殺虫性サリゲニン環状りん酸エステルの研究 (第 8 報)*

サリオキソンおよびサリチオンの分析

江藤守総, 永田礼子**, 大島康義 (九州大学農学部農芸化学科)

昭和 40 年 4 月 23 日 受 理

tri-*o*-Tolylphosphate の活性代謝産物^(1,2)に始まるサリゲニン環状りん酸エステル類の研究によって, 著者らは数種の新しい強力な殺虫性化合物を見出した⁽³⁻⁶⁾. これらのうち, サリオキソン (salioxon: 2-methoxy-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-2-oxide) およびサリチオン (salithion: 2-methoxy-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-2-sulfide) の製造に際して必要な分析法を検討した.

サリオキソン (I; X=O) およびサリチオン (I; X=S) はそれぞれサリゲニンと methyl phosphorodichloridate あるいは methyl phosphorodichloridothionate とより適当な反応条件によって合成される (式 1)⁽⁶⁾.

実験および結果

1. 標準物質

1) サリオキソン: 式 1 によって合成し, 2 回蒸留して精製した無色透明液体. b.p. 135° (0.3 mmHg). $n_D^{25} = 1.5155$.

2) サリチオン: 式 1 によって合成し, メタノールより再結晶を繰返して精製した無色盤状結晶. m.p. 55°.

3) サリゲニン: 市販品をベンゼンより再結晶した. m.p. 86.0~86.5°.

2. 定性分析

1) 赤外吸収スペクトル: 日本分光 IR-S 型赤外分

* Studies on Saligenin Cyclic Phosphorus Esters with Insecticidal Activity. Part VIII. Analyses of Salioxon and Salithion.

By Morifusa ETO, Reiko NAGATA and Yasuyoshi OSHIMA (Department of Agricultural Chemistry, Kyushu University)

** 現在, 九州大学理学部化学科

光光度計, 食塩光学系による 10% クロロホルム溶液の吸収スペクトルを第 1 図に示した. サリオキソン, サリチオンともに 1020 cm^{-1} に P-O-C (alkyl) によると考えられる特徴的な吸収があるが, これは tri-*o*-tolyl phosphate の環状代謝産物⁽²⁾ 2-(*o*-tolylloxy)-4H-1,3,2-benzodioxaphosphorin-2-oxide のようにヘテロ環外にアルキルエステル基がないものにも認められ, 他方, methyl di-*o*-tolyl phosphate のような非環状エステルには認められないので⁽⁵⁾, ヘテロ環の P-O-C (alkyl) によるものと考えられる. サリオキソンには 1295 cm^{-1} に P=O の顕著な吸収があるが, サリチオンにはない.

2) 加水分解: 微量のサリオキソンに pH 7.7 の M/15 りん酸緩衝液 5 ml を加え, しばらく室温に放置後, 0.2% 4-アミノアンチピリン 0.2 ml と 0.8% 赤血塩 0.2 ml とを加えると赤く発色する. これにクロロホルムを加え激しく振とうすると赤色のアミノアンチピリン誘導体の大部分は抽出されずに水層に留まる. これはサリオキソンが加水分解して解離基を有するフェノール, *o*-hydroxybenzyl methyl hydrogen phosphate (II) が生じたからである⁽⁷⁾. 温和な条件下にりん酸緩衝液中で, クロロホルム不溶のアミノアンチピリン誘導体を生ずるのは, サリゲニン環状りん酸エステルの特徴的な反応と考えられる. 加水分解時間を長くすると, さらにサリゲニンにまで分解し (式 2), クロロホルム可溶の部分が增加する. この反応はサリチオンではサリオキソンに比し非常に遅い.

第1図 サリオキソンとサリチオンの赤外吸収スペクトル

25° に保ってあるりん酸緩衝液 8 ml に試料のアセトン溶液 (2.5×10^{-3} M) 2 ml を加え, 時間を追ってその 1 ml をとり, 0.01% アミノアンチピリン 4 ml に注ぎ, 0.8% 赤血塩 0.2 ml を加えて, 日立分光光度計で 510 m μ の吸光度を測定することにより加水分解速度恒数 K_{hyd} を求めると, サリオキソンでは $1.4 \times 10^{-3} \text{ min}^{-1}$, サリチオンでは $2.4 \times 10^{-4} \text{ min}^{-1}$ であった。

