ビオチン関連化合物の標識化とその微量分析への利用研究 (第3報¹⁾) *d*-ビオチンの
還元脱硫による *d*-テチオビオチンの選択的トリチウム化について²⁾

嶋田健次, 長瀬雄三, 松本 潮
東京薬科大学³⁾

Studies on Labeling and Application to Microanalysis of Biotin Related
Compounds. III.¹⁾ Selective Tritiation of *d*-Dethiobiotin
by Reductive Desulfurization of *d*-Biotin²⁾

KENJI SHIMADA, YŪZO NAGASE and USHIHO MATSUMOTO
Tokyo College of Pharmacy³⁾

(Received September 21, 1968)

d-Dethiobiotin tritiated at selective positions can be prepared by reductive desulfurization of *d*-biotin with Raney nickel catalyst. Three combinations of the solvent (water) and the catalyst (Raney nickel) were examined as follows:

- 1) Tritiated water and ordinal Raney nickel (W-2)
- 2) Tritiated water and ³H₂ gas-adsorbed Raney nickel
- 3) Non-labeled water, and Raney nickel adsorbed with tritium gas. Although *d*-dethiobiotin was labeled with tritium by any of these combinations, labeled products with high specific radioactivity were obtained with ³H₂-adsorbed Raney nickel in 2) and 3). In order to clarify whether the tritium incorporated into ³H-*d*-dethiobiotin is derived from tritium water or ³H₂-adsorbed catalyst, the tritiation mechanisms were investigated. Tritium atoms were shown to be freely interchangeable between the solvent (³H₂O) and the catalyst (³H₂-adsorbed Raney nickel) during the catalytic desulfurization of *d*-biotin.

The tritiated *d*-dethiobiotin obtained was assumed to be predominantly 5-methyl[³H]-2-oxo-4-imidazolidinehexanoic[6-methylene-³H] acid from infrared and nuclear magnetic resonance data of ³H-*d*-dethiobiotin prepared by the reductive deuterization of *d*-biotin using an analogous method.

有機化合物のトリチウム標識法としては、トリチウムガスによる不飽和結合その他の接触還元法、トリチウム水浸漬法、Wilzbach 法、反跳法など各種の方法が知られている。最近さらに ³H-リン酸・三フッ化ホウ素⁴⁾、³H-酢酸・三フッ化ホウ素⁵⁾ などの試薬を用いるトリチウム化法も開発されるに至った。

Chart 1

- 1) 第2報: 嶋田健次, 長瀬雄三, 松本 潮, 薬誌, 89, 38 (1969).
- 2) 日本薬学会第87年年会, 京都, 1967年4月および第5回理工学における同位元素研究発表会, 東京, 1968年4月で発表. 本研究の1部は速報とした. K. Shimada, Y. Nagase, U. Matsumoto, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), 16, 1632 (1968).
- 3) Location: No. 600, Kashiwagi-4-Chome, Shinjuku-ku, Tokyo.
- 4) P.M. Yavorsky, E. Gorin, *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 1071 (1962); B.D. Hilton, R.D. Obrien, *J. Agr. Food Chem.*, 12, 236 (1964).
- 5) T. Gosztonyi, J. Márton, A. Kovács, *Nature*, 208, 381 (1965).

トレーサー用標識体の調製法としては、特定位置への高比放射能標識体を、複雑な反応過程を経ずに標識できることが望ましい。著者等は前報¹⁾において Wilzbach 法による *d*-biotin のトリチウム標識化、ならびに標識体の β 線分解について報告した。本報では *d*-dethiobiotin の選択的位置のトリチウム標識化を目的として、*d*-biotin の還元的脱硫反応による高比放射能標識体の調製法と、そのトリチウム化機構について検討した。

d-Dethiobiotin (II) は *d*-biotin (I) の微生物学的前駆体として知られ、ビオチン関連化合物中ではきわめて重要な位置を占めている。II の選択的位置へのトリチウム標識体の調製法として、Chart 1 に示す 2 種の経路が考えられる。4, 5 位に炭素・炭素二重結合を有するイミダゾロン誘導体 (III) から接触還元によって *d*-dethiobiotin を得る Wood 等⁶⁾ および Duschinsky 等⁷⁾ の方法をトリチウム化に利用する経路は、III の合成過程の長いことが難点となる。これに対して、Melville 等⁸⁾ が *d*-biotin (I) をラネーニッケルで還元的に脱硫し *d*-dethiobiotin とした経路はトリチウム化に適切と考えられる。

