

Propentdyopent に関する研究

第 1 篇

Bilirubin より propentdyopent への分解過程について

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂淳夫教授)

副手 河野 浩 哉

〔昭和 34 年 8 月 28 日受稿〕

緒 言

1870年 Stokvis¹⁾により提唱された反応は K. Bingold²⁾により pentdyopent 反応として呼称され、詳細な研究が行われ、その反応の本態は propentdyopent の呈色反応で、K. Bingold³⁾は始め hemoglobin の heme の分解によつて生ずる過程を追及したが、後に門下の W. Stich⁴⁾等と共に、bilirubin, urobilin の分解によつても生ずることを明らかにし、その反応過程は酸化的分解であろうとした。教室の岩原⁵⁾は、黄疸患者の尿中に認められる propentdyopent は K. Bingold³⁾がのべる如く hemoglobin が腎臓中で catalase を失うため容易に H₂O₂により propentdyopent を生ずる過程のものでなく、腎臓より排泄される bilirubin がその酸化作用により propentdyopent に変化されて排泄されるものとした。処で従来までに明らかにされた⁶⁾ propentdyopent の構造式に従えば、bilirubin より直ちに分解されるものであるか、一度 billverdin となり中央位 methine 基の分解に伴い propentdyopent を生ずるものか、又その分解過程は hemoglobin より choleglobin⁶⁾への分解過程にも相似するかにも感ぜられるので bilirubin に二、三の条件を与え主として分光化学的にその分解過程を追及し、与味ある成績を得たので報告する。

1. 実験材料

1. 1. 結晶 bilirubin の精製及び直接 bilirubin 溶液の調整。

結晶 bilirubin を chloroform に溶解し、之を東洋濾紙 No. 6 にて濾過し減圧乾燥した。その結晶 bilirubin 10 mg を 1/10 規定苛性ソーダ溶液 50 cc に溶解して用いた。

1. 2. Vitamine C (以下 V. C と略する。) 溶液の調整。

結晶 l-ascorbic acid 1000 mg を 10 cc の蒸留水に溶かし、1/10 規定苛性ソーダで中和したものをを用いた。

1. 3. Soerensen 磷酸塩緩衝液 (pH 8.04) の調整。

1/15 モル KH₂PO₄ 5 容, 1/15 モル Na₂HPO₄ 95 容を混じて pH 8.04 として用いた。

1. 4. 過酸化水素溶液 (以下 H₂O₂ 液と略する。) 使用した各種%の H₂O₂ 液は、実験毎に、30% H₂O₂ (片山化学製) の新しいもので、之を蒸留水で稀釈し直ちに使用した。

2. 実験方法

2. 1. 吸光曲線の作製

Beckmann-DK 型自記分光光度計を用い測定した。

2. 2. 嫌気性条件の調整

N₂ ガスポンベより導いた N₂ ガスを、灼熱した銅網を入れた石英ガラス管 (300°C に保つ) に通じ、之より更に、30% KOH 溶液 3 容, 15% Pyrogarol 溶液 1 容の割合に混じた吸酸素ビン中を 2 回通過させ、次で、流動パラフィンを目的試験液の上に重層した試験管に導き、更に空気の逆接触を断つために水を入れた瓶を附属させた。試料は、予め脱酸素した溶媒を用い、各々混合した後は、再び脱酸素を 30 分間行つて充分酸素をのぞくことに努めた。

2. 3. pentdyopent 反応 (以下 pdp. 反応と略す。)

試料 5 cc に固型苛性ソーダを加えて溶解せしめ強アルカリ性となし、之に Na₂S₂O₄ 粉末を二刀尖加え、空気酸化を防ぐために、流動パラフィンを重層し、沸騰水中で約 2 分間加熱した。

3. 実験成績並びに考按

3. 1. 好気下に於ける bilirubin ソーダ塩の分解

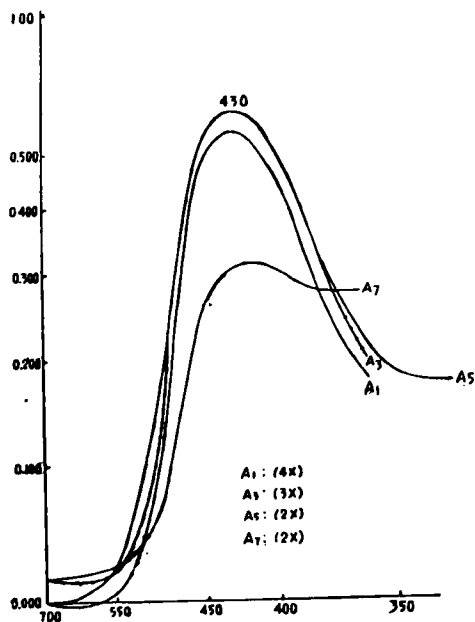
3. 1. 1. bilirubin ソーダ液に V. C と H_2O_2 液を作用させた場合.

