

〈短報〉

結晶非抱合型ビリルビン、ジタウロビリルビン (合成抱合型ビリルビン)、合成デルタビリルビンのモル吸光係数に関する研究

木内 幸子¹⁾、西口 慶一²⁾、難波 俊二³⁾、涓原 博⁴⁾

Studies on molar absorption coefficients of crystalline unconjugated bilirubin, ditaurobilirubin (synthetic bilirubin conjugate), and synthetic delta bilirubin

Sachiko Kiuchi¹⁾, Yoshikazu Nishiguchi²⁾, Sunji Namba³⁾ and Hiroshi Ihara⁴⁾

Summary To recommend the high-performance liquid chromatography (HPLC) method developed by Osawa et al. (Clin Chim Acta, 366: 146, 2006) as a proposed method for measuring serum bilirubin subfractions, we certified the molar absorption coefficients of unconjugated bilirubin (UCB), ditaurobilirubin (DTB), and delta bilirubin (DLB) described in Osawa et al. Solutions of crystalline UCB purchased from Sigma-Aldrich Co., DTB purchased from Frontier Scientific, Inc., and DLB synthesized using Woodward's reagent K were prepared according to previous studies, and their molar absorption coefficients at 450 nm in the eluent [70 % phosphate buffer (pH 6.5, 0.3 mol/L)/30 % acetonitrile] from Osawa's isocratic HPLC were determined using a Hitachi U-5100 ratio beam spectrophotometer. As a result, the molar absorption coefficient was $38.683 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ for UCB, $54.939 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ for DTB, and $74.379 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ for DLB. These values were 62%, 113%, and 96%, respectively, of those given in Osawa et al. The molar absorption coefficient of UCB requires further reconfirmation.

Key words: Molar absorption coefficient, High-performance liquid chromatography, Ditaurobilirubin, Unconjugated and conjugated bilirubin, Delta bilirubin

¹⁾ 千葉科学大学危機管理学部保健医療学科

〒288-0025 千葉県銚子市潮見町3番

²⁾ 城西国際大学薬学部教育支援センター

〒283-8555 千葉県東金市求名1番地

³⁾ つくば国際大学医療保健学部臨床検査学科

〒300-0051 茨城県土浦市真鍋6-20-1

⁴⁾ 東邦大学理学部臨床検査技師課程

〒274-8510 千葉県船橋市三山2-2-1

連絡先：涓原 博

東邦大学理学部臨床検査技師課程

E-mail: ihara@med.toho-u.ac.jp

¹⁾ Department of Health and Medical Sciences, Faculty of Risk and Crisis Management, Chiba Institute of Science, 15-8 Shiomi, Choshi, Chiba 288-0025, Japan

²⁾ Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai International University, 1 Gumyo, Togane, Chiba 283-8555, Japan

³⁾ Department of Medical Technology, Tsukuba International University, 6-20-1 Manabe, Tsuchiura, Ibaraki 300-0051, Japan

⁴⁾ Medical Technology Course, Faculty of Science, Toho University, 2-2-1 Miyama, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan

受付日：2020年2月6日

採択日：2020年4月30日

I. 緒言

ヒト血清ビリルビンは、高速液体クロマトグラフィー (high-performance liquid chromatography: HPLC) 分析により非抱合型ビリルビン (unconjugated bilirubin: UCB)、抱合型ビリルビン (conjugated bilirubin: CB)、デルタビリルビン (delta bilirubin: DLB) に分画される¹⁾。血漿中でUCBは疎水性あるいはイオンの非共有結合的な結合で血清アルブミンに結合して存在し、CBはビリルビンモノグルクロニドとビリルビンジグルクロニドとして、それぞれ、1分子また2分子のグルクロン酸を抱合し、血清アルブミンとは吸着あるいはファンデルワールス (van der Waals) 力で結合していると考えられる。さらに、DLBはビリルビンジグルクロニドから生成し、血清アルブミンと共有結合 (ペプチド結合) で血 (漿) 中に存在すると考えられている²⁾。

