薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
88 (5) 635 — 637 (1968)

UDC 543.52 : 546.11.02 : 546.26.02

液体シンチレーション計数装置による生体試料中の ^{14}C の
測定法および ^3H , ^{14}C の同時測定法¹⁾

馬場茂雄,^{2a)} 岩原滋利, 荻野喜文^{2b)}

東京薬科大学,^{2a)} 陸上自衛隊衛生学校^{2b)}

Determination of ^{14}C and Simultaneous Determination of ^3H and ^{14}C in
Biological Materials by Liquid Scintillation Counter¹⁾

SHIGEO BABA,^{2a)} SHIGETOSHI IWAHARA, and YOSHIFUMI OGINO^{2b)}

Tokyo College of Pharmacy,^{2a)} Medical School of Self-Defence Force^{2b)}

(Received September 13, 1967)

Methods were examined for measuring ^{14}C and for simultaneous measuring of ^3H and ^{14}C in biological samples. A lyophilized organ material was pulverized and about 20 mg of the powder was burnt in an oxygen flask. Scintillator containing ethanolamine was used for radioactive carbon dioxide and a scintillator containing dioxan and ethanolamine was used for simultaneous measurement of ^3H and ^{14}C . Recovery of ^{14}C was 96.3% and its standard deviation was 1.4%. Reproducibility of the assay was further examined with the same liver of a rat given ^{14}C -ephedrine with satisfactory results, i.e. the standard deviation was 0.8%. Recoveries of ^3H and ^{14}C were 99.8 and 99.3% respectively in the simultaneous measurement, and their standard deviation was 1.3 and 1.5%.

トリチウム (^3H) や炭素 14 (^{14}C) 標識化合物を用いた生化学的研究が盛んになるにつれて, 生体試料を液体シンチレーション計数装置で測定しなければならないことが多くなった. 著者等はすでに生体試料中の ^3H 測定のための routine method として利用できる測定法(前報³⁾)を発表した. 今回は生体試料中の ^{14}C の測定および ^3H と ^{14}C の同時測定について検討した.

実験結果

^{14}C の測定は, 前報に準じて行なった. 燃焼に供する乾燥生体試料を約 20 mg とした場合, 若干の余裕を考慮すると全燃焼炭素の量は, 4 mmole になる. 燃焼によって生成する ^{14}C -二酸化炭素 ($^{14}\text{CO}_2$) の吸収剤として methylamine, ethanolamine,⁴⁾ phenethylamine,⁵⁾ hyamine,⁶⁾ などが考えられるが, 4 mmole の CO_2 に対応するこれらの吸収剤の量は, それぞれ 250, 490, 970, 3840 mg となる. これら 4 種類の吸収剤の mmole 当りのクエンチング作用は hyamine が最も大きい. Phenethylamine を吸収剤に使ったときは, その炭酸塩のシンチレーターへの溶解性に, また hyamine は高価であることおよび著しいクエンチング作用を伴うことなどの問題点がある. したがって本報では, ^{14}C -ephedrine を臓器末に添加して, 燃焼した試料に対して市販の 40% methylamine 水溶液と ethanolamine の吸収剤としての優劣を比較した. Methylamine を吸収剤としたときの ^{14}C の回収率は 85.9% 標準偏差は 3.84% に対し, ethanolamine を吸収剤にしたシンチレーター-1 を用いたときには, ^{14}C の回収率は 96.3%, 標準偏差は 1.43% で, 後者の方がすぐれている. Table I に ethanolamine を吸収剤にして ^{14}C の回収率を求めた実験結果を一括した.

1) 日本薬学会第 87 年年会で発表, 京都, 1967 年 4 月.

2) Location: a) 4-chome, Kashiwagi, Shinjuku, Tokyo; b) 1-chome, Ikejiri, Setagaya-ku, Tokyo.

3) 馬場茂雄, 岩原滋利, 松田暁忠, 薬誌, 87, 830 (1967).

4) W. D. Conway, A. J. Grace, J. E. Rogers, *Anal. Biochem.*, **14**, 491 (1966).

5) F. H. Woeller, *Anal. Biochem.*, **2**, 508 (1961).

6) J. M. Possman, N. S. Radin, J. A. Cooper, *Anal. Chem.*, **28**, 484 (1956).

TABLE I. Recovery of the Radioactivity of ^{14}C -Ephedrine as $^{14}\text{CO}_2$ using Ethanolamine as a Fixative

Sample	^{14}C -Ephedrine (mg)	Channel A (cpm)	Ratio A/B	Specific activity (cpm/mg)	Recovery ^{a)} (%)
0 ^{b)}	4.785	7616	2.52	1581	100.0
1 ^{c)}	6.090	8936	2.75	1467	96.3
2	5.247	7793	2.56	1485	94.4
3	5.765	8507	2.64	1475	96.3
4	5.365	7916	2.92	1448	97.3
5	5.409	7963	2.76	1472	97.2
Mean					96.3
Standard deviation					1.43
Coefficient of variability					1.49

a) Recovery is corrected by channel ratio method.

b) Standard sample was prepared by dissolving ^{14}C -ephedrine in the same scintillator. Mean value for 3 samples.

c) About 20 mg of dried liver powder was added to each sample.