表 1 の如き条件で実験を行った. 試験管には An

表 1

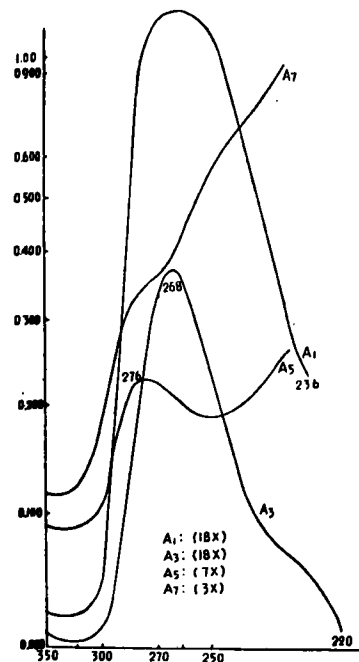
An	V. C cc	H_2O_2 cc	hilirubin ソーダ塩 水溶液 cc	soerensen 氏 燥酸塩緩衝溶 液 (pH 8.04)
A ₁	1cc	0.18w. % 1cc	2 cc	10cc
A ₂	1	0.36% 1	2	10
A ₃	1	0.54% 1	2	10
A ₄	1	0.72% 1	2	10
A ₅	1	0.9 % 1	2	10
A ₆	1	1.8 % 1	2	10
A ₇	1	2.7 % 1	2	10

(n=1→7) と符号を附した. 即ち, その条件において, 37°C 下, 16時間後の吸光曲線は Fig. 1 a の如

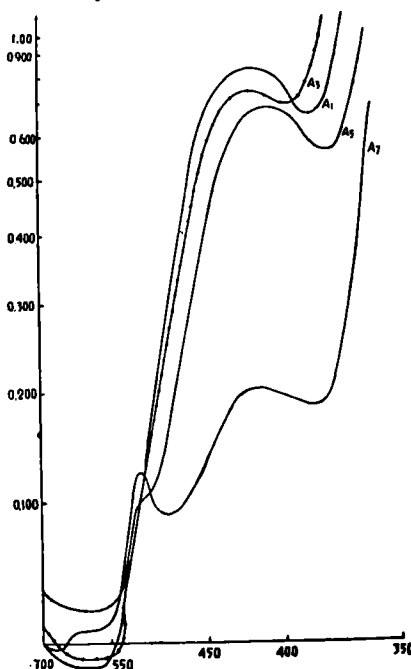
Fig. 1. a $H_2O_2 + V. C.$ (System visible range)

くで, 吸光係数が大きくなると, そのままでは測定不能のため, A₁ (4X), A₃ (3X), A₅ (2X), A₇ (2X) の如く Soerensen 氏緩衝液にて希釈して測定した. 次で各々の液に就いて, そのままの濃度で pdp. 反応を行った. pdp. 反応強陽性の A₇ は, 他の吸光曲線と相違し, 極大 430 m μ より短波長側が著しく上昇し, ならかな勾配を描いて下降した. 又物質 An が波長 λ m μ で吸光度極大を示すときの

吸光係数を E_{λ} (An) で表わすことにすると E_{430} (A₁) > E_{430} (A₃) > E_{430} (A₅) > E_{430} (A₇) で表わされる. 一方この際の紫外部の吸収は, Fig. 1 b の如

Fig. 1. b $H_2O_2 + V. C.$ (System ultra-violet range)

く, A₁, A₃ では, 270 m μ 附近に極大を示し, pdp. 反応陽性を示す A₅, A₇ では共に 280 m μ 近傍に極大を示した. 又 pdp. 反応の強さは $A_3 < A_5 < A_7$ で内

Fig. 2. Pentdyopent reaction ($H_2O_2 + V. C.$ System)