3) 濾紙クロマトグラフィー: シリコン (東芝 953 H) の 5% ヘキサン溶液に浸漬して風乾した東洋濾紙 No. 50 を用い, ベンゼン, ヘキサン, メタノール, 水 (3:6:2:7) の水層 (溶媒 I), あるいはアセトン, アセトニトリル, 水 (12:1:20) (溶媒 II) で上昇法により展開し, 乾燥後 1N-苛性カリ・アルコール溶液をスプレーしてから, ジアゾ化したスルファニル酸⁽⁸⁾をスプレーした。この方法でサリオキソンとサリゲニンは黄色に発色する。サリチオンはあらかじめ飽和臭素水をスプレーしてからアルカリ処理すれば同様に発色する。

R_F 値を第1表に示す。 R_F 値は実験により多少の変動があるが, これは濾紙のシリコン処理が一定に行われ難いからである。シリコン層が厚くなると R_F は減少する。

処理を要せず発色させることができる。 R_F 値を第1表に示した。

この方法ははなはだ簡便で短時間に行えるから, サリチオンおよびサリオキシソンの製造時にこれを応用することによって, 目的物の生成状況を容易に知ることができる。

3. 定量分析

1) 分析法の検討: サリオキソンあるいはサリチオンの粗製品には, それぞれサリゲニンの混在が考えられ

第1表 サリオキソン, サリチオンおよびサリゲニンのクロマトグラフィー (R_F 値)

溶 媒***	濾紙クロマトグラフ*		薄層クロマトグラフ**	
	I	II	III	IV
サリオキソン	0.72	0.84	0.14	0.65
サリチオン	0.02	0.10	0.83	0.97
サリゲニン	0.83	0.93	0.06	0.38

* シリコン処理東洋濾紙 No. 50

** シリカゲル (ワコーゲル B-5)

*** 溶媒 I ベンゼン, ヘキサン, メタノール, 水 (3:6:2:7) 水層

II アセトニトリル, アセトン, 水 (1:12:20)

III クロロホルム

IV クロロホルム, アセトン (10:1)

4) 薄層クロマトグラフィー: Camag アプリケーター B 型で顕微鏡用スライドガラス上に厚さ 0.3 mm になるようにシリカゲル (ワコーゲル B-5) の層を作り使用した。展開溶媒には, クロロホルム (溶媒 III) およびクロロホルム・アセトン (10:1) (溶媒 IV) を用いた。展開後, 風乾してアルカリをスプレー後, 100° に 20~30 分間加熱してからジアゾ化したスルファニル酸液をスプレーした。この方法でサリチオンも臭素

るから、これらを分別定量する必要がある。

サリオキソン, サリチオンともに, $273 \sim 4 \text{ m}\mu$ および $266 \sim 7 \text{ m}\mu$ に極大吸収 ($\epsilon = 780 \sim 860$) があるが, サリゲニンも $274 \text{ m}\mu$ に強い極大吸収 ($\epsilon = 1680$) があるので, 紫外吸収を分別定量に利用するのは好ましくない。

4-アミノアンチピリン-赤血塩によるフェノール類の比色法は, 加水分解処理の有無で, サリゲニンとそのエステルとを区別し得るから都合がよい。以下, アミノアンチピリンによる分析条件を検討した。

a) サリゲニン: サリゲニンは 4-アミノアンチピリン-赤血塩で赤く呈色する。Michaelis のりん酸緩衝液中で発色させると, pH 7.7 から 8.2 の間では極大吸収は $510 \text{ m}\mu$ にあり吸光度一定で, 呈色は試薬添加後 8 分から 60 分の間で, また 15° から 35° の温度範囲で安定であった。また緩衝液の濃度は $\text{M}/10 \sim \text{M}/60$ の範囲で吸光度に差異を生じない。しかし, りん酸とほう砂からなる Kolthoff の緩衝液では呈色がはなはだ弱いので, 一定 pH で吸光度に対するほう砂濃度の影響を調べたところ, あきらかにほう砂がサリゲニンの発色を阻害していることがわかった (第 2 図)。ほう酸でも同様であった。しかし石炭酸のアミノアンチピリンによる呈色は全く影響を受けない。したがってほう酸はサリゲニンに直接作用して, そのアミノアンチピリンとの反応を妨げていると考えられる。

有機溶媒の影響を調べると, アセトンおよびジオキソンの 10% 溶液はそれぞれ吸光度を 3 ないし 5% 増加せ

第 2 図 サリゲニンおよび石炭酸の呈色に対するほう砂の影響
□—□ サリゲニン $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$
△—△ 石炭酸 $2.5 \times 10^{-5} \text{ M}$
いずれも pH 9.2

