

Bilirubin 異性体に関する研究

第一編

Bilirubin 異性体の分離とその性状の検討

岡山大学医学部第一内科教室
(主任：長島秀夫教授・指導：小坂淳夫前教授)

丸 山 陸 郎

(昭和52年9月3日受稿)

緒 言

bilirubin はその化学構造より β 位の側鎖の変換で16の異性体が生じる可能性があり, Fischer と Orth¹⁾ により15の異性体が合成されている. また α 位の3つの橋により結合される pyrrole 環の変換により4つの異性体が存在しうると考えられる. しかし生体内で生成される bilirubin は protoporphyrin IX の α 位が開いて出来る bilirubin IX_a のみと考えられていた. この考えは Gray ら²⁾ のクロム酸酸化法による検討や山岡ら³⁾ の heme の開環酵素 heme- α -methenyl oxygenase の発見などにより支持されたのであるが, 一方 Petryka⁴⁾ は大量の結晶 bilirubin をクロム酸で酸化して生成される pyrrolic acid より, bilirubin には IX_a 型以外にも少量の IX_b または IX_c 型が存在することを報告した. ついで Nichol ら⁵⁾ は市販の bilirubin について質量分析を行い fragment ion の出現状況より Petryka らの成績を肯定したが, 教室の井沢⁶⁾ は人胆汁より精製した bilirubin について同様の検討を行いその成績を否定した. 他方 bilirubin の I から XVI までの異性体について, 1971年 McDonagh ら⁷⁾ は市販の bilirubin が薄層 chromatography により3つの帯を形成することをみとめ, これに質量分析ならびに分光化学的検討を加えることによりそれらが bilirubin III_a, IX_a, XIII_a 型であると報告した. 更に Stoll ら⁸⁾ は結晶 bilirubin を Na-amalgam で還元して生成された mesobilinogen について, 薄層 chromatography,

核磁気共鳴スペクトル, 質量分析を行って IX_a 型以外に III_a 型, XIII_a 型を証明している. しかしながら McDonagh らは核磁気共鳴スペクトルによる直接的な同定は行っていない. また Stoll らの場合は bilirubin そのものではないうらみがある. そこで結晶 bilirubin より McDonagh の方法で分離した各分画につき, 質量分析, 核磁気共鳴スペクトル法を行うことにより bilirubin 異性体の同定を行い, あわせてその分光化学的性状について検討した.

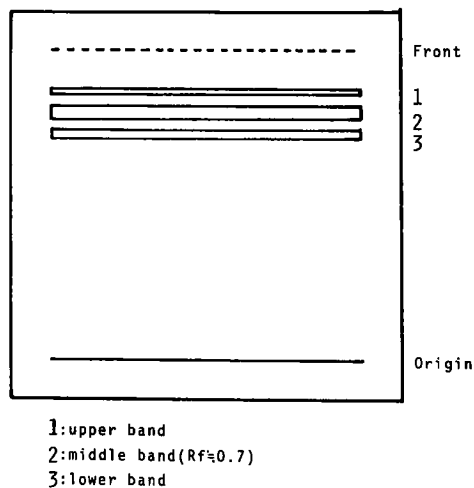


Fig. 1 Thin layer chromatogram on silicagel of bilirubin isomers. solvent system : chloroform, acetic acid. (99 : 1 by vol.)

実験材料と実験方法

1) bilirubin 結晶

第一純正化学製の bilirubin を材料として使用した。

2) 薄層 chromatography

Kieselgel G nach Stahl art Nr. 7731 (Merck) を使用し、20×20 cm のガラス板に厚さ0.5 mm の薄層を作製した。bilirubin 結晶200 mg を300 ml の chloroform に溶解し、その各0.5～1 ml を0.5 cm 以内の帯として薄層に付着し、chloroform : acetic acid (99 : 1 v/v) の溶媒系で室温下 (10～20℃)、暗所で図1の如く、bilirubin が3つの帯に分離される Rf0.7 付近まで持続的に展開した。分画分離された上、中、下の各帯は別々にかきとり、chloroform で溶出後、chloroform 溶液を分液漏斗にとり0.1 N 炭酸水素ナトリウム液100 ml、ついで蒸留水100 ml で数回洗浄したのち汙別し減圧乾固した。これを再び少量の chloroform に溶解後、 $\frac{1}{2}$ 量の methanol を加えて chloroform を蒸発させると bilirubin は橙赤色針状に晶出する。この bilirubin 結晶を試料とした。

