

Verdohemochrome の生成とその性状に関する研究

第 1 編

Pyridine hemin-Hydrazine-O₂ 反応系による Verdohemochrome の生成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: 小坂淳夫教授)

形 見 重 男

[昭和34年9月23日受稿]

緒 言

Verdohemochrome の生成に関する研究は、1930年 O. Warburg と E. Negelein により pyridine hemin に塩酸 hydrazine 及び酸素を作用させて、Grünes Haemin の生成が証明された実験に出発したが、次で1933年に P. Karrer, H. V. Euler, & H. Hellström は還元性物質として ascorbin 酸を用い、甚だ速やかに緑色物質を生ずる事を認め、この実験は R. Lemberg の注目するところとなり、1935年この緑色物質が胆汁色素の前段階物質であることが明らかにされ、この物質は verdohemochrome と命名された。その後 pyridine hemin に酸素と ascorbin 酸を作用させての verdohemochrome 生成実験は各方面より検討され、その分光化学的研究も上代、菊地、教室尼子、山吹らによる詳細な研究がなされているが、hydrazine を用いての verdohemochrome 生成実験については、前述の O. Warburg 及び E. Negelein の原法と、R. Lemberg の変法の提唱がなされたのみで、その反応に関与する種々の条件及び夫々の条件に対応しての反応過程を ascorbin 酸反応系と比較しての検討は殆んど放任されたままである。そこで著者は教室一連の胆汁色素生成過程に関する研究の一環として本検討をとり挙げ verdohemochrome 生成条件を明らかにしようと試みた。

実 験 方 法

1. Hemin の調製法

R. Willstätter の方法に準拠し、牛血液より調製し、再結晶させたものを使用した。

2. 吸光度の測定法

島津製分光光度計 Q B-50型を使用し、液槽 10mm で室温10°C~20°C, 湿度60%前後に於て測定した。

3. 吸光曲線の測定法

米国製 Beckman DK 型自記分光光度計を使用し、液槽10mmで室温10°C~20°C, 湿度60%前後に於て測定した。

4. pH の測定法

島津製硝子電極水素イオン濃度測定器を使用し、反応液混和直後に測定した。

5. 反応各成分率を変化させた際の verdohemochrome の 656m μ における吸光度の推移に関する実験。

Hemin 結晶, pyridine, 硫酸 hydrazine, $\frac{1}{10}$ 規定苛性曹達, 蒸留水を fig. 1. に示す如き配分率に調合したものを反応溶液とし、分量を等しく 20 ml として容量 100ml の同型三角 flask に容れ、pH を測定し、直ちに50°C の恒温槽に並列して、振盪装置により毎分100回振盪し、経時的に反応溶液を 1.0ml 宛別の試験管に取り、20% pyridine 水で 2.5mg/dl hemin 濃度に稀釈し、各々の色調及び濁濁の有無を検べてから、各々 hemin 等量稀釈液の 656m μ 吸光度を測定して、その消長を検討した。fig. 2, 3, 4, 5 にその成績を示した。

6. 反応条件を変化させた場合の吸光曲線の時間的推移に関する実験

PH を変化させた場合と至適 pH 8.0~8.5 の間の一定値に pH を保つた儘、pyridine 濃度, hemin 濃度, 硫酸 hydrazine 濃度を変化させ、それに応じて経時的吸光曲線の推移を Beckman DK 型自記分光光度計により描写した。この際反応を緩慢にする

為、振盪回数を毎分40回としたが、その他反応溶液の操作及び吸光曲線の測定条件は実験5と同様とした。

fig. 6, 以下 fig. 15, までにその成績を示した。

7. 窒素瓦斯通気の下に pyridine hemin に過酸化水素と硫酸 hydrazine とを作用させた場合の反応液吸光曲線の時間的推移に関する実験。

Hemin 結晶 7.5mg を pyridine 60 ml に溶解し、その 10ml 宛を5本の口径30mm, 深さ 17cm, の大試験管に分注し、各々の蒸溜水 37ml を加えて 47ml とし、之に精製した窒素瓦斯を15分間通気したものを pyridine hemin 溶液として使用、次に硫酸 hydrazine 200mg を $\frac{1}{10}$ 規定苛性曹達 16.5ml で中和し、蒸溜水を加えて全量を 20 ml とし精製窒素瓦斯を15分間通気したものを hydrazine 液として使用、この 2.0 ml と、同様に精製窒素瓦斯を15分間通気して無酸素とした 0.1% 過酸化水素溶液 1.0ml の水溶液を窒素瓦斯通気の儘混合し、流動 paraffin を重畳した後、50°C 恒温槽に並列した。そして経時的に各々大型試験管より反応液を測定槽に取つたが、この際測定槽に窒素瓦斯を通気して酸素の混入を防止し、更に流動 paraffin を重畳した上で吸光曲線を描写した。

実験成績並に考按

1. 1. $\frac{1}{10}$ 規定苛性曹達量を変じた場合の verdohemochrome 656m μ 吸光度の消長。

Fig. 1. の如く、hemin, pyridine, 硫酸 hydrazine の量を等しくし、 $\frac{1}{10}$ 規定苛性曹達量のみを 1.0 ml より 4.0ml まで変じて、実験方法 5. にて verdohemochrome を生成させると fig. 2. の如くなつた。即ち苛性曹達量の少い場合は、反応は緩慢で初期には帯紅褐色の濁濁があり、苛性曹達量が多くなると濁濁を有する時間は短縮し、過剰となつた 4.0ml では、初期より黄褐色透明で20分で黄緑色調とはなるが、緑色にはならなかつた。これより $\frac{1}{10}$ 規定苛性曹達 2.0ml の場合が最高濃度及び高濃度維持時間よりみて、最も verdohemochrome 生成率がよかつた。

1. 2. 硫酸 hydrazine 量を変じた場合の verdohemochrome 656m μ 吸光度の消長

1. 1. の成績より $\frac{1}{10}$ 規定苛性曹達 2.0 ml の場合が生成率がよかつたので、 $\frac{1}{10}$ 規定苛性曹達量を 2.0ml に一定し、且つ hemin, pyridine 濃度も fig. 1, 2. の如く一定に保ち、硫酸 hydrazine 量のみを変じると fig. 3. の如くなつた。即ち 5 mg では反応液に濁濁は出現せず、時間を経過するも反応液は茶褐色透明で verdohemochrome 生成は甚だ不良であ

Fig. 1 The Influence of each Component Ratio to the Absorption Coefficiency on the Formation of Verdohemochrome

Experimental Method

Shaking of the mixed Solution described below for 100 Times per 1 Minute at 50°C

| | | |
|-----------------------------|----------------------------------------------------------------------------|--------|
| 1 N/10 MaOH X ml + | hemin 4 mg pyridine 4 ml hyd. sulf. 15mg H ₂ O Y ml | = 20ml |
| 2 hydrazine sulf. X ml + | hemin 4 mg pyridine 4 ml N/10 NaOH 2ml H ₂ O 14ml | = 20ml |
| 3 pyridine X ml + | hemin 4 mg hyd. sulf. 15mg N/10 NaOH 2ml H ₂ O Y ml | = 20ml |
| 4 hemin X mg + | pyridine 4 ml hyd. sulf. 15mg N/10 NaOH 2ml H ₂ O 14ml | = 20ml |

