

## 試験内胆汁色素生成に関する研究

## 第 1 編

Methaemoglobin の l-Ascorbin 酸と分子酸素による  
分解過程に関する分光化学的研究

岡山大学医学部第一内科教室 (主任：小坂教授)

垂 水 昭 二

〔昭和 34 年 8 月 15 日受稿〕

1903年 O. Warburg 及び E. Negelein<sup>1)</sup> は Pyridin 液中で Haemin に分子酸素と塩酸 Hydrazin 等を作用させ、緑色の物質の生ずる事を見出し、之を“grünes Haemin”と呼び諸家の注目を集めた。次いで1935年 R. Lemberg<sup>2)</sup> はその物質が Biliverdin-methylester と塩化第二鉄と塩酸の各一分子よりなる事を明らかにした。その後かかる試験管内実験の反応機序に就いては R. Lemberg, M. Engel, G. Barkan, H. Fischer, H. Libowitzky<sup>3)4)</sup>, 我国に於いても日本医大上代教室及び当教室永井<sup>5)</sup> 荻野<sup>6)</sup> 尼子等により研究され、数多くの報告がある。これ等の反応過程では Methaemoglobin の生成される事も一応想定され、荻野は積極的に Methaemoglobin より分解を M. Engel 法<sup>7)</sup> により Biliverdin の収量から検討した。著者は Beckman 製 DK 型自記分光光度計の入手を機会に、その機械の優秀性を利用して、これらの過程を分光化学的に検討を加え、荻野等の成績と対比した。

Methaemoglobin に関しては T. B. Conant<sup>8)9)</sup> 等の研究があり、Oxyhaemoglobin の自酸化によつても形成されるとしているが、著者は本実験に於いて Methaemoglobin を Oxyhaemoglobin より亜硝酸曹達法によつて調製した。そこで亜硝酸曹達の Methaemoglobin に及ぼす分光化学上の影響を検討した所、一定量の赤血球浮遊液に対しては亜硝酸曹達量が増加するにつれ溶血量は増加し、Methaemoglobin は収量し難くなるが、調製された Methaemoglobin の分光像及び Sodium dithionite による還元、苛性曹達による変性の分光像に相違を認めなかつた。

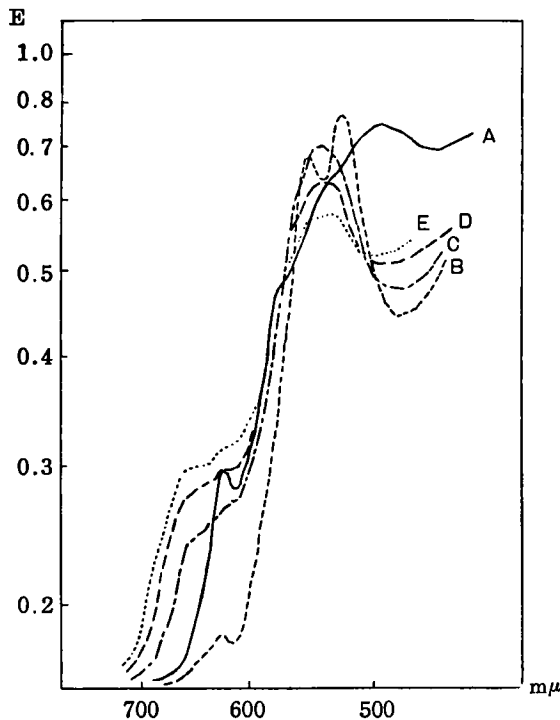
そこで反応液 pH 7.2, 反応温度 37°C 下に於いて Methaemoglobin に l-Ascorbin 酸を加え、室内

放置により分子酸素を作用させ、その分解過程を追求した。この際反応は絶えず進行を示すので自記分光光度計に依り瞬時測定を行ない、その目的を達することが出来た。

pH 7.2, に於ける Methaemoglobin は 630 m $\mu$ , 572 m $\mu$ , 500 m $\mu$  に吸収極大を示すが反応 5 分後には 630 m $\mu$ , 576 m $\mu$ , 540 m $\mu$  に吸収極大を示した。この反応液に Sodium dithionite を加え 6% の苛性曹達で還元変性すると 630 m $\mu$  吸収極大は消失し 556 m $\mu$ , 528 m $\mu$  に吸収極大を示し alkali denatured globin-hemochrome の吸収曲線に一致した。従つて 630 m $\mu$  吸収極大は Methaemoglobin のものであり、576 m $\mu$ , 540 m $\mu$  は Oxyhaemoglobin の吸収極大であつて Methaemoglobin が l-Ascorbin 酸によつて還元され Oxyhaemoglobin を生じ、残余の Methaemoglobin と共存関係を示す吸収曲線になつたものと考えられる。反応 30 分では 670 m $\mu$ , 630 m $\mu$  に吸収極大を示し還元変性すると、760 m $\mu$  吸収極大を中心に 800 m $\mu$ ~740 m $\mu$  の膨隆と 618 m $\mu$  に吸収極大を示した。その間 630 m $\mu$  吸収極大は反応の進行に伴い低下し、670 m $\mu$  吸収極大の出現と共に再び増加した。以後時間の経過に伴い 576 m $\mu$ , 540 m $\mu$  吸収極大は低下、670 m $\mu$ , 630 m $\mu$  吸収極大及び還元変性による 760 m $\mu$ , 618 m $\mu$  吸収極大は増加した。反応 12 時間を過ぎると 576 m $\mu$  吸収極大は次第にその形態が変化し、540 m $\mu$  吸収極大は漸次短波長側に移動した。還元変性によつても 760 m $\mu$  吸収極大は長波長側、618 m $\mu$  吸収極大は短波長側に移動した。反応 24 時間に於いては平坦な膨隆となり、540 m $\mu$  吸収極大は 530 m $\mu$  へ移動した。還元変性によつては 760 m $\mu$  吸収極大は 775 m $\mu$  へ、618 m $\mu$  吸収極大は 590 m $\mu$  へ移動したが、530 m $\mu$