HPLC分析では、血清あるいは除グロブリン血清を試料として、UCBはアルブミンから遊離したビリルビン、CBはグルクロン酸抱合したビリルビン、そしてDLBはアルブミンに共有結合したビリルビンの形で溶出される。検出は各ビリルビンに共通する開環テトラピロールの黄色 (430 ~ 460 nmの吸収) が測定される。多くのグラジエント法を利用したHPLC分析^{1,3-4)}は、CB、DLB濃度の計算にUCBの吸光係数を用い、吸光係数が溶離液組成の影響を受けないと仮定した測定である。大澤ら⁵⁾は、この仮定によらないイソクラティック溶離法によるHPLC分析を開発して、イソクラティック条件 [70%リン酸緩衝液 (pH 6.5, 0.3 mol/L) / 30%アセトニトリル] でのビリルビンモノグルクロニドとビリルビンジグルクロニドのモル吸光係数を求めている。さらに血漿中のUCB、CB、DLBの代替物質として、各々結晶ビリルビン、合成抱合型ビリルビンであるジタウロビリルビン (ditaurobilirubin: DTB)、そして合成デルタビリルビンのモル吸光係数を報告している。大澤らのHPLC法は再現性、直線性、最小検出感度、添加回収試験において優れ、日本臨床化学会の勧告法の候補と考えられているが、いまだ十分な検証がなされていない。

本論文では、結晶UCB、DTB、合成DLBの

モル吸光係数を、大澤らと異なる実験法で報告値を検証した。さらに、本研究で検証されたモル吸光係数の、大澤らのイソクラティックHPLC分析への用い方を考察した。

II. 方法と材料

1. ビリルビン標品

一次校正物質としての米国標準技術研究所 (NIST) からの標準参照物質916a (SRM 916a: ブタ胆汁由来ビリルビン粉末) の供給が停止されているので、シグマ・アルドリッチから結晶UCB粉末 (B4126: 純度98%, $M_w = 584.7$ g/mol, St. Louis, MO, USA) を購入した。DTB粉末はFrontier Scientific, Inc. (B850: 純度97%, $M_w = 842.9$ g/mol, Newark, DE, USA) から購入した。

2. 測定試料の作製

ビリルビン標準液は、NIST SRM 916aの溶解法^{6,7)}に従った。すなわち、10.2 mg (純度補正) の結晶UCB粉末 (シグマ・アルドリッチ) を0.5 mLのジメチルスルホキシド (DMSO) と1.0 mLの0.1 mol/L炭酸ナトリウム溶液に溶解し、次いで、0.1 mol/L トリス緩衝液 (pH 7.4) に溶かした40 g/Lのウシ血清アルブミン (Bovine serum albumin, BSA: 016-15096: 純度95%, $M_w = 66000$ g/mol, 富士フィルム和光純薬株式会社, Osaka, Japan) で100 mLとする (終濃度: $171 \mu\text{mol/L} = 100 \text{mg/L}$)。

測定に用いるUCB溶液は、1.0 mg の結晶UCB粉末 (シグマ・アルドリッチ) を0.5 mLのDMSOと1.0 mLの炭酸ナトリウム溶液 (0.1 mol/L) に溶解し、次いで、上記のBSA溶液で50 mLあるいは25 mLとする (20 mg/L、40 mg/L)。

DTB溶液は、Doumasらの方法⁸⁾で調整した。すなわち、DTB粉末 (1.0 mg) を0.1 mol/L トリス緩衝液 (pH 8.5) で調整した40 g/LのBSA溶液で50 mLあるいは25 mLに溶解する (20 mg/L、40 mg/L)。

合成DLB溶液は、ペプチド合成剤Woodward試薬K (*N*-ethyl-5-phenylisoxazolium-3'-sulfonate) を用いて合成した^{9,11)}。すなわち、結晶UCB粉末 (シグマ・アルドリッチ) にWoodward試薬K、トリエチルアミン、アセトニトリルを加え遮光

下で攪拌溶解する。トリエチルアミンとアセトニトリルを風乾の後、リン酸緩衝液とヒト血清アルブミン (Human serum albumin, HSA)、EDTA-2Na、イミダゾールを加えUCBをアルブミンに共有結合させる。反応終了後、カフェン・安息香酸ナトリウム溶液を用いた限外濾過 (分子サイズ、10 kDa) で、アルブミンに共有結合していないUCBを除去する。アルブミン濃度をプロモクレゾールグリーン法、ビリルビン濃度をDoumasらの基準測定操作法 (Table 1)⁶⁾ で測定する (2濃度合成: 16.2 mg/L {アルブミン濃度 1.06 g/L}、32.3 mg/L {アルブミン濃度 2.06 g/L})。

