

胆 汁 色 素 の 分 光 化 学 的 研 究

第 1 編

尿色素特にその胆汁色素の分光化学的検討

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂教授)
(指導: 九州大学山岡教授)

日 伝 二 雄

[昭和34年9月30日受稿]

結 言

尿色素特にその胆汁色素の分光化学的研究は Heilmeyer, L., Watson, C. J., Müller, P. & Engel, L., Pruckner, F. & Stern, A., 教室岩田・吉岡らの研究がある。然しながらこれら色素の可視部より紫外部に亘る詳細な吸収スペクトルの解析とこれに基く尿着色の本態に関する検討は十分尽されているとは言われない。

そこで著者はまず尿色素に特に関係の深い主として胆汁色素を分離してその吸収スペクトルを描き、尿着色に及ぼすこれら色素の影響を解析し、興味ある成績をえたので報告する。

実験材料並びに実験方法

1. 実験材料

1. 1. Urobilin

Bilirubin を含有せず, Urobilin を多量に含む患者尿を選び, 約 $\frac{1}{2}$ 容の水醋酸を加えたものに等量の Chloroform を加え強く振盪し Chloroform 層を分離する。次でこれに2%アンモニア水 $\frac{1}{2}$ 容を加え強く振盪し色素を完全にアンモニア水中に移行させた後, 数 cc の水醋酸を加えてアンモニアを中和し醋酸酸性とし, 再び強く振盪し Chloroform 層を分離する。次で多量の蒸溜水で十数回強く振盪洗滌し, 混在する Urochrom その他を充分除去して Urobilin 分割とする。

1. 2. Bilirubin

Urobilin を含有しない黄疸尿を選び約 $\frac{1}{2}$ 容の水醋酸及び等量の Chloroform を加え強く振盪し Chloroform 層を分離する。次でこれを多量の蒸溜水で十数回振盪洗滌したものを Bilirubin 分割とする。

1. 3. Uroerythrin

多量の煉瓦色沈渣を含む患者尿を選び, 該沈渣を微温湯に溶解し, 塩化アンモンで過飽和する。沈渣を飽和塩化アンモン溶液で数回洗滌した後, アルコールを加えて数時間約 40°C の孵卵器中に置く。その後, 倍量の蒸溜水を加え数滴の醋酸で酸性とし Chloroform を加え軽く振盪し, Chloroform 層を分離した後, 蒸溜水で数回軽く洗滌して, Uroerythrin 分割とする。

1. 4. Urochrom

Urobilin, Uroerythrin 及び Bilirubin を含まない正常尿に約 $\frac{1}{2}$ 容の水醋酸を加え, Chloroform を以て約10回充分洗滌する。

1) 硫酸法: 磨細した硫酸アンモンを過飽和になるまで加え, よく攪拌し, 暗所に数時間放置した後遠沈する。上清を Urochrom A とする。沈渣の上面に集まる褐色物質を集め硫酸アンモンの飽和溶液で充分洗滌したものを蒸溜水に溶かして Urochrom B とする。

2) Chromatograph 法: 活性アルミナを吸着剤とし尿の Chromatography を行つた。先ず蒸溜水で展開すると帯緑黄色層は速かに下降する。流下するこの色素層を受けて Urochrom A とする。Urochrom B は上端から数滴の所に固着して移動しない。この層を分離し, 水醋酸で溶出して Urochrom B とする。この Urochrom B 層を更に上層と下層に分離して (明瞭な2層を作らず) 別々に溶出する。

