

胆 汁 色 素 に 関 す る 研 究

第 1 編

Dihydrobilirubin の 化 学 的 性 状 に 就 て

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂教授)

副 手 光 本 敏 郎

〔昭和 34 年 8 月 28 日受稿〕

結 言

Bilirubin を mesobilirubinogen に還元する際に生ずる中間物質の化学的研究に関しては H. Fischer 一門及び教室細川¹⁾, 鈴木²⁾等の業績があり, bilirubin の β 位の側鎖の中, 8 位にある vinyl 基が ethyl 基に還元された dihydrobilirubin に就ても H. Fischer & H. W. Haberland³⁾の研究があるが, その性状に関してはなお審かでない点があり, 特に分光化学的には詳細な報告がなされていない. そこで著者は腸管内 urobilinogen 生成過程を研究する一助として, 該物質を化学的に調製し, その調製法, 物理的, 化学的性状, 特にその分光化学的性状に就て検討を行つた.

実 験 方 法

1. Dihydrobilirubin の調製法

1. 1. 結晶 bilirubin の接触還元³⁾

H. Fischer & H. W. Haberland の方法に倣い, 結晶 bilirubin 100 mg を $1/10$ 規定苛性曹達 15 cc に溶解し, 触媒として 1% 膠状 palladium 0.5 cc を加えて水素と共に振盪した. 水素摂取量が 1 mol に達すると振盪を中止し, 直ちに 1% 醋酸にて pH 6.5 前後として chloroform で抽出を繰返し, かくして chloroform で全く抽出出来なくなると更に pH 4.0 前後として抽出を繰返した. chloroform 抽出液は 3 乃至 4 回水洗した後, 30°C の水浴中で減圧下に chloroform を蒸溜除去し, 粗製還元物質を得た. なお, 結晶 bilirubin は Merck 製結晶 bilirubin を chloroform 中で再結晶せしめたものを用いた.

1. 2. Dihydrobilirubin の分離

1. 2. 1. 分別結晶法

粗製還元物質 50 mg を pyridine 5 cc に溶解し,

約 20°C に於て遮光し, 減圧下に pyridine を濃縮して溶液が約 0.5 cc になつた時密栓し, 氷室に 12 時間放置して結晶を析出せしめた後, 濾別して結晶を再び pyridine に溶解し, 同様の操作を繰返して濾別し, 結晶に附着した pyridine を除くため結晶を methanol 中に投じ, よく振盪した後濾別して純物質を得た.

1. 2. 2. Column chromatograph 法⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾

内径 1.3 cm, 長さ 30 cm の円柱硝子管を用い, 下端に脱脂綿球をつめ, 関東化学製 chromatograph 用 silica gel 容量を chloroform 2 容量にとかしたものを注入して, chromatograph 吸着柱を作り, 前記粗物質の chloroform 溶液約 2 cc を吸着柱の表面が一様に浸されるように注入し, 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 chloroform を注入して展開し, 流出する黄色層を減圧下に濃縮し, 更に silica gel を吸着剤とする吸着柱に注入し, chloroform : pyridine = 30 : 1 の混液で展開した.

2. Paper chromatograph 法⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾

直径 6.5 cm, 高さ 33 cm の硝子円筒にゴム栓をして展開装置とし, 濾紙は Schleicher & Schüll-No. 2043 a を用い, 原点は濾紙下端より 7 cm とした. 試料の附着量はその濃度により一定しないが, 直径 5 mm の円形に附着せしめた. 展開は室温に於て一次元上昇法により原点より約 15 cm 行つた.

