感謝致します。

此の報告の大部分は 1957 年 4 月の農芸化学大会で報告した。

- (1) H. O. Halvorson, S. Spiegelman : *J. Bact.*, 64, 207 (1952) ; *Arch. Biochem.*, 55, 512 (1955).
- (2) H. O. Halvorson, S. Spiegelman : *J. Bact.*, 65, 496 (1953) ; *ibid.*, 65, 601 (1953).
- (3) S. Spiegelman et al. : A Symposium on Amino Acid Metabolism (1955).
- (4) B. Rotman, S. Spiegelman : *J. Bact.*, 68, 419 (1954).
- (5) A. Markovitz, H. P. Klein : *J. Bact.*, 70, 649 (1955).
- (6) 須田正己等 : 酵素化学シンポジウム, 9, 88 (1954).
- (7) 福本寿一郎, 山本武彦, 鶴 大典 : 本誌, 31, 545 (1957).
- (8) M. Nomura : International Symposium on Enzyme Chemistry, Tokyo (1957).
- (9) H. Tarver et al. : *J. Biol. Chem.*, 192, 835 (1951) ; *ibid.*, 217, 169 (1955).
- (10) M. Rabinovitz et al. : *J. Biol. Chem.*, 227, 217 (1957).
- (11) G. Brawerman et al. : *Arch. Biochem.*, 68, 112 (1957).
- (12) G. Mandil : *J. Biol. Chem.*, 225, 137 ; *ibid.*, 225, 151 (1957).
- (13) 外村健三, 田辺 脩 : 農芸化学会大会講演 (1957).
- (14) 田辺 脩, 外村健三 : 本誌, 28, 227 (1954).
- (15) W. C. Schneider : *J. Biol. Chem.*, 161, 293 (1945).
- (16) R. J. L. Allen : *Biochem. J.*, 34, 858 (1940).
- (17) E. F. Gale : *J. Gen. Microbiol.*, 1, 53 (1947).
- (18) 和田津 淳 : 本誌, 30, 229 (1956).
- (19) H. Rosen : *Arch. Biochem.*, 67, 10 (1957).

有機殺虫剤のクロマトグラフィー (第1報)*

フェニールセロソルブ付濾紙による殺虫剤の分離

穴 戸 孝, 諏訪内正名 (農林省農業技術研究所)

昭和 33 年 4 月 15 日 受 理

緒 言

パラチオンを始めとする有機燐系殺虫剤, 及び BHC, DDT, aldrin 等の有機塩素系殺虫剤は非解難性で水に難溶な為に水を固定相とした通常のペーパークロマトグラフィーではうまく分離できない。一般にこのような親油性物質のペーパークロマトグラフィーは水以外の極性溶媒を濾紙に保持させ, この固定相と自由に混和しない, より極性の弱い有機溶媒で展開する分離法⁽¹⁻³⁾が行われている。その外に, これとは逆に極性の小さい溶媒を固定相とし, より極性の大きい溶媒を移動相とする逆相クロマトグラフィー^(4,5)も用いられることが多い。

多成分の混在する有機殺虫剤もこれらのクロマト系を利用して分離が行われてきた。塩素系殺虫剤では Moynihan 等⁽⁶⁾が無水醋酸を固定相とし移動相には *n*-ヘキサンを用いて BHC 異性体の分離を行っている。Winteringham 等は水-アルコール-アンモニア/ワセリン系溶媒で DDT 誘導体⁽⁷⁾, BHC 異性体⁽⁸⁾を分離し, Gruch⁽⁹⁾は同様な方法で BHC, DDT の逆相分離に成功している。Mitchell⁽¹⁰⁾は無水醋酸等の溶媒を固定相とし *n*-ヘキサン, オクタン等の無極性溶媒で展開する正相型, 及び大豆油を固定相にし移動相にアセトン, アセトニトリル, ピリジン等の水溶液を用いた逆相型で, DDT, BHC, ドリン剤等の殺虫剤や, 塩素系殺菌剤, 植物生長ホルモン等 40 数種にわたる塩素系農薬の分離を行っている。