眼的には、A₅ でかろうじて紅色が認められたが、A₆, A₇ では明らかに認められた。その際の吸光曲線は Fig. 2 の通りである。

3. 1. 2. bilirubin ソーダ塩に V.C を作用させた場合。

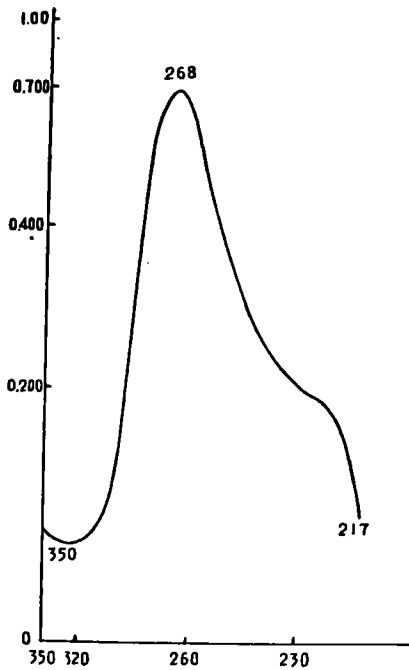
条件は、表 2 の如く、Bn は試験管番号を示す。

表 2

Bn	V. C cc	bilirubin ソーダ塩水溶液 cc	Soerensen 氏 磷酸塩 緩衝溶液 (pH 8.04)
B ₁	0.5cc	2cc	10cc
B ₂	1.0	2	10

先ず、37°C下、16時間後の吸光曲線は、Fig. 3 a, Fig. 3 b の如く、凡て pdp 反応陰性で、(Fig. 4) 可視部の吸収極大は 426 mμ, 紫外部のそれは、270 mμ 近傍に認めた。

Fig. 3. a V. C. System (visible range)



3. 1. 3. V. C, H₂O₂ を共に含まない場合。

bilirubin ソーダ塩溶液 2cc を pH 8.04 の Soerensen 氏緩衝液 10 cc に加え、37°C 下、16時間後の吸収曲線は、可視部に於て、Fig. 5 a の如く、400 mμ 近傍に膨隆を示すが、特に極大を示すことなく、短波長側に増加の傾向を示した。又紫外部では、280 mμ 近傍に極大を示した (Fig. 5 b) その際の pdp. 反応は、肉眼的にも紅色を呈しその吸収極大は 522 mμ であった。

Fig. 3. b V. C. System (ultra-violet range)

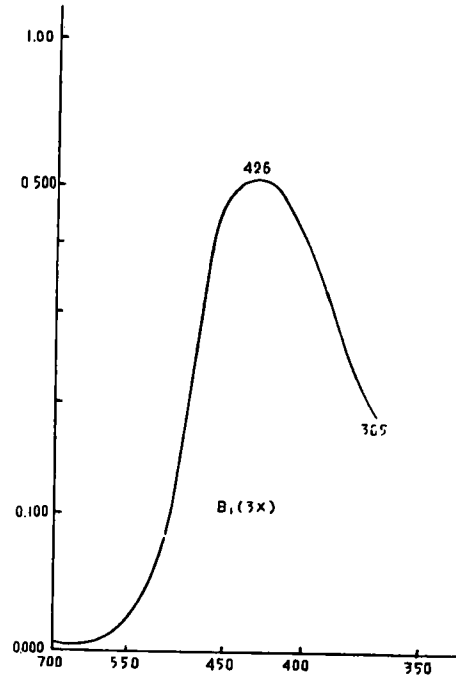
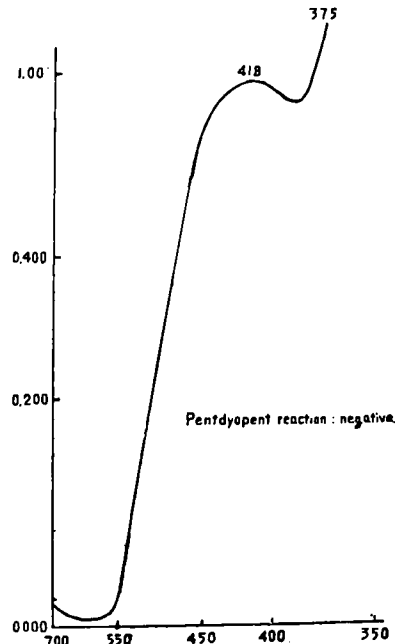


Fig. 4. Pentdyopent reaction (V. C. System)