2. 吸収スペクトルの測定

島津製 QB-50型光電分光光度計を使用した。

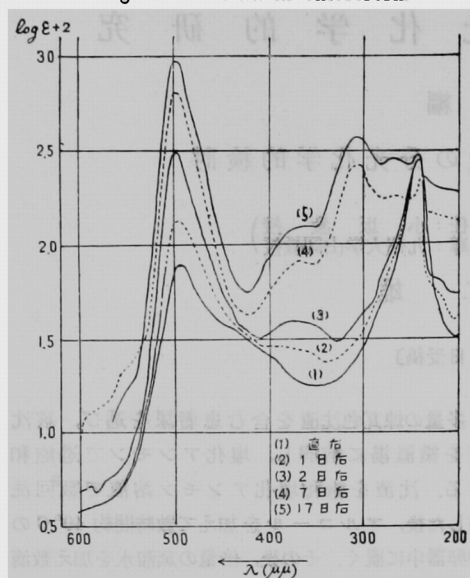
実験成績並びに考按

1. 各 Bilirubinoid の吸収スペクトル

1. 1. Urobilin

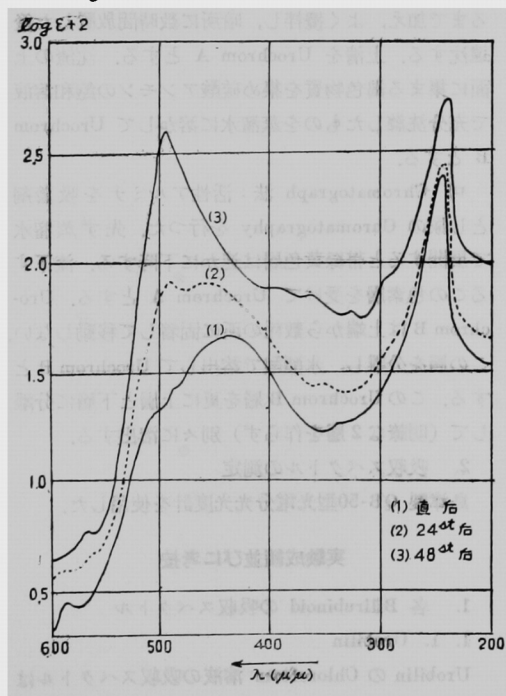
Urobilin の Chloroform 溶液の吸収スペクトルは

Fig. 1 Urobilin in Chloroform



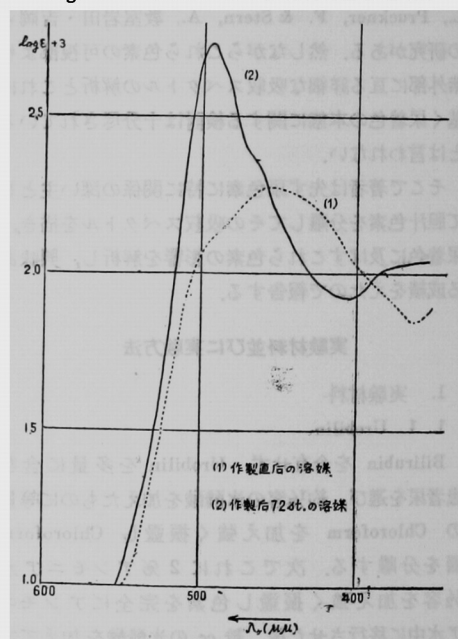
第1図の如く 494 $m\mu$ に吸収極大をもつ単一曲線を示すが、別に紫外部に 242 $m\mu$ の吸収極大を示す。これをそのまま室温に放置してその変化を観察すると 494 $m\mu$ の吸収極大は更に急峻となり、放置1日より 420 $m\mu$ より短波長への下降は平坦に近づき 350 $m\mu$ 附近まで緩やかな曲線を描く、2日後には、

Fig. 2 Urobilin in Chloroform-Alcohol



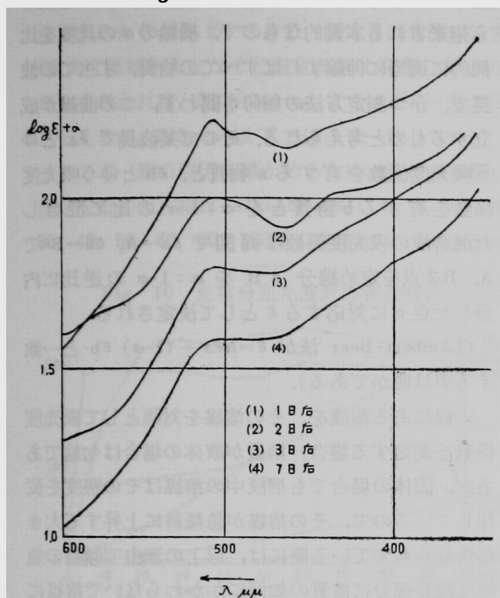
ほぼ370 $m\mu$ を極大とする緩やかな曲線に变じ、7日後には本曲線は更に明瞭となり、外に 310 $m\mu$ を頂点とする別の極大が現われ、17日後も同様である。又これらの変化に伴い 242 $m\mu$ の吸収極大は不著であつた。次に Urobilin-Chloroform 溶液に alcohol を Chloroform : Alcohol 1 : 1 の割合に混和した場合の吸収スペクトルは第2図の如く、494 $m\mu$ の極大は僅かに残り、最大の吸収極大は450 $m\mu$ 附近に移動した。これを室温に放置すると、24時間後では494 $m\mu$ と450 $m\mu$ の2つの極大を示すスペクトルとなり48時間後では454 $m\mu$ の極大は消失し、494 $m\mu$ の極大のみを示した。この際 240 $m\mu$ 附近の吸収極大も毎度みられた。次に溶媒だけを予め混合し一定時間を経過したものゝ Urobilin を溶解した場合も第3図の如く前と全く同一の結果が見られた。この際