Fig. 2 The Changes of Absorption Maximum at 656m μ of Verdohemochrome on the various Concentrations of NaOH

| N/10 NaOH | Time | | pH | | | | | |
|-----------|------|-----------|------|------|------|------|--|--|
| | 10' | 23' | 30' | 45' | 60' | 90' | | |
| 1.0 ml | 7.9 | Turbidity | // | .492 | .506 | .492 | | |
| 1.5 ml | 8.1 | // | // | .506 | .479 | .452 | | |
| 2.0 ml | 8.5 | // | .614 | .581 | .479 | .438 | | |
| 2.5 ml | 9.0 | .614 | .414 | .349 | .215 | .188 | | |
| 3.0 ml | 10.9 | .452 | .521 | .378 | .242 | .233 | | |
| 4.0 ml | 11.3 | .129 | .138 | .138 | .138 | | | |

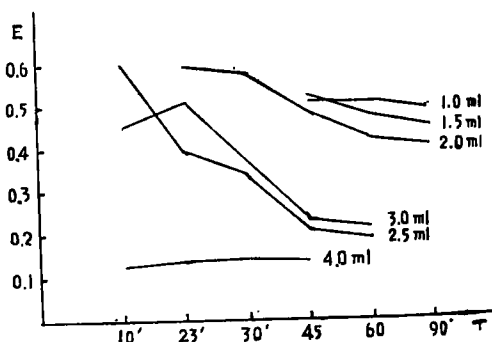
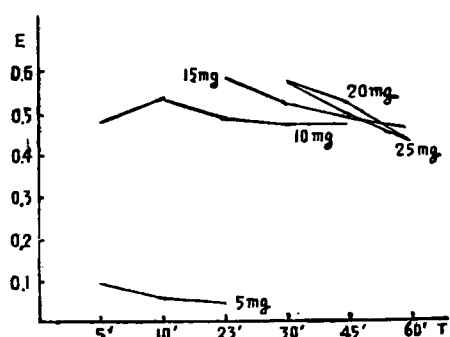


Fig. 3 The Changes of Absorption Maximum at 656m μ of Verdohemochrome on the various Concentrations of Hydrazine Sulfate

| hyd. sulf. | Time | | | | | | | |
|------------|------|-----------|------|------|------|------|------|--|
| | pH | 5' | 10' | 23' | 30' | 43' | 60' | |
| 5 mg | 11.1 | .092 | .064 | .044 | | | | |
| 10 mg | 10.1 | .488 | .536 | .496 | .474 | .474 | | |
| 15 mg | 8.5 | Turbidity | // | .584 | .536 | .488 | .458 | |
| 20 mg | 8.2 | // | // | // | .584 | .536 | .444 | |
| 25 mg | 8.1 | // | // | // | .584 | .504 | .444 | |



つた。硫酸 hydrazine 量を増加させると pH は酸性方向に移動し、初期に帯紅褐色の濁濁あるも、時間の経過と共にこの濁濁は消失すると共に、緑色調を増加するに至った。硫酸 hydrazine 量の増加に伴い反応は促進されるものと期待したが、反応液の濁濁は 25 mg が 15mg の折より長時間続き、矛盾したかの如き成績となつたが、これは硫酸 hydrazine 量増加に伴つて pH が耐性方向に移動した為、反応が緩慢となつた結果であると思われた。又高濃度維持時間も 15mg が最も成績がよかつた。pH が酸性方向に移動して反応がやや緩慢となり最高濃度到達時間の遅延した 20mg, 25mg は反応観察の最終60分で、15mg の場合より吸光度は低下していた。この事より過剰の硫酸 hydrazine によつて、verdohemochrome の分解反応も促進されるものと思われる。

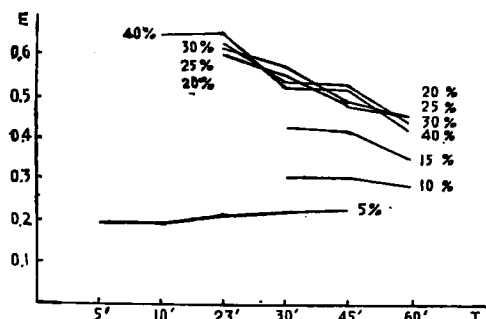
1. 3. pyridine 濃度を変じた場合の verdohemochrome 656m μ 吸光度の消長

O. Warburg & E. Negelein の原法では pyridine 濃度は 26% になっているが、その後 R. Lemberg は 20% が verdohemochrome 生成に最も適当であると補正した。教室倉恒は pyridine-hemin-ascorbin 酸一分子酸素反応系に於て pyridine 至適濃度は、hemin に対する対比濃度でなくて絶対濃度が問題になると述べた。hydrazine 反応系に於て検討するた

め pyridine 絶対濃度を変じて、その verdohemochrome 生成に及ぼす影響を見ると、1. 1. 及び 1. 2. によつて得た 3/10 規定苛性曹達量、硫酸 hydrazine 量を採用し、hemin 4 mg を溶液 20ml に含まれる如くし、pyridine 絶対濃度のみを変じた場合は、fig. 4. の如き成績を得た。即ち 5% pyridine

Fig. 4 The Changes of Absorption Maximum at 656m μ of Verdohemochrome on the various Concentrations of Pyridine

| pyridine | Time | | | | | | | |
|----------|------|-----------|------|------|------|------|------|--|
| | pH | 5' | 10' | 23' | 30' | 45' | 60' | |
| 5 % | 8.4 | .197 | .197 | .206 | .215 | .224 | | |
| 10 % | 8.45 | Turbidity | // | // | .333 | .302 | .281 | |
| 15 % | 8.5 | // | // | // | .420 | .409 | .347 | |
| 20 % | 8.5 | // | // | .614 | .551 | .479 | .438 | |
| 25 % | 8.55 | // | // | .620 | .557 | .482 | .438 | |
| 30 % | 8.55 | // | // | .630 | .536 | .521 | .432 | |
| 40 % | 8.6 | // | // | .648 | .528 | .513 | .420 | |