Fig. 1. A Absorption Curves of Met Hb (A) and Reag. (B, C, D, E.) at 5, 30, 60, 90 min.

Reag : Met Hb + 1-Ascorbic Acid + O<sub>2</sub>  
(without O<sub>2</sub> aeration)



吸収極大は変化を示さなかつた [Fig. 1 A, B.]

次いで Methaemoglobin に 1-Ascorbic 酸を加え、分子酸素を通気してその分解過程を検討した。反応 5 分後に 630 mμ, 576 mμ, 540 mμ に吸収極大を示し、還元変性によつて 556 mμ, 528 mμ に吸収極大を示す事は酸素非通気の場合と同様であるが、その後時間の経過に伴い 630 mμ 吸収極大は低下し反応 60 分では 630 mμ 吸収極大は停滞する。この際同時に 670 mμ に吸収を認め、還元変性を行うと 760 mμ, 618 mμ に吸収極大を示した。反応 90 分で 670 mμ 吸収極大は増大し 630 mμ 吸収極大との間に緩やかな曲線を示した。而してこの両吸収極大は酸素非通気時のそれに比して極めて低かつた。次に酸素通気を中止すると急激に 670 mμ, 630 mμ 吸収極大は増加し再び通気すると 670 mμ 吸収極大は低下し 630 mμ 吸収極大は増加し、両吸収極大間の勾配は急になつた。この反応液を還元変性すると 760 mμ, 618 mμ に吸収極大を示すかが、Sodium dithionite による還元のみでは 765 mμ, 620 mμ, 556 mμ に吸収極大を示し、酸素を通気する 670 mμ, 630 mμ の吸収極大を復元した。 [Fig. 2 A, B, Fig. 3]

Fig. 1. B Absorption Curves of Reag. (A', B', C', D', E')

Reag : (A, B, C, D, E) + Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + 6% NaOH

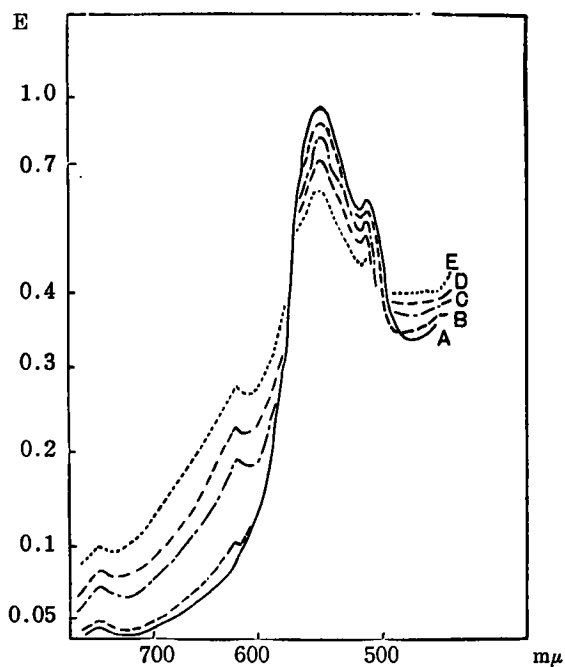


Fig. 2. A. Absorption Curves of Met Hb (A) and Reag. at 30, 60, 90, 120 min (B, C, D, E)

Reag : MtHb + 1-Ascorbic Acid + O<sub>2</sub>  
(O<sub>2</sub> aeration)

