溶液調製法

前篇に同じ。

1. 4. Ehrlich 氏 aldehyde 試薬調製法

前篇に同じ。

2. 主要なる定性反応

2. 1. urobilin 定性法前篇に同じ。

2. 2. Indole 反応

前篇に同じ。

3. chromatograph⁶⁷⁾ 法

3. 1. Paperchromatograph 法

直径 7 cm 長さ 30 cm の硝子円筒に刻み目の入った No. 6 のゴム栓を施して展開装置となし、濾紙は独 schleicher & schüll 2043 A を用い、原点は濾紙端より 4 cm とした。試料の附着量は、その濃度により一定しないが、通常 0.05 乃至 0.1 cc を中心に点状に附着せしめた。展開実験は、常温 (16°C ~ 23°C) に於て一次元上昇法に依り、原点より約 17 cm 展開した。

3. 2. Column chromatograph⁴⁾ 法

直径 3 cm、長さ 35 cm、一端が細く括栓を附した硝子円筒に硝子綿少量を N/10 塩酸にて処理し、その十分水洗しよく乾燥したものを詰め、その上に東洋濾紙製粉末濾紙 14 g に約 3 cc の水を加えてよく潤したものを少量宛円筒内に固く詰める。他方 urobilinogen 調製液に aldehyde 試薬を加え反応させ、chloroform を加えて呈色物質を chloroform 層に移行させ約 2 cc 程度に迄減圧濃縮し、之に粉末濾紙 1 g を加えて十分吸着させ、再び減圧蒸発させて十分乾燥させた後、約 0.3 cc の水を加えて均等に湿したものを試料として上記粉末濾紙注の上に同様固く詰める。更にその上部に粉末濾紙 1 g に水 0.3 cc 加えたものを固く詰め chromatograph 柱を完成した。斯くして作製した chromatograph 柱の上部に展開剤として、methanol、水 (1:2) を加えて吸引する事なく展