濃度では反応初期より帯紅褐色透明で、時間を経過しても緑色調を帯びない。10%では黄緑色を呈するに至るが帯紅褐色の濁濁を長時間持続し、1刀尖の sodium dithionite を添加すれば直ちに赤色調となる。然し教室山吹の ascorbin 酸反応系における実験では 10% pyridine 濃度でも反応は容易に verdohemochrome へ進展している事より、hydrazine と ascorbin 酸とでは pyridine の反応への影響も異なるものと思われる。15% pyridine 濃度では 30分で黄緑色調を呈するに至り、最早や sodium dithionite を添加しても赤色変化を呈せず、次に 20% pyridine 濃度では反応液は 23分目には完全に緑色調を帯びるに至り、高濃度維持時間も長い。20% pyridine 濃度と 25% pyridine 濃度との有意の差は本実験では求められなかつた。30%, 40% pyridine 濃度に於ては verdohemochrome 生成の最高濃度到達時間は早い、緑色調の減退即ち 656m μ 吸光度の減少率も 20%, 25%

pyridine 濃度の場合に比し速やかであつた。この事は教室倉恒が ascorbin 酸反応系に於て認めたと同様のことで過剰の pyridine の作用により verdohemochrome が変性を受けるためと思われる。又 20% pyridine と 25% pyridine の両者は共に、最高濃度及び高濃度維持時間より優劣を定め難かつたが、反応液より verdohemochrome を抽出する場合には、pyridine 濃度の低い程 pyridine 除去が簡単であるから以下の実験では pyridine 濃度は 20% とすべきで、従つて R. Lemberg が O. Warburg & E. Negelein の方法を改良し、26% pyridine 濃度を 20% とした事は合理的である事が確められた。

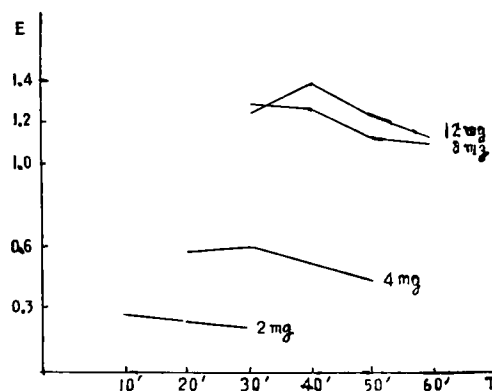
1. 4. Hemin 濃度を变化した場合の verdohemochrome 656m μ の消長

Hemin 4 mg を中心に 2 mg, 8 mg, 12 mg と変えて検討すると、高濃度では帯紅褐色濁の持続時間が長く、低濃度では緑色調は早く出現した。hemin 2 mg と 8 mg は夫々最高濃度到達時間に遅速はあるが、最高濃度は 4 mg の場合の約 $\frac{1}{2}$ 、及び約 2 倍となり比例値を示したが、12 mg の場合は時間を経過しても比例値にまで到達しなかつた。本実験では pH 値の変動は僅少であるから、pH は先ず等しいと考えてよい。又 pyridine 濃度は絶対濃度より 20% に一定してあるので、hemin 12 mg の場合では硫酸 hydrazine 量の不足により反応進行が停止したものと考えられる。処で ascorbin 酸反応系においては、R. Lemberg は pyridine 液中における hematin と ascorbin 酸との酸化関係に就て、ascorbin 酸を一定とし、hematin 量を変化した場合に両者の受ける酸化は大概 hematin 量に比例すると述べ、教室永井は ascorbin 酸量を一定とし血色素量を変化させた場合の biliverdin 収量を求めた実験で、biliverdin 最高収量値は血色素量に比例すると述べている。本実験における硫酸 hydrazine 量を一定とし、hemin 量を変化させた場合に於ても、hemin 濃度の変化範囲が少ない際には、verdohemochrome 生成量は大体 hemin 量に比例する事が判明したが ascorbin 酸の場合に比較すると、その範囲は狭い様である。fig. 5. にその成績を示した。

2. 以上の実験成績より verdohemochrome 生成における $\frac{1}{10}$ 規定苛性曹達量、pyridine 濃度、硫酸 hydrazine 濃度、hemin 濃度等の各変化により夫々 verdohemochrome 生成率に相異が存する事が推察されたが、反応溶液の pH 値に対しては $\frac{1}{10}$ 規定苛性曹達量が最も関係あり、次いで硫酸 hydrazine 及び

Fig. 5 The Changes of Absorption Maximum at 656m μ of Verdohemochrome on the various Concentrations of Hemin

| hemin | Time | | | | | | |
|-------|------|----------------|------|-------|-------|-------|-------|
| | pH | 10' | 20' | 30' | 40' | 50' | 60' |
| 2 mg | 8.5 | .285 | .241 | .235 | | | |
| 4 mg | 8.4 | Turb- idity | .573 | .590 | .512 | .456 | |
| 8 mg | 8.3 | " | " | 1.282 | 1.282 | 1.132 | 1.115 |
| 12 mg | 8.2 | " | " | 1.244 | 1.388 | 1.244 | 1.122 |



hemin は溶液を酸性に、且つ pyridine はアルカリ性に変える事も明らかである。そこで反応条件の至適 pH 値を求め、pH 一定値の条件の上で、各反応構成物質の濃度を变化させたのでなければ、夫々の物質が反応に関与する真の役割は検討出来ない。よつて至適 pH 範囲を決定し、反応溶液を同一 pH に保つた上で、pyridine 濃度、硫酸 hydrazine 濃度、hemin 濃度の変化に応じた場合の verdohemochrome 生成過程を自記分光光度計により経時的に吸光曲線の推移として描写することとした。教室尼子、山吹らは ascorbin 酸反応系における実験において同様の試みを行っているので、これらの成績との対比を試みた。尙本実験に於ては pH の調節は $\frac{1}{10}$ 規定苛性曹達、 $\frac{1}{10}$ 規定塩酸、 $\frac{1}{10}$ 規定塩酸を用い、反応過程の経時的追求に便利ならしめる為、振盪回数を毎分 40 振盪にして反応を緩慢ならしめた。

2. 1. pH を变化させた場合の verdohemochrome 生成における時間的吸光曲線の推移について

実験成績 1. 1. に準じて pH の異なる反応溶液について反応過程を分光化学的に検討すると fig. 6, 7, 8. の如くなる。即ち pH 11. においては、反応開始 10 分までは pH 8.5 以下に比較し、650m μ は高値を示したが、20 分では pH 8.5 の場合が優勢となつた。60 分目に至り 656m μ , 530m μ , 498m μ に吸収の極大を有する verdohemochrome 吸収像を完成したが、

Fig. 6 The Changes of Absorption Maximum at 656 m μ of Verdohemochrome on the various pH

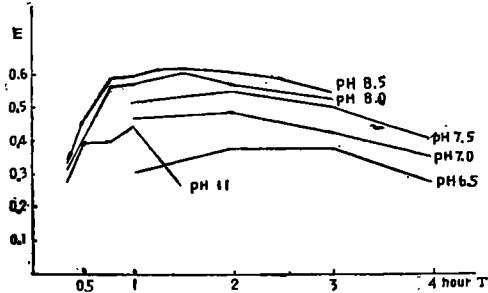


Fig. 7 The Changes of Absorption Curves by Changing of pH-Value on the Formation process of Verdohemochrome