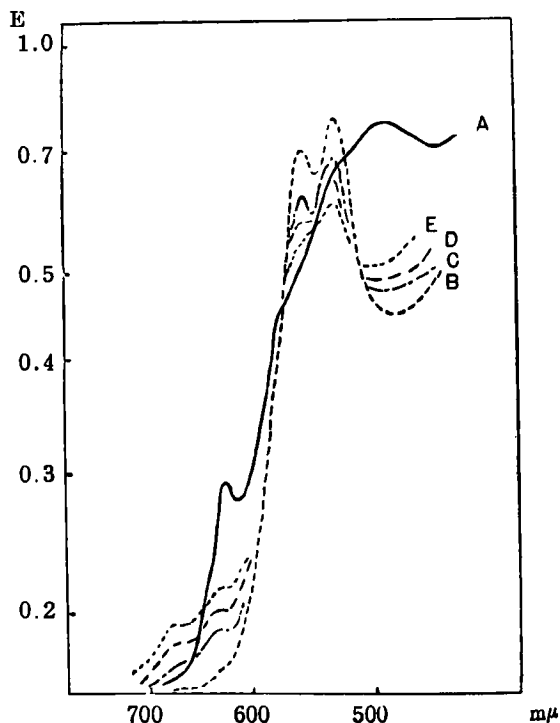


Fig. 2. B Absorption Curves of Reag (A', B'C', E', D')

Reag : (A, B, C, D, E) + Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + 6% NaOH

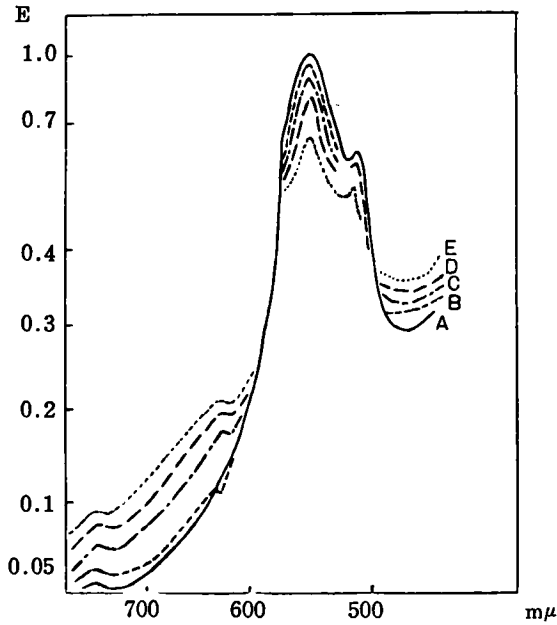
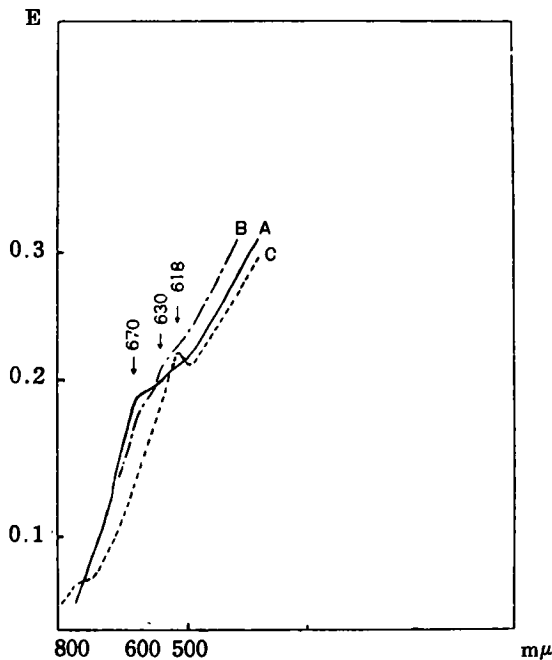


Fig. 3. Absorption Curves of Reag.  
Reag : A : MeAHb + 1-Ascorbic Acid + O<sub>2</sub>  
(without O<sub>2</sub> aeration)  
B : A + O<sub>2</sub> aeration  
C : A + Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub> + 6% NaOH



処で上代<sup>10)11)12)</sup>等は630 mμ 吸収極大は Choleglobin であり, 670 mμ 吸収極大は Verdohaemoglobin であるとし, 630 mμ 物質より 670 mμ 物質

への二段階反応を意定した。教室の竹田は酸素遮断により 670 mμ 物質を捕え, それと酸素通気による 670 mμ, 630 mμ 物質混在液との Biliverdin 収量の比較及び globin 除去後 Chloroform に補欠箇所を抽出し之に Pyridin を附加し, その分光像を比較検討の結果 670 mμ, 630 mμ 物質は 2 段階反応によるものでなく, 酸素によつて規定される同位の物質であるとす。R. Lemberg は 670 mμ, 630 mμ 物質を Ferri-Choleglobin, Ferro-Choleglobin と酸化還元型に考えた。

次に Methaemoglobin に 1-Ascorbin 酸を作用させその反応に及ぼす分子酸素の影響を検討する為, 口径 3 mm の硝子管より酸素を通気し, その際の酸素量を変化させた。毎分 50 気泡程度に於いては酸素非通気例と同様の反応過程を示した。毎分 100 気泡以上になると 670 mμ 吸収極大の出現が遅延し, 670 mμ, 630 mμ 吸収極大は酸素非通気時のそれに比し著しい低下が認められた。処で R. Lemberg, 教室永井等は酸素分圧が低いと Choleglobin の形成が増加するとし, 著者の実験成績と相反する様であるが著者の場合は永井の実験でも分る通り, 670 mμ, 630 mμ 物質の形成よりも分解が酸素量の増加によつて促進する為と思われる。【Fig. 4】