3. 実験法

ビリルビンの光分解を避けるため、実験は遮光・消灯した状態で行った。ビリルビン標準液 (171 $\mu\text{mol/L}$ = 100.0 mg/L) を校正物質に用い UCB 溶液、DTB 溶液、DLB 溶液濃度を、Doumasらの基準測定操作法⁶⁾ (Table 1) で測定する (その濃度を検定濃度とする)。UCB溶液、DTB溶液、DLB溶液は、UCB相当濃度となり、SI単位 ($\mu\text{mol/L}$) の換算は、 $\mu\text{mol/L} = (\text{mg/L}) \times 1000/584.7$ とする。なお、ビリルビン標準液は、アルカリアゾ色素の598 nmにおける吸光度 (A_{598}) を、NIST SRM 916aのモル吸光度係数 (文献値: $76.641 \times 10^3 \text{ L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)⁷⁾ で濃度補正して用いる。アルカリアゾ色素によるビリルビン標準液の濃度補正は、NIST SRM 916a⁷⁾ ならびにDoumasらの基準測定操作法⁶⁾ で求められて

いる操作である。吸光度の測定は、日立U-5100 レシオビーム分光光度計 (波長 $450 \pm 1 \text{ nm}$, スペクトルバンド幅 $5 \pm 0.5 \text{ nm}$, 光路長 10 mm) を用いた。

次いで、UCB溶液、DTB溶液、DLB溶液、それぞれ、0.2 mLを大澤らのHPLC法のイソクラティック溶離液0.8 mLで希釈し、蒸留水を対照に450 nmの吸光度を測定した。イソクラティック溶離液は、Brij 35 (1 g)、アスコルビン酸ナトリウム (80 mg) を含む、リン酸緩衝液 (pH 6.5, 0.3 mol/L : $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$) 70 mLとアセトニトリル30 mLの混液を用いた。希釈後の各ビリルビン溶液の最終pHは 6.5 ± 0.1 にある。得られた吸光度 (A_{450}) よりUCB溶液、DTB溶液、DLB溶液の450 nmにおけるモル吸収係数 (ϵ) を以下の式より計算した。

$$\epsilon (\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}) = A_{450} \times 584.7 \times 5 \times 1000 \times \text{検定濃度}^{-1} \times \text{光路長}^{-1}$$

584.7はUCBの分子量、5は希釈係数、1000はmmol/Lからmol/L換算値、検定濃度はmg/L、光路長はcmとする。

Ⅲ. 実験結果ならびに考察

1. 検定濃度

秤量濃度が20 mg/L、40 mg/LのUCB溶液の検定濃度は、それぞれ、22.4 mg/L、44.2 mg/Lにあった。一方、秤量濃度が20 mg/L、40 mg/LのDTB溶液の検定濃度は、それぞれ、11.9 mg/L、22.8 mg/Lにあった (Table 2)。秤量濃度20 mg/

Table 1 Measurement procedure based on the candidate reference method.

| Reagent | Volume (mL) |
|--|-------------|
| Caffeine-benzoate solution | 2.0 |
| UCB, DTB or DLB solution | 0.25 |
| Diazotized sulfanilic acid solution ¹⁾ | 0.50 |
| Mix and wait 10 min at 25 °C | |
| Alkaline tartrate solution | 1.5 |
| Read the absorbance at 598 nm against blank solution using a Hitachi U-5100 Ratio Beam Spectrophotometer | |

The given reagents⁶⁾ must be added in the above order. ¹⁾For blank absorbance measurement, the diazotized sulfanilic acid solution should be substituted by sulfanilic acid solution.

Table 2 Molar absorption coefficients (ϵ) obtained for UCB, DTB, and DLB preparations in the eluent [70% phosphate buffer (pH 6.5, 0.3 mol/L)/30% acetonitrile] from Osawa's isocratic HPLC.

| | UCB (20 mg/L) ¹ | UCB (40 mg/L) ¹ | DTB (20 mg/L) ¹ | DTB (40 mg/L) ¹ | DLB (16.2 mg/L) | DLB (32.3 mg/L) |
|--|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|--------------------|--------------------|
| Certified concentration (mg/L) | 22.4 | 44.2 | 11.9 | 22.8 | 16.2 | 32.3 |
| A ₄₅₀ | 0.298 ±0.002 | 0.582 ±0.002 | 0.237 ±0.003 | 0.474 ±0.004 | 0.400 ±0.005 | 0.847 ±0.003 |
| $\epsilon \times 10^3$ (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹) | 38.893 ±0.213 | 38.473 ±0.156 | 58.142 ±0.759 | 60.735 ±0.495 | 72.125 ±0.900 | 76.633 ±0.238 |
| Average | 38.683 | | 59.439 | | 74.379 | |
| $\epsilon \times 10^3$ (L·mol ⁻¹ ·cm ⁻¹) from Osawa's report | 62.343 | | 48.550 | | 77.390 | |

¹Weighed concentration. All values are the mean \pm SD (n = 3).