ラネーニッケルによる常圧下の還元脱硫を利用したトリチウム標識法の実例としては、チオフェンカルボン酸類が開環して直鎖状の脂肪酸に還元される際に ^3H 原子が脂肪酸に導入された報告⁹⁾ があるにとどまり、*d*-biotin のようにチオラン環の還元脱硫的トリチウム化の例は見あたらない。そこで著者等は *d*-biotin を出発物質とし、*d*-Dethiobiotin の選択的位置のトリチウム標識を 1 行程で行ないうる方法として、上記 Melville 等⁸⁾ の還元脱硫法を適用した。

トリチウム水およびラネーニッケルによる *d*-Dethiobiotin (1. a) の生成

d-Biotin をトリチウム水 (比放射能 113 mCi/ml) に溶かし (0.5% 炭酸ナトリウム含有)、ラネーニッケル (W-2) を加え、脱硫と同時に *d*-dethiobiotin をトリチウム化した (Chart 2)。反応直後の標識試料は、3 種の展

Chart 2

開溶媒系 (a, b および d)¹⁰⁾ によるラジオペーパースキャンノグラムで、いずれも 1 個の放射能ピークのみを示した。後述のように本法によれば、もとの *d*-biotin の 2, 5 位が選択的にトリチウム化されて脱硫した $^3\text{H-}d\text{-dethiobiotin}$ が得られる。本標識法による $^3\text{H-}d\text{-dethiobiotin}$ の比放射能は 33.8 $\mu\text{Ci}/\text{mmole}$ であった。また本標識体の固相における安定性を検討するために、3 カ月間室温に放置してからラジオペーパースキャンノグラムは、Fig. 1 のように溶媒前線近くに構造不明の放射性分解産物が生ずることを認めた。これは $^3\text{H-}d\text{-dethiobiotin}$ の β 線分解に基づくものと考えられ、面積強度比から算出すると、全放射能の約 6% にあたる。

トリチウム水およびトリチウムガス吸蔵ラネーニッケルによる $^3\text{H-}d\text{-Dethiobiotin}$ (1. b) の生成

より高比放射能の $^3\text{H-}d\text{-dethiobiotin}$ を得るために、トリチウムガスを吸蔵させたラネーニッケルを用いて還元的トリチウム化する新規の方法について検討した。すなわち、減圧下 Wilzbach 装置中 2 Ci のトリチウムガスと 4 日間接触させたラネーニッケルとトリチウム水 (比放射能 19.5 mCi/ml) を用い、以下 (1. a) と同様に操作する。本法によって得られた標識体はラジオペーパースキャンノグラムの面積強度から算出して、約 13% 相当の放射性副生物を混在する。この不純物は *d*-dethiobiotin との分離能の良好な溶媒系 b による PPC で除き、 $^3\text{H-}d\text{-dethiobiotin}$ 相当部分を温湯で抽出して精製した。本標識法によって得られた $^3\text{H-}d\text{-dethiobiotin}$ の比放

6) J.L. Wood, V. du Vigneaud, *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 210 (1945).

7) R. Duschinsky, L.A. Dolan, *ibid.*, **67**, 2079 (1945).

8) D.B. Melville, K. Dittmer, G.B. Brown, V. du Vigneaud, *Science*, **98**, 497 (1943).

9) N.P. Buu-Hoi, *Nature*, **180**, 385 (1957).