3. 被検液の吸光曲線描写法⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾

Beckman DK 型自記光電分光光度計及び島津製 QB 50 型 Beckman 光電分光光度計を用いて, 可視部及び紫外部を測定した. なお, 対照には被検液の溶媒と同一のものを用いた. また赤外部吸光曲線測定は塩野義製薬研究部に依頼し, Perkin-Elmer 12C 型自記赤外分光光度計により, 岩塩プリズムを

使用し, Nujol paste 法により行われた。

4. Dihydrobilirubin の燭点測定法¹⁾

島津製燭点測定装置を用い, 試料を硝子製直径約 1 mm の細管に入れて測定した。

5. Dihydrobilirubin 血清溶液の濾紙電気泳動法¹²⁾

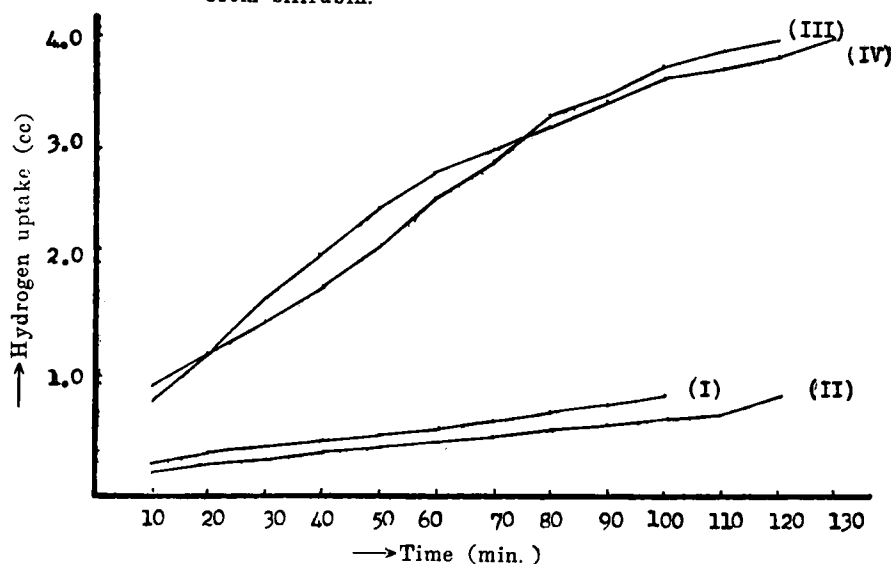
小林式装置により電解液は pH 8.5 の veronal 緩衝液を使用し 0.5 mA/cm で 5 時間泳動した。濾紙は Schleicher & Schüll No. 2043 a を使用した。

実験成績並に考按

1. Dihydrobilirubin 生成法に関する検討

Bilirubin を接触還元する場合, dihydrobilirubin, mesobilirubin, dihydromesobilirubin を経て mesobilirubinogen に至り反応が終了する。之を dihydrobilirubin の段階で中止させるには, 水素摂取量が 1 mol に達した時に振盪を中止し, 触媒を分離すればよいわけである。然しながら第 1 図第 1 例の如く, 水素摂取量が 1 mol に達した時振盪を中止しても反応液の色調は変化せず, その chloroform 抽出液の吸光曲線は第 2 図 1 の如く 448 m μ に極大を有し, 反応が殆んど進行していない事を示している。之は予め触媒を水素とよく振盪して, 之を水素で飽和して置かなかつたため, 摂取された水素が触媒に

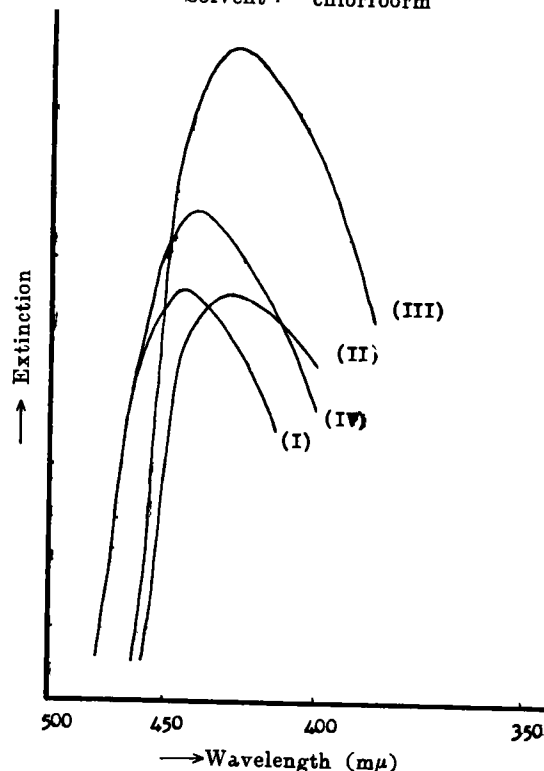
Fig. 1 Hydrogen uptake during dihydrobilirubin formation from bilirubin.