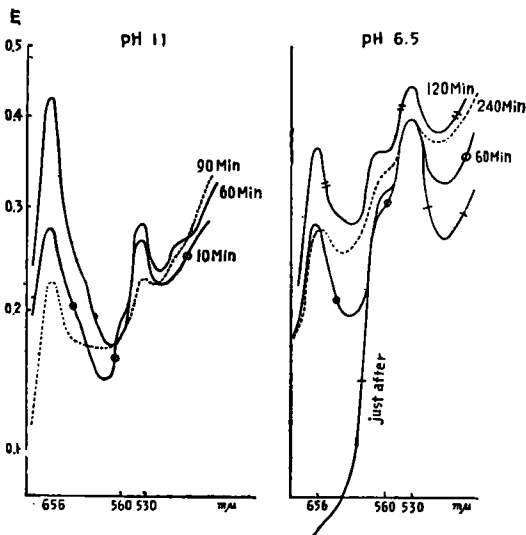
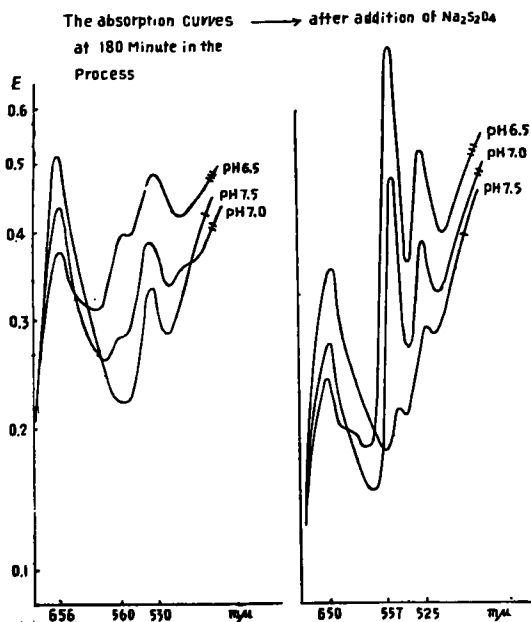


Fig. 8 The Changes of Absorption Curves by Changing of pH-Value on the Formation process of Verdohemochrome



90分には 656m μ は急激に低下した. pH 8.5 と pH 8.0 との比較では60分までは pH 8.5 の方が 656m μ 生成率が高いが, 90分で同値となり, 120分でpH 8.0 の方が優勢となった. 然しながら150分では pH8.0 の場合も吸光係数値を減じた. pH 7.5 の場合も60分で verdohemochrome の吸光曲線も大概完成したかに見えたが, 560m μ に尚 pyridine hemichrome の波棘を残し, その儘120分に至りて 656m μ 吸光係数は最高値を示し, 180分より低下し始めた. 然るに赤色部の減衰を認め初めたこの時に於ても, fig. 8 に示すが如く hemichrome 吸収による 560m μ に僅かに膨隆を残し, sodium dithionite を添加すれば 557 m μ , 525m μ に極大を有する pyridinehemochrome 吸収が出現した. 即ち pH 7.5 においては反応進行が緩慢なる為, verdohemochrome 分解反応と生成反応とが競合して行なわれている事が認められた. pH 7.0 及び 6.5 においては更に反応の進行は緩慢であり 656m μ 生成率も低く, 240分においても fig. 8 と殆んど同程度の pyridinehemichrome 吸収極大を残して居り, 従つて pyridine hemin-hydrazone-O₂ 反応系においては, pH 酸性側では反応の進行は緩慢に過ぎ. 且つ反応温度が 50°C という高温の為, 生成された verdohemochrome も高濃度を保つに至らず分解するものと思われる. 又 pH 高値の場合は, 最高濃度到達時間は速やかであるが, verdohemochrome の分解も又速やかであつた. 一方 pH 8.0 乃至8.5においては最高濃度及び高濃度維持時間も良い成績を示すための至適の pH 値であるといえる. pyridinehemin に分子酸素と各種還元剤を作用させて verdohemochrome を生成させる実験の内, ascorbin酸を用いての実験では, 37°C, pH7.2 とし, 振盪を加えず三角 flask 中に放置して容易に verdohemochrome の生成を見ているが, 本実験では50°C, 三角 flask 中で振盪し, 且つ pH 8.0 乃至 8.5としても尚且つ ascorbin 酸を用いる場合より, 長時間を要する. 又吸光曲線の推移において, 反応初期よりpyridinehemochrome 吸収を生せず, 560m μ と 530m μ に吸収極大を有する pyridinehemichrome の吸光曲線を示し, 之に sodium dithionite を添加すると鮮やかな pyridinehemochrome 吸光像を出現した.

2. 2. pyridine 絶対濃度を変化させた場合の verdohemochrome 生成における時間的吸光曲線の推移について

pyridine 濃度の影響については, 教室倉恒が

ascorbin 酸反応系において, biliverdin 収量から verdohemochrome 生成への pyridine 濃度の影響を検べた実験により, hemin との対比濃度よりも溶液中の絶対濃度が問題である事が知られているので, 絶対濃度を 5%より40%に変化させて夫々濃度に応ずる verdohemochrome 生成過程を吸光曲線の時間的推移から検討する事とした. 尚その際の pH は 8.5 と一定にした. その成績は fig. 9, 10 の如くである. 即ち 5%では反応開始後15分で 650 μ に僅かに吸収極大を見るが主として 565 μ , 530 μ に吸収極大を有する pyridinehemochrome 像を示し, 45分で 650 μ は僅かにその吸係係数値を増加し, 75分までは 650 μ 吸収極大を有するが, それ以後 90分よりは最早や同部の吸収は認められず, 短波長側へ緩やかな膨

Fig. 9 The Changes of Absorption Maximum at 656 μ of Verdohemochrome on the various Concentration of Pyridine

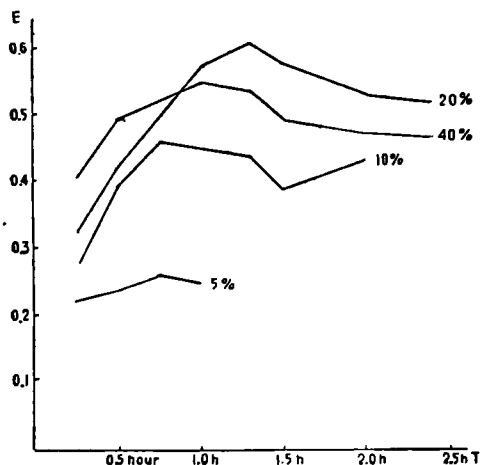
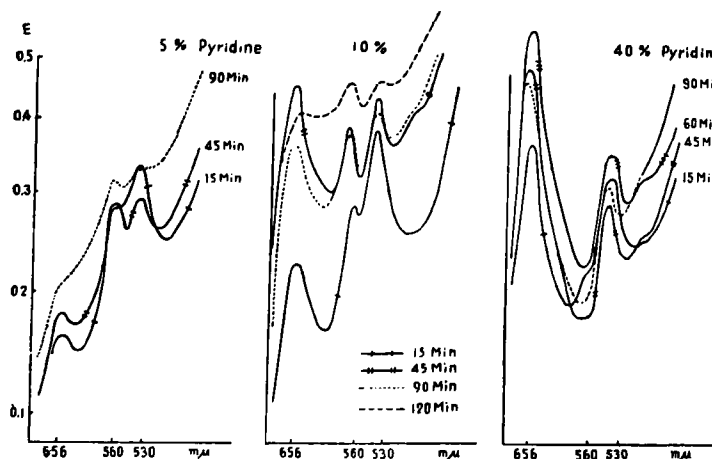


