〔農化 第 36 卷, 第 3 号, p. 222~225, 1962〕

有機殺虫剤のクロマトグラフィー (第 2 報)*

逆相ペーパークロマトグラフィーによる
BHC, DDT, シクロジエン化合物の分離

宍 戸 孝 (農林省農業技術研究所)

昭和 36 年 7 月 29 日 受 理

殺虫剤の種類の増加に伴い、またその広範囲にわたる使用、薬剤の混用等により、殺虫剤の分離、確認は非常に困難なものになってきている。各種有機塩素系殺虫剤のペーパークロマトグラフィーによる分離については、Mitchell によって詳しく行われた⁽¹⁾。すなわち大豆油を固定相に、移動相には各種有機溶媒の水溶液を用いる逆相法と、イソオクタンとフェニルセロソルブの分配による通常法の二つの型の組合せにより分離、確認を試みている。しかし逆相法に用いた大豆油は固定相溶媒としての分離範囲が狭いために、数多い塩素剤の混合物の相互分離とその確認に適しない場合が多い。また McKinley 等^(2,3)は大豆油のかわりに流動パラフィンを用いてアセトン或いはピリジンで展開しているが、移動相溶媒についての選択はこれ以上行っていない。

著者は前報⁽⁴⁾においてフェニルセロソルブ或いはこれとプロピレングリコールの混合物を固定相とし、*n*-ヘキサンを主とする溶媒系で各種殺虫剤の分離を行ったが、本報においては、BHC, DDT, アルドリノ、エンドリン、ディルドリン、ヘプタクロール等、今日広く使用されている塩素系殺虫剤について、逆相ペーパークロマトグラフィーによる各種溶媒系の分離効果を詳細に検討し、これらすべての殺虫剤を二次元法、或いは多重展開法により分離することができたのでここに報告する。

実 験 方 法

固定相 一次元分離用として 15% 或いは 30% 流動パラフィン (和光純薬 1 級品、以下 LP と略す) の *n*-ヘキサン溶液を使用した。二次元分離には 15% LP で、多重展開用には 20% LP を使用した。

移動相 LP を飽和したメチルアルコール、エチルアルコール、*n*-プロピルアルコール、イソプロピルアルコール、*tert*-ブチルアルコール、酢酸、アセトン、ジオキサン、メチルセロソルブ、エチルセロソルブ (以下 EC と略す)、ピリジン、ジメチルホルムアミド (以下 DMF と略す)、エチレンクロロヒドリン、アセトニトリル等の極性溶媒、もしくはその混合溶媒の水溶液を使用した。

標準試料 γ -BHC (m.p. 113°), α -BHC (m.p. 157°), *p,p'*-DDT (m.p. 109°), *o,p'*-DDT (m.p. 73°), アルドリノ (m.p. 103.5°), エンドリン (m.p. 240° 分解), ディルドリン (m.p. 177°), ヘプタクロール (m.p. 94~95°) を各々 10 mg/cc になるようにトルエンにとかした。

検出法 Mitchell 法⁽⁵⁾にしたがって硝酸銀-フェニルセロソルブ混液を噴霧し、紫外線照射により検出した。

濾 紙 30×40 cm の東洋濾紙 No. 50 を珪藻引バ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、風乾し、幅 2cm、長さ 30cm に切り使用する。二次元展開の場合には 20×20 cm の東洋濾紙 No. 51 を用いた。

展開装置 ストリップは外径 3.4cm、高さ 32cm のガラス管を、二次元用にはデシケーターを使用した。

展 開 下端より 3cm の濾紙原線上に試料液 1 μ l をマイクロピペットでスポットし、上昇法で原線より 20cm 展開する。二次元法の場合は 16~16.5cm 展開する。温度は 28~30° で展開した。

結 果 及 び 考 察

水に難溶性である有機殺虫剤の中で特に非極性の強い BHC, DDT, シクロジエン系化合物の分離には、ステロイド或いは高級脂肪酸の分野にみられるように逆相クロマトグラフィーが最適と考えられる。逆相法に用いられる固定相溶媒を種々検討した結果、LP が一番すぐれた分離能を有することがわかった。この LP 固定相にく

* Chromatography of Organic Insecticides. Part II. Separation of BHC, DDT and Cycloidiene Compounds by Reversed Phase Paper Chromatography.