開する。

3. 3. 水素 ion 濃度測定法

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

4. 被検液の吸光係数曲線抽写法

吸光係数曲線は米国 Beckman 製 DK 型自記光電分光光度計を用いて抽いた。測定波長は可視部を用い、対照には被検液の溶媒即ち展開液を用いた。

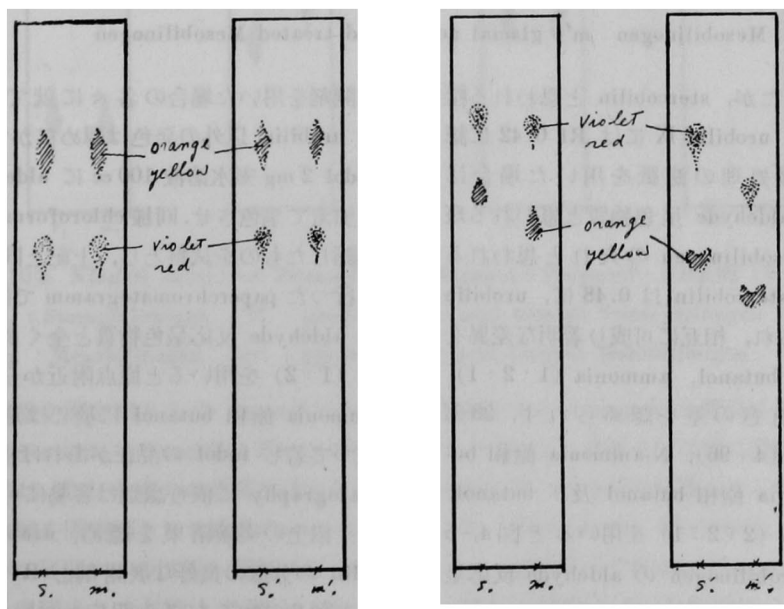
実験成績並びに考按

1. Urobilinogen の Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色物質の paperchromatography

尿より調製した濃度 4.1 mg % の urobilinogen 溶液 20 cc に、aldehyde 試薬 2 cc を加えて呈色させ、同量の chloroform を加えて振盪すると、呈色物は chloroform 層に移行する。此の chloroform 抽出液を約 1 cc 程度迄減圧濃縮して試料とし、対照として結晶 bilirubin 10 mg より調製した mesobilinogen を同様処理したものをを用いた。先づ蒸溜水のみを展開剤として用いた場合は Rf 0.35 乃至 0.40 に赤紫色斑、Rf 0.68 乃至 0.82 に黄色斑が認められ、schlesinger 氏試薬に浸すと黄色斑は緑色の螢光を発した。仍て赤紫色斑は urobilinogen、黄色斑は urobilin と思われるが、tailing が大で両者の分離は必ずしも良好でなかつた。次に展開剤として各

種の有機溶媒を単独に用いて展開したが、Benzol, Toluol, Butanol, cyclohexan 及び chloroform では原点に止まり、殆んど移動しなかつた。Gohr, H. ¹⁾ は、biliubin の如く中央位に methylen 基を有する胆汁色素は chloroform で移動し、urobilin の如く中央位に methin 基を有する胆汁色素は移動しないと述べているが、山岡・中川等に依ると urobilinogen の aldehyde 反応呈色物は中央位 methylen 基に於て p-dimethylamino benz aldehyde の塩酸塩が添加したものであると考えられているから、移動しなかつたものと思われる。又 chloroform, 氷醋 (2:1) 及び chloroform, methanol, 塩酸 (4:2:1) 又、butanol, 氷醋, 水 (4:1:5) 等の酸性展開剤を用いた場合は殆んど尖端に移動し、而も tailing が著明で両者の分離は不良であつた。次に、lutidin, collidin, 水 (1:1:1), pyridin, butanol, 水 (1:1:2) 等の pyridin 誘導体を用いた alkali 性展開剤の場合は特有な赤色斑が褪色し後に塩酸を加えても復色せず、又 schlesinger 試薬に浸しても螢光は認められず、濾紙上にて何等の化学反応の進行が考えられ、展開剤としては不適当と認めた。更に ethanol, 水 (1:2), propanol, 水 (1:2) にて展開すると Rf 0.62 乃至 0.74 に赤紫色斑が、Rf 0.80 乃至 0.88 に黄色斑が認められるが、分離は不良であつた。methanol, 水 (1:2) に於ては図 2 の如く Rf 0.59 に赤紫色斑、Rf 0.76 に

Fig. 2. Paperchromatogramms of the Aldehyde Reactants of Urobilinogen.

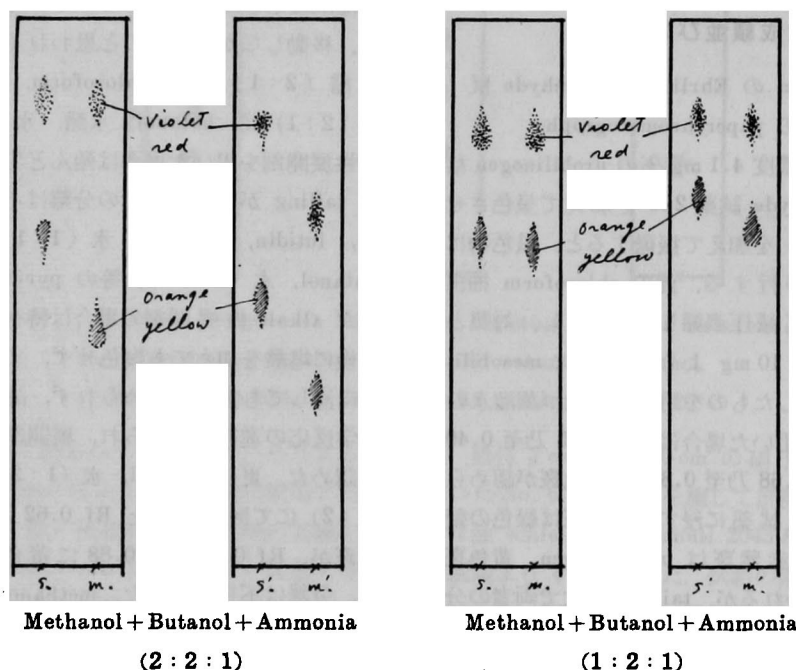


Methanol + H₂O (1:2) Methanol + Ammonia + H₂O (76:4:20)
 S: Stercobilinogen S': Glacial acetic acid treated Stercobilinogen
 m: Mesobilinogen m': Glacial acetic acid treated Mesobilinogen