	Bilirubin (mg.)	Temp. (C.)	Press. (mm. Hg.)	Calculating dosis of H (cc)
I	20	25.2	757.6	0.88
II	20	25.0	755.1	0.87
III	100	19.0	759.8	4.18
IV	100	10.0	767.7	4.00

Fig. 2 Absorption curves of reduction products of I~IV.

Solvent: chloroform



吸収されて反応にあつからなかつたためと考えられる。第 2 例は予め触媒を水素で飽和した後に反応液

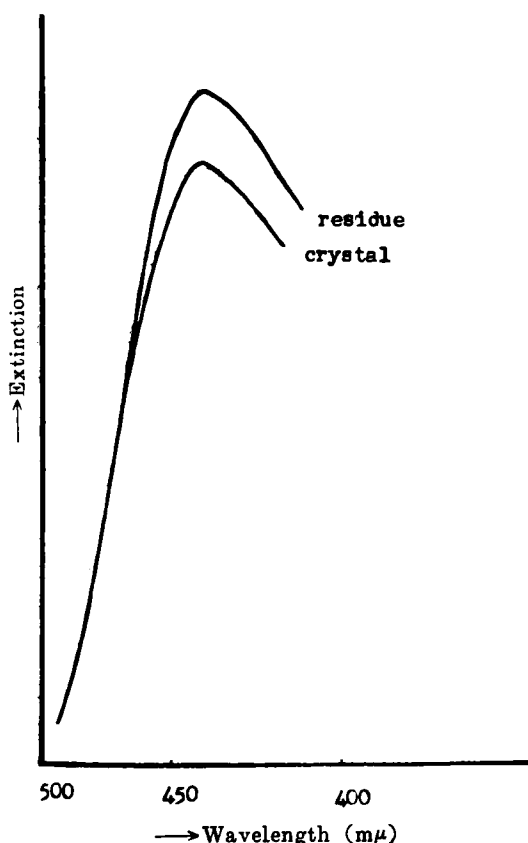
に加えたものであるが, bilirubin の使用量が少く, かつ気温が高かつたため, 水素摂取量が計算量に達した時に振盪を中止したにも拘わらず, 見る間に反応液が明黄色になり, その chloroform 抽出液の吸光曲線は 426 m μ に極大を有し, 大部分のものが mesobilirubin に変化したと考えられる。更に第 3 例の如く, bilirubin 100 mg を使用しても, 振盪中止後暫く放置すれば反応液は第 2 例と同様になり, その

chloroform 抽出液の吸光曲線は 425 m μ に極大を有し, mesobilirubin の生成を示す¹³⁾. 之は触媒に吸着されている水素が振盪中止後も作用して, 反応が進行したものと考えられる¹⁴⁾. 故に bilirubin は少くとも 100 mg を要し, 又, 水素摂取量が計算量に達する直前に振盪を中止して, 直ちに抽出を行わねばならない. 第 4 例はこのようにして行つたもので, 反応の進行するにつれて反応液の色調は bilirubin の橙赤色から次第に黄色調を増し, 振盪中止時には橙黄色であつた. 反応前後に於て Gmelin 反応, Ehrlich's diazo 反応を行つたが差を認めず, jod 加 Schlesinger 反応に於ても肉眼的には差を認めなかつた. なお, 第 4 例の反応終了液の chloroform 抽出液は吸光曲線に於て 437 m μ に極大を示した.