次に本反応に及ぼす 1-Ascorbin 酸の影響をみるに Oxyhaemoglobin の分解に及ぼす 1-Ascorbin 酸の影響を Biliverdin の収量から求めた成績では Oxyhaemoglobin と 1-Ascorbin 酸量との間に一定比率を認めている。而し Methaemoglobin の場合は 1-Ascorbin 酸量の増加に伴い反応過程は促進し, Biliverdin の収量とは平行しなかつた。【Fig. 5】

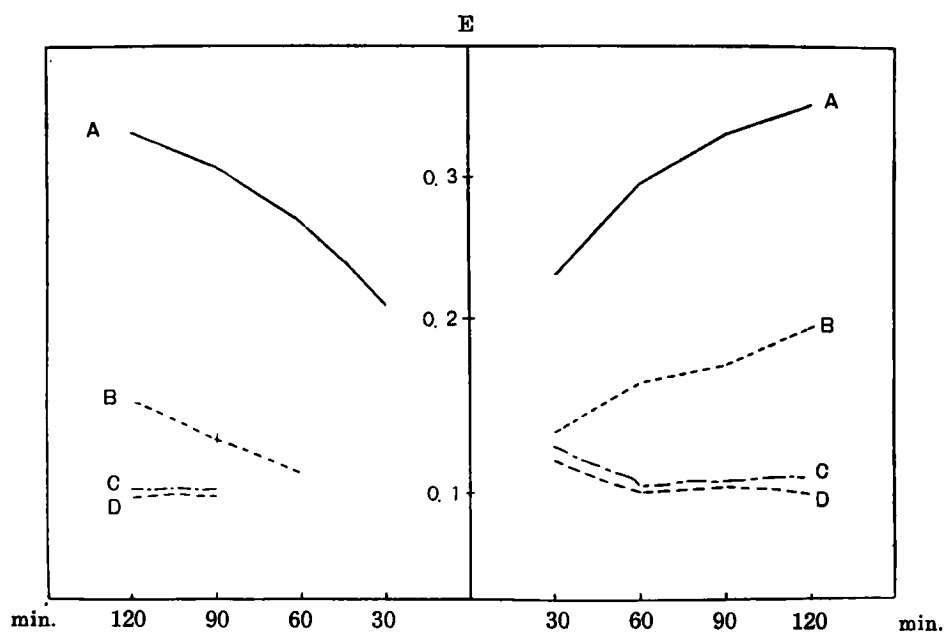
次に本反応に及ぼす Ion 濃度の影響であるが, Methaemoglobin は Ion 濃度によつて吸収曲線は異なり, 特にアルカリ性に於いては, alkali Methaemoglobin を形成し, Oxyhaemoglobin に似た分光像となる。而し pH 6.8~7.7 の間では略々同型の分光像を示し, 630 mμ の吸光係数が pH の増加につれ減少し, 560 mμ~572 mμ 間の膨隆が 572 mμ 側に移動し, 明瞭になる。本反応に及ぼす Ion 濃度の影響は Biliverdin の収量より観察した場合と一致し, pH 7.1 に於いて 670 mμ, 630 mμ 吸収極大は最大となり, 酸性, アルカリ性側になるにつれ分解過程は遅延し, その吸光係数は減少する。【Fig. 6】

次に本反応に及ぼす温度の影響では, 20°C に於いては反応は殆んど進行せず, 反応 3 時間に於いて

Fig. 4. E670m $\mu$ , E630m $\mu$  of Reag in various Dosis of O<sub>2</sub> aeration

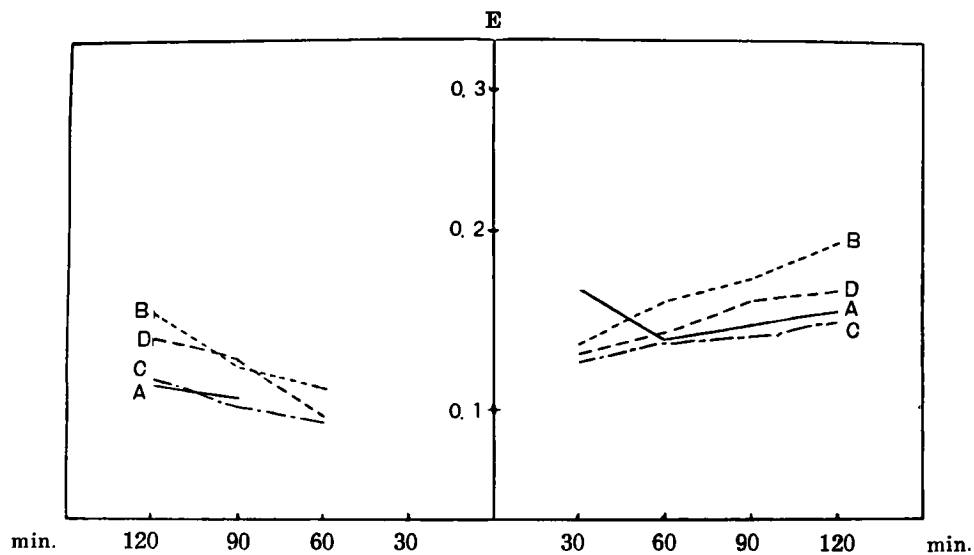
A : 50vacuolae/min O<sub>2</sub>  
 B : 100  
 C : 200  
 D : 300