黄色斑を認め、分離は良好であつた。又 Gohr¹⁾ の如く cyclohexan, methanol, chloroform (0.5 : 0.1 : 1.8) にて展開を行つたが、濾紙の相違からか尖端に移動し分離は不良であつた。次に methanol, ammonia, 水 (76 : 4 : 20) にて展開した場合は図 2 の如く Rf 0.68 に橙黄色斑, Rf 0.82 に赤色斑を認めた、次に濾紙を予め氷醋酸蒸気中に貯えて氷醋酸を固定相としたものを用いると stercobilinogen の

aldehy 呈色物質で Rf 0.55 に球状に固まつた橙黄色斑を, Rf 0.78 に赤紫色斑を認めた。他方 mesobilinogen の夫れでは Rf 0.48 に橙黄色斑を, Rf 0.69 に赤紫色斑を生じた。斯くて stercobilinogen と mesobilinogen 夫々の Ehrlich 氏 aldehyde 呈色物質の間には Rf 値上差異が認められた。更に両者に就き methanol, butanol, ammonia (2 : 2 : 1) を展開剤として検討すると図 3 の如く両者共 Rf 0.85

Fig. 3. Paperchromatograms of the Aldehyde Reactants of Urobilinogen



S. : Stercobilinogen S' : glacial acetic acid treated Stercobilinogen
m. : Mesobilinogen m' : glacial acetic acid treated Mesobilinogen

に赤紫色斑を認めたが, stercobilin と思われる橙黄色斑は 0.61 に, urobilin IX には Rf 0.42 に認められた。又水醋酸処理の濾紙を用いた場合は stercobilinogen の aldehyde 呈色物質と思われる斑は Rf 0.81 に, mesobilinogen の夫れと思われる斑は 0.64 に, 又 stercobilin は 0.48 に, urobilin IX には 0.31 に認められ、相互に可成り著明な差異を示した。methanol, butanol, ammonia (1 : 2 : 1) を用いると両者に有意の差を認められず, 28% ammonia, butanol (4 : 96), N-ammonia 飽和 butanol, 10% ammonia 飽和 butanol 及び butanol, propanol, ammonia (2 : 2 : 1) を用いると図 4, 5 に見られる如く urobilinogen の aldehyde 反応呈色物質と urobilin との分離は良好であるが, stercobilinogen, mesobilinogen の夫々の aldehyde 反応呈色物質の間には差異は認められなかつた。尚上記

展開剤を用いた場合の各々に就ては urobilinogen と urobilin 以外の発色は認めなかつた。尚試みに, Indol 2 mg % 水溶液 100 cc に aldehyde 試薬 10 cc を加えて呈色させ、同様 chloroform にて抽出し減圧濃縮したものを試料とし、上記と同一展開液を用いて行つた paperchromatogramm では, urobilinogen の aldehyde 反応呈色物質と全く異り, methanol, 水 (1 : 2) を用いると原点附近から移動せず, 10% ammonia 飽和 butanol に於ては逆に尖端に移動し、従つて若し indol の混在があれば上記の paperchromatography に依り識別は容易に可能であると云える。以上の実験結果を纏め、urobilinogen と urobilin の分離の良好な展開剤と Rf 値を表にしてみると図 6 の如くなる。即ち methanol, ammonia, 水 (76 : 4 : 20) 及び methanol, butanol, ammonia (2 : 2 : 1) 及び 10% ammonia 飽和 butanol を展開