一方, パラチオンその他の有機燐化合物のペーパークロマトグラフィーでは Metcalf 等がアルコール-クロホルム-水/シリコン 550 の溶媒系によりパラチオン異性体, 誘導体⁽¹¹⁾, systox 異性体, 誘導体⁽¹²⁾, malathion, 及びその代謝産物⁽¹³⁾の分離を行っている。その他 diazinon 系化合物の逆相分離^(14,15), シリカ付濾紙によるパラチオン異性体の分離⁽¹⁶⁾, 石油エーテル-ペンゼン/プロピレングライコール系溶媒でパラチオン,

* Chromatography of Organic Insecticides. Part I. Separation of Insecticides on Phenylcellosolve Treated Paper.

By Takashi SHISHIDO and Masana SUWANAI (National Institute of Agricultural Sciences, Tokyo)

パラオキシソン, パラニトロフェノール (PNP) の分離⁽¹⁷⁾ や, 薬剤処理しない濾紙でエーテル-石油エーテルによるパラチオン, PNP の分離等を行った例が数々あげられる. しかし燐化合物のペーパークロマトグラフィーはパラチオン, systox 異性体, 或は生体内生成物の分離を目的としたもので, かなり極性の異ったもの相互の分離であって, 性質の近似した個々の燐殺虫剤の分離には適しない. 各燐剤の相互分離を行った例では Cook⁽¹⁹⁾ が流動パラフィンを固定相とし水-アセトン-アルコールで展開し, 6 種の燐剤を分離したものがあり, 又住木, 松山^(20,21) はメタノール或はエチレンクロロヒドリン等の有機溶媒を固定相とし *n*-ヘキサンを移動相として使用した実験, 及び大豆油を固定相としアルコール或はアルコール-ニトロメタン系溶媒で展開した逆相型により 17 種の有機燐剤と *r*-BHC, *p,p'*-DDT の分離を行ったものを報告している.

著者は有機燐, 塩素系殺虫剤の相互分離にあたり, 各種溶媒を検索した結果 Neher 等⁽⁹⁾ がかなり極性の低いステロイドの分離に利用したエチレンジグリコールモノフェニールエーテル (フェニールセロソルブ) が固定相としてすぐれている事を見出した. 更にこのフェニールセロソルブとプロピレンジグリコールの混合物を固定相とし *n*-ヘキサン, クロロホルム, ベンゼン, アセトニトリル等の混合溶媒を移動相とするペーパークロマトグラフィーにより 25 種の有機燐, 塩素系殺虫剤並びに関連化合物の分離を行った.

実験方法

固定相 固定相溶媒は次の様な割合に混合して作った (数字は ml). (a) フェニールセロソルブ (以下 PC と略す) -アセトン (以下 A と略す) (1:5), (b) フェノール-A (1:4), (c) ベンジルアルコール-A (1:4), (d) PC-プロピレンジグリコール (以下 PG と略す) -A (1:1:10), (e) PC-PG-A (1:1:20), (f) PC-A (1:10), (g) PC-A (1:20), (h) エチレンジグリコール-A (1:10).

移動相 次の様な割合に混合し二層に別れたものは上層を使用した (数字は ml). (a) アセトニトリル飽和 *n*-ヘキサン, (b) *n*-ヘキサン-クロロホルム-アセトニトリル (50:5:6), (c) *n*-ヘキサン-ベンゼン-アセトニトリル (50:10:5), (d) *n*-ヘキサン-クロロホルム-アセトニトリル-PC (50:5:6:2), (e) *n*-ヘキサン-アセトニトリル-PC (50:2:2), (f) *n*-ヘキサン-クロロホルム-醋酸 (10:20:1), (g) *n*-ヘキサン-クロロホルム-醋酸 (10:5:1).