Reag : MtHb+1-Ascorbic acid+O<sub>2</sub>

Fig. 5. E670m $\mu$ , E630m $\mu$  of Reag in various Dosis of 1-Ascorbic Acid

A : 1-Ascorbic acid 50mg  
 B : " 100 "  
 C : " 200 "  
 D : " 300 "

Reag : MtHb+1-Ascorbic acid+O<sub>2</sub>





を認めている処からも, Oxyhaemoglobin はまづ M. Engel の所謂 Verdohaemoglobin に分解され, 次いで Dipyrromethen 系物質へ分解するものと考えられ, その際 Pentdyopent 物質の生成が推定される訳である.

そこで Methaemoglobin に l-Ascorbin 酸及び分子酸素を作用させ反応 4, 14, 48 時間目の反応液に於いて Pentdyopent 反応を行なつた. 4, 14 時間目の反応液の吸収曲線では 670 m $\mu$ , 630 m $\mu$  に吸収極大を有し, 還元変性により 760 m $\mu$ , 618 m $\mu$  に吸収極大を認めた. 48 時間目の反応では 670 m $\mu$  ~ 630 m $\mu$  の膨隆及び 530 m $\mu$  に吸収極大を示し, 還元変性により吸収曲線の変化はなかつた. 武谷<sup>16)</sup> は苛性曹達を加えた l-Ascorbin 酸を熱することにより赤色となり Pentdyopent 反応と同様に呈色するので, Pulflich 光度計により区別する事は出来ないが, 分光化学的に前者は 500 m $\mu$ , 後者は 525 m $\mu$  に吸収極大を有する点に注意検討を加えた結果, 反応液中に Dipyrromethen 系物質は含まれないとした. 著者は反応液に氷醋酸処理を行い, globin を除去した後 Pentdyopent 反応を行なつた所赤色の発色を認め, 520 m $\mu$  に明瞭な Pentdyopent の吸収極大を得た. 而も反応 14 時間目の Pentdyopent の 520 m $\mu$  吸収極大は 4 時間目のそれに比して大であつた. 但し反応 48 時間目の反応液からは Pentdyo-

pent を検出出来なかつた. この際氷醋酸の影響は無視出来ないが, 少なくとも本反応過程に於いて Dipyrrolyl 系物質への分解は認められる. 又 M. Engel 法により反応液より Biliverdin を Aether 層に抽出し Silicagel を吸着剤とし Chloroform : Buthanol 9 : 1 の液を展開液とし Column Chromatogramm を調製すると, 緑色の一層を分離し Gmelin 反応は黄, 紫, 赤色を呈し Schlesinger 反応, Ehrlich 氏 aldehyde 反応共に陰性, 吸収曲線では 480 m $\mu$  に吸収極大を示し Biliverdin を確認したが, R. Lemberg の主張する Biliverdin は検出出来なかつた.

次に反応液より M. Engel 法により Biliverdin を抽出する際 Ether 層と塩酸 Biliverdin 層の間に灰色の混濁層を生ずる. そこで Aether 層とこの中間層を夫々苛性曹達液で抽出し Pentdyopent 反応を行なうと中間層に陽性で而も 520 m $\mu$  に吸収極大を認めた. [Fig. 8, 9]

以上の如く Methaemoglobin の l-Ascorbin 酸と分子酸素による反応過程に於いて Propentdyopent の生成される事は確實である.

Fig. 8. MtHb+l-Ascorbic acid+O<sub>2</sub>  
M. Engel's Methode

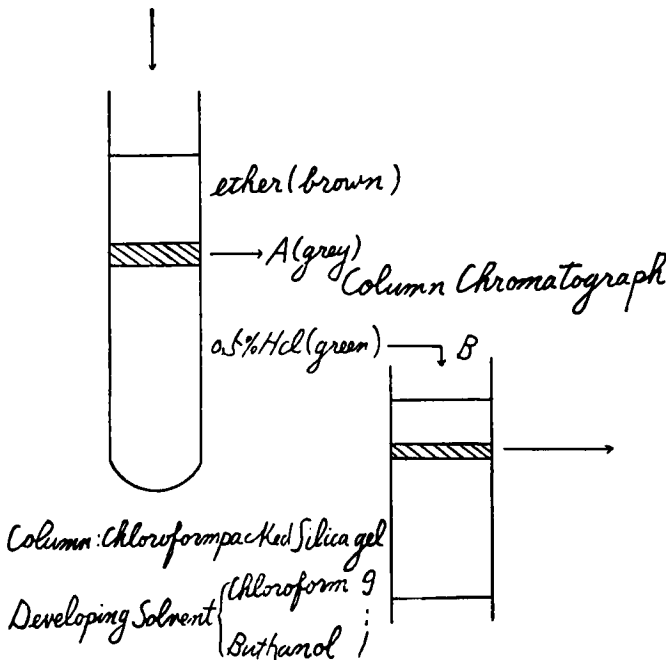
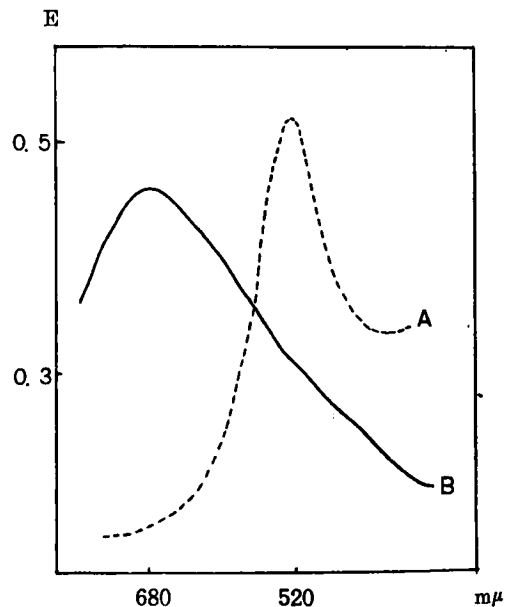