Fig. 3 Urobilin in Chloroform-Alcohol



Chloroform と Alcohol との間に何らかの相互作用を推定したが溶媒二者のみの混液の吸収スペクトルは時間的に変化しない処から疑わしく、教室吉岡や恩師山岡教授の所説の如く Alcohol 添加後の Ester 化への進行を推定させる。而も放置後次第に Urobilin の Chloroform 中での吸収スペクトルに復するのは Alcohol 作用の減弱に伴うもので反応の可逆性を推定させる。次に1規定の苛性ソーダ溶液に Urobilin を移して時間的に吸収スペクトルを測定すると第4図の如く、反応1日後では吸収極大

Fig. 4 Urobilin+NaOH

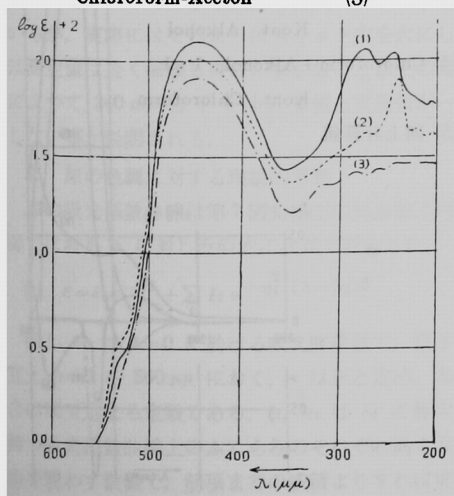


は 508 $m\mu$ 附近に移動すると共に短波長側へ上昇する。その後経過と共に 508 $m\mu$ 附近の極大は緩やかとなり短波長側への上昇は急峻となる。なお反応 2 日後において 430 $m\mu$ 附近を中心に緩やかな膨隆をみとめたが一過性であつた。

1. 2. Bilirubin

間接 Bilirubin の Chloroform 溶液及びそれに等量の Alcohol, Aceton を混合した場合の吸収スペクトルは第 5 図の如くでいずれも 450 $m\mu$ に吸収極

Fig. 5. Bilirubin
in Chloroform (1)
Chloroform-Alcohol (2)
Chloroform-Aceton (3)

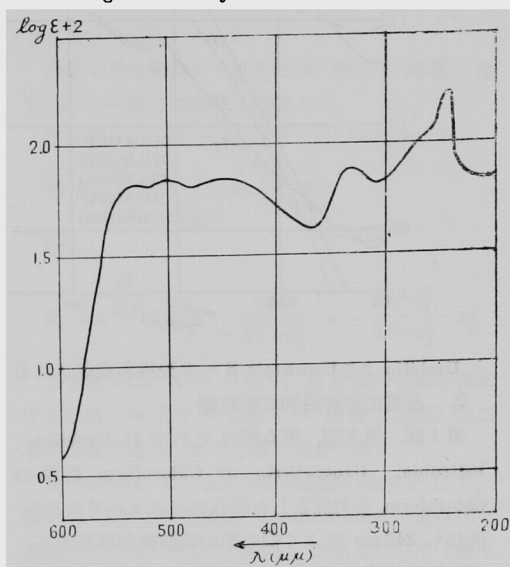


大をもち、短波長側での 276, 242 $m\mu$ 附近の吸収極大に変化をみとめるのみである。教室岩田、吉岡らは間接 Bilirubin-Chloroform 溶液に Alcohol を添加した場合吸収極大の変化を記載したが、添加 Alcohol の量的関係も影響するものと思われる。

1. 3. Uroerythrin

A 型 Uroerythrin の Chloroform 溶液の吸収スペクトルは第 6 図の如く 440~540 $m\mu$ までは平坦でその中央部では 500 $m\mu$ を中心とする緩やかな膨隆を示し、外に 336, 242 $m\mu$ の吸収極大を示す。