標準試料 *O,O*-diethyl *O-p*-nitrophenyl thiophosphate (ethyl parathion), *O,O*-dimethyl *O-p*-nitrophenyl thiophosphate (methyl parathion), *O,O*-diethyl *O-o*-nitrophenyl thiophosphate (orthoparathion), *O,O*-diethyl *O-m*-nitrophenyl thiophosphate (metaparathion), *O,O*-diethyl *O-p*-nitrophenyl phosphate (paraoxon), *O*-ethyl *O-p*-nitrophenyl benzenethiophosphonate (EPN), *O*-(2-chloro-4-nitrophenyl) *O,O*-dimethyl thiophosphate (isochlorthion), *O,O*-dimethyl *S*-(1,2-dicarboethoxyethyl) dithiophosphate (malathion), *O,O*-diethyl *O*-2-ethylmercaptoethyl thiophosphate (systox), *O,O*-dimethyl *O*-2-ethylmercaptoethyl thiophosphate (metasystox), *O,O*-dimethyl *S*-(4-oxobenzo-1,2,3-triazino-3-methyl) phosphorodithioate (gusathion), *O,O,O,O*-tetraethyl dithiopyrophosphate (sulfotepp), *O,O*-dimethyl 1-hydroxy-2-trichloromethyl phosphonate (dipterex), *O,O*-dimethyl *O*-2,2-dichlorovinyl phosphate (methyl DDVP), *O,O*-diethyl *O*-2,2-dichlorovinyl phosphate (ethyl DDVP), *O,O*-diisopropyl *O*-2,2-dichlorovinyl phosphate (isopropyl DDVP), *O,O*-dimethylchlorothiophosphate, *O,O*-diethylchlorothiophosphate, 2,2-bis-(*p*-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (*p,p'*-DDT), 2-(*o*-chlorophenyl)-2-(*p*-chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane (*o,p'*-DDT), 1,2,3,4,10,10-hexachloro-1,4,4a,5,8,8a-hexahydro-1,4-*endo*,*exo*-5,8-dimethanonaphthalene (aldrin), 1,2,3,4,10,10-hexachloro-6,7-epoxy-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-1,4-*endo*,*endo*-5,8-dimethanonaphthalene (endrin), 1,2,3,4,10,10-hexachloro-6,7-epoxy-1,4,4a,5,6,7,8,8a-octahydro-1,4-*endo*,*exo*-5,8-dimethanonaphthalene (dieldrin), γ -1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane (*r*-BHC), α -1,2,3,4,5,6-hexachlorocyclohexane (α -BHC) の純品 (ethylparathion, orthoparathion, metaparathion, malathion, metasystox, systox, sulfotepp の精製は諏訪内⁽²²⁾の方法により分離した) を各々 10 mg/cc になる様にベンゼンにとかした.

検出法 ethyl parathion, methyl parathion, orthoparathion, metaparathion, paraoxon, EPN, isochlorthion 等は 5% アルコール性苛性加里⁽¹¹⁾を噴霧するか, 紫外線吸収⁽¹⁸⁾により検出した. systox, metasystox, sulfotepp の検出には NBS-fluorescein 法⁽¹⁹⁾を使用した. malathion, gusathion はこの方法では鋭敏

でないで、アンモニア性硝酸銀(0.1N 硝酸銀と 5N アンモニア水の等量混合物)を噴霧し加熱或は紫外線照射により生ずる褐色のスポットにより確認した。その他塩素を含む燐化合物と塩素系殺虫剤は Mitchell のフェニールセロソルブと硝酸銀の混合液を噴霧し、その後紫外線を照射⁽²⁸⁾して検出した。

濾紙 30 cm×40 cm の東洋濾紙 No. 50 を、珪藻引パットに入れた固定相溶媒中に十分ひたし、引上げて濾紙についている過剰の液を新しい大型濾紙の間にはさみ吸取った後、30分風乾し、幅 2 cm, 長さ 30 cm に切り使用する。

展開装置 外径 3.4 cm, 高さ 32 cm のガラス管を用いた。

展開 2 cm×30 cm の濾紙原線(下端より 3 cm)上に試料液 1 μ l~3 μ l をガラス毛细管を用いて径 5 mm 以下になるようにスポットした。乾燥後展開液を 5 cc 入れたガラス管に入れ密栓し、上昇法で原点より 20 cm 迄展開を行う、温度は 14~16°(室温)の外、1°, 14°, 30°(恒温室)で展開した。