2. Dihydrobilirubin の分離に関する検討

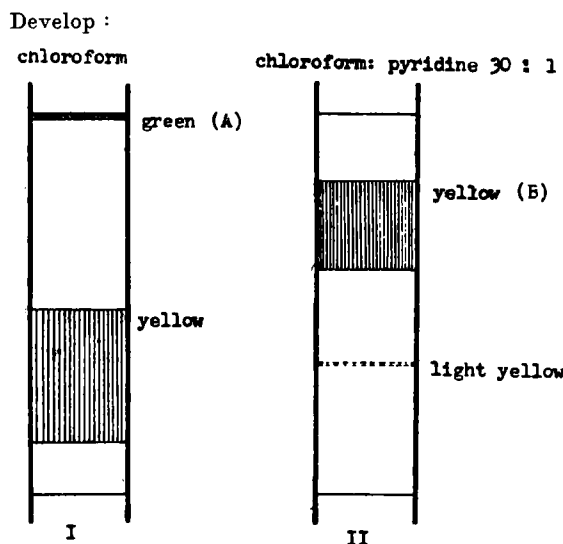
反応終了液から chloroform に抽出した粗物質は吸光曲線に於て 437 m μ に極大を有した. 之を chloroform を吸引蒸発せしめ, 残渣を前記の方法により pyridine より分別結晶すると, 橙赤色, 平行四辺形の結晶を得, その chloroform 溶液の吸収の極大は第 3 図に示す如く, やはり 437 m μ であつ

Fig. 3 Adsorption curves of the crystals obtained by fractional crystallization with pyridine and its residue.



たが, 分別結晶後の残渣の chloroform 溶液の吸収の極大は 436 m μ であつた. さて, この方法に於ては粗物質の量が少い場合, 操作中の loss の割合が大きく, 又 pyridine が塩基性であるために之に溶解した粗物質は非常に不安定で緑色の物質に酸化され易く, 全操作を遮光下に行う必要があり, 分離法としてはこの場合適當と思われないので, column chromatograph 法による分離を試みた. しかしながら bilirubin, dihydrobilirubin, mesobilirubin は分子量が非常に近似しており, かつ構造も互に酷似しているため¹⁵⁾, 吸着剤及び展開剤の選択に際して非常に困難があつたが, 種々試みの中で最も良好と思われるものは次の如きものである. 即ち先づ silica gel を吸着剤とし, chloroform を展開剤として展開し, 流出する黄色層を更に silica gel を吸着剤とし chloroform 30 と pyridine 1 の混液で展開するもので, 第 1 の column に於ては第 4 図 I に示す如く 2 層に分離する. 上部は緑色の薄層で, 下部は黄

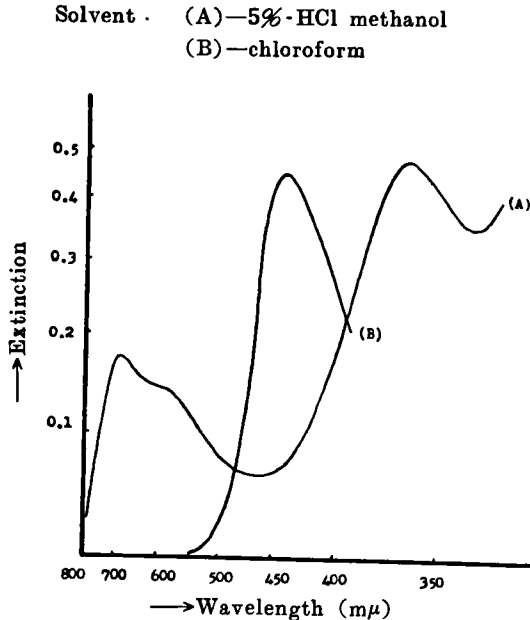
Fig. 4 Column chromatograms of the extract from the reacting solution after the reaction.