Fig. 6 Uroerythrin in Chloroform



1. 4. Urochrom

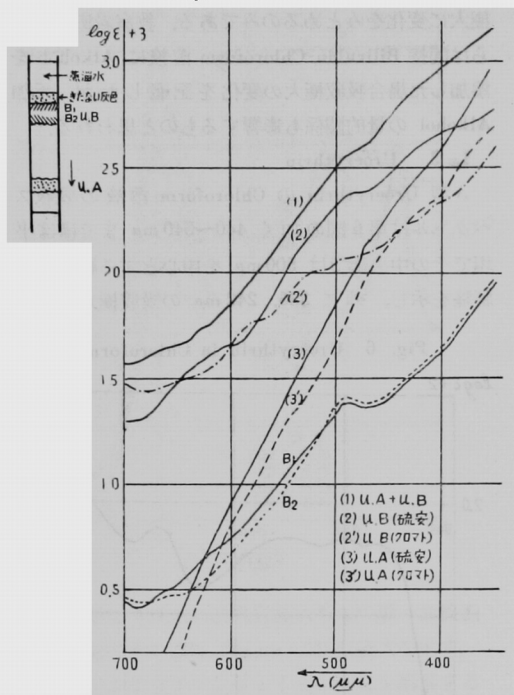
Urochrom A 及び B の水溶液の吸収スペクトルは第 7 図の如くである。

Urochrom は元来明瞭に定義されていない色素であり、測定の結果も尿によつて種々であるため、図にはその 1 例を示したにすぎない。但し Urochrom A は短波長へ急峻な上昇を示し、一定の吸収極大を示さぬが、Urochrom B は 490 $m\mu$ 附近に小さい吸収極大をもつ。

Urochrom A と B との分離は硫酸法及びクロマトグラム法によつた。Urochrom A は両方法で互によく一致するが、B はかなり著しい差を示す。

更にクロマト柱上の Urochrom B 層を上層と下層に分離し別々に溶出すると図の B₁ B₂ の如く微少な差を示す。この Urochrom B との吸収スペクトルを Urobilin 苛性ソーダ液の放置時のそれと比較すると、短波長側の吸収スペクトルは近似

Fig. 7 Urochrom



し Urobilin より Urochrom B への分解が推定される。

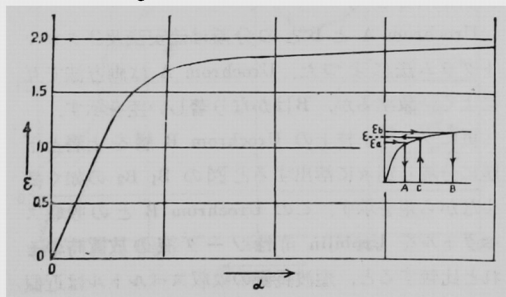
2. 溶質に非特異的な吸収線

第1図, 第5図, 第6図はそれぞれ Urobilin, Bilirubin, Uroerythrin の Chloroform 溶液の Chloroform を対照とした吸収スペクトルであるが, 何れも $242\text{m}\mu$ によく似た形の吸収線が存在する。Alkohol 溶液の場合には, $220\text{m}\mu$ に Chloroform の場合とは全く形の異つた吸収線が現われる。即ち溶質に無関係に, 溶媒によつて特徴づけられた吸収線が存在する。

以下この吸収線の出現する理由を考察する。

第8図は結晶 Bilirubin の濃度 α と吸光度係数 ϵ との関係を $450\text{m}\mu$ で測定したものであるが, ϵ がほぼ1.2を越えると Lambert-Beer の法則が成

Fig. 8 濃度と吸光度との関係



立しない事を示す。この関係は吸光度係数の定義から招来される本質的なもので, 横軸の α の尺度を比例的に適当に伸縮すればすべての物質, すべての波長で, かつ測定方法の如何を問わず, この曲線が成立するものと考えられる。そこで某波長で ϵ_a とゆう吸光度係数を有する a 物質と, ϵ_b とゆう吸光度係数を有する b 物質とを $\alpha : 1-\alpha$ の比に混合した混合液の吸光度係数は同図で $\epsilon_a \rightarrow A$, $\epsilon_b \rightarrow B$ で A, B 2 点を定め線分 $\overline{AB}$ を $\alpha : 1-\alpha$ の逆比に内分した点 c に対応する ϵ として決定される。

(Lambert-Beer 法が $\epsilon = \alpha \epsilon_a + (1-\alpha) \epsilon_b$ と一致する事は明かである)。