3. 2. 嫌気性下に於ける bilirubin ソーダ塩の分解。

実験方法でのべた嫌気装置を用い、試料に用いる溶媒は、十分に N₂ ガスを通じ、O₂ を除去した後を用いた。

3. 2. 1. bilirubin ソーダ塩に V. C と H₂O₂ 液を作用させた場合。

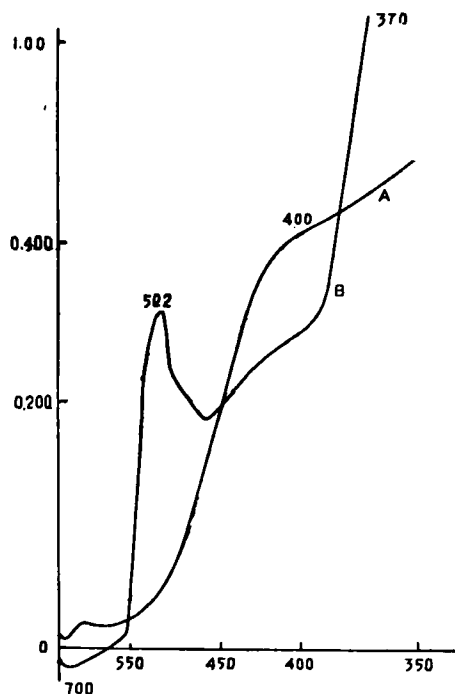
Fig. 5. a H_2O_2 (-)V.C. (-) System (visible range) and its Pentdyopent reaction

Fig. 5. b

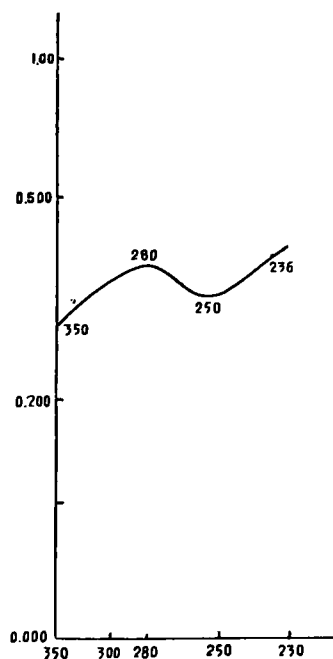


表3の如き反応系を調製し、之を、 $37^{\circ}C$ 下、16時間後に吸光曲線を描くと、Fig. 6aの如く、可視部で、 $430\text{ m}\mu$ に吸収極大を示し、稀釈度を考慮すれば、 $E_{430}(A_1) > E_{430}(A_2) > E_{430}(A_3)$ で、紫外部では、Fig. 6bに示す如く、 A_1, A_2 は $270\text{ m}\mu$ 近傍に吸収極大を有し、 A_3 は、 $280\text{ m}\mu$ 近傍に吸収極大を示した。而して、pdp. 反応では、 A_3 におい

表 3

An	V. C cc	H_2O_2 cc	bilirubin ソーダ塩 水溶液 cc	Soerensen 氏 磷酸塩緩衝溶 液 (pH 8.04)
A ₁	1 cc	0.36w. % 1 cc	2 cc	10 cc
A ₂	1	0.9	1	10
A ₃	1	2.7	1	10