LのDTB溶液はUCB相当量に換算すると、それぞれ、13.9 mg/L (20 × 584.7/842.9)、27.7 mg/L (20 × 584.7/842.9) となる (584.7はUCBの分子量、842.9はDTBの分子量)。このように、結晶UCB粉末、DTB粉末とも1.0 mgの秤量は精度が低く検定が必要とされた。なお、基準測定操作法(ジアゾ法)⁶⁾で検定したDTBならびにDLBの重量濃度はUCB相当量となる。

2. モル吸光係数

検定したUCB、DTB、DLB溶液を用いて大澤らのイソクラティック溶離液中での450 nmにおけるモル吸光係数を求めると、それぞれ、38.683 × 10³、54.939 × 10³、74.379 × 10³ L·mol⁻¹·cm⁻¹となり、UCB、DTB、DLBのモル吸光係数はビリルビン成分により異なることが再確認された (Table 2)。大澤らの報告値では、それぞれ、62.343 × 10³、48.550 × 10³、77.390 × 10³ L·mol⁻¹·cm⁻¹であり、今回の測定値は大澤らの測定値と比較して、それぞれ62%、113%、96%と、UCBが大きく乖離した結果にあった。

LeeとGartnerは、UCB (HSA溶液) のリン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.1 mol/L) 中での、460 nmにおけるモル吸光係数を47.0 × 10³ L·mol⁻¹·cm⁻¹と報告している¹²⁾。このモル吸光係数は新生児血清のビリルビン測定 (Direct spectrophotometry) に用いられている¹³⁾。さらにLeeとGartner¹²⁾は、リン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.1 mol/L) のpHを変えるとUCB (HSA溶液) のモル吸光係数は変化し、

pH 6.5では38.0 × 10³ L·mol⁻¹·cm⁻¹に低下することを報告している (pH 8.5では上昇して58.0 × 10³ L·mol⁻¹·cm⁻¹)。また生理食塩水中のUCB (HSA溶液) の460 nmにおけるモル吸光係数は49.1 × 10³ L·mol⁻¹·cm⁻¹と報告されている¹⁴⁾。

また、DTB (BSA溶液) の460 nmにおけるモル吸光係数は、トリス緩衝液 (pH 8.5, 0.1 mol/L) で56.7 × 10³ L·mol⁻¹·cm⁻¹、リン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.134 mol/L) で43.2 × 10³ L·mol⁻¹·cm⁻¹と報告されている⁸⁾。さらに、ヒト血清から抽出したDLB¹⁵⁾ の440 nmにおけるモル吸光係数は、トリス緩衝液 (pH 8.5, 0.1 mol/L) で71.8 × 10³ L·mol⁻¹·cm⁻¹、リン酸緩衝液 (pH 7.4, 0.134 mol/L) で72.4 × 10³ L·mol⁻¹·cm⁻¹と報告されている¹⁶⁾。溶液の違いと±10 nmの波長の差はあるが、今回の測定値は文献値の80%～103%にあった。本研究で用いたDLB溶液のHSA濃度は他のビリルビン溶液に比べ低濃度であるが、DLBの吸光度はHSA濃度に依存しない¹⁶⁾こと、またHSAは450 nmに吸収を持たないことから本成績への影響はないものと考えられる。測定した濃度の異なる2試料についてもBeerの法則が成立している。このことより、UCBとDTBは緩衝液組成による変化が大きく、DLBで少ない傾向が確認された。

3. HPLC分析への用い方

HPLC法によるビリルビン分画測定では、面積百分率法 (Area normalization method) が汎用

されている。大澤らは、この総ビリルビン濃度に各ビリルビン成分のピーク面積の割合 (%) を乗じた分画濃度は、溶離液組成の影響を受けることをグラジエント法で提起した。さらに大澤らのイソクラティック法でもビリルビン成分のモル吸光係数の違いがピーク面積の割合 (%) に影響を与えることを示し、ビリルビンモノグルクロニド、ビリルビンジグルクロニドについて、モノグルクロニドで 52.520×10^3 、ジグルクロニドで $44.170 \times 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ のモル吸光係数を求めている。一方、各ビリルビン成分の標準物質を用いた外部標準法（絶対検量線法）もビリルビン分画測定に利用できるが、ビリルビンモノグルクロニドとビリルビンジグルクロニドの標品は供給されていないことが課題である。胆汁からの抽出法^{15,17)}もあるので検討が求められる。従って、現時点では、大澤らの方法を組み入れた面積百分率法がビリルビン分画測定の勧告法となろう。すなわち、測定試料の総ビリルビン濃度（UCB相当濃度）を基準測定操作法（あるいは、トレーサブルな日常検査法）で測定し、同試料のHPLC分離で得られる各ビリルビン分画のピーク面積を、 $\times [(\text{UCBモル吸光係数}) / (\text{各ビリルビンのモル吸光係数})]$ と、いわゆる相対感度で補正して用いる「修正面積百分率法」が推奨される。