10) ペーパークロマトグラフィー (以下 PPC と略す) 用展開溶媒系:

a: ブタノール-1 N 塩酸 (6:1) b: ブタノール-ピリジン-水 (1:1:1) c: ブタノール-酢酸-水 (4:1:5)

d: 三級ブタノール-アセトン-水-濃アンモニア水 (40:35:20:5)

Fig. 1. Radio-paperscannograms of ^3H -*d*-Dethiobiotin

(A) immediately after tritiation (B) 3 months later
 solvent systems: a) BuOH-1N HCl (6:1) b) BuOH-pyridine- H_2O (1:1:1)
 d) *tert*-BuOH-acetone- H_2O -conc. NH_3 aq. (40:35:20:5)
 //: color developed with *p*-dimethylaminocinnamaldehyde

射能は 1.05 mCi/mmole で, (1. a) の還元法によるものの約 31 倍に上昇した。

軽水およびトリチウムガス吸蔵ラネーニッケルによる ^3H -*d*-Dethiobiotin (1. c) の生成

ラネーニッケルを Wilzbach 装置中で 2 Ci のトリチウムガスと 5 日間接触させる。このトリチウムガス吸蔵ラネーニッケル触媒と軽水とを用い、*d*-biotin から *d*-dethiobiotin への還元的トリチウム化を実施した。得られた標識体には、3 種の溶媒系によるラジオペーパー・スキャンノグラムから、約 17% の放射性不純物が検出された。その 1 例を Fig. 2 に示す。この放射性不純物は水による再結晶を繰り返しても除去できず (戸紙電気泳動¹¹⁾ では *d*-dethiobiotin の単一ピークを示した)、溶媒系 d による PPC で精製した。単離した標識体のラジオペーパー・スキャンノグラムは、3 種の溶媒系 (a, b および d) でいずれも単一ピークを示し、*p*-ジメチルアミノシンナムアルデヒド (以下 *p*-DACA と略す) 試薬のスプレーによる非放射性 *d*-dethiobiotin の発色¹²⁾ 帯と一致した。液体シンチレーション計数装置により測定した結果、単離精製した ^3H -*d*-dethiobiotin の比放射能は 33.1 mCi/mmole であった。

Fig. 2. Radio-paperscannogram of Products of Reductive Desulfurization of *d*-Biotin with Tritium Gas-adsorbed Raney Ni and Water

solvent system: *tert*-BuOH-acetone- H_2O -conc. NH_3 aq. (40:35:20:5)
 //: color developed with *p*-dimethylamino-cinnamaldehyde

Fig. 3. Radio-paperscannograms of *dl*-Dethiobiotin exposed with 5.7 Ci of $^3\text{H}_2$ Gas for 2 Days

solvent systems: a) BuOH-1N HCl (6:1)
 b) BuOH-pyridine- H_2O (1:1:1)
 c) BuOH-AcOH- H_2O (4:1:5)
 //: color developed with *p*-dimethylamino-cinnamaldehyde

11) 酢酸-ピリジン-水 (10:1:89) pH 3.6, Whatman 3 MC, 250 V, 3 hr.

12) 佐藤和男, 津田 健, 端 邦雄, 日本薬学会第 85 年年会, 福岡, 1965年 4 月, 要旨集, p. 160.

なお (1. b), (1. c) で用いた ラネーニッケルにおいて, トリチウムはニッケルと $\text{Ni } ^3\text{H}$ または $\text{Ni}(^3\text{H})$ を形成していると考えられる.

$d\text{-Dethiobiotin}$ の Wilzbach 法によるトリチウム化

上述の還元脱硫法によるトリチウム標識法と比較するために, Wilzbach 法¹³⁾ による dethiobiotin のトリチウム化を試みた.

$d\text{-Dethiobiotin}$ を 5.7 Ci のトリチウムガスと室温において 2 日間接触させる. 得られたトリチウム標識体のラジオペーパースキャンノグラムを Fig. 3 に示す. かなりの放射性副生物の伴うことが認められ, $p\text{-DACA}$ 試薬によって (de) 相当部分のみが発色して標品の R_f 値と一致することから, 放射能ピーク (de) が dethiobiotin であると同定された.