Fig. 6. a

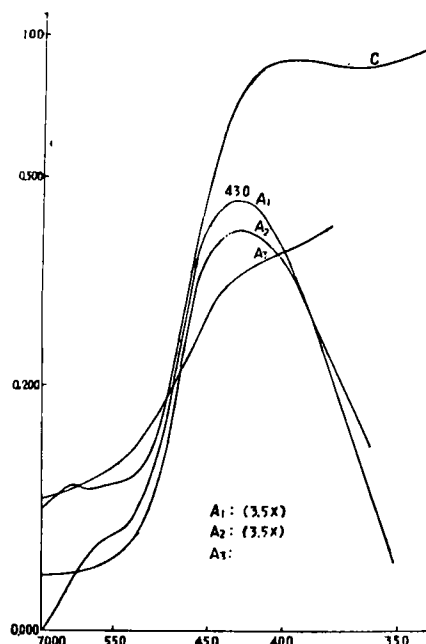


Fig. 6. b

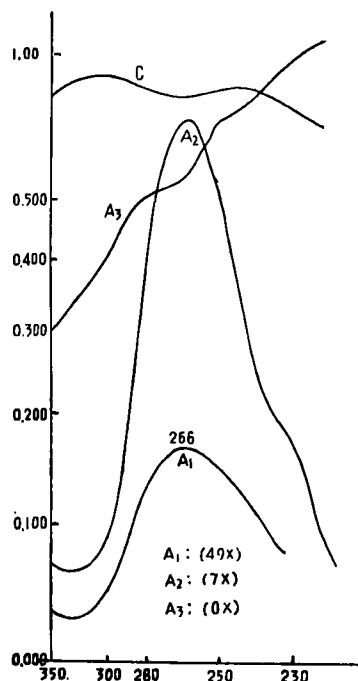
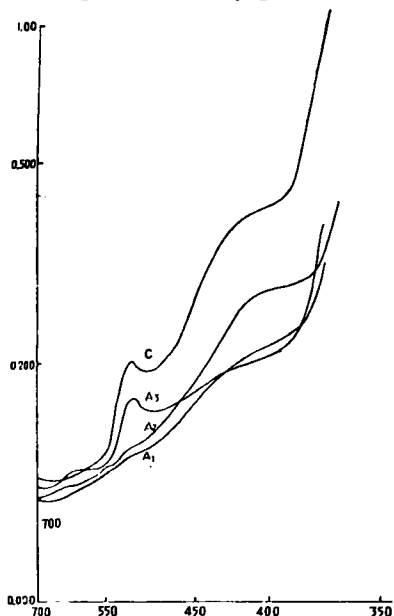


Fig. 6. c Pentdyopent reaction



て陽性 (Fig. 6c) で、吸収極大は522 mμであつた。

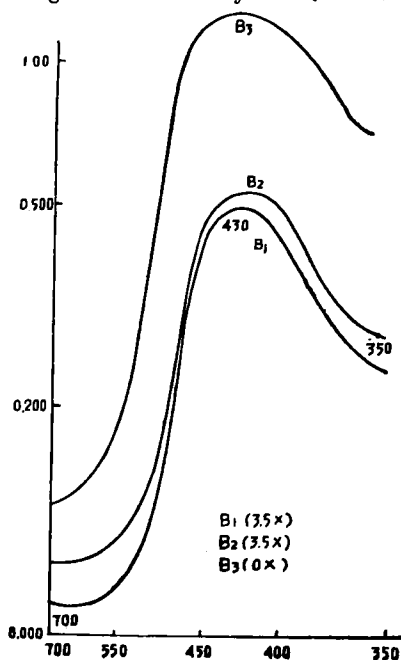
3. 2. 2. bilirubin ソーダ塩に V.C を作用させた場合。

表 4 の如き反応系を調製し、37°C 下、16時間後

表 4

Bn	V. C cc	bilirubin ソーダ塩水溶液 cc	Soerensen 氏磷酸塩緩衝溶液 (pH 8.04)
B ₁	0.2cc	2cc	10cc
B ₂	0.3	2	10
B ₃	0.4	2	10

Fig. 7. a V. C. System (visible range)



の反応の吸光曲線は、可視部では、Fig. 7 a の如く、極大を 430 mμ に認め、 $E_{430}(B_3) > E_{430}(B_2) > E_{430}(B_1)$ で、紫外部では、Fig. 7 b の如く、極大を 270 mμ 近傍に認め、 $E_{270}(B_3) > E_{270}(B_2) > E_{270}(B_1)$ 。pdp. 反応は、Fig. 7 c の如く陰性で、V.C 量が多い程 270 mμ 近傍の山は大となる。

Fig. 7. b V. C. System (ultra-violet range)

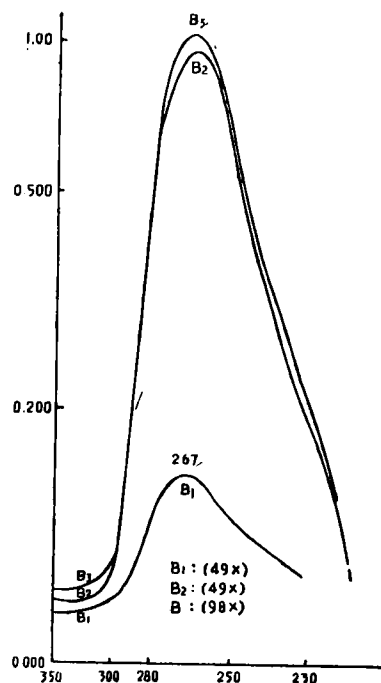
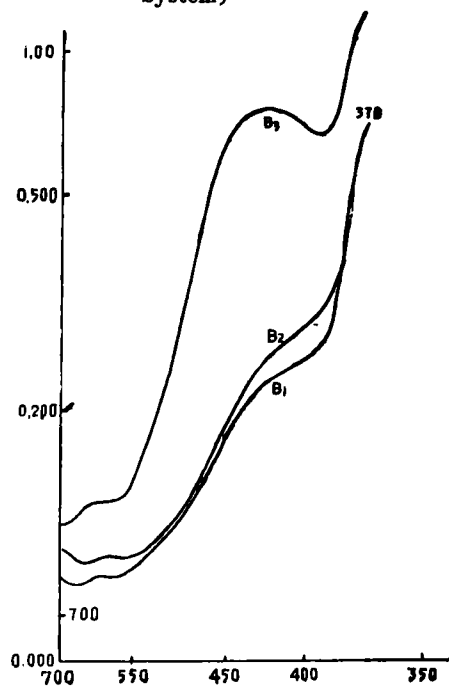