Fig. 10 The Changes of Absorption Curves by Changing of Pyridine Concentration on the Formation process of Verdohemochrome



隆となり移行した. 150分の反応液に sodium dithionite を添加すると pyridinehemochrome の吸収を認めた. 即ち 5%では pyridinehemochrome より verdohemochrome への進行は極めて不良で, 副反応が専ら行なわれている様に見える. 次に10%では45分まで 656 μ の吸光係数値は増加するが, 90分には低下している. 120分では吸光係数値の再上昇をみるが, fig. 10, の如く吸光曲線は変化し, 656 μ は短波長に緩やかに移行する膨隆として見られる. このことは時間の経過に伴い副反応が優勢となつて来ると思われる. 従つて 656 μ の吸光度測定は 120分よりは verdohemochrome 生成量と比例しない事が明らかとなつた. 次に20%では反応溶液混和直後のものに, 630 μ を中心とする 600 μ ~650 μ の膨隆を認めた. 15分にはこの吸収部は 650 μ に移行し, 30分には更に 656 μ の吸収極大に移行した. 75分でも sodium dithionite の添加により, 僅かに 558 μ , 525 μ の pyridinehemochrome の吸収極大が出現するが, 90分では sodium dithionite 添加による最早出現せず完全な verdohemochrome 吸光曲線を呈するに至つた. 又40%では反応溶液混和直後のものに於ても, 630 μ は既に 645 μ に移行し, 45分までは 656 μ 吸光係数値は20%より高値を示すが, 60分にはまだ 560 μ に小膨隆を残しているにも拘らず低値となる. そして 498 μ の吸収極大も崩れて短波長に移行し始めている. 90分では sodium dithionite 添加によつても pyridinehemochrome 吸収像は出現しなかつた. 498 μ は僅かの膨隆として認められた. 以上の事から pyridine 濃度の不足の場合は, pyridinehemochrome より verdohemo-

chrome への生成過程は阻害され, 時間の経過と共に副反応が優勢となると思われる. 又過剰の pyridine が一旦生成された verdohemochrome の分解を促進させると思われる. 至適 pyridine 濃度は20%であつた. ascorbin 酸反応系においては, 教室倉恒, 山吹らの実験では10%pyridine 濃度においても容易に verdohemochrome 生成反応を起し得ているのと異なる.

2. 3. 硫酸 hydrazine 量を変化させた場合の verdohemochrome 吸光曲線の時間的推移

反応溶液 20ml 中の硫酸 hydrazine 量を 5 mg, 15mg, 30mg, 60mg とし pH を 8.35に一定して実験を行なつた. pyridine

濃度は20%に hemin は各反応溶液に4 mg を溶解した。処で既述の実験 1. 2. に於て硫酸 hydrazine 量と verdohemochrome 656 μ m の吸光度の消長の関係を求めたが、その際は pH 一定となっていないのでその結果は hydrazine 量と pH との両者によつて影響されていると考えなければならぬので改めて硫酸 hydrazine 単独の影響を検討した。即ち硫酸 hydrazine 5 mg では 560 μ m に吸収極大を残し、sodium dithionite 添加により明らかな pyridine-hemochrome 吸収を出現した。30mg, 60mg では初期の反応は速やかであるが、verdohemochrome 生成率は 15mg に比し劣つた。即ち教室永井が ascorbin 酸反応系に於て述べたのと等しく、hemin 量を一定にして hydrazine 量を変化させた場合は hematin の受ける酸化は hydrazine 量に比例しなかつた。然して過剰の hydrazine は吸光曲線の推移

Fig. 11 The Changes of Absorption Maximum at 656 μ m of Verdohemochrome on the various Concentration of Hydrazine Sulfate at pH 8.35

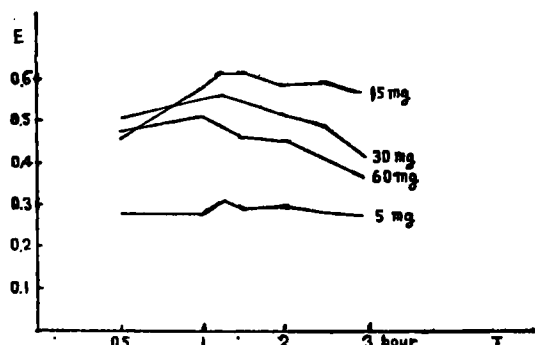
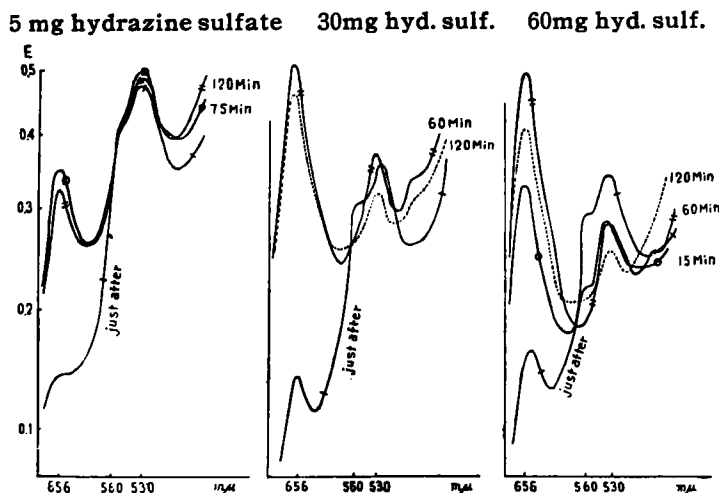


Fig. 12 The Changes of Absorption Curves by Changing of Hydrazine Sulfate Concentration on the Formation process of Verdohemochrome