結 果 及 び 考 察

n-ヘキサンに自由に混和しない PC, BA, フェノール, ジメチルホルムアミド, エチレングライコール, PG 等を固定相にえらび、無極性のヘキサンを主とする溶媒を移動相として展開を試みた。このうち水と混合しない PC, BA, フェノール系溶媒は BHC, DDT, ドリン剤の分離に適するが、塩素系殺虫剤に比して極性のやや高い燐系殺虫剤はかなり R_F 値が低く燐化合物間の分離にはむかない(第 1 表 1)。展開剤として *n*-ヘキサン単独又は固定相を飽和した溶媒を使用すると、下方に *n*-ヘキサンを飽和したその固定相(例えばフェノールを固定相とすると *n*-ヘキサン飽和のフェノール相)が不規則に生じて、固定相がくずれるため、移動し難い物質ではスポットが乱れ一定の R_F 値が得られない。この現象は *n*-ヘキサンに、より可溶性なフェノール, BA の場合や、展開温度が高くなるにつれておきやすく拡がりやすい。しかしアセトニトリル飽和の *n*-ヘキサンをを用いるとこの相の乱れを押える事が出来る。

次に *n*-ヘキサン等の無極性溶媒に混合しないが水と自由に混和する PG, エチレングライコール, ジメチルホルムアミド等の極性の高い溶媒を固定相にした場合、塩素系は勿論、燐系殺虫剤でも R_F は一、二のものをのぞいていずれも高く、かなり極性の異った thiono, thiol 異性体, オキソン, 或は代謝分解生成物の分離には適するが個々の燐系殺虫剤の分離には使用できない。そこで R_F の低い値を示した PC 固定相と、高い値を示した PG 固定相との両者を混合した固定相で展開すると、パラチオンを始めとする燐化合物の R_F は PC 固定相に較べて上昇し、より極性の低い BHC, DDT, ドリン剤は更に高い R_F を示すようになり燐系殺虫剤の分離に適してくる(第 1 表 4~6)。濾紙上の混合固定相は量が多い場合 R_F は低く少い場合には高くなる。又 PC 単独の固定相の場合も量が減るに従い燐化合物の R_F が上昇し分離可能(第 1 表 7, 8)となるが、温度が高くなると固定相がくずれやすくなる。使用する移動相は無極性溶媒 *n*-ヘキサンを主とし、パラチオンその他の化合物を良く溶解するアセトニトリル, ベンゼン, クロロホルム等の混合溶媒を用いた。ベンゼン或はクロロホルムがヘキサン中に増加するにつれて R_F は一般的に高くなる。この混合溶媒系はその他様々の溶媒の組合せを用いたより分離能よく、固定相をくずさない点ですぐれていた。各燐化合物の R_F の順序は用いられた溶媒により若干変動がある。パラチオン系化合物はクロロホルムよりベンゼンの入った溶媒系の方が R_F 高く、クロロホルムを含む系では systox 系, DDVP 系化合物の R_F が高くなるので順序の逆転が所々で起る。同族体では高級のもの程高い。水酸基を持つ最も極性に富んだ dipterex は *n*-ヘキサンにはほとんど不溶で、PC 或は PC-PG 固定相で展開した場合に、極めて R_F 低くベンゼン或はクロロホルム量をふやしても上昇し難い。この化合物の分離には極性の強いエチレングライコールを固定相に、移動相には *n*-ヘキサン-クロロホルム-酢酸の溶媒系が最も適している。この場合酢酸が入らないと tailing を起す(第 1 表 9, 10)。

有機溶媒固定相クロマトグラフィーでは温度の及ぼす影響は大きく温度が高くなるにつれて R_F は上昇する。固定相の PC 量が多い場合には 1~30° の間で展開しても固定相の乱れは起らないが(第 1 表 1, 1', 1'') PC-A (1:10, 1:20) の様に少ない場合には、17~18° 以上で展開すると固定相面の乱れが起り易い。PC-PG の混合固定相では温度が低い程分離能が悪く tailing を起す。この溶媒系は温度の高い程よく 14~30° 迄使用出来る(第 1 表 4, 4')。又湿度の高い時処理した濾紙は乾燥時のそれにくらべて R_F が高くなる。この様に温度、湿度の影響を受けるが同一時に処理した濾紙ではかなりの再現性がある。