Fig. 4. Paperchromatograms of the Aldehyde Reactants of Urobilinogen



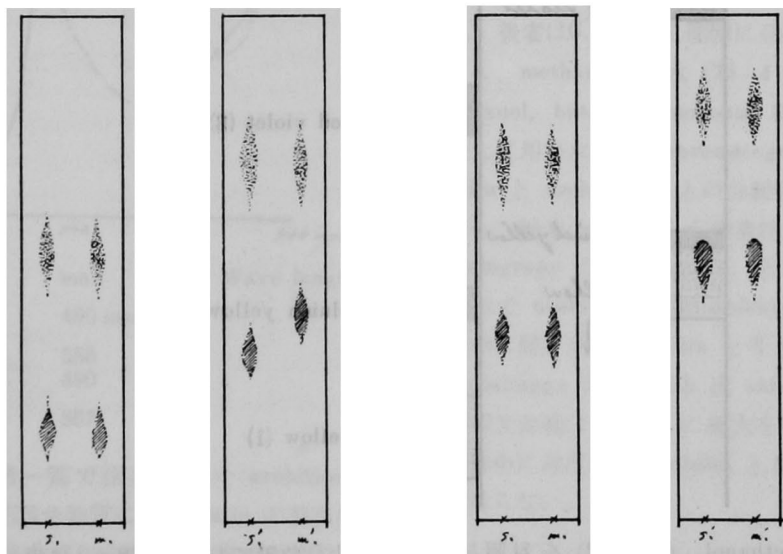
28% Ammonia + Butanol (4 : 96)

N-NH₄OH saturated Butanol

S. : Stercobilinogen S' : glacial acetic acid treated Stercobilinogen

m. : Mesobilinogen m' : glacial acetic acid treated Mesobilinogen

Fig. 5. Paperchromatograms of the Aldehyde Reactants of Urobilinogen

10% NH₄OH saturated ButanolButanol + Propanol + NH₄OH (2 : 2 : 1)

S. : Stercobilenogen S' : glacial acetic acid treated Stercobilinogen

m. : Mesobilinogen m' : glacial acetic acid treated Mesobilinogen

剤として用い氷醋酸を固定相とした paperchromatograph では, stercobilin と urobilin IX α との間に R_f との間に R_f 値に可成りの差異が認められた。尚この場合氷醋酸を固定相とした濾紙に ammonia を含む溶媒を用いて展開するのは些か問題がある様に考えられるが, 展開途中に濾紙上で酸と alkali との種々の平衡が起り, 分配の差が強かつわれ複雑な配位をとるに至るものと思われる。尚この際展開

後風乾して ammonia を蒸発させると, 何れも復色する所から, 濾紙上では特に問題とすべき化学変化は起らず, 十分目的を達しうるものと思われる。

2. urobilinogen Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色物質の Column Chromatography

尿より調製した stercobilinogen 調製液に 1/10 容の aldehyde 試薬を加え呈色させた後, 粉末濾紙に依る column chromatography を行つた。展開液