3) 質量分析

Schimazu LKB 9000 Gas chromatography-mass spectrometer を使用した。測定は直接法にて試料を導入し、Nichol ら⁹⁾に従い、加熱温度250℃、イオン化電圧70 eVにて記載した。

4) 核磁気共鳴スペクトル

Hitachi R-22 high resolution N.M.R. spectrometer を使用し、測定周波数90 mega Hz で溶媒として hexadeutro dimethyl sulphoxide を用いた。tetramethylsilane を基準物質として磁場掃引速度400秒、磁場掃引範囲8000 Hz で測定し、一回の測定で十分なスペクトルが得られない場合には数回の積算を行った。

5) diazo 試薬の調製法

sulfanyl 酸を用いた diazo 試薬は Ehrlich ら⁹⁾の方法により作製した。即ち第1液(sulfanyl 酸5 g、濃塩酸15 ml、水985 mlの混液)、第2液(0.5%亜硝酸ソーダ液)を用時第1液10 mlと第2液0.3 mlを混じて調製し使用した。ethylanthranilate を用いた diazo 試薬は、Heirwegh ら¹⁰⁾の方法に従って ethylanthranilate 0.1 ml に0.15 N 塩酸液10 ml を加え、さらに0.5%亜硝酸ソーダ液0.3 ml を加えて混和し5分間放置後1% ammonium sulfamate 0.1 ml を添加し、3分間放置後使用した。

6) bilirubin-azo 色素生成法

bilirubin-chloroform 溶液1 ml に sulfanyl 酸 diazo 試薬又は ethylanthranilate diazo 試薬0.5 ml を加え、さらに methanol 3.5 ml を添加し室温で15分間放置した後に測定した。酸性 bilirubin-azo 色素液は bilirubin-azo 色素液にさらに濃塩酸0.4 ml を加えて作製した。

7) 吸光曲線の測定

吸光曲線の測定は島津自記分光光度計 (UV 200) を用い、可視部で測定した。bilirubin は各分画とも chloroform に溶解して測定した。bilirubin-azo 色素液はそのまま測定した。

8) bilirubin の分子最大吸光係数の測定

2) の薄層 chromatography により分画分離した bilirubin 分画をそれぞれ chloroform で抽出したのち減圧乾固し、chloroform-methanol 系にて再結晶したものを秤量して20 ml 程度の chloroform に溶解し各分画の吸光極大で吸光係数を測定し算出した。

実験成績

1) 質量分析 (図2)

結晶 bilirubin を薄層 chromatography を行うことにより分離した上、中、下の各帯の質量スペクトルは(図2)の如くでいずれも m/e584 に親イオンを認め、中央の methylene 橋で断裂したと思われる二種の fragment ion を m/e299 および286 に認めた。以下各帯の m/e100 以上で得られた signal を示し、() 内にその ion intensity (% of the base peak) を示す。上帯：584(46.8%), 540(8.2), 496(13.4), 465(10.5), 363(8.5), 300(10.3), 299(100), 286(88.7), 255(15.8), 242(13.6), 179(8.3), 137(9.5), 中帯584(57.8), 540(14.1), 496(11.3), 465(12.4), 363(10.2), 300(7.8), 299(100), 286(72.2), 255(18.3), 242(15.5), 下帯584(50.0), 540(9.6), 496(10.4), 465(8.5), 363(8.8), 300(11.2), 299(100), 286(98.1), 255(13.5), 242(9.6), 179(8.2), 137(6.5)

2) 核磁気共鳴スペクトル (表1)

対照として測定した第一純正化学製の結晶 bilirubin の核磁気共鳴スペクトルは表1の如くで、p.p.m. 値でそれぞれ1.93, 2.00 (C-2 および C-7 の -CH₃) 2.03, 2.17 (C-13 および C-17 の -CH₃) 4.00 (C-10 の -CH₂-) 5.61, 5.73 (C-3 および C-18 の -CH : CH₂) 6.10 (C-5 および C-15 の =CH-) 9.91 (第Ⅲ pyrrole 環の -NH-) 10.04 (第Ⅱ py-