Fig. 9. Absorption curves of Biliverdin hydrochloride (B) and Pentdyopent (A)



## 実験の部

## 1) Methaemoglobin の調製及びその濃度測定法。

上代の方法に従つて、牛の頸動脈から採取した新鮮な血液 50 cc を、脱繊維した後、脱脂綿で濾過し、濾液を電気遠心して血清を除き、得た血液粥を生理的食塩水で、蛋白反応陰性になるまで洗い、之に亜硝酸曹達 1 g を加え、生理的食塩水で洗滌し、洗滌液が沃度加里澱粉反応を呈しなくなるまで洗滌を行い、次で蒸留水で完全に溶血させ、更に電気遠沈し Gelatin 様の Stroma を除去し、得た赤褐色の上清に  $H_2O_2$  を含有しない Aether を加え、よく振盪した後、電気遠沈し、Aether 層に移行した Lipoid を捨てる。この操作を aether 層に Lipoid が含まなくなる迄繰返して行ない、得た赤褐色の透明な液を Methaemoglobin 液とし、Toluol を重畳して氷室に保存した。濃度測定は K. Bertke & W. Sabelberg 法によつた。

## 2) 吸収曲線の描写法

米国製 Beckman DK 型自記分光光度計を用い、液槽 10 mm、室温  $10^{\circ}C$  以上、湿度 70% 以下に於いて行なつた。

## 3) Methaemoglobin 調製時の亜硝酸曹達量の検討

新鮮な牛血液 50 cc を脱繊維後、脱脂綿で濾過し、濾液を電気遠沈して血清を除去し、得た血液粥を生理的食塩水で洗滌し、上清が蛋白反応を呈しなくなった血液粥に亜硝酸曹達（結晶）を 0.5, 2, 4, 6, 8, 10 g 加え上述の要領で Methaemoglobin 液を調製し、その吸ひ曲線を比較検討した。

## 4) Methaemoglobin に l-Ascorbin 酸を加え、分子酸素を作用させる反応における酸素の作用方法の相違に関する検討

1. 10 g % の牛血 Methaemoglobin 液 0.5 cc を、100 cc 容量の Kolben にとり、l-Ascorbin 酸 100 mg を蒸水 1 cc に溶解し、 $1/10$  N 苛性曹達 4.5 cc で中和したものを加え、更に pH 7.2 の  $1/15$  M Sorensen 磷酸塩緩衝液を加え全量 60 cc とし  $37^{\circ}C$  の恒温槽に保ち、他方同様の条件下で調製した反応液に、毎分 100 気泡の速度で口径 3 mm の硝子管より分子酸素を通気し、経時的に夫々の吸ひ曲線を測定し比較した。

2. 10 g % Methaemoglobin 液 0.5 cc を 100 cc 容量の Kolben にとり l-Ascorbin 酸 100 mg を蒸水 1 cc に溶解し、 $1/10$  N 苛性曹達 4.5 cc で中和し

たものに加え、更に pH 7.2 の  $1/15$  M Sorensen 磷酸緩衝液を加え、全量 60 cc とし、 $37^{\circ}C$  の恒温槽に保ち、口径 3 mm の硝子管より毎分 100 気泡の速度で、分子酸素を通気し、反 90 分後に酸素通気を中止し、10 分後再び酸素を通気し、夫々の吸収曲線を測定し比較した。

## 5) Methaemoglobin + l-Ascorbin 酸 + 分子酸素反応時の分子酸素量の影響

10 g % の牛血 Methaemoglobin 液 0.5 cc を 100 cc 容量の Kolben にとり、l-Ascorbin 酸 100 mg を蒸水 1 cc に溶解し  $1/10$  N 苛性曹達 4.5 cc で中和したものを加え、pH 7.2 の  $1/15$  M Sorensen 磷酸塩緩衝液を加え全量 60 cc とし  $37^{\circ}C$  の恒温槽に保ち、口径 3 mm 硝子管より毎分 50, 100, 200, 300 気泡の速度で分子酸素を通気し、経時的に吸収曲線を測定し比較した。