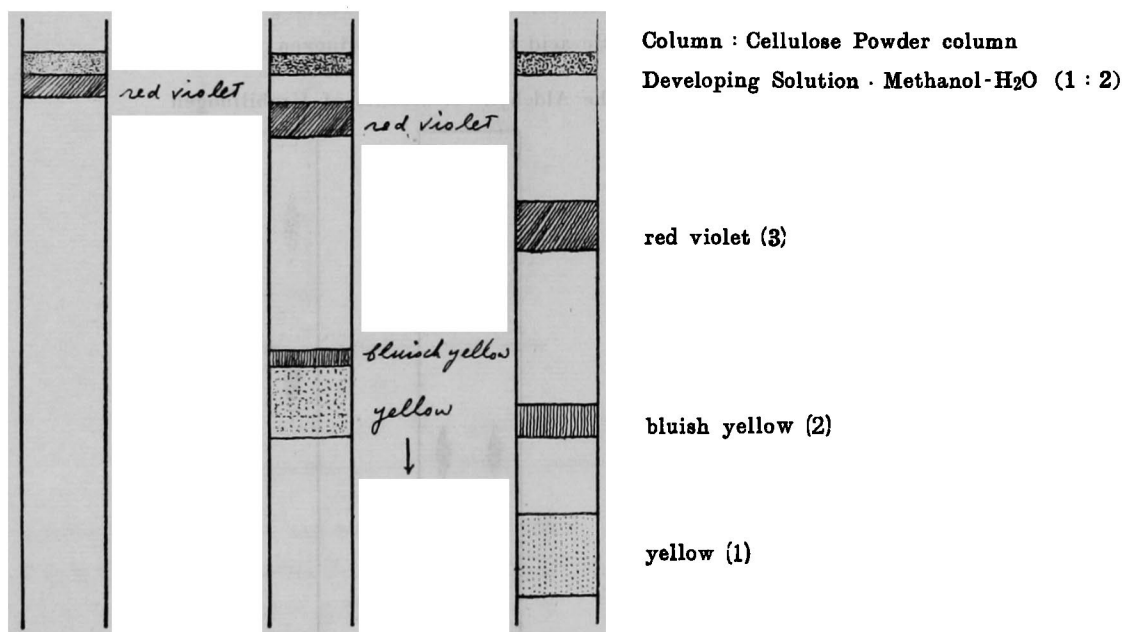
Fig. 6. Rf Values of the Urobilinogen Reactants.

Solvents					Acetic acid treated			
	Stercobili- nogen	Sterco- bilin	Mesobili- nogen	Nrsbilin IX ₂	Stercobili- nogen	Sterco- bilin	Mesobili- nogen	Nrsbilin IX ₂
Methanol + H ₂ O (1 : 2)	0.59	0.76	0.58	0.76	0.60	0.77	0.59	0.75
Met-OH + NH ₄ OH + H ₂ O (76: 4: 20)	0.82	0.68	0.80	0.61	0.78	0.55	0.69	0.48
Met-OH + But-OH + NH ₄ OH (2: 2: 1)	0.86	0.61	0.84	0.42	0.81	0.48	0.64	0.31
Met-OH + But-OH + NH ₄ OH (1: 2: 1)	0.79	0.60	0.78	0.58	0.83	0.68	0.81	0.61
28% NH ₄ OH + Butanol (4 : 96)	0.56	0.14	0.56	0.14	0.23	0.03	0.31	0.03
N-NH ₄ OH sat. Butanol	0.48	0.17	0.49	0.13	0.64	0.24	0.64	0.23
10% NH ₄ OH sat. Butanol	0.53	0.19	0.52	0.18	0.70	0.33	0.70	0.41
Butanol + Propanol + Ammonia (2 : 2 : 1)	0.70	0.36	0.70	0.36	0.82	0.51	0.82	0.51

は、methanol, 水 (1 : 2) を用いた。その結果、
図7の如く徐々に黄色帯と赤色帯の二層に分離を始
め、黄色帯は比較的速かに移動するが、赤色帯は可

成緩急に移動する。その際この二つの着色帯の中間
で、黄色帯に近く帯青黄色の分別帯が分割される。
之等を自然流下を待つて、個々に試験管に採取し、

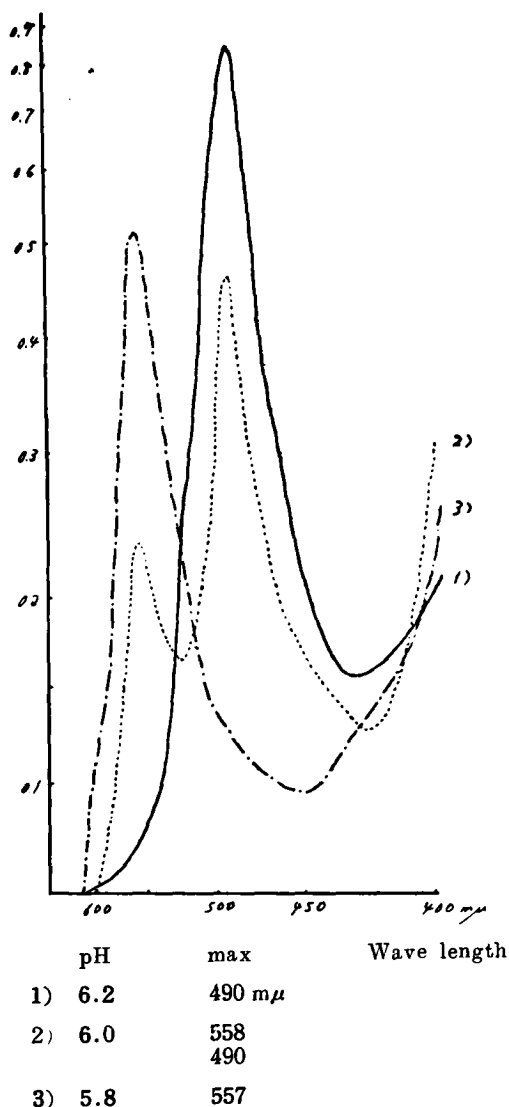
Fig. 7. Column Chromatogram of the Aldehyde Reactants of Stercobilinogen