色の層である. 黄色層が流下した後しばらく chloroform で展開を続けたが緑色層は移動せず, 展開剤を methanol に変更すると一層となつて流下した. 夫々の吸光曲線は第 5 図に示す如く黄色層のものは 437 m μ に, 緑色層のものは 5% 塩酸 methanol 溶液中で 675 m μ 及び 365 m μ に極大を有する. 緑色層は反応液より chloroform に抽出する際に用いる酸により, 或はその後の操作中に空気中の酸素により, 粗物質が酸化されて出来たものと考えられる.

さて、黄色層は chloroform を吸引蒸発せしめて第 2 の column により展開すると第 4 図Ⅱの如く 2 層に分離する。上部は黄色層、下部は淡々黄色の薄層

Fig. 5 Absorption curves of each zones separated by the column chromatography.



である。後者は展開を続行する中に不明となり、又展開を中止して溶出を試みても微量のため成功しなかつたが、column chromatography に対する態度及び pyridine よりの結晶分別後の残渣の吸光曲線の極大が短波長側に移動した事と考え合せて mesobilirubin ではないかと考えられる。上部の黄色層は流下後、溶媒を吸引蒸発せしめ、chloroform に溶解して吸光曲線を見ると、やはり 437 mμ に極大を有し、暗室に放置した所、chloroform 中より橙赤色、平行四辺形の結晶として析出した。この方法に於ては分別結晶法の約 3 倍の収量を得た。

3. Dihydrobilirubin と推定した色素の検討

3. 1. Paper chromatograph 法による検討

対照に bilirubin 及び mesobilirubin を用い、室温 20°C に於て分配すると第 6 図の如く acetone 80, water 15, ammonia 5 (I) では $R_f = 0.02$ に、又 acetone 40, water 50, ammonia 10 (II) では $R_f = 0.10$ に spot が移動し、bilirubin 及び mesobilirubin との間僅かの差を認めるのみである。更に之等の spot に Gmelin 試薬、Schlesinger 試薬及び Ehrlich's aldehyde 試薬を噴霧すると前者では全て陽性で、後二者では全て陰性であつた。又 paper 乾燥後に行つた Ehrlich's diazo 試薬の噴霧

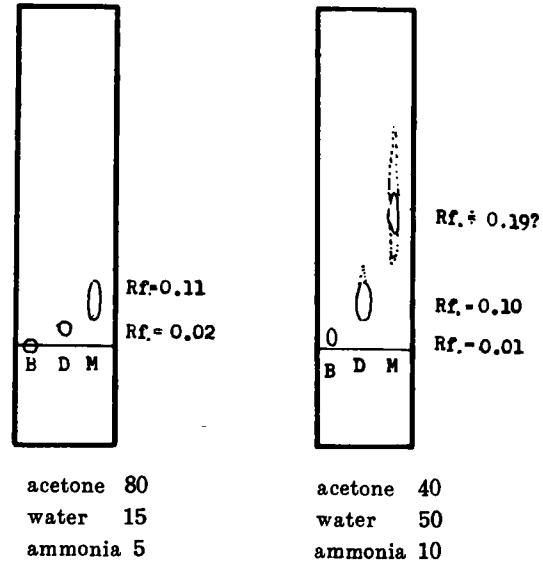
Fig. 6 Paper chromatograms of separated crystal.