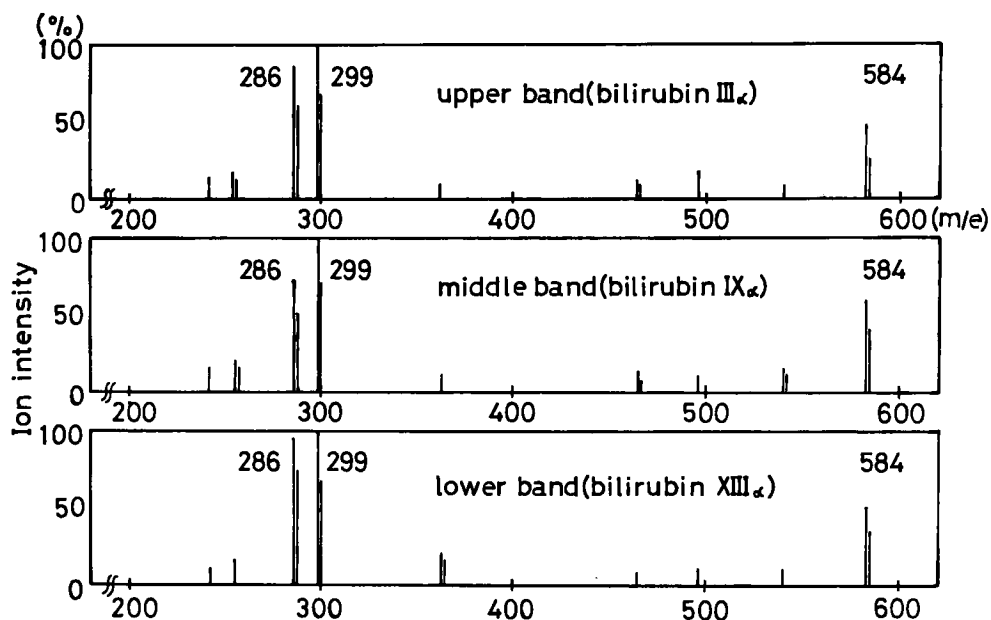


Fig. 2 Normalized histograms of mass spectra of bilirubin isomers. ($C_{33}H_{46}N_4O_6 = 584$)

rrrole 環の—NH—) 10.49 (第Iおよび第IV pyrrole 環の—NH—) に signal が認められた。結晶 bilirubin より分離された中帯のスペクトルは p.p.m. 値でそれぞれ 1.92, 2.00 (C-2 および C-7 の—CH₃) 2.03, 2.16 (C-13 および C-17 の—CH₃) 4.00 (C-10 の—CH₂—) 5.61, 5.72 (C-3 および C-18 の—CH : CH₂) 6.09 (C-5 および C-15 の = CH—) に signal を認め対照と一致した。上帯では C-2 および C-7 の—CH₃ に相当する signal は認められず, 2.03, 2.16 (C-13 および C-17 の—CH₃) 5.62 (C-3 および C-18 の—CH : CH₂) 6.07 (C-5 および C-15 の = CH—) に signal を認めた。下帯では, C-13 および C-17 の—CH₃ に相当する signal は認められず, 1.91, 2.00 (C-2 および C-7 の—CH₃) 5.63 (C-13 および C-18 の—CH : CH₂) 6.07 (C-5 および C-15 の = CH—) に signal を認めた。なお中帯の C-2, C-7, C-13, C-17 の各—CH₃ のプロトンの積分強度は等価であり, 上帯における C-13 と C-17 の—CH₃ のプロトン積分強度比, 下帯における C-2 と C-7 の—CH₃ のプロトン積分強度比はいずれも 1 : 1 であった。