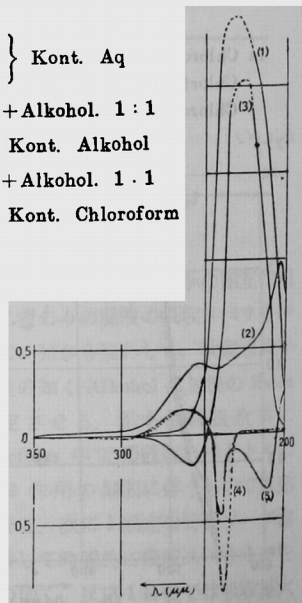
一般にある溶液を, その溶媒を対照として吸光度係数を測定する場合, 溶質が液体の場合は勿論であるが, 固体の場合でも溶液中の溶媒はその密度を変化しているので, その溶媒が急傾斜に上昇する大きな吸収をもっている際には, 以上の理由で傾斜の急峻な波長部分に溶質の如何にかかわらないで溶媒に特異的な形の吸収線が現われるのである。

第9図 (1) 及び (2) はそれぞれ Chloroform 及び Alkohol の蒸留水を対照とした吸収スペクトルである。(3) (4) は等容の Chloroform-Alkohol 混液の, それぞれ Alkohol 及び Chloroform を対照として測定した吸収スペクトルである。(3)(4)は明かに x 軸に関して対称ではない。

以上の仮説を証明するために, 第8図及び第9図

Fig. 9

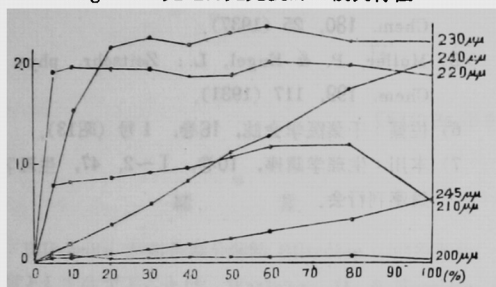
- (1) Chloroform } Kont. Aq
- (2) Alkohol }
- (3) Chloroform + Alkohol. 1 : 1
Kont. Alkohol
- (4) Chloroform + Alkohol. 1 : 1
Kont. Chloroform
- (5) 同上計算値



の(1)(2)を基礎として、(4)に相当する曲線を作図法で求めたものが(5)である。測定及び作図の誤差(吸光度係数が大となると測定誤差は非常に大となる)を考えれば、350~240 mμ まではよく一致すると云えるが、240 mμ 以下では全く一致しない。

この不一致の原因を確かめるために更に第10図の測定を行つた。図は Alkohol に対して、5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 80, 100%の容積比に Chloroform

Fig. 10 光電分光光度計の波長特性



を混じて、Alkohol を対照として吸光度係数を測定し、波長を Parameter としてグラフを作つたものである。 $\epsilon=1.8$ 以上は測定誤差の大きなために測定値に信をおき難い事を考慮に入れて、200 mμ, 210 mμ は $\epsilon=1.0$ 以下で Lambert-Beer の法則が成立せず全く測定値が信頼し得ない。220 mμ, 230 mμ となるに従つて次第に第8図に形が似て来る。装置の光源の特性上、波長が短くなるに従つてスリット巾を大とするために、測定しようとする波長以外の光線、即ち散乱光が比較的に強くなり、このような結果を生じたものと考えられる。島津製光電分光光度計は構造上スリット幅は 20 mm まで拡大し得、かつその事を装置の特長の一つに挙げているが、実際にはそのようにスリット巾を大にしては測定値は全く信頼し得ない事が分る。以上の理由によつて 240 mμ 以下では計算値と実測値が一致しない事が説明される。

3. 尿の色調に対する理論的考察

尿の吸光係数曲線は第7図曲線(1)に見る如く可視部では波長 λ に対し近似的に次式で表わした。

$$(1) \epsilon = \epsilon_0 e^{-\kappa \lambda + \sum_i \xi_i e^{-\eta_i^2 (\lambda - \lambda_i)^2}}$$

但し ϵ_0 は $\lambda=0$ に於ける吸光度係数で、以下便宜上 $\lambda=0$ を 560 mμ におく。 κ は正と定め、各場合の尿で定まる定数である。 ξ_i, η_i は λ_i に極大を持つ吸光係数曲線上のふくらみのそれぞれ高さ及び巾を現わす数値で、前項までの成績よりすれば実際