酸素フラスコ中に大過剰に存在する酸素のクエンチング作用は、 ^3H の場合には燃焼後生成したトリチウム水 ($^3\text{H}_2\text{O}$) を凝縮させたのち、窒素置換することにより低くすることができる。 ^{14}C の場合には、窒素置換できないが、シンチレータを加えたのち、窒素を約 2 分間吹き込むだけでクエンチング作用を少なくすることができた。その結果を Table II に示した。

TABLE II. Effect of N_2 -Bubbling to remove Oxygen Quenching

Sample	^{14}C -Ephedrine (mg)	N_2 -bubbling (2 min)	Channel A (cpm)	Ratio A/B	Specific activity (cpm/mg)
1 ^{a)}	4.445	no	6428	3.166	1446
2	4.317	no	6229	2.986	1442
3	2.700	no	4010	2.430	1485
Mean for 1—3				2.861	1458
4	3.895	yes	6029	2.584	1547
5	3.833	yes	5946	2.505	1551
6	3.641	yes	5568	2.646	1529
Mean for 4—6				2.578	1542

a) About 20 mg of dried liver powder was added to each sample.

Scintillator solution [toluene:ethylcellosolve:ethanolamine (48:40:12)] contains 0.6% of PPO and 0.03% dimethyl-POPOP.

同一臓器についての測定結果の再現性についても検討した。 ^{14}C -ephedrine $8.8\mu\text{Ci}/0.5\text{ ml}$ 生理食塩水を体重約 140 g のラットの腹腔内に注射し、2 時間後に肝臓を摘出し、前報の方法にしたがって燃焼試料を調製した。その結果は Table III に示すとおりで良好な再現性が得られた。

生体試料中の ^3H , ^{14}C を同時測定する場合、燃焼によって生成した $^3\text{H}_2\text{O}$, $^{14}\text{CO}_2$ を捕集するシンチレータとしては、かなりの親水性と同時に CO_2 を吸収し、かつ炭酸塩をよく溶かすようなシンチレータでなければならない。この目的に使用できるシンチレータの組成をいろいろ検討したが、シンチレータ-2 の組成のものが最もよい結果を与えた。 ^3H , ^{14}C 同時測定法に本法を適用したときの精度を検討するために、既知量の ^3H -testosterone と ^{14}C -ephedrine を乾燥臓器末に加えて燃焼させた。この場合には 1 時間ドライアイス-アセトンで酸素フラスコの底部を冷却し、 $^3\text{H}_2\text{O}$ を凝縮させたのち、シンチレータ-2 を 15 ml 注入し、酸素フラスコを動かして $^3\text{H}_2\text{O}$ を捕集する。つぎに 30 分間水冷しながら、ときどき振とうして $^{14}\text{CO}_2$ を捕集した。実験結果を Table IV に一括したが、回収率は ^3H で 99.8%, ^{14}C で 99.3%, 標準偏差はそれぞれ 1.29% と 1.48% であった。また ^3H , ^{14}C

TABLE III. Reproducibility of the Radioactivity Assay for the Liver of a Rat^{a)}

Sample	Tissue ^{b)} (mg)	Channel A (cpm)	Ratio A/B	Specific activity (cpm/mg)		Error ^{c)} (%)
				Uncorrected	Corrected	
1	22.9	6097	2.670	272.0	279.4	+0.5
2	18.4	5030	2.565	273.6	275.5	-0.8
3	17.3	4689	2.583	271.0	276.5	-0.4
4	23.6	6362	2.730	269.5	280.5	+1.1
5	24.6	6589	2.720	267.6	277.5	-0.1
Mean				270.7	277.9	
Standard deviation						0.75

a) Scintillator was the same as one of Table II.

b) Dried and powdered liver removed from the rat administered with 8.8 μ Ci 14 C-ephedrine.

c) $\left(\frac{\text{specific activity}}{277.9} \times 100\right) - 100$

のうちの一方が他方に比べて著しく大きな cpm を示すような試料 (sample の 6—11) の場合にもすぐれた精度が得られることがわかった。

TABLE IV. Results of Simultaneous Determination of 3 H and 14 C

Sample	Activity of sample ^{a)}		Recovery	
	3 H ^{b)} (dpm)	14 C ^{c)} (dpm)	3 H (%)	14 C (%)
1	12540	4995	97.2	97.2
2	22260	6878	100.3	97.7
3	19260	6145	99.8	100.0
4	18350	5835	99.4	99.4
5	17420	5235	98.9	97.2
6	1235000	4310	99.6	100.3
7	1201500	4185	99.8	100.0
8	1385000	4850	99.8	100.3
9	3720	6200	102.8	99.9
10	6735	11260	101.5	99.8
11	1835	3187	98.8	100.8
Mean			99.8	99.3
Standard deviation			1.29	1.48

a) About 20 mg of dried liver powder was added to each sample.