## 6) Methaemoglobin + l-Ascorbin 酸 + 分子酸素反応系に及ぼす l-Ascorbin 酸量の影響

10 g % の牛血 Methaemoglobin 液 0.5 cc を 100 cc 容量の Kolben にとり、l-Ascorbin 酸 50, 100, 200, 300 mg を夫々蒸水 1.0 cc に溶解し、 $1/10$  N 苛性曹達 2.3 cc, 4.5 cc, 9 cc, 13.5 cc で中和したものを加え、これに pH 7.2 の  $1/15$  M Sorensen 磷酸塩緩衝液を加え全量 60 cc とし、 $37^{\circ}C$  の恒温槽に保ち、分子酸素を型の如く、毎分 100 気泡の速度で通気し、経時的にその吸収曲線を測定し、吸光係数を求めて比較した。

## 7) Methaemoglobin + l-Ascorbin 酸 + 分子酸素反応系に及ぼす水素 Ion 濃度の影響

10 g % の牛血 Methaemoglobin 液 0.5 cc を 100 cc 容量の Kolben にとり、l-Ascorbin 酸 100 mg を蒸水 1 cc に溶解し、 $1/10$  N 苛性曹達 4.5 cc で中和したものを加え、更に pH 6.8, 7.1, 7.4, 7.7 の  $1/15$  M Sorensen 磷酸塩緩衝液を加えて、夫々全量を 60 cc とし、 $37^{\circ}C$  の恒温槽に保ち、型の如く分子酸素を毎分 100 気泡の速度で通気し、経時的に吸収曲線を測定すると共に、その吸光係数を求めて比較した。

## 8) Methaemoglobin + l-Ascorbin 酸 + 分子酸素反応系に及ぼす温度の影響

10 g % の牛血 Methaemoglobin 液 0.5 cc を 100 cc 容量の Kolben にとり、l-Ascorbin 酸 100 mg を蒸水 1 cc に溶解し、 $1/10$  N 苛性曹達 4.5 cc で中和したものを加え、更に pH 7.2 の  $1/15$  M Sorensen 磷酸塩緩衝液を加えて全量 60 cc とし、夫々温度を

20°C, 30°C, 37°C, 40°C に保ち型の如く分子酸素を毎分100気泡の速度で通気し、経時的にその吸収曲線を測定すると共にその吸光係数を求めて比較した。

9) Biliverdin の抽出及びその定量法 M. Engel の方法に従つた。

10) Methaemoglobin + l-Ascorbin 酸 + 分子酸素系反応液に於ける Pentdyopent 反応の検討

1. 10 g %の牛血 Methaemoglobin 液 0.5 cc を 100 cc 容量の Kolben にとり、l-Ascorbin 酸 100 mg を蒸水 1.0 cc に溶解し 1/10 N 苛性曹達 4.5 cc で中和したものを加え、更に pH 7.2 の 1/15 M Sö-reusen 磷酸塩緩衝液を加えて全量 60 cc とし 37°C の恒温槽に保ち、反応 4, 14, 48 時間目の反応液 20 cc に 10 cc の氷醋酸を加え 10 分間放置する。次で結晶醋酸曹達 6 g を加え完全に溶解する迄振盪すると蛋白質の凝塊が析出する。遠心分離した上清に飽和苛性曹達水溶液を加えて alkali 性とし、次で Natrium dithionite を加えて加温し、Pentdyopent 反応を検査し、次でその吸収曲線を測定した。

2. 1) で得た上清に Aether 30 cc を加えてよく振盪した後、遠心沈澱を行ない Aether 層を分離する。次で 0.5% 塩酸液 20 cc を加えて振盪すると、塩酸液は青緑色に着色し、その際茶色の Aether 層との間に灰色の凝塊状の中間層を得る。その各層を 2 cc とり飽和苛性曹達水溶液を加え、alkali 性とし Natrium dithionite を加えて加温し Pentdyopent 反応を検査した後、その吸収曲線を測定した。

3. 2) に於いて得た青緑色の溶液を Silicagel を吸着剤とし、Chloroform : Butanol 9 : 1 の溶液を展開液とし Column chromatography を行ない、一層の緑色層を得た。この緑色層は Methanol で抽

出され、Gmelin, Schlesinger, Ehrlich's aldehyde, Ehrlich's diako 反応, Pentdyopent 反応を行ない、又その吸収曲線は測定した。

## 結 論

Methaemoglobin に l-Ascorbin 酸と分子酸素を作用させ、その分解過程を分光化学的に検討して次の結論を得た。

1) 亜硝酸曹達によつて Oxyhaemoglobin より Methaemoglobin 調製の場合、亜硝酸曹達による Methaemoglobin の分光化学上の影響は認められなかつた。

