

Monomethoxy-bilirubindimethylester 及び dimethoxy-bilirubindimethylester の性状に関する研究

第 1 篇

化学的性状に就て

岡山大学医学部第 1 内科教室 (主任: 小坂教授)

有 地 澄 郎

〔昭和34年 8 月28日受稿〕

緒 言

bilirubin を diazomethane を用いて ester 化する際に bilirubindimethylester の他に, α 位の両端に存する水酸基の一側或は両側が置換されて, 夫々その monoether (monomethoxy-bilirubindimethylester), diether (dimethoxy-bilirubindimethylester) を生ずる事は, H. Fischer¹⁾ によつて記載せられているが, これ等両者の性状に就ては尙審かでない点が多く, 特にその分光化学的報告は未だ成されていない. またこれ等両者の様に, bilirubin の propion 酸基乃至は水酸基に結合基が存する場合の, diazo 反応が如何に変化するかは不明である.

そこで monoether, diether を調整し, その調整法の検討, 分光化学的性状, 化学的性状特にその diazo 反応に対する態度に就いて検討を行った.

実 験 方 法

1. bilirubindimethylester の合成

W. Küster²⁾ の方法に倣い diazomethane-ether 溶液を用いて ester 化を行ったが, diazomethane は nitrosomethylurea より出発した. 即ち ether 15cc 中に nitrosomethylurea 2 g を投じ, 是を氷冷しながら 50%苛性加里水溶液 6 cc を徐々に加え水浴上で 30°C まで漸次加熱し, 氷冷 ether 10cc 中に蒸溜して diazomethane-ether 溶液 20cc を得た. 他方結晶 bilirubin を chloroform 中に浮遊させて置き, 是に上記の diazomethane-ether 溶液を加え 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に変化した. 本液を 10%炭酸曹達水溶液で洗滌して未反応の結晶 bilirubin を除き, 且つ余剰の diazomethane の分解を図つたが, 實際に

は既に未反応の結晶 bilirubin は殆んどなく, 10%炭酸曹達水溶液への移行は見られなかつた. この bilirubin-dimethylester の chloroform-ether 溶液を更に蒸溜水で数回洗滌し, 次に無水硫酸曹達で脱水後濾過した. 斯くして調整を終ると直ちに減圧吸引して枯濁粉末となし冷暗所に保存した.

2. chloroform の精製³⁾

主として安定剤として含まれる ethanol を除く目的で, column chromatography の展開剤として使用する直前に, 蒸溜水で数回洗滌し, 次いで塩化カルシウムで脱水後使用した.

3. mono- 及び dimethoxy-bilirubindimethylester の分離

H. Fischer¹⁾ の原法に倣い, 円柱硝子管を用い, 下端に脱脂綿球をつめ, Brockman 製 chromatogramm 用活性 alumina 1 容量を chloroform 2 ~ 3 容量にとかしたものを注入して, chromatograph 吸着柱を作り, bilirubindimethylester の chloroform 溶液を吸着柱の表面が一様に浸される様に注入し, 自然浸透のままに放置して, 溶媒が全部濾過されて了うや直ちに精製 chloroform を注入して展開し, diether を得た. diether が流出し終ると次に chloroform で展開して monoether を得た. 最後にこの吸着柱を下端より硝子棒で突出し, 最上層部を chloroform-methanol (1:1) に溶出し, 東洋濾紙 No. 6 で濾過して, bilirubindimethylester を得た.

4. 被検液の吸光係数曲線描写法

Beckman DK 型 自記分光光度計を用いて測定した. 対照には被検液の溶媒と同一のものを用いた.