展開剤と同一の methanol, 水 (1 : 2) を対照として吸光曲線を描いてみると、図8の示す如く、最初に流下する黄色帯は図中 1. の如く 490 mμ に単一の極大を有する曲線が得られ、之に等量の schleisinger 試薬を加えると緑色の強い螢光を発するので stercobilin と考えられる。次に流下する帯青黄色帯は図中 2. の如く 558 mμ 及び 490 mμ に極大を有する二峯性の曲線を示し他に曲線の山を認めず、Schleisinger 試薬に依り緑色の螢光を発するところから stercobilin に stercobilinogen の aldehyde 反応呈色物質が混存しているものと考えられる。最後に流下する走紫色帯は図中 3. の如く 600 mμ 附

近より急激に上昇し 558 mμ に単一の極大を有する曲線を示し、左右対称的で、urobilinogen の aldehyde 反応呈色物質の吸光曲線に屢々認められる 490 mμ 附近の山は認められなかつた。即ち、粉末濾紙の吸着柱とし、methanol, 水 (1 : 2) を展開剤とし、urobilinogen (この際は stercobilinogen) の aldehyde 反応呈色物質の Column chromatography を行つてみると urobilinogen の aldehyde 反応呈色物質とそれに混合する urobilin との分離を行う事が出来た。尚展開剤に paperchromatography の場合用いた ammonia を含む展開剤を用いると赤紫色帯に褪色したまゝで復色せず不適當であつた。以

Fig. 8. Absorption Curves of the Aldehyde Reactants in Each separated Zone on the Column of Cellulose Power.



上に依り既に第一篇で認めた如く urobilinogen の aldehyde 反応呈色物質には urobilin の混在を屢々認め、その吸光曲線作成時には注意が必要であることが云える。

結 論

生体内 urobilinogen の大部分を占める stercobilinogen と、一部の存在が考えられる mesobilinogen とを分離する方法としてその aldehyde 反応呈色物に就き paperchromatography に依り区別する事を試みると共に、urobilinogen の aldehyde 反応呈色物質中に混在する urobilin を粉末 cellulose を用いた column chromatography に依り分割する事を試み以下の如き成績を得た。

1. methanol, 水 (1:2), methanol, butanol, butanol ammonia (1:2:1), 28% ammonia, butanol (4:96), N-ammonia 飽和・butanol, 10% ammonia 飽和 butanol 及び butanol, propanol, ammonia (2:2:1) 等を展開剤とし、paperchromatography を行くと、urobilinogen の aldehyde 呈色物質と urobilin の分離は良好であるが、stercobilinogen と mesobilinogen の夫々の aldehyde 反応呈色物質間には分離は不能であつた。

2. 氷醋酸を固定相として濾紙にて、methanol, butanol, ammonia, 水 (76:4:20) 及び methanol, butanol, ammonia (2:2:1) を用いて展開すると stercobilinogen の aldehyde 反応呈色物質と mesobilinogen の失れとは Rf 値に於て前者の 0.81 に対し、後者は 0.64 を示し明瞭に分割出来る。