3) bilirubin 異性体およびその azo 色素の吸光極大 (表 2)

bilirubin III_α, IX_α, XIII_α の chloroform 溶液における吸光極大は, 表 2-A の如くで bilirubin III_α 455~458 nm, bilirubin IX_α 453~455 nm, bilirubin XIII_α 449~453 nm であった。sulfanyl 酸により生成した bilirubin-azo 色素液 (pH 1.3) では, 表 2-B の如くで bilirubin III_α 548~556 nm, bilirubin IX_α 540~548 nm, bilirubin XIII_α 533~540 nm で塩酸酸性 (pH 0.5) 下では, bilirubin III_α 577~584 nm, bilirubin IX_α 570~577 nm, bilirubin XIII_α 563~570 nm と吸光極大はいずれも長波長側に偏位した。又 ethylanthranilate により生成した bilirubin azo 色素液 (pH 1.4) では, 表 2-C の如くで bilirubin III_α 524~527 nm, bilirubin IX_α 527~530 nm, bilirubin XIII_α 530~533 nm であり, sulfanyl 酸を用いて生成した bilirubin azo 色素液の吸光極大との間に差異を認めた。

4) bilirubin 異性体の分子最大吸光係数

bilirubin 異性体の分子最大吸光係数は, それぞれ bilirubin III_α 0.35 mg, IX_α 3.35 mg, XIII_α 0.41 mg を用いて, chloroform 溶液で bilirubin III_α 64,900, bilirubin IX_α 62,900, bilirubin XIII_α 53,700 であった。

Table 1. N. m. r. assignments of bilirubin isomers in hexadeutero dimethyl sulphoxide.

Chemical shift (p. p. m.) (shape of signal, relative area)					
bilirubin K _a (Kuenzle)	commercial bilirubin	upper band (III _a)	middle band (IX _a)	lower band (VII _a)	assignments
1.93 (s-3H)	1.93 (s-3H)	_____	1.92 (s-3H)	1.91 (s-3H)	Methyl groups on C-2 & C-7
2.00 (s-3H)	2.00 (s-3H)	_____	2.00 (s-3H)	2.00 (s-3H)	
2.03 (s-3H)	2.03 (s-3H)	2.03 (s-3H)	2.03 (s-3H)	_____	Methyl groups on C-13 & C-17
2.17 (s-3H)	2.17 (s-3H)	2.16 (s-3H)	2.16 (s-3H)	_____	
4.00 (sb-2H)	4.00 (sb-2H)	_____	4.00 (sb-2H)	_____	Methylene protons on C-10-central methylene bridge
5.24~7.00 (m-6H)	5.61 (m-3H) 5.73 (m-3H)	5.62 (m-3H) _____	5.61 (m-3H) 5.72 (m-3H)	5.63 (m-3H) _____	
6.10 (s-2H)	6.10 (s-2H)	6.07 (s-2H)	6.09 (s-2H)	6.07 (s-2H)	Vinyl protons on C-5 & C-15- methene bridge
9.91 (sb-1H)	9.91 (sb-1H)	_____	_____	_____	
10.04 (sb-1H)	10.04 (sb-1H)	_____	_____	_____	Amine proton on second ring
10.45 (sb-1H)	_____	_____	_____	_____	
10.49 (sb-1H)	10.49 (sb-2H)	_____	_____	_____	Carboxyl protons of propionic acid side chains on C-8 & C-12
11.89 (sb-2H)	_____	_____	_____	_____	

abbreviations: s, singlet; m, multiplet; b, broad.

Table 2-A Absorption maxima of bilirubin isomers in chloroform

		(pH 4.6)	(pH 2.0, acetic acid)
upper band (III _a)	455~458 nm	454~457 nm	
middle band (IX _a)	453~455	451~454	
lower band (VII _a)	449~453	448~451	

Table 2-B Absorption maxima of diazotized sulfanilic acid azo-pigments of bilirubin isomers

	(pH 1.3)	(pH 5.0, hydrochloric acid)
upper band (III _a)	548~556 nm	577~584 nm
middle band (IX _a)	540~548	570~577
lower band (VII _a)	533~540	563~570

Table 2-C Absorption maxima of diazotized ethyl-anthranilate azo-pigments of bilirubin isomers

	(pH 1.4)
upper band (III _a)	524~527 nm
middle band (IX _a)	527~530
lower band (VII _a)	530~533