Paper: Schleicher & Schüll No. 2043 a

B: bilirubin

D: dihydro-bilirubin

M: mesobilirubin

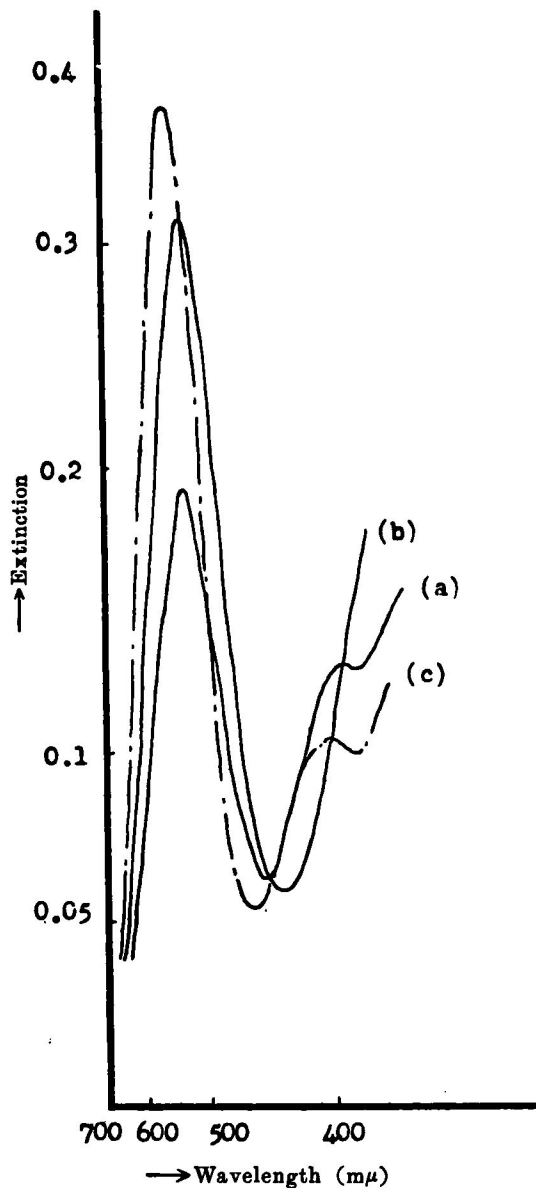


に於ては全て直接反応陰性であつた。以上の事実からこの色素は bilirubin, mesobilirubin と酷似した性質を有するが、僅かに之等と異なる点を有する他の色素である事がわかる。

3. 2. 化学的並に分光化学的検討

分離した橙赤色の結晶は融点 315°C で、分光化学的には可視部に於ける吸収の極大は第 5 図に示す如く chloroform 溶液に於て 437 mμ にあり、Gmelin 反応陽性で、Ehrlich's diazo 反応に於ては間接陽性を示し、その吸光曲線は第 7 図に示す如く、反応直後に於ては 552 mμ 及び 395 mμ に極大を有し、更にこの極大は塩酸添加により長波長側へ移動した。この点は結晶 bilirubin と同様である¹⁶⁾。又反応液に塩酸を添加する事なく放置すれば 395 mμ の極大は時と共に消失する。なお、教室金田¹⁷⁾によれば結晶 bilirubin の diazo 反応液の吸光曲線の極大は 560 mμ 及び 420 mμ であり、結晶 mesobilirubin のそれは 550 mμ 及び 390 mμ である。Ehrlich's aldehyde 反応は陰性で、Schlesinger 反応に於ては黄色の chloroform 溶液が橙黄色に変化するが螢光は発しない。jod 加 Schlesinger 反応に於ては赤色螢光を発し、第 8 図の如く 630 mμ, 585 mμ に極大を有する。結晶の赤外部吸光曲線に於ては 10.13 μ に極大を示し vinyl 基の吸収の残存している事が分る。以上の実験結果は先に H. Fischer & H. W.