しめた。エタノールおよびイソプロパノールの 10% 溶液は, 対照に同じ溶液を用いれば全く影響しない。

試薬量は 0.2% の 4-アミノアンチピリンと 0.8% の赤血塩を用いた場合, 全容 10 ml の発色液に対し各々 0.5 ml で十分であった (第 3 図)。

以上により次のように条件を定め, 直線状の検量線を得た (第 4 図)。すなわち, 10 ml 定容フラスコ

に $6 \times 10^{-4} \text{ M}$ 以下のサリゲニン水溶液あるいはエタノール溶液 1 ml を入れ, pH 8.0 の $\text{M}/30$ Michaelis りん酸緩衝液 5 ml, 0.2% 4-アミノアンチピリン溶液 0.5 ml, 0.8% 赤血塩溶液 0.5 ml を加えて混和し, 水を加えて 10 ml とする。室温に 15~20 分間放置後日立分光光度計により試料のみを含みぬ対照を用い $510 \text{ m}\mu$ の吸光度を測定した。

この検量線は, 後述のサリオキソン定量におけるりん酸緩衝液中 30 分間加熱処理, およびサリチオン定量における $\text{N}/3$ -苛性ソーダ中 10 分間加熱処理によっても変

第 3 図 サリゲニンの呈色に対する試薬量の影響
サリゲニン $5 \times 10^{-5} \text{ M}$
4-アミノアンチピリン 0.2% 溶液,
赤血塩 0.8% 溶液

第 4 図 検 量 線
○—○ サリオキソン ●—● サリチオン □—□ サリゲニン

第5図 りん酸緩衝液中加熱によるサリオキソンとサリチオンの分解

○—○ サリオキソン 5.3×10^{-5} M
●—● サリチオン 5.2×10^{-5} M

らない。分子吸光係数は 1.32×10^4 である。

b) サリオキソン： サリゲニンの発色に適當であった pH 8.0 の M/30 りん酸緩衝液を用い、サリオキシンの加水分解時間と温度とを検討した。100°, 20~30 分間加熱で吸光度が一定となった (第5図)。50° あるいは 75° に加熱した場合には、20 分間でそれぞれ 100° の場合の 20% と 75% の値しか得られなかった。また、サリオキソンは先述のように、りん酸緩衝液中では室温でも分解が進み、サリゲニンの定量操作、すなわち加熱せず直ちに発色させる場合にも、加熱分解した場合の 1.8% の吸光が認められた。それ故、サリゲニンとサリオキシンの混合物の分析に際してはこの補正が必要である。

以上により次のようにして第4図のような検量線を得た。すなわち、 7×10^{-4} M 以下のサリオキシンのアルコール溶液 1 ml に pH 8.0 M/30 りん酸緩衝液 5 ml を加え、沸とう水浴中で 30 分間加熱し、流水冷却後、前記サリゲニンの場合と同様に発色させ吸光度を測定した。この条件でサリオキシンの分子吸光係数は 1.066×10^4 となった。

c) サリチオン： 上述のようにサリチオンのりん酸緩衝液中での加水分解速度はサリオキソンに比して遅く、約 50 分間の加熱で一定値となり (第5図)、このとき分子吸光係数は 9.7×10^3 で検量線も直線となった。しかしこの方法によるとサリチオンとサリゲニンの混合物の吸光度は、それぞれ単独の吸光度の和より約 5% 減少しており、定量法としては不適当と認められた。

そこで、あらかじめサリチオンをサリオキソンに酸化した後、加水分解する方法を検討した。

この酸化は過酸化水素では困難であるが、臭素によってすみやかに進行する。しかし過剰の臭素は呈色を阻害するので、これを除去するためにチオ硫酸ソーダや加熱揮散せしめる方法を試みたが、いずれも呈色に悪影響を与えた。結局、臭素が大過剰になるのを避け、液が微黄色になるまで飽和臭素水を注意深く 1 滴ずつ加え、ついで 25° に 20 分間放置する場合が最も良く、ほぼ直線状の検量線が得られた。しかしサリゲニンのアミノアンチピリンによる呈色は、第6図に示すように臭素の存在によってははなはだしく影響される。すなわちサリゲニンの吸光度は微量の臭素で約 20% 増加し、過剰の場合には激減する。したがってこの臭素による酸化の方法では、一定条件で任意の試料を分析することは困難である。