トリチウム水とラネーニッケル間のトリチウム原子の交換および $^3\text{H}\text{-}d\text{-Dethiobiotin}$ (2. a) の生成

つぎに前記 (1. a) ないし (1. c) の方法による $^3\text{H}\text{-}d\text{-dethiobiotin}$ の調製過程における, ラネーニッケルと水との間での ^3H 原子の交換の有無, およびトリチウム化反応の機構について検討を加えた.

Fig. 4. Decrease in Radioactivity by Water-washings of Tritium Water-treated Raney Ni

ラネーニッケルを触媒として, $d\text{-biotin}$ の脱硫反応を行なったところ, $0.13 \mu\text{Ci}/\text{mmole}$ の比放射能を有する $^3\text{H}\text{-}d\text{-dethiobiotin}$ が得られた. この 16 回水洗ずみのラネーニッケルを用いてもトリチウム標識された $d\text{-dethiobiotin}$ が生成するという現象は, ラネーニッケル表面に吸着していたトリチウムが水洗操作で一応除去されても, 多孔質性のニッケル触媒内に吸蔵された ^3H 原子は単なる水洗では除去されずに残存することを示す. これが脱硫時接触的に $d\text{-dethiobiotin}$ に取り込まれてトリチウム標識化を行なうものと考えられる.

軽水とトリチウムガス吸蔵ラネーニッケル間のトリチウム原子の交換および $^3\text{H}\text{-}d\text{-Dethiobiotin}$ (2. b) の生成

(2. a) とは別に, ラネーニッケルに吸蔵されたトリチウムガスと軽水との間にトリチウムの交換が行なわれることの有無を調べ, ついで軽水とこのラネーニッケルを用いて $d\text{-biotin}$ の脱硫反応を行なうことを試みた.

ラネーニッケルを Wilzbach 装置中で 10—20 mCi のトリチウムガスと 24 時間接触させる. このトリチウムガス吸蔵ラネーニッケルを軽水 10 ml ずつで反覆洗浄し, 各水洗液の比放射能を測定した結果を Table I に示す. すなわち, ニッケルに吸蔵されていたトリチウムが相当多量に軽水と交換していることが確認された. Table I の洗浄 5 回目の水洗液の比放射能は $15.0 \mu\text{Ci}/\text{ml}$ である. この 5 回水洗後のラネーニッケルを用いて $d\text{-biotin}$

TABLE I. Specific Activity of Water-washings for Raney Ni exposed with about 15 mCi of Tritium Gas

Washing times	Sp. act. (cpm/10 μl)	Washing times	Sp. act. (cpm/10 μl)
1	1.31×10^6	4	2.56×10^4
2	3.96×10^5	5	1.60×10^4
3	7.15×10^4		

13) K.E. Wilzbach, *J. Am. Chem. Soc.*, **79**, 1013 (1957).

の脱硫反応を行なうと、比放射能 $0.67 \mu\text{Ci}/\text{mmole}$ の ^3H -*d*-dethiobiotin が得られた。

以上の結果から *d*-biotin の脱硫反応による ^3H -*d*-dethiobiotin への還元的トリチウム化において、トリチウムの導入される機構はつぎのように考えられる。触媒のラネーニッケルと溶媒間で Chart 3 のようなトリチウム原子の可逆的の交換が生じ、この可逆的にラネーニッケル触媒に交換されたトリチウム原子が *d*-biotin の脱硫反応に際して取り込まれ、 ^3H -*d*-dethiobiotin を生成する。すなわち、*d*-dethiobiotin を単にトリチウム化することが目的ならば、ラネーニッケル触媒か、反応溶媒である水のいずれか一方をトリチウム源として用いれば標識化が可能である。