Fig. 7. c Pentdyopent reaction (V. C. System)



3. 2. 3. V. C, H₂O₂ 液を共に含まない場合.

bilirubin ソーダ塩溶液 2 cc に pH 8.04 の Soerensen 氏緩衝液 10 cc を加え, 37°C 下, 16時間後の反応液の吸光曲線を描くと, Fig. 6 a の c に示す如く, 400 m μ に極大を有し, 紫外部では, Fig. 6 b の c の如くで, 270 m μ 近傍の極大は認めなかつた.

3. 3. 結晶 bilirubin より propentdyopent の精製及び其の紫外部に於ける分光吸収像.

v. Dobeneck, H.⁷⁾ に準じて, 500 mg の結晶 bilirubin を 8% NaOH 溶液 70 cc に溶かし, 之に片山化学製の 30% H₂O₂ 2.5 cc を加えると, 濃褐色の色調は, 次第に黄色調へと移る. 約 4 時間室温に放置した後少量の MnO₂ を加えて, 余分の H₂O₂ を除く. 之は生じた propentdyopent が余剰の H₂O₂ で再び分解を受けるからである. MnO₂ により H₂O₂ の発泡が充分なくなつてから東洋濾紙 No. 6 で濾過する. 此の黄色の濾液に, 硫酸を加えて酸性とする. 次で, ethyl-ether を加えて 7~8 時間の間毎分 60 回の割合に振盪して抽出する. ethyl-ether は淡々黄色となり, 之を分別漏斗により分離し, 濃縮蒸発させ, その残渣に少量の氷冷 acetone を加えると, 白色フケ様の不定形結晶を生ずる. 他の黄褐色物質は acetone に溶ける, 此の ether-acetone の操作を繰返すと, 最後に, 白色フケ様の不定形結晶のみとなる. このものは, 水, ethyl-alcohol, NaOH 溶液に易溶で, 微量で, pdp. 反応陽性を強く示しその吸光曲線では, Fig. 9 B に示す如く, 526 m μ の極大を認める. 又其の白色フケ様の不定形結晶を 1% NaOH に溶解し, 紫外部の吸収極大を求めると, Fig. 8 の如く, 283 m μ に極大を有することがわかる. 一方 ether 抽出の際の残渣に, pdp. 反応を行うと, 之も強陽性を示し, その吸光曲線は, Fig. 9 A に見る如く, 524 m μ に極大を認め, 先の不定形結晶 propentdyopent の pdp. 反応が示す 526 m μ とは区別される. 又その際の紫外部の吸収極大は, 残渣からの propentdyopent の分離が出来ないために求めることが出来なかつた. これは, v. Dobeneck⁸⁾ が, ether 抽出性 (酸性溶液からの) の物質を propentdyopent 2, 3 とし, その pdp. 反応の分光像は, $\frac{536-523}{529}$ と記し, 残渣中には, propentdyopent 4 が存することになり, 此の pdp. 反応の吸収は, $\frac{529-517}{523}$ と述べているのと比べて略同様の結果を示すが, 吸収の極大は, propentdyopent 2, 3 及び propentdyopent 4 とで

Fig. 8.