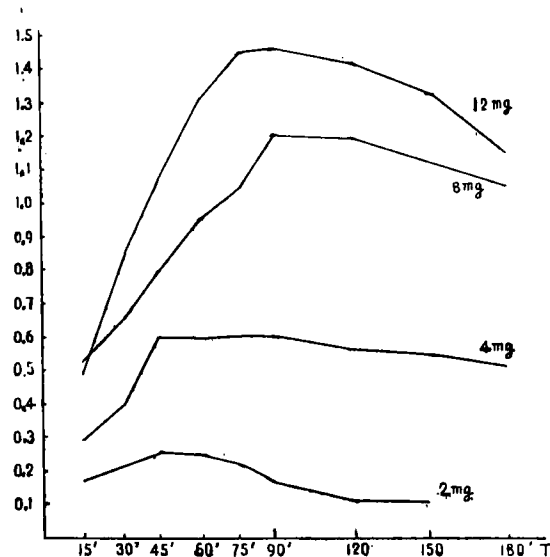


よりみて、verdohemochrome を分解させる事も過剰 ascorbin 酸におけると同様であつた。その成績は fig. 11, 12 の如くである。

2. 4. 硫酸 hydrazine 量を一定にして hemin 量を変化させて verdohemochrome の生成を吸光曲線の推移より見た実験

次に硫酸 hydrazine 量を 15mg とし、pH 8.5 に一定して、吸光曲線を描写し、その 656 μ m 吸光係数の推移を観察すると fig. 13 の如き成績を得た。即ち30分までは hemin 2 mg の場合が verdohemochrome 生成強度が早い、45分では 4 mg が ver-

Fig. 13 The Changes of Absorption Maximum at 656 μ m of Verdohemochrome on the various Concentration at pH 8.5



dohemochrome 吸光係数も増加は優勢となつた。2 mg では60分目より赤色部吸光係数の低下と共にその吸光曲線も変形し、verdohemochrome 分解速度も速やかで、fig. 12 の硫酸 hydrazine 60mg の場合の吸光曲線と同一の経過をたどつた。hemin 8 mg では90分で最高濃度に到達するが、120分より赤色部吸収は減弱し、尙且つ hemichrome 像を残した。hemin 12mg の場合は生成状態は hemin 濃度に比例せず、反応進行も緩慢で 180 分においても hemichrome 吸収を残し、fig. 12, の硫酸 hydrazine 5 mg の場合と同一の経過をたどつた。hemin 4 mg と 8 mg の両者の間にも最高濃度において比例値

を示すが、2 mg と 12mg では比例しない。要するに hemin 量が過剰では反応は hemichrome の段階に止まり、前述の hemin を一定とし硫酸 hydrazine 量の不足した際の成績と一致した。hemin 量過少の際は、反応は当初のみ早いが verdohemochrome の生成及び高濃度維持時間は不良であった。即ち前述の hemin を一定とし hydrazine 過剰の際の成績と相似した。この事より本反応系においては hydrazine の溶液中絶対濃度が必要なのではなく、hemin との対比濃度が重要な事が確かめられた。この点は ascorbin 酸反応系におけると同様であるが、菊池によれば ascorbin 酸は hemin の約50倍~100倍 Mol 濃度が必要とのことであるが、硫酸 hydrazine では hemin の約10倍~25倍 Mol 濃度を至適対比濃度とするのが妥当である。

2. 5. 硫酸 hydrazine との対比濃度を至適とし、hemin 量を変化した際の verdohemochrome 吸光曲線の推移

hemin に対する硫酸 hydrazine 量を18.8倍 Mol 濃度とし、この至適対比濃度で hemin 濃度を低濃度、中等濃度、高濃度の3つの場合に区分し夫々の反応過程を吸光曲線の推移より観察した。反応液の条件は50°C、毎分40振盪、pyridine 20%、pH 8.0 として実験し、吸光曲線の描写に際しては、3者とも等しく 2.5mg/dl hemin 濃度として測定した。その成

績を示すと fig. 14 の如くなる。即ち hemin 1mg の場合は観察終了の120分においても hemichrome 像を残し、sodium dithionite 添加にて著明の hemochrome 吸収像が出現したが、高濃度 hemin 1.6 mg においても 656m μ の吸光係数増加は至適標準 hemin 量の場合に比して不良であり、観察終了の120分まで 565m μ と 530m μ に吸収極大を残し、この 565m μ は尖鋭な吸収棘を示した。この 565m μ が尖鋭な吸収棘となつた事は、低濃度、hemin 1mg 中濃度 hemin 4 mg の場合 560m μ が肩吸収であるのと異なつていた。又 656m μ の吸光度係数の増加が中濃度 hemin 量と比較して不良の成績を残す点においては高低濃度の両者共に同様である。

次に反応120分の反応液に、夫々 sodium dithionite による還元法を行うと、低濃度では著明な hemochrome 吸収像の出現がみられ、この場合大部分の hemin は未反応の儘で存在する事が判る。高濃度では 525 m μ が 557 m μ より優位となり、pyridine hemochrome の吸光曲線とは異つた。これは菊池の 630物質を sodium dithionite で還元した際の緑色部吸光曲線と同様の関係になり、又役に pyridine hemin-hydrazine-H₂O₂ 反応系を無酸素状態で検討した際に生ずる 630m μ 物質を還元した場合に、525m μ がその成長率において 557m μ より優ると同一の関係にあり、高濃度の場合に sodium dithionite 還元を行つた際の緑色部吸光曲線は 630物質が還元されて生じたものであると推定される。

以上より hemin 16mg の高濃度の場合は、hemin 1 mg の低濃度の場合より反応が速やかで、殆どの pyridine hemin が分解しているが、尙一部は 630m μ 物質の状態にあると推定される。次に高濃度の場合を中濃度の場合と比較すると、後者では反応90分で既に verdohemochrome の生成は完了し、630物質の残存はみられなかつた。従つて硫酸 hydrazine 対比濃度を至適にした場合の verdohemochrome の生成は、hemin 4 mg において最もよく、これよりあまり低濃度にすぎても、又高濃度にすぎても verdohemochrome も生成は劣つた。

2. 6. 至適条件下に於ける pyridine hemin-hydrazine-O₂ の反応系の時間的吸光曲線

pH を8.5とし、その他の条件を至適とし実験法 6.により吸光曲線を描写すると fig. 15 の如くなる。即ち反応液を混和直後のものでは 630m μ に僅少の膨隆を認めたが、直ちに長波長側に移行し、15分では 650m μ に吸収極大を示し、560m μ は肩吸収を示し

Fig. 14 The Changes of Absorption Curves by Changing of Hemin Concentration on the Formation process of Verdohemochrome in the Ratio of Hemin 1 Mol. and Hyd. Sulf. 18. 8 Mol.