第6図 サリゲニンの呈色に対する臭素の影響
 5×10^{-4} M サリゲニン水溶液 1 ml に飽和臭素水を指定量 (ml) 加え 20 分間室温放置後、pH 8.0 りん酸緩衝液 5 ml を加え 20 分間 100° に加熱し、発色試薬を加え、水で 10 ml とする。

次にアルカリによる加水分解を試みた。サリチオンのアルコール溶液 1 ml に N/3 苛性ソーダ 1 ml を加え、沸とう水浴中で加熱した後、流水冷却して M/3 第一りん酸カリを加えて pH 8.0 とし (あらかじめ pH 8.0 にするに必要な量を決めておく)、10 ml 定容フラスコに移し込んで、以後、サリゲニンの場合と同じように発色させた。サリチオンは 5 分間の加熱で完全に加水分解され、40 分まで一定の吸光度を示した。それ故 10 分間加熱す

ることとし, 第 4 図のような直線の検量線を得た. 分子吸光係数は 1.28×10^4 であった.

2) 混合物の分別定量

a) サリオキソンとサリゲニンの混合物: 試料のエタノール溶液 1 ml をとり, pH 8.0 のりん酸緩衝液 5 ml を加え, 直ちに 0.2% 4-アミノアンチピリン 0.5 ml と 0.8% 赤血塩 0.5 ml を添加し, 水を加えて 10 ml として 15 分後に 510m μ の吸光度を, 試料のみを含まずアルコールその他試薬を含む対照を用いて測定する. この測定値を E_0 とすると, これは存在するサリゲニン (G) とこの処理で分解したサリオキソン (D) の吸光度の和である (式 3).

$$E_0 = \epsilon_g G + \epsilon_d D \quad (3)$$

ただし, ϵ_g と ϵ_d はそれぞれサリゲニンおよびサリオキソン分解生成物の吸光係数である.

先述のようにサリオキソンは, この処理によって加熱処理時の吸光度の 1.8% の吸光を示すから

$$\epsilon_d D = 0.018 \epsilon_x X \quad (4)$$

となる. ただし, ϵ_x と X はサリオキシンの吸光係数と濃度である.

一方, 試料の他の 1 ml をりん酸緩衝液 5 ml とともに 100° に 30 分間加熱した後, 同様に発色させて測定値 E_h を得る. サリゲニンの分子吸光係数はこの処理で変化しないから

$$E_h = \epsilon_x X + \epsilon_g G \quad (5)$$

となる.

これらの各式より

$$X = (E_h - E_0) / \epsilon_x (1 - 0.018) \approx 1.018 (E_h - E_0) / \epsilon_x \quad (6)$$

$$G = (E_0 - 0.018 E_h) / \epsilon_g (1 - 0.018) \approx 1.018 (E_0 - 0.018 E_h) / \epsilon_g \quad (7)$$

先述のように $\epsilon_x = 1.066 \times 10^4$, $\epsilon_g = 1.32 \times 10^4$ であり, サリオキソンとサリゲニンの分子量は, それぞれ 200 と 124 であるから, 式 6 と式 7 より次の算定式を得る.

$$\text{サリオキソン} (\mu\text{g}) = 191 (E_h - E_0) \quad (8)$$

$$\text{サリゲニン} (\mu\text{g}) = 95.6 (E_0 - 0.018 E_h) \quad (9)$$

この操作法と計算法にしたがって, サリオキソンとサリゲニンの混合試料の分析を行った結果を第 2 表に示す.

b) サリチオンとサリゲニンの混合物: 試料のアルコール溶液 1 ml をとり, サリオキソン・サリゲニン混合物の場合と同様にして E_0 を得る. この操作でサリチオンは分解しないから

第 2 表 混合試料の分析

試料 番号	試料組成 (μg)			測定値 (μg)		
	サリオ キソン	サリチ オン	サリゲ ニン	サリオ キソン	サリチ オン	サリゲ ニン
1	106	—	12.4	104.7	—	12.4
2	106	—	24.8	105.6	—	25.1
3	106	—	37.2	105.1	—	36.6
4	—	111.5	18.6	—	111.4	18.8
5	—	111.5	12.4	—	109.5	12.8
6	—	89.2	12.4	—	90.6	12.6

$$E_0 = \epsilon_g G \quad (10)$$

試料の他の 1 ml に N/3 苛性ソーダを加え, 沸とう水浴中で 10 分間加熱後 M/3 第一りん酸カリを加え, 冷却後 10 ml 定容フラスコに移し, 以下同様に発色させて E_h を得る. サリゲニンの吸光係数はこの操作で変化しないから,

$$E_h = \epsilon_t T + \epsilon_g G \quad (11)$$

ただし, ϵ_t と T とはそれぞれサリチオンの分子吸光係数とモル濃度である. ϵ_t は 1.28×10^4 , サリチオンの分子量は 216 だから, 式 10, 11 より次の算定式を得る.