総括並びに考案

McDonagh ら⁷⁾の方法により結晶 bilirubin より薄層 chromatography で分画分離した上, 中, 下の各帯は質量分析の結果, ともに分子量が584でその解裂様式が Nichol⁹⁾らの報告した bilirubin の解裂様式と同一であることよりいずれも bilirubin であると考えられた. しかも m/e 332, 239に有意の signal が認められなかったことより井沢⁹⁾の bilirubin IX_a, IX_bの存在はないとする成績を支持するものであった. 次に核磁気共鳴スペクトルの結果, 第一純正化学製結晶 bilirubin は Kuenzle ら¹⁰⁾の bilirubin IX_aの N. M. R. 値と一致し, 彼らの成績を支持するものであった. しかし, 彼らの示した 11.89 p. p. m. の C-8および C-12の carboxyl 基の signal は認めなかった. ところで図3の如く, bilirubin IX_aの構造は中央の methylene 橋をはさんで左右非対称であり, bilirubin III_aは bilirubin IX_aの第1 pyrrole 環のβ位側鎖である methyl 基と vinyl 基が置換して左右対称となった構造であり, bilirubin XII_aは bilirubin IX_aの第IV pyrrole 環のβ位側鎖である methyl 基と vinyl 基が置換して左右対称となった構造である. この構造より考えて核磁気共鳴スペクトル上, bilirubin IX_aでは I, II, III, IV各 pyrrole 環のβ位側鎖の methyl 基に相当する signal が認められるはずである. 同様に bilirubin III_aはその構造より bilirubin IX_aの右半分の構造のみとなるので, 第III, IV pyrrole 環のβ位側鎖の methyl 基 signal のみとなり, 第I, II pyrrole 環の methyl 基 signal は消失するはずである. 又 bilirubin XII_aでは逆に bilirubin IX_aの左半分の構造のみとなるので第I, II pyrrole 環のβ位側鎖の methyl 基 signal のみとなり, 第III, IV pyrrole 環の methyl 基 signal は消失するはずである. 又それら methyl 基のプロトン積分強度は等価となるはずである. 既述の核磁気共鳴スペクトルの結果はこれらの条件をすべて満足するもので, 上帯が bilirubin III_a, 中帯が bilirubin IX_a, 下帯が bilirubin XII_aと同定され, McDonagh ら⁷⁾の推測を確認した.

以上の結果より結晶 bilirubin (第一純正化学製)中に bilirubin IX_a以外に bilirubin III_a, XII_aの微量の混在が証明された. そこでこれら bilirubin 異性体の生体内での意義が問題となるが, その生成機序はなお明らかではない. すなわち, 1) heme 合成過程での異性体の形成, 2) 実験過程における異性体

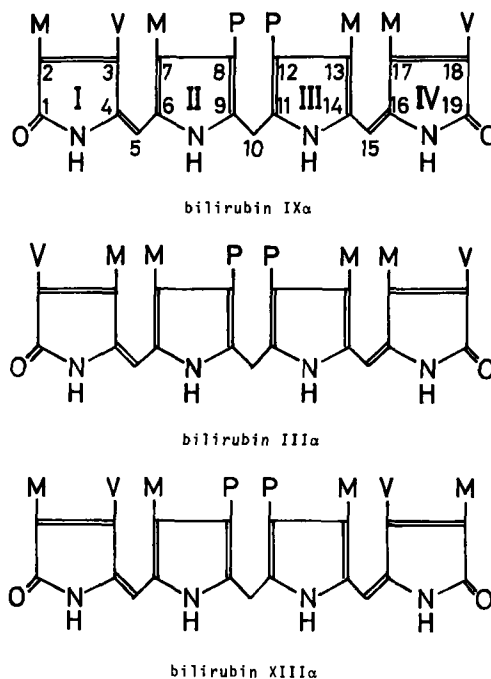


Fig. 3 The chemical structures of bilirubin isomers M = -CH₃, V = -CH=CH₂, P = -CH₂CH₂COOH