また赤外部吸収 spectrum は塩野義製薬研究部に依頼し, 測定は Perkin-Elmer 12C 型自記赤外分光

光度計に依つて行われた。

5. diazo 試薬の調製

Jendrasik & Cleghorn⁴⁾の処方によつた。

6. 各種溶媒に対する溶解度及び diazo 反応時の反応速度曲線の決定

各種溶媒に対する溶解時の比較には Pulfrich の Stufenphotometer で濾光板 S_{43} と液槽 1.0cm により測定した吸光係数値を以てした。

又 diazo 反応時の反応速度曲線の決定には, diazo 試薬を加えた後, 各時間毎の吸光係数を濾光板 S_{53} と液槽 1.0cm に依り測定して行つた。

実験成績並に考按

1. monoether, diether の分離法 (column chromatography法) に関する検討

diazomethane を用いて ester 化した bilirubindimethylester より, その monoether, diether を分離する為には, H. Fischer¹⁾ の報告によると, 活性 alumina を吸着剤とする column chromatography で, chloroform で展開して得る流出液が diether, 次で chloroform に少量の methanol を加えて展開することに依り得る流出液が monoether であると述べている。先づこの原法に倣い chloroform 次で容量比 100:1 の chloroform-methanol で展開して得た流出部につき, 分光化学的に検討した。

最初の流出部は chloroform 溶液で吸収極大は $420m\mu$ にあり diazo 間接反応陽性, 次で得る流出部は chloroform 溶液で吸収極大は $400m\mu$ にあり, これは後述する様に, bilirubindimethylester そのものの吸収曲線であり, 之は bilirubindimethylester が 流出した為と考えられ, 展開剤として適当でない事を認めた。この理由として, 市販 chloroform には安定剤として 1% の ethanol を含む為と考えられる。即ち chloroform を精製することなくそのまま展開剤として使用する場合には, 吸着剤に固定されているべき bilirubindimethylester が chloroform 中に含まれる ethanol 及び添加 methanol の影響をうけて, 一部流下してくるものと考えられる。又精製していない chloroform で展開して得た流出部は, 赤外部吸収像で OH 基に依る吸収を認め, diether を分離する為には, 展開剤として用いる chloroform は精製に依り ethanol を除く必要を確認した。

そこで, 精製により ethanol を除いた chloroform で展開してみると, 以下の方法により確認する通

り diether を純粹にうることが出来た。

diether が流出し終つた後, chloroform で展開すると, monoether が流出する。

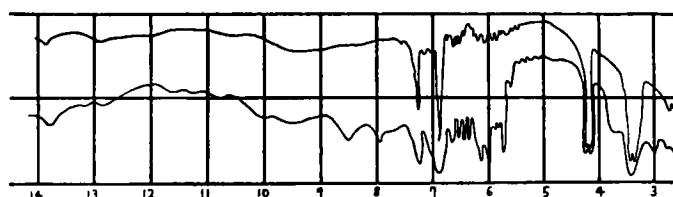
吸着剤として尚 silica gel を使用し検討したが, 諸種の展開溶媒によつて column の最上層に存する bilirubindimethylester が一部混合して流下する為に, 適当とは思われなかつた。

2. 分光化学的検討

2.1. 赤外部吸収像

前記の方法によりえた bilirubindimethylester は Nujol-Paste 法で図表第 1 の如き赤外部吸収像を示した。

Fig. 1. Infra-red absorption spectrum of bilirubin-dimethylester by Nujol-Paste Methode



即ち, 3.43μ , 3.51μ , 6.85μ , 及び 7.27μ に 4 個の paraffin oil 固有の吸収を認めるが, bilirubindimethylester 吸収に関しては下記の如き所見を得た。

- 3.00μ に OH, NH の伸縮振動 ν_{OH} , ν_{NH} に依る吸収帯を 1 個の吸収帯として認める。
- 5.76μ に ester の C=O 伸縮振動 $\nu_{C=O}$ に依る吸収帯と思される吸収を認む。
- 6.03μ に vinyl 基 ($-CH=CH_2$) の C=C 伸縮振動 $\nu_{C=C}$ に依る吸収帯を認む。
- 6.12μ , 6.34μ に共軛二重結合に依る吸収を認め, これは根の吸収と思される。
- 10.08μ と 10.85μ に vinyl 基の C-H 面外変角振動 δ_{CH} に依る吸収帯を認む。