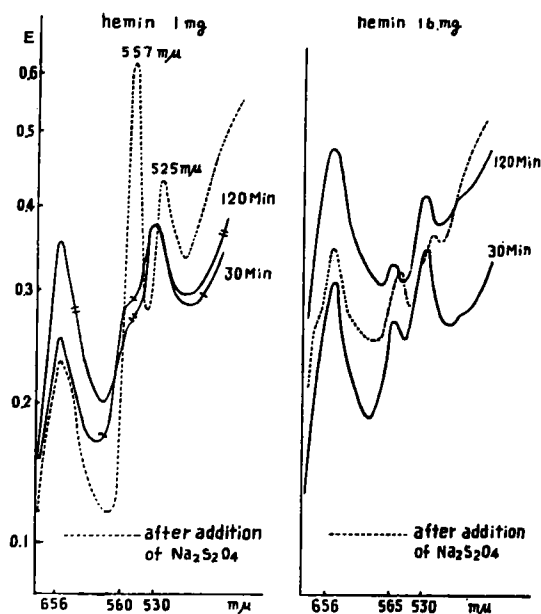
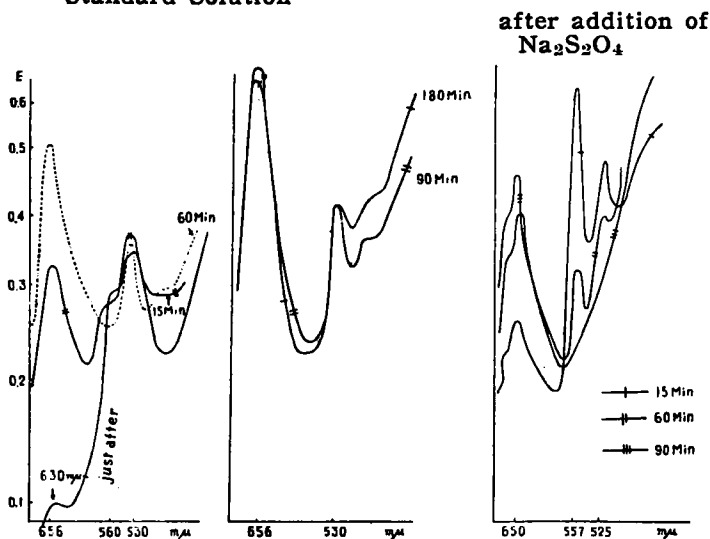


Fig. 15 The Changes of Absorption Curves on the Standard Solution



530 μ に移行する hemichrome 吸収を残した。60分では 650 μ の吸収極大は 656 μ に移行しその吸光係数値も高かつたが、580 μ より 560 μ に平底なる吸収の谷を形成し、530 μ へと移行した。続いて 498 μ にもこの際すでに膨隆を形成し始めている。90分では 656, 530, 498 μ の吸収極大を明瞭に認めた。又紫外部では 395 μ を中心とする単一な吸収を示している。180分では 656 μ は減衰し、尙560 μ の吸収の谷は浅くなる為、吸収棘は巾の広い形となつた。530 μ も減衰し、498 μ は膨隆となつた。次に各時間毎に反応溶液中に sodium dithionite を加えてその推移をみると fig. 15 の 2 の如く pyridine hemochrome への移行が verdohemochrome 生成に逆比例して減衰して行くのが明らかとなつている。

2. 7. pyridine hemin-hydrazine-H₂O₂ 反応系について

2.4.において630物質の生成を sodium dithionite 還元に対する態度から推察し、又至適条件下においても反応極く初期に、630 μ に僅かに吸収棘をみた事より、本反応系においても菊地の630物質を経過する事は確かであると思われた。菊地は hydrazine 反応系に於ても630物質を生成すると述べたが未発表に終っている。これらの点を明確にするため、pyridine hemin-l-ascorbin 酸-H₂O₂ 反応系における教室尼子の方法に準じて、無酸素条件下に実験した。その成績は fig. 16 の如くである。即ち反応30分において630 μ に吸収極大を生じ、60分では630 μ の吸光係数は増加した。その後120分では極大は640 μ に移行し、180分では645 μ に移行すると共に吸光係

数は増加した。かくて本反応系において630物質の段階を経る事を認めたが、嚴重なる無酸素状態とし、反応液外よりの酸素の侵入は全く斜断して実験したにも拘らず、630物質のみを成長させる事は60分までは可能であつたが、それ以上の時間を経過させると verdohemochrome への進行が認められた。これは時間の経過に伴い hemin の katalase 作用により H₂O₂ が分解され反応管内部に酸素が発生したものと考えられる。本実験に於ては緑色部吸収は pyridine hemochrome 557, 525 μ の吸収を示し、ascorbin 酸を用いた場合と等しく pyridine hemochrome より630物質へと移行するものと思われた。次に反応120分の反応液を sodium dithionite で還元すると557 μ と525 μ はその

吸光係数を増したが、525 μ 極大が比較的大きく吸光比率は pyridine hemochrome 単独の場合を選

Fig. 16 The Changes of Absorption Curves on the Formation Process of Verdohemochrome under N₂

| | |
|-------------------------------|--------------|
| Hemin | 1.25mg |
| Pyridine | 10 ml |
| Hyd. sulf | 1g/dl |
| H ₂ O ₂ | 33mg/dl |
| H ₂ O | 47.0ml |
| Total | 50 ml |

after addition of Na₂S₂O₄ and O₂ aerator

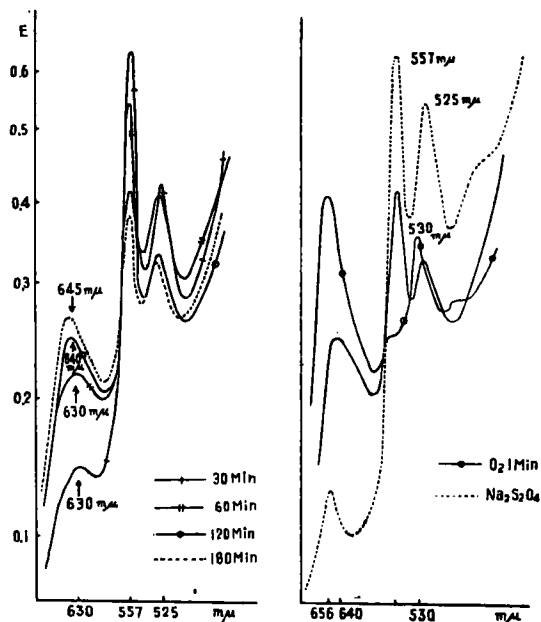
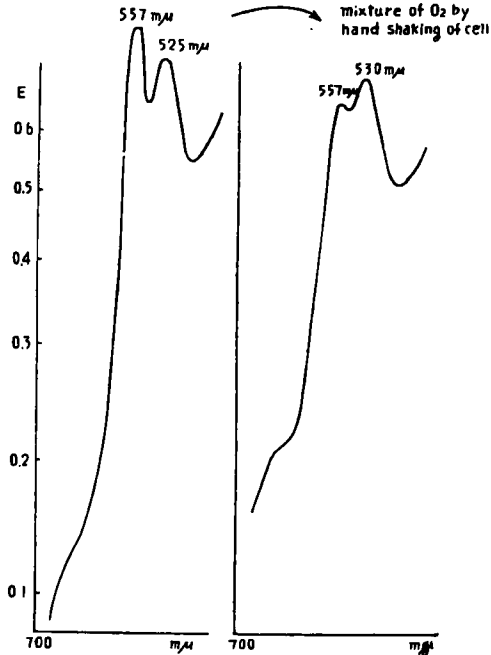


Fig. 17 The Changes of Absorption Curves by the Airation of O_2 on the Formation Process of Verdohemochrome



元する時現われる両者の比率と相異した。これは630物質の還元による吸収が加わった為で、pyridine hemochrome の $557m\mu$, $525m\mu$ における吸収と逆の関係を示し、両吸収線の差が短縮されたものと考えられる。