Chart 3

^3H -*d*-Dethiobiotin の選択的トリチウム標識化位置の証明

トリチウム化と同様に重水と重水素ガス吸蔵ラネーニッケルとを用いて重水素化した ^2H -*d*-dethiobiotin を用い、その赤外部吸収スペクトル (以下 IR スペクトルと略す) と、核磁気共鳴スペクトル (以下 NMR スペクトルと略す) とから、 ^3H -*d*-dethiobiotin が選択的にトリチウム標識化される可能性を検討した。Fig. 5 に IR スペクトル (KBr 錠剤法) を、Fig. 6 に NMR スペクトル (D_2O , 0.5% Na_2CO_3) をそれぞれ示す。標品 *d*-dethiobiotin の IR スペクトルの δ_{CH_3} 1380 cm^{-1} の吸収強度に比べて重水素化体のそれは弱まり、一方、 δ_{CH_2} 1463 cm^{-1} の吸収強度が他の吸収と重なって増大する。 ^2H -*d*-dethiobiotin の NMR スペクトル (Fig. 6b) からプロトンの積分強度比を算出すると、 $\delta_{1.08}$ の CH_2D は 2H, $\delta_{1.37}$ の $\text{CHD}(\text{CH}_2)_3$ は 7H で、それぞれ 1H ずつ Fig. 6a のそれに比べて減少し、 $\delta_{2.12}$ の CH_2CO のプロトン数は全

Fig. 5. Infrared Absorption Spectra of *d*-Dethiobiotin and ^3H -*d*-Dethiobiotin (KBr Tablet)

— *d*-dethiobiotin
 ----- ^3H -*d*-dethiobiotin

Fig. 6. Nuclear Magnetic Resonance Spectra of *d*-Dethiobiotin and ^3H -*d*-Dethiobiotin in D_2O (0.5% Na_2CO_3)

a) *d*-dethiobiotin b) ^3H -*d*-dethiobiotin

く変化しなかった。これら IR および NMR スペクトルによって、*d*-dethiobiotin (II) (5-methyl-2-oxo-4-imidazolidinehexanoic acid) の 5-CH_3 基には確実に、また 3, 4, 5 および 6-CH_2 基のうちいずれかに重水素化が行なわれたことが示され、おそらくは 5-CH_3 基と、6 位の置換された ^2H -*d*-dethiobiotin が主として生成すると考えられる。以上の重水素化の結果からトリチウム標識化の位置を推定すると、ラネーニッケルによる還元脱硫反応で調製した ^3H -*d*-dethiobiotin は予期のとおりに選択的にトリチウム標識された 5-methyl[^3H]-2-oxo-4-imidazolidinehexanoic[6-methylene- ^3H] acid を主体とするものと考えられる。なお、このトリチウム化位置の証明に関しては、化学的分解によってトリチウムの分布を算出する予定である。

トリチウム水中でラネーニッケルを調製すれば、トリチウム標識体の比放射能を一層高くすることも可能であると考えられる。高比放射能の標識体を調製するための、トリチウムガス吸蔵ラネーニッケルを用いる方法は、biotin および biocytin, biotin sulfoxide などのビオチン関連化合物をはじめとするチオラン環状化合物の還元脱硫的トリチウム化のみならず、炭素・炭素不飽和化合物、カルボニル化合物およびニトロ化合物などの還元による高比放射能のトリチウム化体の調製などにも広く応用できると考えられ、高比放射能トリチウム標識体の調製法として本法はきわめて有効であると考えられる。

実 験 の 部

1. a) $^3\text{H}_2\text{O}$ および Raney Ni による *d*-Dethiobiotin のトリチウム化 d -Biotin (Merck) 50.5 mg を $^3\text{H}_2\text{O}^{14)}$ (113 mCi/ml) を含む 0.5% Na_2CO_3 15 ml に溶かし、常法により Ni-Al 合金 (Ni 48%) から調製した Raney Ni (W-2 型)¹⁵⁾ をあらかじめ 50° に加温して加え、 75° , 15 min 加熱。遠心分離で Raney Ni を除き、0.5% Na_2CO_3 2 ml で 2 度、水 2 ml で 2 度 Raney Ni を水洗する。反応液および洗液は合わせて dil. HCl で Congo Red 酸性とし、減圧下 dry ice-acetone トラップで $^3\text{H}_2\text{O}$ を捕集。標識体は水から再結晶。これは a, b および d の溶媒系によるラジオペーパースキャンノグラム上単一ピークを示し、*p*-DACA で発色させた *Rf* 値に一致。比放射能 33.8 $\mu\text{Ci}/\text{mmole}$ 。