生成, 3) 生体内での異性体の変換形成とが考えられるが, bilirubin III_a, XII_aの構造より考えて protoporphyrin IX からこれらが直接生ずる可能性はなく, 又 protoporphyrin IX あるいは bilirubin IX_aのβ位側鎖の無秩序な置換によって生成されるとするならば理論上16個の異性体ができるはずである. しかるに結晶 bilirubin 中に bilirubin III_a, IX_a, XII_aの3種の異性体のみ認められたことより考えると1)の過程による形成は考えにくい. McDonagh らが実験的に示した異性体間の相互変換の可能性は否定できない. 彼ら¹²⁾は強酸による bilirubin IX_aより bilirubin III_a, XII_aへの変換を報告し, 更に生理的 pHのもとにおいても同様の変換が起り, この反応は可逆的であるとした.¹³⁾ 彼ら^{14, 15)}は bilirubin IX_aが中央の methylene 橋で断裂して生ずる左半分の dipyrrole が2個再結合することにより bilirubin XII_aが生じ, 右半分の dipyrrole が2個再結合することによって bilirubin III_aが生じると推測している. しかしこのような変換は bilirubin が albumin と結合した状態では起らず, 普通の状態では生体内での変換は起らないとしており, 結晶 bilirubin 中

の bilirubin III_a, XII_a は、大部分その精製過程における副産物であろうとしている。しかし、彼らも、微量の bilirubin 異性体が生体内で生成される可能性については否定していない。

一方 bilirubin の光分解^{16, 17, 19)} により生体内に水, n-butanol に可溶性, pentdyopent 反応陽性の dipyrrole 物質が生成される事実があり、又²⁰⁾ heme の分解過程において bilirubin になる以前に dipyrrole 物質に分解される経路も示されている。更に bilirubin 代謝の主経路である glucuron 酸抱合が障害された Gunn rat や Crigler-Najjar 症候群では alternate path way として bilirubin より dipyrrole 物質への分解が起ることがわかってきている^{21, 22)} それ故これら dipyrrole 物質の再結合によって生じる shunt bilirubin^{23, 24, 25, 26)} の生体内生成も推定されるので(2)(3)の過程の形成については現在の成績より速断することはできない。bilirubin 異性体の性状に関する検討では、bilirubin-chloroform 溶液の吸光極大は bilirubin III_a 455~458 nm, bilirubin IX_a 453~455 nm, bilirubin XII_a 449~453 nm と吸光極大には差異が認められた。bilirubin-azo 色素液を sulfanyl 酸を用いて生成した場合と、ethylanthranilate を用いて生成した場合とでは、前者は bilirubin III_a, IX_a, XII_a の順に吸光極大が短波長側に認められたのに反し、後者では逆順に短波長側に吸光極大が存在した。吸光極大の中央波長での異性体間の差は sulfanyl 酸による bilirubin-azo 色素液の方が ethylanthranilate による bilirubin-azo 色素液の場合より著明であったが吸光極大は後者が前者より尖鋭であり、いずれが有用であるとは断定しがたい。bilirubin-chloroform 溶液中での分子最大吸光係数は McDonagh ら⁹⁾ の bilirubin III_a 65,200, bilirubin IX_a 62,600, bilirubin XII_a 52,500 に比較してそれぞれ 64,700, 62,900, 53,700 でほぼ一致する成績であった。この事実はこれら bilirubin 異性体定量上同一分子吸光係数として測定できないことを示すものと思われた。

結 論

bilirubin 異性体について第一純正化学製の結晶 bilirubin を材料とし McDonagh らの薄層 chr-

omatography により 3 分画に分離し、各分画について質量分析、核磁気共鳴スペクトル、分光化学的検討を加え次の結論を得た。

1) 質量分析では、上、中、下各帯共に m/e 584 の親イオンと m/e 299, 286 の二種の fragment ion を認め、bilirubin IX_a の解裂様式と一致した。

2) 核磁気共鳴スペクトルは、上帯では bilirubin の C-13 および C-17 の methyl 基 signal を 2.03 および 2.16 p. p. m. に認め、中帯では C-2 および C-7, C-13 および C-17 の methyl 基 signal を 1.92 および 2.00 p. p. m., 2.03 および 2.16 p. p. m. に認め下帯では C-2 および C-7 の methyl 基 signal を 1.91 および 2.00 p. p. m. に認めた。以上の結果より上帯は bilirubin III_a, 中帯は bilirubin IX_a, 下帯は bilirubin XII_a と同定された。