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

第 1 表 塩素系殺虫剤の R_F 値

固定相	15% LP ²⁾	15% LP	15% LP	15% LP	15% LP	15% LP	15% LP	15% LP	15% LP	15% LP	15% LP	15% LP	15% LP	30% LP	15% LP
移動相 ¹⁾ (v/v)	MeOH 3 水 1	EtOH 9 水 4	<i>n</i> -PrOH 4* 水 5	<i>i</i> -PrOH 9* 水 5	<i>n</i> -PrOH 3* <i>i</i> -PrOH 3 水 5	<i>tert</i> -BuOH 1 水 1	酢酸 9 水 4	アセトン 2 水 1	ジオキサン 2 水 1	MC ⁵⁾ 5 水 2	EC ⁴⁾ 2* 水 1	ピリジン 2 水 1	DMF ⁶⁾ 3** 水 1	DMF 2 AN ⁶⁾ 2 水 1	ECH ⁷⁾ 5 水 2
γ -BHC	0.46	0.56	0.57	0.61	0.64	—	0.55	0.59	0.66	0.67	0.74	0.69	0.71	0.75	0.89
α -BHC	0.38	0.49	0.46	0.56	0.55	—	0.51	0.53	0.62	0.61	0.63	0.65	0.65	0.69	0.88
<i>p,p'</i> -DDT	0.09	0.18	0.15	0.25	0.22	0.18	0.10	0.27	0.36	0.26	0.35	0.41	0.50	0.43	0.41
<i>o,p'</i> -DDT	0.09	0.17	0.15	0.25	0.22	0.18	0.08	0.23	0.31	0.21	0.33	0.40	0.39	0.32	0.36
アルドリン	0.05	0.17	0.14	0.26	0.20	0.21	0.06	0.11	0.16	0.09	0.17	0.15	0.16	0.14	0.23
エンドリン	0.19	0.37	0.33	0.48	0.45	0.41	0.34	0.34	0.40	0.32	0.43	0.51	0.45	0.46	0.76
ディルドリン	0.22	0.43	0.39	0.56	0.52	0.49	0.39	0.37	0.41	0.37	0.50	0.49	0.49	0.51	0.79
ヘプタクロール	0.12	0.22	0.17	0.32	0.25	0.24	0.14	0.21	0.25	0.18	0.25	0.23	0.29	0.29	0.39

1) 移動相: いずれも流動パラフィン飽和, 2) 15% LP: 15% 流動パラフィンの *n*-hexane 溶液 (v/v), 3) MC: methyl cellosolve, 4) EC: ethyl cellosolve, 5) DMF: dimethyl formamide, 6) AN: acetonitrile, 7) ECH: ethylene chlorohydrin

* 二次元用第 1 方向展開溶媒, ** 二次元用第 2 方向展開溶媒

らべて, Mitchell の用いた大豆油は著しく分離範囲が狭く, 極性溶媒の種類を色々に変えていっても相互分離性において, はるかに劣っている. LP にみられるすぐれた分離能は大豆油と LP に対する塩素系化合物の溶解度差に起因するものと考えられる.

LP と各種有機溶媒による γ -BHC, α -BHC, *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDT, アルドリン, エンドリン, ディルドリン, ヘプタクロールの分配クロマトグラフィーの結果を第 1 表に示した. これらの溶媒を用いた場合に塩素化合物の移動の順序は必ずしも一定ではなく, 比較的移動しやすい γ -BHC, α -BHC の二つを除いて屢々逆転が見受けられる. アセトン, ジオキサン, メチルセロソルブ, EC 等の溶媒で展開した場合の移動順序は γ -BHC > α -BHC > ディルドリン > エンドリン > *p,p'*-DDT > *o,p'*-DDT > ヘプタクロール > アルドリンである. エチルアルコール, *n*-プロピルアルコール, イソプロピルアルコール等のアルコール系溶媒では DDT が移動しにくいので, γ -BHC > α -BHC > ディルドリン > エンドリン > ヘプタクロール > *p,p'*-DDT = *o,p'*-DDT = アルドリンとなるが, 同じアルコールでもメチルアルコールでは DDT > アルドリンで, *tert*-ブチルアルコールでは逆にアルドリン > DDT の順となり, 若干の変化がみられる. また酢酸溶媒はアルコール系溶媒とほぼ同じである. 以下アセトン溶媒系を基準に比較してみると, DMF の場合には *p,p'*-DDT の移動が大きいため, γ -BHC > α -BHC > *p,p'*-DDT > ディルドリン > エンドリン > *o,p'*-DDT > ヘプタクロール > アルドリンの順となり, ピリジンではディルドリンとエンドリンが逆転する. エチレンクロロヒドリンの場合にはヘプタクロールが *p,p'*-DDT と *o,p'*-DDT の中間に位置する. またアセトニトリルと DMF の混合溶媒ではアセトン系と同じ移動順序となる.