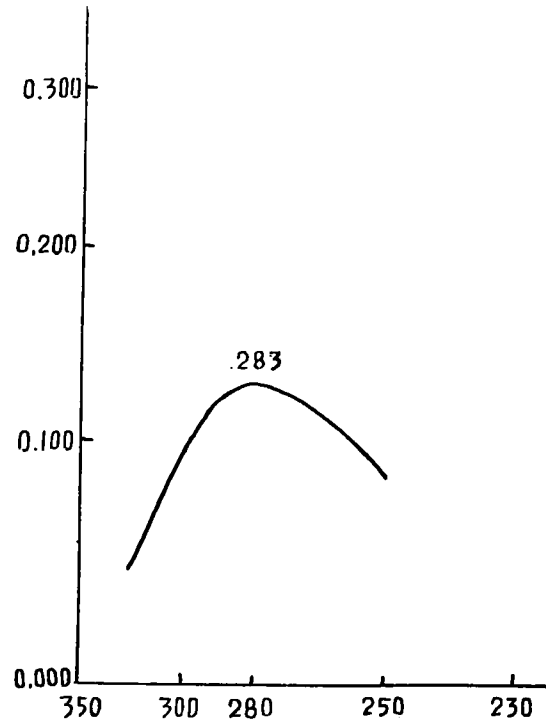
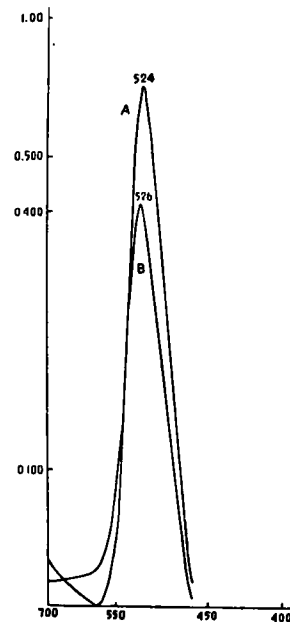


Fig. 9.



多少差がある. propentdyopent 自体の紫外部吸収については, 記載がなく, 著者の検討した処では, Dobeneck のいう propentdyopent 2, 3 に対応するものの吸収極大は 283 m μ であつた.

総括並びに考按

v. Dobeneck の方法⁷⁾ に倣い, 結晶 bilirubin を苛性ソーダに溶し, H₂O₂ 溶液を作用させて, pro-

pentdyopent を製成すると, ethyl-ether 抽出可能のものとは抽出のものに分れる. ethyl-ether 抽出可能のもの紫外部吸収極大は, 283 $m\mu$ にあり, V. C⁹⁾ のそれが中性溶液にて 265 $m\mu$, 酸性溶液で 240 $m\mu$ にあるのと明らかに異なる.

扱 bilirubin ソーダ塩を pH 8.04 磷酸塩溶液に溶かし, これに V. C 溶液及び H_2O_2 を好気性並びに嫌気性条件下で作用させると, $H_2O_2/V. C$ 容量比が大なるに従つて bilirubin の 430 $m\mu$ の吸収極大は, その吸光係数を減じ, 極大は次第に短波長にずれ, 420 $m\mu$ へと移行する. 而して最も著しい場合は短波長側への曲線の勾配は, ならぬであつた. Siedel & Möller¹⁰⁾ のいう mesobilifuscin (Körper II) の dioxane 中で可視部の吸光曲線に類似する. 之は, bilirubin が mesobilifuscin へと分解することを推定させる. 事実この様な場合に pdp. 反応を行うと, 最も陽性度は高く, 又紫外部の吸光曲線では 280 $m\mu$ 附近に propentdyopent に一致する極大を認める. 一方 $H_2O_2/V. C$ 比の低い場合は pdp. 反応は陰性で, 紫外部の吸光曲線では V. C の極大を認めるのみであつた. 以上の反応系で bilirubin が分解されて propentdyopent を生ずるためには H_2O_2 と V. C の容量比は大きい程反応は良好に進行し, 両者の容量の間に一定の適当な比を求めることが出来なかつた. 次に bilirubin ソーダ塩に V. C のみを作用させた場合は, 好気性条件下でも嫌気性条件下でも propentdyopent の生成を証明することは出来なかつた. V. C は pH 8.04 の条件では自酸化を行うことは不可能であり, hemoglobin に作用させた場合の如く, 触媒の介入はなく, 仮令溶液中に微量の Cu-ion の混入があるにしても殆んど自酸化作用を望みうべくもない. むしろ弱い還元作用を期待しうるに過ぎない. 而も嫌気性条件下でも V. C の作用を認めないところから bilirubin の還元は V. C に依つては多くを期待されない. 又 bilirubin ソーダ塩を pH 8.04 において放置すると, 好気性条件下では propentdyopent の生成を証明するが, 嫌気性条件下では証明されなかつた. 以上のことから bilirubin が propentdyopent へと分解する過程は H_2O_2 の作用によつて期待される酸化反応過程であり, hemoglobin が choleglobin に分解される過程は, l-ascorbin 酸と分子酸素又は H_2O_2 の共同酸化による酸化還元反応であるのと異なるところである. bilirubin が酸化され, biliverdin となり, 中央位 methyne 基において分解して propentdyopent を