Ⅳ. 結語

大澤らのHPLC溶離液中の結晶UCB（非抱合型ビリルビン）、DTB（ジタウロビリルビン）、DLB（デルタビリルビン）の450 nmにおけるモル吸光係数を検証した。結晶UCBについては再検証が必要とされる。

謝辞

本研究は千葉科学大学教育研究費の支援により行ったものである。ご校閲をいただいた国際医療福祉大学大澤進教授に深謝し、またデルタビリルビンを合成いただいたニプロ株式会社に感謝する。

本論文内容に関連する著者（ら）の利益相反：なし

文献

- 1) Lauff JJ, Kasper ME, Ambrose RT: Separation of bilirubin species in serum and bile by high-performance reversed-phase liquid chromatography. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*, 226: 391-402, 1981.
- 2) Adachi Y, Kambe A, Yamashita M, Yamamoto: Bilirubin diglucuronide as the main source for in vitro formation of delta bilirubin. *J Clin Lab Anal*, 5: 331-334, 1991.
- 3) Adachi Y, Inufusa H, Yamashita M, Kambe A, Yamazaki K, Sawada Y, Yamamoto T: Clinical application of serum bilirubin fractionation by simplified liquid chromatography. *Clin Chem*, 34: 385-388, 1988.
- 4) Ihara H, Aoki Y, Aoki T, Yoshida M: Light has a greater effect on direct bilirubin measured by the bilirubin oxidase method than by the diazo method. *Clin Chem*, 36: 895-897, 1990.
- 5) Osawa S, Sugo S, Yoshida T, Yamaoka T, Nomura F: An assay for separating and quantifying four bilirubin fractions in untreated human serum using isocratic high-performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta*, 366: 146-155, 2006.
- 6) Doumas BT, Kwok-Cheung PP, Perry BW, Jendrzczak B, McComb RB, Schaffer R, Hause LL: Candidate reference method for determination of total bilirubin in serum: development and validation. *Clin Chem*, 31: 1779-1789, 1985.
- 7) Gonzalez CA, Choquette SJ: National Institute of Standards and Technology. Certificate of Analysis, Standard Reference Material 916a, Bilirubin, 2016.
- 8) Doumas BT, Wu TW, Poon KC, Jendrzczak B: Chemical nature of a synthetic bilirubin conjugate and its reactivities in the total and direct reactions by the Jendrassik-Gróf method. *Clin Chem*, 31: 1677-1682, 1985.
- 9) Kuenzle CC, Gitzelmann-Cumarasamy N, Wilson KJ: Affinity labeling of the primary bilirubin binding site of human serum albumin. *J Biol Chem*, 251: 801-807, 1976.
- 10) Ihara H, Nakamura H, Aoki Y, Aoki T, Yoshida M: Effects of serum-isolated vs synthetic bilirubin-albumin complexes on dye-binding methods for estimating serum albumin. *Clin Chem*, 37: 1269-1272, 1991.
- 11) 渭原博: デルタビリルビンの抽出とその化学合成法. *医学検査*, 43: 1253-1255, 1994.
- 12) Lee KS, Gartner ML: Spectrophotometric characteristics of bilirubin. *Pediatr Res*, 10: 782-788, 1976.
- 13) Tietz NW: Determination of bilirubin in infants by direct spectrophotometry. *Textbook of Clinical Chemis-*

- try. W.B. Saunders Company. Philadelphia. pp. 1390-1391 (1983).
- 14) Meites S, Traubert JW: Use of bilirubin standards. Clin Chem, 11: 691-699, 1965.
- 15) Lauff JJ, Kasper ME, Wu TW, Ambrose RT: Isolation and preliminary characterization of a fraction of bilirubin in serum that is firmly bound to protein. Clin Chem, 28: 629-637, 1982.
- 16) Doumas BT, Wu TW, Jendrzczak B: Delta bilirubin: absorption spectra, molar absorptivity, and reactivity in the diazo reaction. Clin Chem, 33: 769-774, 1987.
- 17) 血清ビリルビン測定法の標準化委員会: グルクロン酸抱合ビリルビンのヒト胆汁からの抽出法. 医学検査, 47: 753-758, 1998.