1. b) $^3\text{H}_2\text{O}$ および $^3\text{H}_2$ ガス吸蔵 Raney Ni による *d*-Dethiobiotin のトリチウム化 Raney Ni (W-2 型) の EtOH 懸濁液 (Raney Ni として 5 g) を Wilzbach 装置中で減圧下 EtOH を留去して乾固させ、直ちに $^3\text{H}_2^{16)}$ 2 Ci を封じ 4 日間接触させた $^3\text{H}_2$ 吸蔵 Raney Ni を、*d*-biotin 52.8 mg を $^3\text{H}_2\text{O}$ (19.5 mCi/ml) を含む 0.5% Na_2CO_3 15 ml に溶かした混液に加える。以後の操作は (1. a) と同様。標識試料の一部 (6.21 mg) は溶媒系 b で Whatman 3 MC (46.4 $\times$ 40 cm) を用いた PPC で、 ^3H -*d*-dethiobiotin 相当部分を切断細片し、温湯 100 ml で抽出、減圧濃縮で精製。抽出乾燥試料 0.38 mg に非放射性の *d*-dethiobiotin 37.66 mg を加えて radio-PPC 用の希釈体を調製。溶媒系 a, b および d によるラジオペーパースキャンノグラムからは単一ピークが得られ、*p*-DACA による発色帯と一致。比放射能 1.05 mCi/mmole。

1. c) 軽水および $^3\text{H}_2$ ガス吸蔵 Raney Ni による ^3H -*d*-Dethiobiotin の調製法 Raney Ni の EtOH 懸濁液 (Raney Ni として 5 g) を Wilzbach 装置中、(1. b) の調製法と同様に EtOH を除き $^3\text{H}_2$ 2 Ci と 5 日間接触させ、接触終了時に容器を dry ice-acetone 冷却下に取りはずす。*d*-biotin 54.4 mg に軽水溶媒を用いた接触的トリチウム化で、ラジオペーパースキャンノグラム上約 17% の放射性不純物を検出。d を溶媒系とし、Whatman 3 MC の PPC により分離精製。溶媒系 a, b および d の 3 種の radio-PPC で放射化学的に純粋であることを確認。比放射能 33.1 mCi/mmole。

2. a) $^3\text{H}_2\text{O}$ および Raney Ni 間の ^3H 原子の交換と *d*-Dethiobiotin のトリチウム化 Raney Ni の EtOH 懸濁液 (Raney Ni として 5 g) を $^3\text{H}_2\text{O}$ (2.5 mCi/ml) 15 ml と Na_2CO_3 75 mg の混液 (0.5% Na_2CO_3 に相当) に加え、 75° , 15 min 加熱する。遠心分離により上澄液を除き、10 ml の軽水を加え 1 min 振り混ぜて各洗液を集める。16 回の洗浄操作を行なった。各洗液を適当に希釈してその 0.01—0.1 ml をとり放射能を測定する。16 回目水洗液の比放射能 7.35 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 。水洗後の Raney Ni を *d*-biotin 51.1 mg の 0.5% Na_2CO_3 15 ml に加え還元反応を行なう。得られた *d*-dethiobiotin は a, b および d 3 種の溶媒系による PPC での *p*-DACA 発色で単一スポット。比放射能 0.13 $\mu\text{Ci}/\text{mmole}$ 。