2) Methaemoglobin は l-Ascorbin 酸と分子酸素により、Oxyhaemoglobin に還元され、その後同様の分解過程を示す。

3) 本反応では分子酸素の影響をうけ、分子酸素量が大であると反応速度も大であるが、670 m $\mu$  物質の生成は抑制され、而も 670 m $\mu$ , 630 m $\mu$  物質は分子酸素量が小さい場合に吸光係数が大である。

4) 本反応の中間物質である 670 m $\mu$ , 630 m $\mu$  物質は分子酸素量の多寡によつて相互に移行する。

5) 本反応は Ion 濃度の影響をうけ pH 6.8~7.7 の間では、pH 7.2 に於いて 670 m $\mu$ , 630 m $\mu$  物質の生成量が最も大である。

6) 本反応は l-Ascorbin 酸量の影響をうけ、l-Ascorbin 酸量の増加に伴い、反応速度は促進する。

7) 本反応は温度によつて影響をうけ、高温になるにつれ反応過程は促進し、低温になるにつれ遅滞する。

8) 本反応の早期に Dipyrromethen 系物質は生成される。

9) 本反応の Dipyrromethen 系物質は、670 m $\mu$ , 630 m $\mu$  物質の分解によつて生成される。

## 主 要 文 献

- 1) O. Warburg u. E. Negelein: Ber. dtsh. Chem. Ges. **63**, 1816 (1930).
- 2) R. Lemberg: Biochem. J. **28**, 980 (1935).
- 3) H. Fischer u. H. Libowitzky: Z. physiol. Chem. **251**, 198 (1937); **255**, 209 (1938).
- 4) H. Libowitzky: Z. physiol. Chem. **256**, 191 (1940).
- 5) 永井: 医学研究, **22**(8), 124 (1951).
- 6) 萩野: 医学研究, **25**(10), 128 (1955).
- 7) M. Engel: Z. physiol. Chem. **266**, 135 (1940).
- 8) Conant, J. B.: J. Biol. Chem. **57**, 401 (1923).
- 9) Conant, J. B. & D. Scott: J. Biol. Chem. **76**, 207 (1928); **98**, 57 (1932).
- 10) 上代・生化学, **26**, 177 (1954).
- 11) 梶田: 生化学, **28**, 119 (1956).
- 12) 菊地 生化学, **21**, 174 (1949).
- 13) K. Bingold: Kl. Wschr. **13**, 1451 (1934); **14**, 1287 (1935); **17**, 289 (1938).
- 14) R. Lemberg, B. Cortis-Jones & W. H. Norrie: Nature **139**, 1016 (1937); **140**, 65 (1937);



- 242, 148 (1938).  
15) G. Barkan u. Schales: Z. physiol. Chem. 244, 81 (1936); 248, 96 (1937); 253, 83 (1938); 254, 241 (1938).  
16) 武谷: 生化学, 21, 134 (1949).  
17) Bertke & W. Sabelberg: Klin. Wschr. 28, 482 (1950).  
18) R. Lemberg, B. Cortis-Jones & M. Norrie: Biochem. J. 32, 171, 149 (1938).  
19) R. Lemberg, J. W. Legge & W. H. Lockwood: Biochem. J. 33, 754 (1939).  
20) R. Lemberg, J. W. Legge & W. H. Lockwood: Biochem. J. 35, 328, 339, 353, 363 (1941).

---

## Studies on the Production of Bile Pigment *in vivo*

### Part 1. Spectrochemical Study on Decomposition Processes of Methemaglobin by 1-Ascorbic Acid and Molecular Oxygens

By

Shoji Tarumi

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

By amking 1-ascorbic acid and molecular oxygens act upon methemoglobin the author studied the decomposition processes spectrochemically and obtained the following results.

1. In preparing methemoglobin from oxyhemoglobin with sodium nitrite no spectrochemical effect of sodium nitrite can be recognized on methemoglobin.
  2. Methemoglobin is reduced to oxyhemoglobin in the presence of 1-ascorbic acid and molecular oxygen and thereafter it shows a similar decomposition processes as observable in the case of oxyhemoglobin.
  3. This reaction is affected by molecular oxygens namely, when the quantity of molecular oxygen is large, the speed of the reaction is greater but the production of 670 m $\mu$  substance is inhibited; whereas when the quantity of molecular oxygen is small, the absorption index of 670 m $\mu$  and 630 m $\mu$  substances is greater.
  4. The 670 m $\mu$  and 630 m $\mu$  substances that are intermediate substances of this reaction are reversible to one another depending upon the quantity of molecular oxygen present.
  5. This reaction is affected by the ion concentration; namely, between pH 6.8 and pH 7.7 at pH 7.2 the 670 m $\mu$  and 630 m $\mu$  substances are produced in the greatest amounts.
  6. This reaction is affected by 1-ascorbic acid; namely, with the increase in the amount of ascorbic acid the speed of reaction is accelerated.
  7. This reaction is affected also by temperature; namely, with a rise in temperature the reaction is accelerated whereas with a fall in temperature the reaction is retarded.
  8. At an early stage of this reaction dipyrromethen series substances are produced by the decomposition of the 670 m $\mu$  and 630 m $\mu$  substances.
-