以上あげた溶媒系では EPN, ethyl parathion, isochlorothion 等かなり R_F が接近しているため分離不可能

第 1 表 有機燐、塩素系殺虫剤の R_F 値

番 号	1	1'	1''	2	3	4	4'	5	6	7	8	9	10
固 定 相	PC ¹⁾ 1 A ²⁾ 5	PC 1 A 5	PC 1 A 5	Phenol 1 A 4	BA ³⁾ 1 A 4	PC 1 PG ⁴⁾ 1 A 10	PC 1 PG 1 A 10	PC 1 PG 1 A 10	PC 1 PG 1 A 20	PC 1 A 10	PC 1 A 20	EG ⁵⁾ 1 A 10	EG 1 A 10
移 動 相	CH ₃ CN 飽和 n-hexane	CH ₃ CN 飽和 n-hexane	CH ₃ CN 飽和 n-hexane	CH ₃ CN 飽和 n-hexane	CH ₃ CN 飽和 n-hexane	CH ₃ CN 飽和 n-hexane	CH ₃ CN 飽和 n-hexane	CH ₃ CN 飽和 n-hexane	CH ₃ CN 飽和 n-hexane	CH ₃ CN 飽和 n-hexane	CH ₃ CN 飽和 n-hexane	CH ₃ CN 飽和 n-hexane	CH ₃ CN 飽和 n-hexane
温度(°C)	14~16	1	30	14~16	14~16	14~16	30	14~16	14~16	14	14	14	14
Ethyl parathion	0.15		0.47	0.50	0.50	0.50	0.80	0.57	0.79	0.36	0.60		
Methyl parathion	0.08		0.28	0.33	0.33	0.33	0.61	0.39	0.64	0.23	0.43		
Orthoparathion	0.14		0.46	0.50	0.50	0.50	0.78	0.52	0.77	0.32	0.54		
Metaparathion	0.16		0.50	0.56	0.56	0.56	0.85	0.57	0.83	0.38	0.62		
Paraoxon	0.01		0.16	0.19	0.19	0.19	0.51	0.20	0.50	0.17	0.35		
EPN	0.11		0.40	0.48	0.48	0.48	0.78	0.52	0.78	0.35	0.58		
Isochlorthion	0.11		0.35	0.40	0.40	0.40	0.74	0.51	0.76	0.30	0.54		
Malathion	0.10		0.41	0.38	0.38	0.38	0.73	0.42	0.68	0.31	0.54		
Systox	0.10		0.39	0.42	0.42	0.42	0.78	0.36	0.64	0.39	0.63		
Metasystox	0.06		0.22	0.23	0.23	0.23	0.57	0.20	0.45	0.25	0.47		
Gusathion	0.01		0.11	0.12	0.12	0.12	0.42	0.12	0.34	0.12	0.25		
Sulfotepp	0.58		0.84	0.85	0.85	0.85	0.96	0.78	0.91	0.78	0.89		
Dipterex	0		0.04	0.03	0.03	0.03	0.17	0.05	0.08	0.07	tailing	0.66	0.41
Methyl DDVP	0.10		0.34	0.36	0.36	0.36	0.65	0.35	0.59	0.33	0.55		
Ethyl DDVP	0.28		0.50	0.55	0.55	0.55	0.85	0.48	0.72	0.51	0.68		
Isopropyl DDVP	0.49		0.73	0.73	0.73	0.73	0.93	0.73	0.90	0.68	0.87		
O,O-dimethylchloro rothiophosphate	0.55												
O,O-diethylchloro thiophosphate	0.69			0.63	0.63	0.63		0.69	0.85	0.62	0.79		
p,p'-DDT	0.65	0.59		0.80	0.66	0.80		0.81	0.92	0.73	0.85		
o,p'-DDT	0.73	0.70		0.84	0.73	0.84							
Aldrin	0.89	0.86		0.86	0.87	0.91							
Endrin	0.56	0.53		0.60	0.53	0.98							
Dieldrin	0.60	0.54		0.65	0.58	0.83							
γ-BHC	0.40	0.31		0.50	0.40	0.84							
α-BHC	0.47	0.42		0.58	0.47	0.62							

1) PC: phenylcellosolve, 2) A: acetone, 3) BA: benzyl alcohol, 4) PG: propylene glycol, 5) EG: ethylene glycol.