3) bilirubin-chloroform 溶液の吸光極大は、bilirubin III_a 455~458 nm, bilirubin IX_a 453~455 nm, bilirubin XII_a 449~453 nm であった。又 sulfanyl 酸を用いて生成した bilirubin-azo 色素液 (pH 1.3) の吸光極大は bilirubin III_a 548~556 nm, bilirubin IX_a 540~548 nm, bilirubin XII_a 533~540 nm, ethylanthranilate を用いて生成した bilirubin-azo 色素液 (pH 1.4) では bilirubin III_a 524~527 nm, bilirubin IX_a 527~530 nm, bilirubin XII_a 530~533 nm でありいずれの場合にも異性体間で僅少ではあるが吸光極大の差が認められた。sulfanyl 酸による bilirubin-azo 色素液は塩酸性下 (pH 0.5) で bilirubin III_a 577~584 nm, bilirubin IX_a 570~577 nm, bilirubin XII_a 563~570 nm といずれも吸光極大は長波長側に偏位した。

4) bilirubin 異性体の分子最大吸光係数は chloroform 溶液中で bilirubin III_a 64,900, bilirubin IX_a 62,900, bilirubin XII_a 53,700 であった。

稿を終るにあたって直接御指導をいただいた小坂淳夫岡山大学医学部第一内科前教授ならびに近藤忠亮講師に深く感謝致します。本論文の御校閲いただいた岡山大学医学部第一内科長島秀夫教授に深謝致します。又質量分析、核磁気共鳴スペクトル測定に関し御指導いただいた薬学部薬化学教室、小山鷹二教授、岩藤章正氏に感謝致します。

文 献

- 1) Fischer, H. & Orth, H : Chemie des Pyrrols. II Band Pyrrolfarbstoffe. Akademische Verlagsgesellschaft. M. B. H., Leipzig. 1937.
- 2) Gray, C. H., Nicholson, D. C. & Nicholaus, R. A. : The IX_α structure of the common bile pigments. Nature, **181** : 183, 1958.
- 3) Nakajima, H., Takemura, T., Nakajima, O. & Yamaoka, K. : Studies on heme α -methenyl oxygenase. I, J. Biol. Chem., **238** : 3784, 1963.
- 4) Petryka, Z. J. : Identification of isomers differing from IX_α in the early labelled bilirubin of the bile (31515). Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **123** : 464, 1966.
- 5) Nichol, A. W. & Morell, D. B. : Studies on the isomeric composition of biliverdin and bilirubin by mass spectrometry. Biochim. Biophys. Acta, **184** : 173, 1969.
- 6) 井沢徹一 : 胆汁色素に関する研究. 第II編胆汁中 Bilirubin 異性体の検討, 岡山医学会誌, **87** : 339, 1975.
- 7) McDonagh, A. F. & Assisi, F. : Commercial bilirubin : A trinity of isomer. FEBS Letters, **18** : 315, 1971.
- 8) Stoll, M. S. & Gray, C. H. : The oxidation products of crude mesobilirubinogen. Biochem. J., **177** : 271, 1970.
- 9) Ehrlich, P. : Die Schutzstoffe des Blutes. Dtsch. med. Wschr., **27** : 151, 1901.
- 10) Heirwegh, K. P. M. : Heterogeneity of bile pigment conjugates as revealed by chromatography of their ethylanthranilate azopigments. Biochem. J., **120** : 877, 1970.
- 11) Kuenzle, C. C. : Bilirubin conjugates of human bile. Biochem. J., **119** : 877, 1970.
- 12) McDonagh, A. F. & Assisi, F. : Direct evidence for the acid-catalysed isomeric scrambling of bilirubin IX_α . J. Chem. Soc. Chem. Commun., : 117, 1972.
- 13) McDonagh, A. F. & Assisi, F. : The ready isomerisation of bilirubin IX_α in aqueous solution. Biochem. J., **129** : 797, 1972.
- 14) McDonagh, A. F. : Thermal and photochemical reactions of bilirubin IX_α . Annals New York Academy of Sciences. : **244** ; 553, 1975.
- 15) McDonagh, A. F. : An overview of bilirubin chemistry. in Jaundice, edited by Goresky, C. A. & Fisher, M. M., Plenum Press, New York & London, 1972. p 1,
- 16) Ostrow, J. D. : Photo-oxidative derivatives of C^{14} -bilirubin and their excretion by the Gunn rat. in Bilirubin Metabolism, edited by Bouchier I.A.D. and Billing, B.H. Blackwell, Oxford, 1967. p117.
- 17) Porto, S. O. & Hsia, D. Y. Y. : The mechanism of blue light on neonatal jaundice, Annual Meeting-1968, Midwest Society of Pediatric Research. J. Ped., **812**, 1969 (Abstract).
- 18) 山下文雄, 安部弘彦, 奥田邦雄 : ビリルビン代謝に関する最近の知見 (その2) — ビリルビンの光分解, 定量法等について —. 日本臨床, **28** : 2469 : 1970.
- 19) 大西鐘寿, 藤掛守彦 : 新生児黄疸の光療法および酵素誘導療法について. 日本臨床, **30** : 100, 1972.
- 20) Goldstein, G. W., Hammaker, L. & Schmid, R. : The catabolism of Heinz bodies. Blood, **31** : 388, 1968.
- 21) Israels, L. G., Suderman, H. J. & Ritzman, S. E. : Hyperbilirubinemia due to an alternate path of bilirubin production. Amer. J. Med., **27** : 693, 1959.
- 22) Axelrod, J., Schmid, R. & Hammaker, L. : Metabolism and disposition of C^{14} -bilirubin in congenital nonhemolytic jaundice. J. Clin. Invest., **42** : 1720, 1963.
- 23) London, I. M., West, R. & Rittenberg, D. : On the origin of bile pigment in normal man. J. Biol. Chem., **184** : 351, 1950.