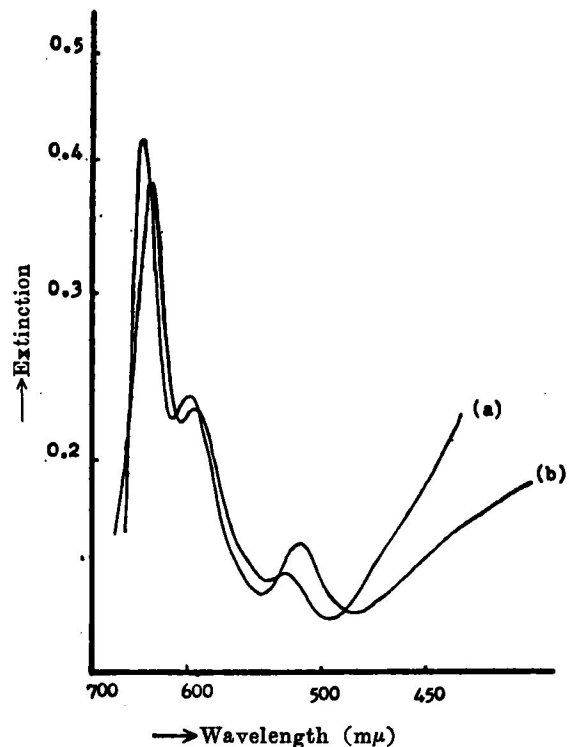
Fig. 7 Absorption curves of the diazo reacting solution of separated crystal.
 a: immediately after the reaction
 b: 10 minutes after the reaction
 c: acid solution with the addition of HCl



Haberland の記載した dihydrobilirubin³⁾ の性状に全く一致する。従つて分離した結晶は dihydrobilirubin のそれであり、得られた分光化学的性質も dihydrobilirubin の特性を示すものである。さて、column chromatograph 法に於て methanol によつて流下した緑色色素は 5% 塩酸 methanol 溶液に於て吸光曲線の極大が 675 mμ, 365 mμ にあり、biliverdin 及び glaukobilin のそれと比較して¹⁸⁾、dihydrobilirubin の酸化物であると考えられる。

以上の如く dihydrobilirubin は bilirubin, meso-

Fig. 8 Absorption curves of Schlesinger reacting solution with the addition of iodine.
 a: separated crystal
 b: bilirubin

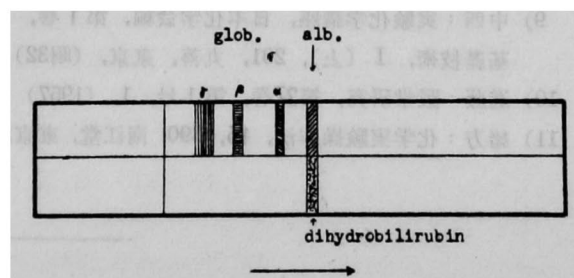


bilirubin と定性的に肉眼により区別する事は出来ないが、定性反応を行つてその反応液を分光化学的に測定する事により区別し得る。そして、どの定性反応に於ても丁度 bilirubin と mesobilirubin の中間に位置している。この事はその構造上からも想像される所である。

3. 3. Dihydrobilirubin の濾紙電気泳動法による検討

Dihydrobilirubin を教室大月¹⁹⁾ が bilirubin に就て行つたと同様の方法で人血清に溶解し、前記の方法により濾紙電気泳動を行うと、約 12 cm 移動し、その上半分を切離して蛋白染色を行うと第 9 図の如

Fig. 9 Paper electrophoretic figure of dihydrobilirubin in serum.



く、丁度 dihydrobilirubin と同じ場所に血清 albumin の像が現われた。即ち dihydrobilirubin は結晶 bilirubin の場合と同様に血清 albumin と結合して移動する¹⁹⁾。

結 論

1. 結晶 bilirubin より膠状 palladium を用いる接触還元により dihydrobilirubin を調製する場合、結晶 bilirubin は少くとも 100 mg 以上を要し、使用する膠状 palladium は充分水素で飽和した後に用いる必要がある。

2. Pyridine 溶液よりの分別結晶法及び column chromatograph 法によつて分離した dihydrobilirubin の結晶は chloroform 溶液に於ける吸光曲線上、437 m μ に極大を示した。

3. Dihydrobilirubin は濾紙 Schleicher & Schüll No. 2043 a を用い、20°C に於ける一次元上昇 paper chromatograph 法に於て、展開剤が acetone : water : ammonia = 80 : 15 : 5 の時は Rf=0.02, acetone : water : ammonia = 40 : 50 : 10 の時は Rf=0.10 であつた。