$$\text{サリチオン} (\mu\text{g}) = 169 (E_h - E_0) \quad (12)$$

$$\text{サリゲニン} (\mu\text{g}) = 93.9 E_0 \quad (13)$$

これらの操作法と計算式により, 混合試料の分析を行った結果を第 2 表に示した.

c) 粗製原体の分析: 以上の方法によりサリオキソンおよびサリチオンの粗製原体の分析を行った. サリオキソン標品は未蒸留粗製品で褐色透明液体, サリチオン標品は臭気を有する 1 回再結晶品 m. p. 52~5° である. 上記分析法により, 前者は純度 92.8% でサリゲニン 1.4% を含有し, 後者は純度 96.5% でサリゲニン 0.3% を含有していた.

考 察

サリオキソンおよびサリチオンの製造に際し, 目的物の生成の状況はスライドガラスを利用したシリカゲル薄層クロマトグラフ法によって極めて容易に知り得, また製品は赤外吸収スペクトルの 1020 cm⁻¹ の吸収で確認できる. これらは類縁物の場合にも有効に利用できよう.

粗製品には原料のサリゲニンの混在がわずかながら認められた. サリオキソンはりん酸緩衝液中で加熱すると容易に加水分解されるので, 加水分解前後のサリゲニン量をアミノアンチピリン法で比色して定量できる. しかしサリオキソンはりん酸イオンの触媒作用で室温でも分

解するので, 操作を迅速に行い, かつ冷時分解したサリオキソン量の補正が必要である。

サリチオンは比較的安定で, りん酸緩衝液法では分析しがたい。サリチオンは臭素で容易に酸化され加水分解され易くなるが, この方法は煩雑でかつ誤差が大きい。臭素はサリゲニンのアミノアンチピリンによる呈色にはなはだしい影響を与える。おそらく臭素はサリゲニンと反応し, さらに重合を起させるものと考えられる⁽⁹⁾。サリチオンは苛性アルカリで容易に加水分解されるので, その後, 第一りん酸カリを加えて pH を調節することにより比色法を適用できる。

このようにして, サリゲニンが混在する場合のサリオキソンとサリチオンを分析することができた。

既報の合成法によって, サリオキソンは未蒸留のままでも 92% 以上の純度で得られ, サリチオンも簡単な再結晶で 96% 以上の純度で得られることがわかった。

要 約

サリオキソンおよびサリチオンの定性ならびに定量分析法について検討した。

これらは赤外吸収スペクトル, りん酸緩衝液中での加水分解およびクロマトグラフィーにおいて, それぞれ特徴ある性質を示した。

サリオキシソンのりん酸緩衝液中での加水分解を利用し, 4-アミノアンチピリン法によってサリゲニンが混在する場合の定量法を考案した。また, サリチオンは稀苛性ソーダ水で加水分解した後 pH を調整することによって同様に分析できた。

- (1) J. E. Casida, M. Eto, R. L. Baron : *Nature*, **191**, 1396 (1961).
- (2) M. Eto, J. E. Casida, T. Eto : *Biochem. Pharmacol.*, **11**, 337 (1962).
- (3) M. Eto, T. Eto, Y. Oshima : *Agr. Biol. Chem.*, **26**, 630 (1962).
- (4) M. Eto, Y. Kinoshita, T. Kato, Y. Oshima : *Nature*, **200**, 171 (1963).
- (5) M. Eto, Y. Kinoshita, T. Kato, Y. Oshima : *Agr. Biol. Chem.*, **27**, 789 (1963).
- (6) M. Eto, K. Kobayashi, T. Kato, K. Kojima, Y. Oshima : *ibid.*, **29**, 243 (1965).
- (7) M. Eto, Y. Oshima : *ibid.*, **26**, 452 (1962).
- (8) R. J. Block, E. L. Durrum, G. Zweig : "Paper Chromatography and Paper Electrophoresis" Academic Press, p. 305 (1958).
- (9) R. H. Rodd : "Chemistry of Carbon Compounds" III, Elsevier Publishing, p. 734 (1956).