- 24) Yamamoto, T., Skanderberg, J., Ziprusky, A. & Israels, L. G. : The early appearing bilirubin : Evidence for two components. *J. Clin. Invest.*, **44** : 31, 1965.
- 25) Israels, L. G., Levitt, M., Novak, W., Foerster, J. & Ziprusky, A. : The early bilirubin. in *Bilirubin Metabolism*, edited. by Bouchier, I. A. D. and Billing, B. H. Blackwell Oxford, 1967. p 3,
- 26) Robinson, S. H. : The origin of bilirubin. *Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital.* Boston. *New. Engl. J. Med.*, **279** : 143, 1968.

Studies on bilirubin isomers**Part 1. Separation and characterization of bilirubin isomers**

by

Mutsuo MARUYAMA

The First Department of Internal Medicine, Okayama University Medical School

(Director : Prof. Kiyowo Kosaka & Prof. Hideo Nagashima)

The commercial bilirubin obtained from Daichi Pure Chemical Co. Ltd. was separated into three fractions according their movability from the front (upper, middle and lower bands) by McDonagh's thin layer chromatography. Each fraction was examined by mass spectrometry, nuclear magnetic resonance (N.M.R.) spectra and photochemical methods. The following results were obtained.

1) Mass spectra specific to bilirubin, the parent ion at m/e 584 and the fragment ions at m/e 299 & 286 were obtained from all these fractions.

2) Signals of methyl groups in bilirubin molecule on N.M.R. spectra of these fractions were observed as follows. Upper band: at 2.03 and 2.16 p.p.m. of C-13 and C-17, middle band: at 1.92 and 2.00 p.p.m. of C-2 and C-7, 2.03 and 2.16 p.p.m. of C-13 and C-17, and lower band: at 1.91 and 2.00 p.p.m. of C-2 and C-7, respectively. From these observations it was concluded the bands coincide with bilirubin III α , IX α and XIII α respectively.

3) Absorption maxima of bilirubin III α , IX α and XIII α in chloroform were found at 455~458nm, 453~455nm and 449~453nm respectively. Absorption maxima of their diazotized sulfanilate solution (pH 1.3) were 548~556nm, 540~548nm and 533~540nm respectively. Absorption maxima of their diazotized ethylanthranilate solution (pH 1.4) were 524~527nm, 527~530nm and 530~533nm respectively. After acidification with hydrochloric acid to pH 0.5, absorption maxima of their diazotized sulfanilate solution were moved to 577~584nm, 570~577nm and 563~570nm.

4) E_{max} of the isomers in chloroform were calculated to be 64,900 for bilirubin III α , 62,900 for bilirubin IX α and 53,700 for bilirubin XIII α respectively.