630物質の生成をみた60分の反応液に酸素を2mmの硝子管を通じ、1分間200気泡の割に1分間通気すると、 $630m\mu$ は直ちに $656m\mu$ に移行し、hemochrome 吸収部は $560m\mu$, $530m\mu$ の hemichrome 吸収像に変化した。従つて本反応系では $630m\mu$ より $656m\mu$ への移行が確認された訳であるが、注目すべきは pyridinehemin-hydrazine- O_2 反応系においては、無酸素状態で過酸化水素を作用させると hemochrome と630物質の生成が認められ、酸素添加により $656m\mu$ 物質と hemichrome が認められ、又 hydrazine- O_2 反応系においては、hemichrome 吸収をみせながら、反応は進行し、verdohemochrome 生成反応が起こり、一方 ascorbin 酸反応系においては、hemichrome 像をみず hemochrome 像に終始している。

更に反応溶液の hemin 量少くし、測定に際しても20% pyridine 水で稀釈する必要を無くして、稀釈操作による酸素の進入を防いだ実験では、hydrazine 量を多くすれば、hemochrome 像を呈するが、測定槽を振盪して空気を触れさせれば hemichrome へと

戻つた。

即ち hydrazine 反応系と ascorbin 酸反応系とは hydrazine と ascorbin 酸の相異による反応の酸化還元電位の差に基くもので、pyridine hemin-hydrazine- O_2 反応系において $630m\mu$ の吸収線の確認がごく限られて、早期より $656m\mu$ の線を認めたこともその差によるものであろう。

結 論

Pyridine hemin に硫酸 hydrazine と酸素、又無酸素下に過酸化水素と硫酸 hydrazine とを作用させ、前者においては反応条件を種々に変えた場合の verdohemochrome 生成に及ぼす影響を分光化学的に観察し、又後者においては $630m\mu$ 物質生成の過程を分光化学的に観察し次の結果をえた。

1. 本反応系では pH の影響が大きく、反応液の pH が高値では verdohemochrome 生成量も低く、pH 7.0 近傍では反応は緩慢で且つ生成量も低下し、pH 8.5 乃至8.0を至適と判定した。

2. Pyridine 濃度は絶対濃度で20%を至適とし、以下では反応進行は不良であり、又過剰では verdohemochrome の分解が促進される。

3. hemin 濃度と hydrazine 濃度は相関関係にあり、その至適対比濃度が必要で、硫酸 hydrazine 量は hemin 量の約10倍乃至25倍 Mol. 濃度が必要である。

4. 硫酸 hydrazine 濃度を hemin 濃度に対し至適対比濃度とした際、hemin 濃度は $20mg/dl$ が至適であつた。

5. 硫酸 hydrazine を使用する反応では、 $50^{\circ}C$ で flask の振盪を必要とし、ascorbin 酸を用いる反応より緩慢であつた。

6. Pyridine hemin-hydrazine- H_2O_2 反応系において $630m\mu$ 物質の生成を確認し、これに酸素を通気すると容易に $656m\mu$ 吸収極大を移動した。

7. 本反応系では pyridine hemichrome の吸収に終始し、pyridine hemin-hydrazine- H_2O_2 反応系を無酸素条件下で進行させると pyridinehemochrome の吸収像を認めた。

8. これらの結果から hydrazine 反応系では l-ascorbin 酸反応系に比し、反応液中の酸化還元電位を著しく異にしていることが判る。

主 要 文 献

- | | |
|-----------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1) Warburg, O., & E. Negelein, Ber. Dtsch. chem. Ges., 63 1816, 1930. | 8) 山吹: 日本血液学会雑誌, 21, 522, 1958. |
| 2) Karrer, P., H. V. Euler, & H. Hellstrom, | 9) Willstätter, R., Ann. Chem., 373, 232, 1910. |
| 3) Lemberg, R., Biochem. J., 29, 1322, 1935. | 10) 倉恒: 医学研究, 24, 9, 1840, 昭30. |
| 4) 菊地: 生化学, 22, 214, 1950. ibid, 23, 44, 1951. ibid, 23, 38, 1951. | 11) Lemberg, R., Biochem.J., 32, 148, 171, 1938. |
| 5) 菊地・富村: 生化学, 23, 139, 1952. | 12) 永井: 医学研究, 22, 8, 124, 昭27. |
| 6) 花岡: 生化学, 25, 347, 1954. | 13) Lemberg, R., Hematin Compounds and Bile pigments, Intersc, publishers., Inc., New York, 1949. |
| 7) 尼子: 医学研究: 27, 7, 1592, 昭32. | 14) 山吹: 岡山医学会雑誌, (掲載中) |

Studies on the Formation of Verdohemochrome and It's Property

Part 1 Spectrochemical Studies on the Formation of Verdohemochrome by the Pyridine Hemin-hydrazine-O₂ Reacting System

By

Shigeo KATAMI

The First Department of Internal Medicine Okayama University,
Medical School

(Director : Prof. K. Kosaka)

Conclusions

The influence to the formation of verdohemochrome was spectrochemically observed on the action of hydrazine sulphate and oxygen to pyridine hemin in various changes of the reacting condition and the formation process of the product with the absorption maximum at 630 m μ was spectrochemically observed on the action of hydrogen peroxide and hydrazine sulphate to pyridine hemin under the airless condition. And the results were as follows.

1. In this reaction system, the influence of pH was great, the formation dosis of verdohemochrome was low on the high pH-value of reaction solution, the reaction was slow and the formation dosis of verdohemochrome was declined on the pH-value around 7.0, and it was decided that the pH-value at 8.5-8.0 was the most suitable.

2. The pyridine concentration was the most suitable in 20% of absolute concentration, the reacting process was not good below 20% and the decomposition of verdohemochrome was promoted on the over dosis.

3. There was the correlation between the hemin concentration and hydrazine concentration, the most proper concentration rate was needed and the dosis of hydrazine sulphate was needed in 10 or 25 times' Mol. concentration of hemin dosis.

4. The most proper concentration of hemin was 20mg/dl, when the concentration of hydrazine sulphate was made to be the most proper concentration rate to the hemin concentration.

5. In the reaction using hydrazine sulphate, the shaking of flask at 50°C was necessary and it was more slow in comparison with the reaction using ascorbic acid.

6. The formation of the product with the absorption maximum at 630 m μ was certified in the pyridine hemin-hydrazine-H₂O₂ reaction system and the absorption maximum was easily shifted to 650m μ on the aeration of oxygen to the above product.

7. In this reaction system, it persevered the absorption of pyridine hemichrome, and the absorption picture of pyridine hemochrome was observed on the progression of the pyridine hemin-hydrazine-H₂O₂ reaction system under the airless condition.

8. Since the above results, it was understood that the oxydation-reduction potential in the hydrazine reaction system was much different in comparison with that of the l-ascorbic acid reaction system.