3. methanol, 水 (76:4:20) 及び methanol, butanol, butanol, ammonia (2:2:1) を展開剤として用いた paperchromatography では stercobilin と urobilin IXα との分割も容易であつた。

4. 粉末 cellulose を吸着柱とした column chromatography では methanol, 水 (1:2) を展開剤とすれで urobilinogen の aldehyde 反応呈色物とその中に混在する urobilin とを分離出来る。斯くて urobilinogen の Ehrlich 氏 aldehyde 反応呈色物質の吸光曲線は 558 mμ に極大を有する単一曲線で、操作中に混在する urobilin とは厳に区別しなければならない。

主 要 文 献

- 1) Gogr, H. & Heinen, W. : Z. gesamt, Inn. Med. 11, 310 (1956)
- 2) Stich, W. & Kchl, R. : Z. physiol. Chem. 292, 178, 180 (1953)
- 3) Sans, I. : Z. physiol. Chem. 300, 252 (1955)
- 4) 佐野 : 生化学, 27巻3号, 153~164 (1955)
- 5) 大須賀 化学の領域, 8巻, 3号, 181 (1954)
- 6) 栗田 : クロマトグラフィー (昭29) 続クロマト

- グラフィー (昭30) (広川書店)
- 7) 佐竹: クロマトグラフ, 共立全書, 12巻 (昭28)
- 8) Lederer, E. & M.: Chromatography, Elsevier
Publishing. Co. (1954)
- 9) Baumgärtel, Tr.: Med. Klin. 42, 231 (1947)
43, 320 (1948)
- 10) Stich, W.: Münch. Med. Wschr. 92, 1276
(1950)
- 11) Stich, W.: Klin. Wschr. 26, 365 (1848)
- 12) L wry, P. T., Ziegler, N. R., Cardinal, R.
& Watson. C. J., J. Biol. Coem. 208, 543
(1854)

Studies on Urobilinogen

Part 2. Separation of the coloured substances of stercobilinogen and mesobilinogen with the ehrlich's aldehyde reagent by the chromatography

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 paper chromatography was attempted for the separation of stercobilinogen, predominating in urobilinogen of living body, and mesobilinogen, being supposed to partly exist in vivo, on the coloured substances of them by the addition of the Ehrlich's aldehyde reagent, and the column chromatography with the column of a cellulose powder was also attempted for the separation of the urobilin coexisting in the coloured substances of urobilinogen by the addition of the Ehrlich's aldehyde reagent. And the results are as follows.

1. The coloured substance of urobilinogen and urobilin are definitely separated, but the separation between the coloured substances of stercobilinogen and mesobilinogen by the addition of the Ehrlich's aldehyde reagent is impossible, by the paper chromatography with the developing solvents of a methanol and water mixture (1:2), a methanol, butanol and ammonia mixture (1:2:1), a 28% ammonia and butanol mixture (4:96), N-Ammonia-condensed butanol, 10% Ammoniacondensed butanol, and a butanol, and a butanol, propanol and ammonia mixture (2:2:1) etc.

2. The coloured substances of stercobilinogen and mesobilinogen with the Ehrlich's aldehyde reagent display the Rf 0.81 and 0.64 respectively and are definitely separated, on the use of the paper with the stationary phase made with glacial acetic acid and, with the developing solvents of a methanol, ammonia and water mixture (76:4:20) and a methanol, butanol and ammonia mixture (2:2:1).

3. The separation of stercobilin and urobilin IX α are easily obtained by the paper chromatography with the developing solvents of a methanol, ammonia and water mixture (76:4:20), and a methanol, butanol and ammonia mixture (2:2:1).

4. The coloured substances of urobilinogen with the Ehrlich's aldehyde reagent and urobilin in them can be separated by the column chromatography with the column of cellulose powder and the developing solvent of a methanol and water mixture (1:2). Therefore, as the absorption curve of the coloured substance with the Ehrlich's aldehyde reagent displays having only one absorption maximum at 558 m μ , it must be definitely distinguished from the urobilin which becomes coexisted during the process.