次に移動相溶媒による各化合物の相互分離性をみると, アルコール系溶媒では γ -BHC- α -BHC, ディルドリン-エンドリン, ヘプタクロール-DDT-アルドリンの三つのグループに分かれる. ピリジン溶媒では γ -BHC- α -BHC, ディルドリン-エンドリン, *p,p'*-DDT-*o,p'*-DDT, ヘプタクロール, アルドリンに分かれ, DMF では γ -BHC- α -BHC, *p,p'*-DDT-ディルドリン-エンドリン, *o,p'*-DDT, ヘプタクロール, アルドリンの 5 つのグループに分れる. エチレンクロロヒドリンでは γ -BHC- α -BHC, ディルドリン-エンドリン, *p,p'*-DDT-ヘプタクロール-*o,p'*-DDT, アルドリンに分かれる. 個々の溶媒によっていくつかにグループ分けされた化合物のグループ内分離は不可能であるが, グループ間の相互分離はほぼ可能である. またアセトン系溶媒では 8 つの化合物の間に少しずつ R_F 値の差があり, この中で比較的分離能のすぐれているものとして EC があげられる. *p,p'*-DDT と *o,p'*-DDT がかなり接近するだけで, これをのぞいた化合物の相互分離は試料を少く, また展開距離を長くした場合に可能となるが, 明瞭な分離はのぞめない.

従来の逆相法では相互分離の不完全なものが多く γ -BHC と α -BHC, ディルドリンとエンドリン, エンドリンと *p,p'*-DDT, *p,p'*-DDT と *o,p'*-DDT, ヘプタクロールとアルドリン等がその例としてあげられよう. しかし適当な溶媒系を第 1 表からえらぶことにより, ディルドリンとエンドリンの分離をのぞいて, 上記化合物の分離は一次元法で完全に分離できる. γ -BHC と α -BHC の分離には EC が最適であり, DDT 異性体の分離には

DMF, 或いはアセトニトリルが適している。このうちアセトニトリル単独ではスポットの乱れがみられ好ましくないが, これは固定相量を増し, DMF との混合溶媒にして展開すると良い結果がえられる。シクロジエン殺虫剤の分離はアルドリン, ヘプタクロールの場合, 容易であるが, デイルドリンとエンドリンはどの溶媒を使用しても R_F 値が接近しているために一次元法では明瞭に分れにくい。この両者の分離には, デイルドリンとエンドリンの R_F 値に比較差のあるアルコール, 或いは EC 溶媒で, 単に展開距離を長くするよりも, 多重展開を行うことによって, アルドリン, ヘプタクロールの分離をも含めて, 非常に良い結果を得ることができた。

以上で明らかなように, 一種の溶媒で8化合物の分離は不可能であるが, 各種溶媒に対する移動の順序と化合物間の相互分離性から, 二次元法或いは多重展開法によって完全に分離することは容易にできる。 α -, γ -BHC, p,p' -, o,p' -DDT, アルドリン, エンドリン, デイルドリン, ヘプタクロールを二次元法で分離する場合に, p,p' -DDT と o,p' -DDT の分離と, デイルドリンとエンドリンの分離が比較的困難なので, この両者を分離する溶媒をえらぶ必要がある。エンドリンとデイルドリンの分離能の比較的良好な溶媒としては, n -プロピルアルコール-水 (4:5), イソプロピルアルコール-水 (9:5), n -プロピルアルコール-イソプロピルアルコール-水 (3:3:5), EC-水 (2:1) 等であり, p,p' -DDT と o,p' -DDT の分離には DMF-水 (3:1) がすぐれている。この両者を組合せて二次元クロマトグラフィーを行った結果を第1図に示した。多重展開法の場合も, 同一溶媒による分離は困難で, いくつか異なった溶媒で展開する必要がある(第2表)。すなわち EC 溶媒を用いて p,p' -DDT と o,p' -DDT をのぞく残り全部を分離し (2回展開), 次に DMF 溶媒で p,p' -DDT と o,p' -DDT を分離する方法か, n -プロピルアルコール溶媒でデイルドリン, エンドリンの分離を目的として展開し, 次に EC 溶媒で DDT 以外のものの分離を行い, 最期に p,p' -DDT, o,p' -DDT, ヘプタクロール, アルドリンの分離のために DMF で展開する。この場合, n -プロピルアルコールのかわりにメチルアルコールを用いてもよい。多重展開法により分離したクロマトグラムを第2図に示した。

展開される物質の R_F 値は, 温度はもちろんのことであるが, 濾紙に保持される固定相の多少, 移動相溶媒中の有機溶媒の濃度等により変動がみられる。またこれらの分離能に及ぼす影響も非常に大きいので分離目的に応じて適正量使用することが必要である。濾紙に保持される量が多いほど R_F 値は低く, また展開液中の水分含量が多くなるにしたがって R_F 値は減ずる。15% LP を用いた場合, 第1表に示した展開溶媒で十分に分離される