これ等の結果から bilirubin は ester 化されていることが証明される。

次に bilirubindimethylester の α 位の両端に存する水酸基の一側或は両側が methoxyl 基で置換された monoether 及び diether の赤外部吸収像は, 3.00μ の OH, NH の伸縮振動 ν_{OH} , ν_{NH} に依る吸収帯を除いては, bilirubindimethylester のそれと同様であるので, 3.00μ 附近の赤外部吸収像を bilirubindimethylester, monoether, diether の三者につき比較すると夫々図表第 2, 第 3, 第 4 に示す如くである。

Fig. 2. Infra-red absorption spectrum of dilirubin-dimethylester around 3μ .



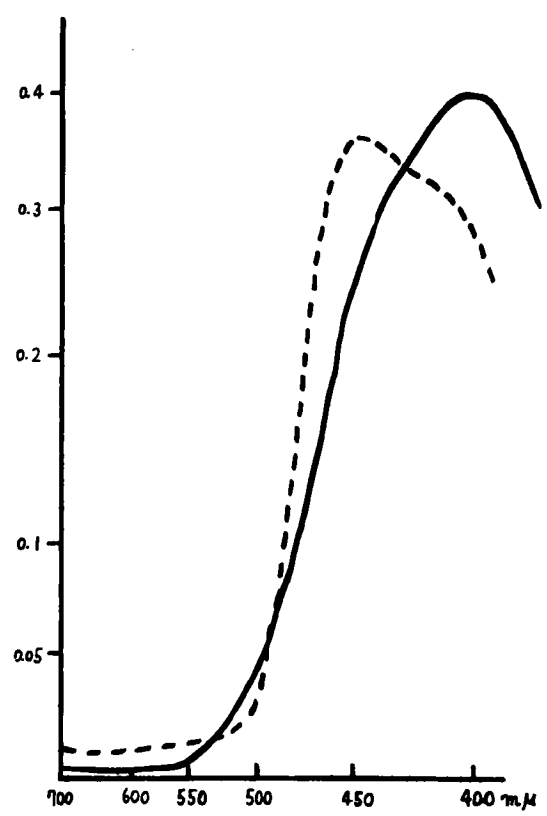
Fig. 4. Infra-red absorption spectrum of diether around 3μ .



Fig. 3. Infra-red absorption spectrum of monoether around 3μ .



Fig. 5. Absorption spectra of bilirubin-dimethylester
 — chloroform solution
 ... methanol solution



即ち diether の赤外部吸収像にては、 2.9μ に小なる ν_{OH} とも ν_{NH} とも思考し得る1個の吸収帯を認め、 ν_{OH} 或は ν_{NH} のいづれなりやは判別し難いが、monoether の夫れに比べて極めて小なる吸収となつてゐる。

