

different influence upon the results.

Although it is difficult to indicate the repellent efficiencies in quantitative expression, there are some reasons to express the repellent effects in quantitative terms. In strict sense, if a repellent allows only one insect to alight on a surface which has been treated with it, it will be concluded that its effect has disappeared, or that it is not a repellent. Practically, however, if a large number of biting insects attack an untreated animal, whereas the treated animal has only a few, it will be concluded that it is efficacious material, because the repellent brings a greater comfort on the animal. The degree of repellent effect must be expressed in quantitative terms as in the estimation of an insecticidal effect.

The methods reported in the present paper may not be sufficient to solve the general problem of testing repellents, but they seem to be useful to evaluate the effect of some repellents in practice.

Finally, a convenient method, termed Sandwich-Method, for testing some fly repellents<sup>3,5)</sup> is added.

#### Résumé

Some methods for evaluating the effectiveness of certain repellents against the common housefly, *Musca domestica vicina* Macq., were reported.

The data from various testing methods were fitted to provisional regression lines when the percentages of repellency had converted into probit and plotted against the dosages in logarithm. From the results of the analysis, it was concluded that these methods were so reliable that the data from a series of tests in laboratory or outdoors could be compared each other. However, the results of the tests were not directly comparable unless the comparison could be made at the median effective dose, since the slope of curve in each repellent varied with the testing methods. It is obvious that the bait used as fly attractants had some influences upon the difference of the results in each method.

#### References

- 1) Bliss, C. I. : Ann. appl. Biol. 22, 134 (1935).
- 2) Dethier, V. G. : "Chemical insect attractants and repellents". The Blakiston Co., Philadelphia, Penna., 289pp, (1947).
- 3) Goodhue, L. D. and Roy E. Stansbury : J. Econ. Entomol. 46, 982 (1953).
- 4) Ikeda, Y. : Botyu-Kagaku 23, 161 (1958).
- 5) Kilgore, L. B. : Soap Sanit. Chemicals 15 (6), 103 (1939).
- 6) Kono, T. : Botyu-Kagaku 16, 62 (1951).
- 7) Smith, C. N. : Soap Chem. Specialties 34 (2), 105 (1958).
- 8) — : ibid. 34 (3), 126 (1958).

**Synthesis of BHC-1-C<sup>14</sup> and Separation of its Isomers. Mode of Action of BHC. I.** Shoziro ISHII, Chisato HIRANO (National Institute of Agricultural Sciences, Nishigahara, Tokyo) and Yoshio TAMAKI (Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Tokyo) Received Oct. 4, 1959. *Botyu-Kagaku*, 24, 181, 1959 (with English résumé, 184).

35. BHC-1-C<sup>14</sup> の合成並びに各異性体の分離\* BHCの作用に関する研究 I\*\* 石井象二郎・平野千里 (農林省農業技術研究所), 玉木佳男\*\*\* (東京農工大学農学部) 34. 10. 4 受理

BHC の植物, 昆虫に対する作用を研究するため, C<sup>14</sup> 標識 BHC を C<sup>14</sup> 標識ベンゼンより合成し, 放射性  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  異性体を分離し, その確認を行った。

#### 緒 言

BHC はわが国で最も多量に使われる殺虫剤である

が, 作物, 昆虫に対する作用は, DDT やパラチオンなどに比べて研究されていない。また BHC には各種の異性体があり, 分子構造の違いによって著るしく昆

\* 要旨を1959年4月日本応用動物昆虫学会大会で講演発表した。

\*\* 文部省科学研究費による研究の1部である。

\*\*\* 現在農林省東海近畿農業試験場茶業部。

虫に対する毒性が異なり、生物学的、化学的に非常に興味がある。われわれは BHC の植物、昆虫に対する作用を研究するために、ラジオアイソトープで標識した BHC を用いることが有効な研究手段であると考え、 $C^{14}$ -BHC を合成し、異性体を分離して作物、昆虫に対する一連の研究を行った。しかしながら BHC の作用機構を調べるためには比放射能が強くなかったため満足すべき結果を得ることができなかったが、再合成をする見込みがないので、とりまとめて発表することとした。

本研究は千葉大学園芸学部野村健一教授を主任とする機関研究の一部として行ったものであり、同教授に謝意を表す。農業技術研究所病理昆虫部長加藤静夫技官、昆虫科長深谷昌次博士は終始われわれを援助下さった。農業技術研究所アイソトープ研究室小平潔、佐藤敏郎 両技官、理化学研究所 田中穰博士は放射性 BHC 合成並びに比放射能測定に関して種々助言を与えられた。これらの方々には深く感謝の意を表す。