であるが目下逆相クロマトグラフィーでこれらを分離中である。

要 約

有機溶媒を固定相としたペーパークロマトグラフィーにより燐、塩素系殺虫剤の分離を行った。各種溶媒につき検討した結果、フェニールセロソルブを固定相にアセトニトリル飽和の *n*-ヘキサンを移動相にした分配溶媒系が極性の低い塩素系殺虫剤の分離に適し、塩素剤より、やや極性の高い燐系殺虫剤に対してはフェニールセロソルブ-ブロビレンジアールの混合固定相と *n*-ヘキサンを主としアセトニトリル、ベンゼン、クロロホルム等の混合溶媒を移動相とする溶媒系が適する事を見出し、夫々の殺虫剤の *R_F* 値を決定した。

終りに臨み終始御指導いただいた農薬科長福永一夫氏並びに色々と御助言を与えられた当研究所の佐藤敏郎氏、守谷茂雄氏、試料の一部を提供された田中俊彦氏に感謝致します。

- (1) R. Burton et al. : *J. Biol. Chem.*, 188, 763 (1951).
- (2) A. Zaffaroni, R. Burton : *J. Biol. Chem.*, 193, 749 (1951).
- (3) R. Neher, A. Wettstein : *Helv. Chim. Acta*, 35, 276 (1952).
- (4) T. Kritchvsky, A. Tiselius : *Science*, 114, 299 (1951).
- (5) F. Brown : *Biochem. J.*, 47, 598 (1950).
- (6) P. Moynihan et al. : *Chemistry & Industry*, 1951, 407.
- (7) F. Winteringham et al. : *Nature*, 166, 999 (1950).
- (8) F. Winteringham et al. : *Nature*, 177, 86 (1956).
- (9) W. Gruch : *Naturwissenschaften*, 41, 39 (1954).
- (10) L. Mitchell : *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 35, 920 (1952); 36, 553 (1953); 36, 1183 (1953); 37, 216 (1954); 37, 530 (1954); 37, 996 (1954); 39, 484 (1956); 39, 985 (1956); 39, 980 (1956); 40, 294 (1957).
- (11) R. Metcalf et al. : *Science*, 117, 527 (1953); *J. Econ. Ent.*, 46, 288 (1953).
- (12) R. Metcalf et al. : *J. Agr. Food Chem.*, 2, 732 (1954); *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 5103 (1954).
- (13) R. Metcalf et al. : *J. Econ. Ent.*, 49, 185 (1956).
- (14) J. Vigne et al. : *Bull. soc. chim. France*, 1955, 1282; *C.A.*, 50, 1530^e (1956).
- (15) J. Vigne et al. : *Bull. soc. pharm. Marseille*, 5, 49 (1956); *C.A.*, 51, 5350^d (1957).
- (16) 浅川 勝, 諏訪内正名 : 日本応用動物昆虫学会誌, 1, 67 (1957).
- (17) J. Gage : *Biochem. J.*, 54, 426 (1953).
- (18) D. Fiori : *Nature*, 178, 423 (1956).
- (19) J. Cook : *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 37, 987 (1954).
- (20) Y. Sumiki, A. Matsuyama : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 21, 204 (1957).
- (21) Y. Sumiki, A. Matsuyama : *Bull. Agr. Chem. Soc. Japan*, 21, 329 (1957).
- (22) 諏訪内正名 : 農業技術研究所報告 C, 7, 33 (1957).
- (23) L. Mitchell : *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, 39, 891 (1956).