この点より diether に於ては水酸基の消失が考えられる。

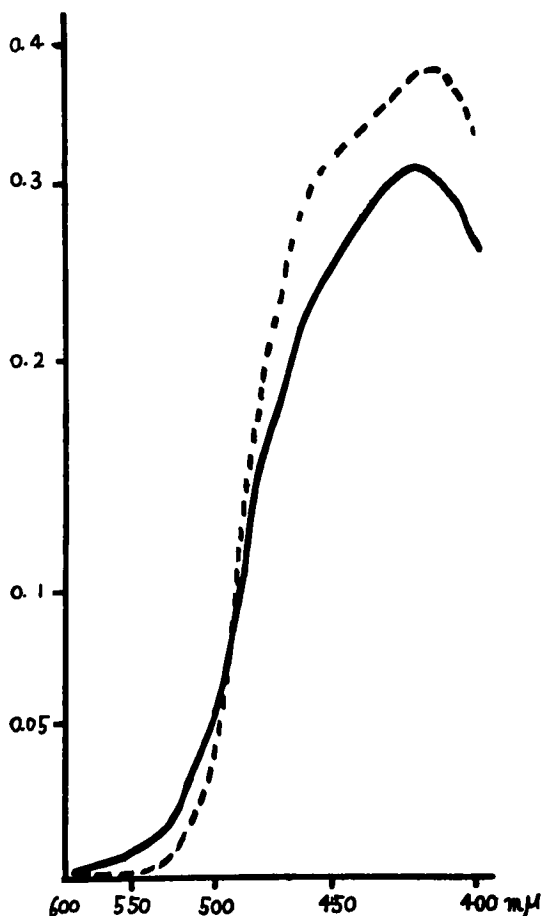
2. 2. 可視部吸収曲線

先づ bilirubindimethylester の吸収曲線は図表第5に示す如く、chloroform 溶液で $400m\mu$ に、methanol 溶液では $450m\mu$ に吸収極大を有する。

monoether, diether は図表第6に示す如く、いづれも chloroform 溶液で $420m\mu$, methanol 溶液で $415m\mu$ に吸収極大を有し、殆んど差異を認めない。

Fig. 6.

Absorption spectra of monether & diether
— chloroform solution
... methanol solution



3. diazo 反応に対する態度に関する検討

3. 1. 各種有機溶媒中の diazo 反応

monoether 及び diether と bilirubindimethylester との比較は第1表に示す様に、chloroform 溶液では、monoether, diether は直接反応陰性であり、bilirubindimethylester は直接陽性である。その他 Petrolether, ethylacetat, ethylether 溶液に於ても何れも同様な結果を示した。

第1表 各種有機溶媒中の diazo 反応

org. solvent	diether	monoether	bilirubin-dimethylester
chloroform	(-)	(-)	(+)紫 色
petrolether	(-)	(-)	(+)紫 色
ethylacetat	(-)	(-)	(+)紫 色
ethylether	(-)	(-)	(+)紫 色
aceton	(+)赤 色	(+)赤紫色	(+)紫 色
acetic acid	(+)紫 色	(+)紫 色	(+)紫 色
pyridine	(+)赤 色	(+)赤紫色	(+)赤紫色
methanol	(+)赤紫色	(+)紫 色	(+)紫赤色

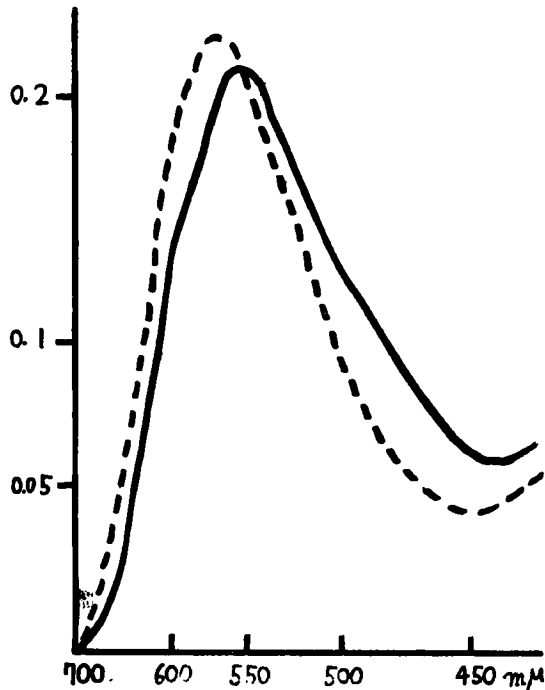
又 aceton, acetic acid, pyridine, methanol 溶液に於ては、monoether, diether 共に bilirubindimethylester と同様に何れも陽性に反応した。これ等 aceton, acetic acid, pyridine 及び methanol は教室の研究では何れも間接 bilirubin を直接化する物質として知られており陽性を示すことは当然と思われる。この様に間接 bilirubin を直接化する溶媒以外の有機溶媒では、monoether, diether は diazo 反応陰性で、結晶 bilirubin と同様な態度を示す。