Scintillator solution [toluene:dioxane:ethylcellosolve:ethanolamine (44:4:40:12)] contains 0.5% of PPO and 0.04% dimethyl-POPOP.

b) 3 H-compound: 3 H-testosterone

c) 14 C-compound: 14 C-ephedrine

実験の部

装置 燃焼装置、臓器の粉末器は前報と同じものを使用した。液体シンチレーション計数装置は、 14 C の測定には、Aloka 製 LSC—201 を用い、印加電圧 Tap 5、波高選別電圧 A channel 5—13V、B channel 13—100 V に設定した。 3 H と 14 C の同時測定には、Aloka 製 LSC—501 を用い、波高選別器を Double mode にして測定した。

試薬 3 H-Testosterone は RCC 製 3 H-testosterone を前報に準じ、希釈して用いた。 14 C-ephedrine 生理食塩注射液は、約 10^6 dpm/mg の 14 C-ephedrine⁸⁾ を用い、回収率を求める実験には、これを約 2000 dpm mg まで希釈して用いた。

シンチレータの組成 シンチレーター-1 は、トルエン—エチルセロソルブ—エタノールアミン (48:40:12) の

8) 長瀬雄三, 馬場茂雄, 山田泰司, 松山陽太郎, 薬誌, 81, 1479 (1961).

混合液に PPO 6 g/liter, ジメチル POPOP 0.3 g/liter の割合に溶かして調製した。

シンチレータ-2 は, トルエン—ジオキサン—エチルセロソルブ—エタノールアミン (44:4:40:12) の混合液に, PPO 5 g/liter ジメチル POPOP 0.4 g/liter の割合に溶かして調製した。

操作法 臓器の乾燥と粉末化, 燃焼試料の調製は, 前報にしたがって行なった。(燃焼試料の調製のための容器として, 2×2 cm の沓紙上に試料をはかり取り, 糸を導大線とし, その上からセロテープを貼り合わせて調製してもよい。)

測定試料の調製も前報に準じて行なうが, ^{13}C 測定試料の調製は, 燃焼後, 酸素フラスコ中が減圧となるよう加減して酸素を充填し, 試料を燃焼させ, ただちに氷冷し, シンチレータ-1 を 15 ml 注入して酸素フラスコの底部を 30 min 氷冷しながら, とくどき振とうして, $^{14}\text{CO}_2$ を吸収させ, 炭酸塩を溶解させた後, バイアルに移す, さらに 5 ml のシンチレータ-1 で酸素フラスコを煮沸してバイアルに移す。

外部線源法による計数効率補正曲線の作成 Aloka 製 LSC—201 使用のときの補正は前報に準じた。LSC—501 を使用するとき, ^3H および ^{14}C 標準試料に *n*-ニトロアニリン 0.75% EtOH 溶液 0–0.3 ml をクエンチャーとして加え, 外部線源に対する channel ratio と A,B channel に対する ^3H , ^{14}C の計数効率および ^{14}C の A channel に落ち込む割合との関係を求めた。

謝辞 終わりに本研究に対して, 御助言を賜った東京薬科大学男子部長, 長瀬雄三教授, 御鞭撻を賜った陸上自衛隊関係上司に感謝いたします。また測定に一部御便宜をいただいた国立公衆衛生院放射線衛生部に感謝します。

〔薬学雑誌〕
YAKUGAKU ZASSHI
88 (5) 638—642 (1968)

UDC 547.722.04.07 : 542.958

フラン誘導体の合成化学的研究 (第36報¹⁾) Wittig 反応 によるフラン誘導体の合成²⁾

西海枝東雄, 中村周三
九州大学薬学部³⁾

Synthesis of Furan Derivatives. XXXVI.¹⁾ Synthetic Studies on Furan Derivatives by Wittig Reaction²⁾

HARUO SAIKACHI and SHUZO NAKAMURA
Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of Kyushu³⁾

(Received September 21, 1967)

As the new salt of the Wittig reagent, 5-nitrofurylmethylenetriphenylphosphonium chloride, furylmethylenetriphenylphosphonium chloride, 5-nitrofuroylmethylenetriphenylphosphonium bromide, and furoylmethylenetriphenylphosphonium bromide were prepared. Olefination was carried out by the conventional method using these phosphonium salts with 5-nitro-, 5-methyl-, and 5-bromo-furfural, furfural, 3-(2-furyl)acrolein, 3-(5-nitro-2-furyl)acrolein, and 5-(5-nitro-2-furyl)-2,4-pentadienal. Products from each of these reactions were submitted to elution chromatography for separation into *cis* and *trans* isomers but the separation was not effected.

前報¹⁾において cyanomethylenetriphenylphosphorane と数種の 5-置換 furfural との反応で, 種々の外部因子²⁾による *cis* および *trans* 異性体の生成比の変化を gas chromatography で定量的に測定した。本報は Wittig 反応の機構解明の一画として本研究上必要な新試料を得る目的で, フラン誘導体の合成化学的研究を行なった結果について報告する。まずフラン誘導体の Wittig 試薬類を合成するために最初 5-nitrofurfural を出発原料として

1) 第 35 報: 薬誌, 88, 110 (1968)。

2) 日本薬学会第 85 年年会発表, 徳島, 1965 年 10 月。

3) Location: Katakasu, Fukuoka.