生ずる反応が, heme の α 位の methyne 基の分解に相似するのではないかと推定し, hemoglobin の分解において 630, 670 $m\mu$ 物質を証明した様に分解過程を分光化学的に追及しうるのでないかと期待したが, 何等の成果もなく, hemoglobin の分解では補欠族 heme の条件で分解を受けるために一定の酸化還元電位を必要とするところから, 同一条件を求めることは困難であろう.

教室竹内¹¹⁾ は bilirubin の放置実験において, biliverdin へ更に propentdyopent への分解を吸光曲線の追及から証明しており, その意味で, bilirubin より biliverdin へ更に propentdyopent への分解過程も肯定されるが, 著者の実験では bilirubin より biliverdin への酸化過程は証明していないところから, bilirubin より直ちに分解されて propentdyopent が生成されると考えられる.

W. Stich⁴⁾ は bilirubin より propentdyopent への分解は酸化反応であろうと記載したが, 本実験によりこれを裏付けえたことになる.

結 論

bilirubin より propentdyopent への分解過程を各種条件下に主として分光化学的に追及し, 次の結果をえた.

1. bilirubin より v. Debeneck⁷⁾ の方法により調製した propentdyopent (ether 可溶) は紫外部において 283 $m\mu$ に吸収極大を示した.
2. bilirubin に V. C と H_2O_2 を作用させると, 好気性と嫌気性と何れにおいても, H_2O_2 量の多い程 propentdyopent の生成は良好であつた. 又その際反応中間産物としての吸収極大は証明されなかつた.
3. bilirubin に V. C のみを作用させた場合は反応の進行を認めなかつた.
4. bilirubin ソーダ塩を pH 8.04 の緩衝液中に放置すると, 好気性条件下のみ propentdyopent へと分解された.
5. bilirubin が propentdyopent へと分解されるには, そのままで酸化反応を受けることによつて期待される.

文献

- | | |
|---|--|
| 1) Stokvis, H. v. Dobeneck : Z. ges. Inn. Med. 3 (1948), 252. | York. (1949). |
| 2) Bingold, K. : Klin. Wschr. (1934), 1287. | 7) v. Dobeneck, H. : Hoppe Seyl. Z. 269 (1941), 268. |
| 3) Bingold, K. & Stich, W. : Dtsch. med. Wschr. 73 (1948), 501. | 8) v. Dobeneck, H. . Hoppe Seyl. Z 275 (1942), 1. |
| 4) Stich, W. : Viertes Freiburger Symposion med. Univ. Klinik von 29 Juni bis 1 Juli. (1956). | 9) The Merck Index of chemical and drugs. sixth edition. (1952). |
| 5) 岩原 · 日本内科学会雑誌, Vol. 40, No. 3. | 10) Siedel, W. and Möller, H. : Hoppe Seyl. 259 (1939), 113. |
| 6) Lemberg, R. & Legge, J. W. : Hematin Compounds and Bile Pigments, Intersc, Publ. New York. | 11) 竹内 : 岡山医学会雑誌投稿中 |

 Studies on Propentdyopent

 Part I Studies on the decomposition process of bilirubin
to propentdyopent

By

Hiroya Kono

 From the First Department of Internal Medicine, Okayama University, Medical School
(Director : Prof. K. Kosaka)

The photometric observation was mainly done on the decomposition process of bilirubin to propentdyopent under various conditions. And the results were as follows.

1. The propentdyopent (soluble in ether) prepared from bilirubin by the method of v. Dobeneck displayed the absorption maximum at 283 m μ .
 2. On the action of Ascorbic acid and H₂O₂ to bilirubin. the formation of propentdyopent was increased with the dosis of H₂O₂ under both of aerobic and anaerobic condition, but the absorption maximum as the intermediate product of the reaction was not identified at that time.
 3. The progress of reaction was not observed on the action of only ascorbic acid to bilirubin.
 4. Standing bilirubin-soda-salt in the buffer of pH 8.04, it resolved into propentdyopent under only aerobic condition.
 5. The decomposition of bilirubin to propentdyopent is expected by the oxidation as it is.
-