そこで更にこれらの chloroform 及び methanol 溶液中での diazo 反応状態を分光学的に検討してみると monoether, diether の chloroform 溶液に diazo 試薬を加え充分振盪した場合は diazo 試薬層は無色で、可視部吸収曲線上にも吸収極大を認めないが、bilirubindimethylester の chloroform 溶液で diazo 反応を行うと、試薬添加後充分振盪すると、diazo 試薬層は著明に紫色を呈して直接 diazo 反応陽性であり、その azo 色素は $560m\mu$ に吸収極大を示し、且つ塩酸添加に依る酸性 azo 色素も $560m\mu$ に吸収極大を有し長波長側へは移動せず不変である。

次に、monoether, diether methanol の溶液で diazo 反応を行うと、いづれも赤紫色を呈し、図表第

7に示す様に 550m μ に吸収極大を有するが、塩酸添加による酸性 azo 色素は青紫色を呈し吸収極大は 570m μ に移動する。

Fig. 7. Absorption spectra of the diazoreaction of monoether & diether in methanol
 — azo dyes
 · azo dyes+hydrochloric acid



3. 2. azo 色素の分光化学的経日的観察

monoether, diether, bilirubindimethylester 等の bilirubinoid に於ける間接 diazo 反応過程を分光化学的に検討するために、これ等 bilirubinoid の chloroform 溶液-methanol-diazo 試薬 (2 : 6 : 1) による azo 色素を室温に放置し、その変化を経日的に追求した。これ等 bilirubinoid の azo 色素は、いずれも赤紫色を呈して monoether, diether の azo 色素ではいずれも 530m μ , bilirubindimethylester の azo 色素は 540m μ に吸収極大を有するが、いずれも経日的に漸次橙色调をおび、吸収極大は短波長側に移行し且つ扁平となる。

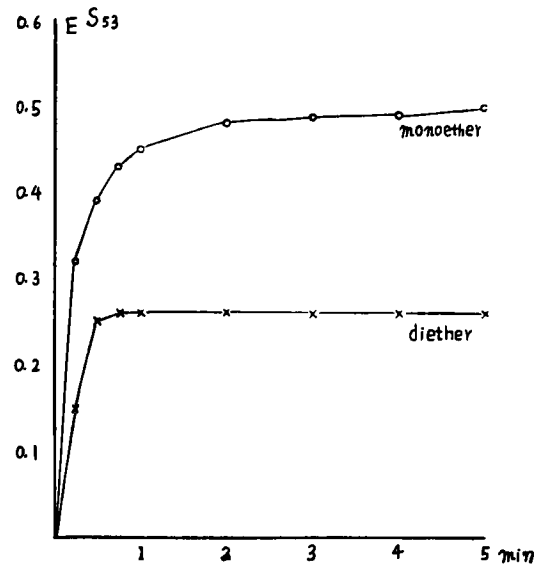
次に monoether, diether, bilirubindimethylester の各 azo 色素に塩酸を添加して得た酸性 azo 色素は、いずれも青紫色を呈し 580m μ に吸収極大を有し、室温に放置するも 2 週間後に於ても吸収曲線には有意な変化を認めず、極めて安定であった。

3. 3. methanol 溶解時の diazo 反応速度

monoether, diether の methanol 溶液に diazo

試薬を添加した後、diazo 反応を pulfrich の光度計で 15, 30, 45 秒, 1, 2, 3, 4, 5 分と観察し、反応速度曲線を描写すると、図表第 8 に示す様に monoether, diether いずれに於ても反応は促進され、1~2 分で反応は完結する事を認めた。

Fig. 8. Diazoreactions curves of monoether and diether in methanol



3. 4. 血清溶解時の diazo 反応

bilirubindimethylester 及びその monoether, diether はいずれも血清に溶解し難い為濃厚な血清溶液は調製し難いが、第 2 篇に記載する方法により血清に溶解させて diazo 反応の態度に就き検討した。bilirubindimethylester 溶解血清に diazo 試薬を加えると、紅赤色を呈して直接反応陽性である。monoether, diether 溶解血清に diazo 試薬を加えると、bilirubindimethylester の場合に比べて反応は遅延するが軽度に紅赤色を呈して、直接 diazo 反応陽性であった。尚 Pulfrich の Stufenphotometer で diazo 試薬添加後各時間毎の吸光係数を測定したが、monoether, diether の azo 色素の吸光係数は Stufenphotometer の目盛りで 0.1 以上に達せず肉眼の感覚度よりその読みは困難で、反応速度曲線の決定は出来なかつた。