上 Uroerythrin, Urobilin, Bilirubin の三者が存在する。正常尿では $\xi_i=0$ であるから(1)は第一項のみとなる。

一方人間の肉眼の視感度曲線、換言すれば等エネルギースペクトルの明度分布曲線は、諸家の報告があるが、Kohlrausch が交照光度計 (Flimmer photometer) 法によつて得たものは次式でよく近似させることができる。

$$(2) y = \frac{h}{\sqrt{\pi}} e^{-h^2 \lambda^2}, \quad h = 1.4 \times 10^{-2}$$

但し(2)の係数は規格化するため、即ち $\int_{-\infty}^{+\infty} y d\lambda = 1$ となるように附したものである。

肉眼で尿を観察する場合には、従つて両者の積 $Y = \epsilon y \dots (3)$ が考察の対象となる。

尿の濃さは、次式で定義するのが理論的である。

$$(4) F = \int Y d\lambda = \int \epsilon y d\lambda = \int_{-\infty}^{+\infty} \epsilon y d\lambda$$

(可視部) (可視部)

即ち、

$$F = \epsilon_0 e^{-\frac{\kappa^2}{4h^2}} + h \sum_i \frac{\xi_i}{\sqrt{h^2 + \eta_i^2}} e^{-\frac{h^2 \eta_i^2}{h^2 + \eta_i^2}} \lambda_i^2$$

正常尿では、 $\xi_i=0$ になり、正常尿の色調を表現するには、 ϵ_0 及び κ ($\log \epsilon - \lambda$ 曲線の勾配)の二者が必要であり、かつ二者で充分である。

Heilmeyer, L. は正常尿の濃度の物差として、535 mμ の吸光度係数を Harnfarbwert と名付けて使用している。そして 535 mμ を選んだのは「種々の根拠から」とだけ記載して明瞭にしていない。然し(3)の極大を求めるため $\frac{dY}{d\lambda} = 0$ とおくと、

$$(5) \lambda_{\max} = -\frac{\kappa}{2h^2}$$

多くの尿に於ては(5)は -20 mμ 程度の数値となり、前述の 560 mμ に原点をおいた事から、540 mμ 附近に極大がある事になるので、Heilmeyer の Harnfarbwert ϵ_{535} もある程度の意味を持つものと考えられる。

主色素 Urochrom 以外の各色素、即ち Uroerythrin, Urobilin 及び Bilirubin の尿色調に対する寄与は、(4)の第二項から数値計算すると、等しい ξ_i に対しては 9:5:1 の比となる。即ち尿の色調に対しては、Uroerythrin が最も大きな影響をもち、次いで Urobilin, Bilirubin は非常に小さな影響しか与えない結果となる。

結 論

1. 尿より Urobilin, Bilirubin, Uroerythrin 及び Urochrom A, B の各色素を分離し、各々の吸収スペクトルを決定した。

2. ある種の溶媒を使用した場合の吸収スペクトル中には溶質に非特異的に、かつ溶媒に特異的に現われる吸収の存在すること、並びにその出現する理

由を明からかにした。

3. 尿の色調は主色素 Urochrom の外, Uroerythrin が最も影響をもち、次いで Urobilin, Bilirubin は非常に小さい影響しか持たない。

主 要 文 献

- | | |
|---|--|
| 1) Heilmeyer, L.: Medizinische Spektrophotometrie, Jena. Gustav Fischer (1933).
2) Heilmeyer, L. & Krebs, W.: Zeitschr. phys. Chem. 228 , 33 (1934).
3) Watson, C. J.: Zeitschr. phys. Chem. 233 , 39 (1935).
4) Pruckner, F. & Stern, A.: Zeitschr. phys. | Chem. 180 , 25 (1937).
5) Müller, P. & Engel, L.: Zeitschr. phys. Chem. 199 , 117 (1931).
6) 佐藤: 千葉医学会誌, 16巻, 1号 (昭13).
7) 本川: 生理学講座, 10巻, I~2, 47, 生理学講座刊行会. |
|---|--|

Spectrochemical Studies on Bile Pigment.

Part 1. Spectrochemical Studies on the Pigments in Urine,
Especially on the Bile Pigment.

By

Tuguo HIZUTA

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

Conclusions.

1. The absorption spectra of urobilin, bilirubin, uroerythrin, urochrom A and urochrom B were determined after separating them from urine.
2. In the absorption spectra using some solvents, there were other absorption spectra which were specific to the solvents and unspecific to the solutes. The mechanism of these absorption spectra was clarified.
3. Besides urochrom, uroerythrin had the most contributing factor to the color of urine, on the other hand urobilin and bilirubin were displaying very little rolls.