第1図 有機塩素系殺虫剤の二次元クロマトグラム
固定相: 15% 流動パラフィン
スポット番号: 1. γ -BHC, 2. α -BHC, 3. デイルドリン, 4. エンドリン, 5. p,p' -DDT, 6. o,p' -DDT, 7. ヘプタクロール, 8. アルドリン

第2表 多重展開溶媒系の種類
移動相 (v/v)

溶媒系	固定相	第1回	第2回	第3回	分離物質
A	20% LP	EC-水* (3:2)	EC-水 (3:2)	DMF-水 (2:1)	γ -BHC, α -BHC, p,p' -DDT, o,p' -DDT, アルドリン, エンドリン, デイルドリン, ヘプタクロール
B	20% LP	MeOH-水 (2:1)	EC-水 (3:2)	DMF-水 (2:1)	
C	20% LP	n -PrOH-水* (3:4)	EC-水 (3:2)	DMF-水 (9:4)	*の溶媒で2回, 或いは第2回まで展開するとシクロジエンの化合物の分離可能

第2図 多重展開法による有機塩素系殺虫剤の分離
溶媒系: A, 第2表のA
B, 第2表のB
C, 第2表のC
スポット番号: 第1図に同じ。

が、このバランスがくずれた溶媒系を用いると全体的に物質の移動率が大きすぎたり、少なすぎたりして、相互に接近し、分離能が落ちてくる。特に R_F 値が高い場合には、スポットの拡がりも加わってくるので良くない。多重展開では全体的に R_F 値を低くする溶媒系をえらぶ必要がある。すなわち、固定相をふやし (20% LP)、移動相は有機溶媒量を減じ、水分含量をふやして展開する。また LP は常に一定の品質のものを得がたいため R_F 値に若干の変動がみられる場合もあるが、各塩素剤間の相互分離性にはほとんど影響しない。常に同一ロットナンバーの製品で一連の実験をおこなうことがのぞましい。本実験において保持された LP 含量は、東洋濾紙 No. 50 を 15% LP につけたとき、 1 cm^2 当り 2.0~2.1 mg で、20% では 2.7~2.8 mg、30% で 4.0~4.1 mg であり、二次元展開に用いた No. 51 の場合は、15% で 1.3 mg であった。

Mitchell 法による塩素剤の呈色は濾紙中に含まれる硝酸銀反応物によりかなり妨害される。展開中にこの不純物が上部に移行するため、特に濾紙上部において著しい。この影響を防ぐため、Mitchell は濾紙を洗滌後展開しているが、しかしこれでも完全に取りのぞくことは困難であり、 R_F 値の高いものの確認はむずかしい。展開溶媒中の不純物質による再汚染も考えられるので、濾紙を展開乾燥し、次に蒸留水を濾紙の先端まで上昇させ、洗滌を行うと、塩素化合物の R_F 値に影響することなく、かなりの硝酸銀反応物質を濾紙先端に集めることができる。この方法は展開前の濾紙洗滌よりすぐれている。

要 約

有機塩素系殺虫剤について、逆相ペーパークロマトグラフィーによる各種溶媒系の分離効果を検討した。固定相溶媒は流動パラフィンが相互分離性の点で大豆油よりすぐれていた。 γ -BHC と α -BHC の分離にはエチルセロソルブ溶媒が最も適しており、DDT 異性体はジメチルホルムアミド溶媒により、またシクロジエン系化合物は n -プロピルアルコール、或いはエチルセロソルブによる多重展開により分離された。 γ -, α -BHC, p , p' -, o , p' -DDT, アルドリン, エンドリン, ディルドリン, ヘプタクロールの相互分離はイソプロピルアルコール (或いは n -プロピルアルコールかエチルセロソルブ) 溶媒とジメチルホルムアミド溶媒による二次元展開により、またエチルセロソルブ-ジメチルホルムアミド、或いはメチルアルコール-エチルセロソルブ-ジメチルホルムアミドのそれぞれ異った溶媒で、多重展開を行なうことによって完全に分離された。

終りに臨み、終始御指導いただいた農薬科長福永一夫博士、並びに農薬化学第三研究室長諏訪内正名博士に感謝いたします。

- (1) 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**, 980 (1956); **39**, 985 (1956); **40**, 294 (1957); **41**, 781 (1958).
- (2) W. McKinley, J. Mahon : *ibid.*, **42**, 725 (1959).
- (3) W. McKinley, H. Grice : *ibid.*, **43**, 725 (1960).
- (4) 矢戸 孝, 諏訪内正名 : 本誌, **32**, 956 (1958).
- (5) L. Mitchell : *J. Assoc. Offic. Agr. Chemists*, **39**, 891 (1956).