4. その他 2, 3 の性状に関する検討

先づ酸及び alkali に対する溶解性は第 2 表に示す様に、1 規定塩酸及び 1 規定硫酸には両者いずれも溶解しないが、濃塩酸及び濃硫酸にはいずれも一部溶解し、濃塩酸にては赤変し、濃硫酸では緑変する。又いずれの alkali にも溶解しない。

第2表 酸及び alkali に対する溶解性

	diether	monoether
一規定苛性曹達水溶液	(-)	(-)
1/10規定苛性曹達水溶液	(-)	(-)
10% 炭酸曹達水溶液	(-)	(-)
飽和重炭酸曹達水溶液	(-)	(-)
一 規 定 塩 酸	(-)	(-)
濃 塩 酸	(+)赤変	(+)赤変
一 規 定 硫 酸	(-)	(-)
濃 硫 酸	(+)緑変	(+)緑変

各種有機溶媒に対する溶解性を比較する為に、蒸溜水を対照として吸光係数を測定すると、第3表に示す様に多少程度の差はあるがよく溶解する。

第3表 各種有機溶媒に対する溶解性(S₄₈)

org. solvent	diether	monoether
chloroform	0.15	0.39
petrolether	0.16	0.29
ethylacetat	0.17	0.37
ethlether	0.17	0.34
aceton	0.16	0.38
acetic acid	0.05	0.11
pyridine	0.17	0.32
methanol	0.14	0.43

次に Gmelin 反応を chloroform 溶液について行い結晶 bilirubin, bilirubindimethylester の場合と比較すると次の様であつた。即ち結晶 bilirubin, bilirubindimethylester はいづれも 緑, 青, 紫, 赤, 橙色と呈色の変化を示した。monoether は赤, 緑, 青, 緑, 橙色と変化し, diether は赤, 緑, 橙色と呈色の変化を示した。この様に呈色の経過に差異はあるが、いづれも Gmelin 反応陽性であつた。

次にこれ等の bilirubinoid を chloroform 溶液となし, methanol を少量加えた後塩化第二鉄濃厚水溶液を加えると, bilirubindimethylester, monoether, diether は赤色輪, その上層に緑色輪を生じ, 三者同様な態度を示すが, 結晶 bilirubin では赤色輪を認めず, 緑色輪のみを認めた。

次に aldehyde 反応を chloroform 溶液について行くと, 試薬添加後充分振盪すると, 試薬層はいづれも淡緑色を, chloroform 層は, bilirubindimethylester, monoether では暗褐色, diether では紅色を示した。methanol 溶液について行くと, いづれも緑色を呈した。以上の呈色はいづれも試薬中の塩酸に依る為と考えられ, aldehyde 反応陰性であつた。

次に Schlesinger 反応を, chloroform, methanol を溶媒として行つたが, monoether, diether ともに, 紫外線下に螢光を示さず陰性であつた。

結 論

結晶 bilirubin より diazomethane を用いて bilirubindimethylester 調製時に生ずる monoether, diether を分離し, その分離法の検討, 分光化学的及び化学的性状につき検討を加えて以下の所見を得た。