2. b) 軽水と $^3\text{H}_2$ ガス吸蔵 Raney Ni 間の ^3H 原子の交換と *d*-Dethiobiotin のトリチウム化 Raney Ni の EtOH 懸濁液 (Raney Ni として 5 g) を Wilzbach 装置中に入れ、EtOH を減圧留去し、10—20 mCi の $^3\text{H}_2$ と 24 hr 接触する。この $^3\text{H}_2$ 吸蔵 Raney Ni を共栓試験管に移し、軽水 10 ml ずつで 1 min 激しく振り、遠心分離により洗液を集める。以上の洗浄操作を 5 回行なう。各洗液の 0.01 ml をとり放射能を測定。5 回目洗液の比放射能は 15.0 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$ 。この $^3\text{H}_2$ 吸蔵 Raney Ni と軽水とを用いて *d*-biotin (Roche) 51.3 mg を脱硫し、a, b および d 3 種の溶媒系による PPC での *p*-DACA 発色で単一スポットを示す *d*-dethiobiotin を得た。比放射能 0.67 $\mu\text{Ci}/\text{mmole}$ 。

^3H -*d*-Dethiobiotin の安定性 ^3H -*d*-Dethiobiotin (1. a) を室温で 3 カ月間暗所に固相状態で放置し、標識化直後と同一の a, b および d の溶媒系によるラジオペーパースキャンノグラムの面積を積分計 (島津製作所製複式プランニングメータ) で求め、標識化直後の面積を基準にして 3 カ月目の試料の面積比を算出。

Wilzbach 法による *dl*-Dethiobiotin のトリチウム化 *dl*-Dethiobiotin (Sigma) 10.9 mg に 5.7 Ci の $^3\text{H}_2$ を Wilzbach 装置中で 48 hr 接触。labile な置換 ^3H 原子は MeOH 5 ml ずつで 5 回蒸留して除去。

14) トリチウム水 ($^3\text{H}_2\text{O}$): The Radiochemical Centre Amersham, England. Tritiated water 0.43 ml—2 Ci を希釈して使用。

15) R. Mozingo, "Organic Syntheses," Coll. Vol. III, John Wiley and Sons, Inc., New York, N.Y., 1941, p. 181.

16) トリチウムガス ($^3\text{H}_2$ Gas): The Radiochemical Centre Amersham, England. Tritium Gas 98% T_2/H_2 .

***d*-Dethiobiotin の重水素化** *d*-Biotin 51.0 mg を $D_2O^{17)}$ を含む 0.5% Na_2CO_3 15 ml に溶かす。これにトリチウム吸蔵のときと同様にして 1 liter の $D_2^{18)}$ と Wilzbach 装置中で 7 日間接触させた D_2 吸蔵 Raney Ni (W-2 型) 5 g を加え, (1. a) ないし (1. b) の方法に準じて還元的に脱硫反応を行なった。 3H -*d*-Dethiobiotin の収量 19.0 mg. PPC での *p*-DACA 発色で単一スポットを示す。

放射能の測定 日本無線医理学研究所製 Aloka LSC-501 型液体シンチレーション計数装置。シンチレーター組成: PPO 4.0 g, dimethyl POPOP 0.4 g, naphthalene 100 g を toluene-dioxane-methyl cellosolb (3:15:2) 1000 ml に溶解。各種 3H -*d*-dethiobiotin 標識体は一定量をあらかじめ水 0.1—0.2 ml に溶かし, 水性試料の場合には直接に, いずれもシンチレーター 15 ml ずつを注入。外部線源法により計数効率を補正。

Radio-paper Chromatoscanner 日本無線医理学研究所製 PCS-4 型 4 π paper chromatoscanner. Velocity: 12.5 mm/min, Full scale: 3—30 K, Slit width: 3 mm, Response: 10 sec.

スペクトルの測定 IR スペクトルは日本分光 DS-301 型を, NMR スペクトルは日本電子製 100 Mc, JNM-4H-100 型を使用し, D_2O 溶媒中 tetramethylsilane を内部規準とした。

謝辞 *dl*-Dethiobiotin 標品を恵与された国立衛生試験所の新村寿夫博士, Wilzbach 装置使用の便宜を与えられた国立公衆衛生院の高瀬 明博士, 出雲義朗氏および根本特殊化学 K.K., ならびに NMR スペクトルを測定された本学 小野俊雄氏に深謝いたします。

17) E. Merck (Germany) 社製 D_2O , スペクトル用 (99.75%).

18) 高千穂化学 K.K. 製。