4. Dihydrobilirubin に iod 加 Schlesinger 反応を行うと青緑色を呈して赤色螢光を發し、吸光曲線に於て 630 m μ 及び 585 m μ に極大を示した。

5. Dihydrobilirubin の酸化物は緑青色を呈し、その 5% 塩酸 methanol 溶液に於ける吸光曲線は 675 m μ 及び 365 m μ に極大を有する。

6. Dihydrobilirubin 血清溶液を濾紙電気泳動を行うと、血清 albumin と結合して行動する。

主 要 文 献

- 1) 細川：医学研究，第26卷，第5号，121，(1956)
- 2) 鈴木：医学研究，第28卷，第8号，28，(1958)
- 3) H. Fischer u. H. W. Haberland：Z. physiol. Chem., **232**, 236, (1935)
- 4) 桑田：クロマトグラフィー，広川書店，東京，(昭27)
- 5) 桑田：続クロマトグラフィー，広川書店，東京，(昭30)
- 6) 佐竹，成田：実験化学講座，日本化学会編，第2巻，203，丸善，東京，(昭30)
- 7) 佐竹：クロマトグラフ，共立全書，第12巻，共立出版，(昭27)
- 8) 馬場：実験化学講座，日本化学会編，第3巻，325，丸善，東京，(昭32)
- 9) 中西：実験化学講座，日本化学会編，第1巻，基礎技術，I (上)，291，丸善，東京，(昭32)
- 10) 進藤：医学研究，第27巻，第1号，1，(1957)
- 11) 緒方：化学実験操作法，**15**，390，南江堂，東京，(昭16)
- 12) 後藤：医学研究，第26巻，第8号，32，(1956)
- 13) F. Pruckner u. A. Stern：Z. physiol. Chem., **A 180**, 25, (1937)
- 14) 佐竹，成田：実験化学講座，日本化学会編，第17巻，有機化合物の反応，I (下)，245，丸善，東京，(昭31)
- 15) C. H. Gray：The bile pigments, Methuen & Co. LTD., London, (1953)
- 16) 坂本：日本消化機病学会雑誌，第55巻，第7号，42，(1958)
- 17) 金田，坂本：日本消化機病学会雑誌，第55巻，第7号，42，(1958)
- 18) R. Lemberg & J. W. Legge：Hematin compounds and bile pigments. Interscience publishers, Inc., New York, (1949)
- 19) 六月：未発表。

Studies on Bile Pigment

Part 1. Chemical Properties of Dihydrobilirubin

By

Toshiro Mitsumoto

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

1. When dihydrobilirubin is prepared from crystalline bilirubin by direct contact reduction with the use of collagenous palladium, at least over 100 mg crystalline bilirubin is required and it is necessary to saturate collagenous palladium sufficiently with hydrogen before the use.
 2. Crystal of dihydrobilirubin isolated from pyridine solution or isolated by column chromatography, when dissolved in chloroform solution, shows the absorption peak at 437 m μ on the absorption curve.
 3. In the primary elevation paper chromatography of dihydrobilirubin conducted at 20°C using Schleicher and Schüll-No. 2043 filter paper when the developing agent is acetone-water-ammonia in the proportion of 80:15.5, R_f equals 0.02; while when the combination is in the ratio of 40:50:10, R_f equals 0.10.
 4. When dihydrobilirubin previously added with iodine is made to undergo Schlesinger reaction, it turns bluish green, emanating red fluorescent light, and shows the absorption peak at 630 m μ and 585 m μ on its absorption curve.
 5. Oxide of dihydrobilirubin is greenish blue, and when it is dissolved in a 5% methanol hydrochloride, the absorption curve shows the peak at 675 m μ and 365 m μ .
 6. When a dihydrobilirubin serum solution is put to filter paper electrophoresis, it acts in combination with serum albumin.
-