1. column chromatography による monoether, diether の分離には, 吸着剤には活性 alumina 展開剤には chloroform が最も好適であつた。
2. 以上の方法により分離した bilirubindimethylester, その monoether, diether の赤外部吸収像を描き, 化学構造式の妥当性を確認した。
3. chloroform 溶液とした場合 bilirubindimethylester は 400m μ に吸収極大を有し, monoether, diether はいづれも 420m μ に吸収極大を有し殆んどが差異を認めない。
4. chloroform, petrolether, ethylacetat, ethylether 等の有機溶媒に於て, bilirubindimethylester は直接 diazo 反応陽性であるが, monoether, diether は陰性である。
5. monoether, diether の methanol 溶液に於ける azo 色素は 550m μ に, 塩酸添加による酸性 azo 色素は 570m μ に吸収極大を有する。
6. bilirubindimethylester の monoether, diether の間接 diazo 反応によりえた azo 色素は経日的に漸次短波長側に移行し, 吸収極大も扁平となるが, 塩酸添加による酸性 azo 色素は変化せず安定である。
7. bilirubindimethylester の monoether 及び diether はともに諸種有機溶媒に溶触し易いが, 酸及び alkali には濃塩酸濃硫酸を除き溶解しない。
8. bilirubindimethylester, その monoether, diether の chloroform 溶液につき, bilirubin の

chloroform 溶液を対照として Gmelin 反応, 塩化第二鉄濃厚水溶液添加時及び aldehyde 試薬添加時の反応の推移を呈色について観察すると, 夫々多少の差

異を示した. そのことは夫々の構造の差異による安定性に基くものと思われる.

参 考 文 献

- 1) Fischer, H. Plininger, H. & Weissbarth, O. : Z. physiol. chem., 268, 197, 1941.
- 2) Küster, W. : Z. physiol. chem., 141,40, 1924.
- 3) 日本化学会編 : 実験化学講座 2 基礎技術II, 丸善株式会社, 昭30.
- 4) Jendrassik, L. Cléghorn, R. A. & Grofe P. : Biochem. Z., 297, 71, 1938.
- 5) 木村 : 医学研究, 23, 34, 昭28.

Properties of Monomethoxyl-Bilirubindimethylester and Dimethoxybilirubin Dimethylester

Part 1 A Study on the Chemical Properties of these Compounds

By
Sumiro ARICHI

Department of Internal Medicine Okayama University Medical School
(Director : Prof. Kiyowo Kosaka)

By isolating monoether and diether produced in the preparation of bilirubindimethylester from crystalline bilirubin with the use of diazomethane, the author studied the techniques of such isolation as well as the spectroscopic and chemical properties of these ethers, and obtained the following results.

1. For the isolation of monoether and diether by means of the column chromatography active alumina is most suitable as the adsorbent and chloroform is the best developer.
2. By drawing the infrared absorption curve of bilirubindimethylester and its monoether and diether isolated by the above techniques, our on the chemical structural patterns of these substances has been confirmed to be rational.
3. Bilirubindimethylester in the form of a chloroform solution has the maximum absorption at $400m\mu$, and both monoether and diether have the maximum at $420m\mu$, showing hardly any difference among these compounds.
4. With the use of organic solvents such as chloroform, petrolether, ethylacetate, and ethylether, bilirubindimethylester is positive to the direct diazo reaction while monoether and diether prove to be negative.
5. Azo dye in the methanol solution of monoether or diether has the maximum absorption at $550m\mu$, and acidic azo dye by loading hydrochloric acid to the solution has the maximum absorption at $570m\mu$.
6. The azo dye obtained by means of direct diazo reaction with monether and diether of bilirubindimethylester gradually moves towards the long side of short wave with the lapse of time, and the peak of the absorption curve becomes flat. However, the maximum absorption of the acidic azo dye produced by loading hydrochloric acid does not change but remain constant.

7. Monoether and diether of bilirubindimethylesteter are both readily soluble in various organic solvents, but with exception of conc. hydrochloric acid and conc. sulfuric acid, they are soluble neither in acids or alkies.

8. In the observations of changes in the color tone monoether and diether in the form of a chlorform solution, taking Gmelin reaction of bilirubin chloroform solution as the control, each shows some differences in the color tone between the case loaded with conc. ferrous chloride aqueous solution and the case loaded with aldehyde reagent. This seems to be dependent upon the stability of each structural pattern.