### BHC の 合 成

Benzene- $1-C^{14}$  (The Radiochemical Centre, England) 0.4 mc (比放射能 0.1mc/l. 32mg) を輸入した。Benzene- $1-C^{14}$  は 0.1mc ずつ 径 1cm 長さ 25cm の二重に封じたガラス管に入れられてあったのでその管をそのまま反応容器とした。管をドライアイスとアルコールで約  $-70^{\circ}C$  に冷却しながら切り、各管にキャリアーとして benzene 約 66mg (ピペットで 3 滴) を加え、計算量の塩素を吹込んだ四塩化炭素を加え、第 1 図の反応装置にビニール管で連結した。20W 蛍光灯 2 箇で照射しながら氷水中で 29 時間徐々に反応させた。反応が進むと液の黄色が褪せ、ガラス管内壁に BHC が析出してくる。

反応終了後未反応の benzene 及び四塩化炭素をドライアイス、アルコールで冷却したトラップに減圧で

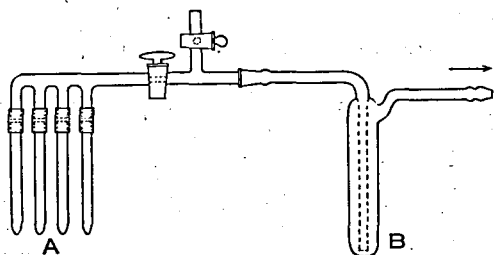


Fig. 1 Apparatus for synthesis of radioactive BHC from radioactive benzene labelled with  $C^{14}$ . A. Glass tube containing  $C^{14}$ -benzene. B. Trap.

回収した。

反応生成物をアセトン 30ml に溶かし 50ml ビーカーに移し通風下でアセトンを追い、淡黄色の放射性 BHC 原体 965mg (理論収量の 96%) を得た。合成はフード内通風下で行った。

### 放射性 BHC 異性体の分離

異性体の分離は分配クロマトグラフ法<sup>1)</sup>によった。

#### (1) クロマトグラフ I

無水珪酸 10g にニトロメタン 10ml を加えて攪拌し、これに展開溶剤 (ニトロメタン飽和 n-ヘキサン) 50ml を加え粥状として長さ 55cm (上部径 2.5cm, 長さ 25cm, 下部径 1.2cm, 長さ 30cm) のクロマト用ガラス円筒に流し込み、約 10 lbs. の圧力で緊密につめる。

BHC 原体に展開溶剤約 5ml を加え加温溶解せしめ放冷後上澄液をシリカ・ゲル円筒に溶し込む。加圧し溶液がシリカ・ゲル柱中に没してから圧を抜き、更に展開溶剤 2ml で円筒内壁を洗い再び加圧して溶液をシリカ・ゲル柱内に圧入する。展開溶剤 100ml を加えて 10~15 lbs. に加圧し 1.5ml/min の流速で滴下させ流出液を 50ml ビーカーに分取する。最初の 25ml は 1 箇のビーカーにとり、その後は 1 箇のビーカーに約 2ml ずつとる。α, γ, α-hepta (微量) を分離。

#### (2) クロマトグラフ II

原体残渣に展開溶剤約 5ml を加え加温、溶解後クロマトグラフ I と同様に調製したシリカ・ゲル円筒に注入する。更にビーカーを溶剤 5ml で洗い円筒に流し込む。以後クロマトグラフ I と同様の操作により流出液を分取する。原体中の γ-BHC の大部分はクロマト I の際展開溶剤に溶解分離され、クロマト II の際完全に分離される。クロマト I, II に際して展開溶剤計約 15ml に溶解せず、残っているものは展開溶剤難溶の β-BHC 及び α-BHC の一部分である。これは (4) により分離する。

#### (3) δ-BHC の分離

クロマト I, クロマト II で 100ml の展開溶剤が流出した後、ベンゼン 50ml をそれぞれの円筒に加え、15~20 lbs. の圧を加えてシリカ・ゲル柱に吸着されている δ-BHC を溶出させる。淡黄色に着色しており、四塩化炭素より 1 回、メタノールより 1 回再結し、結晶 10mg と母液を濃縮乾固させた淡黄褐色固体 40mg を得た。

#### (4) β-BHC の分離

原体残渣中の β と α-BHC との分離には展開溶剤に対する溶解度の差を利用した。すなわち残渣に 10ml の展開溶剤を加え、加温溶解、放冷後、シリカ・ゲル

7gを填充した円筒に注入し加圧埋没す。残渣に更に3回10mlずつで同じ操作を繰返した後、5mlずつ2回で洗う。計50mlの展開溶剤処理で $\alpha$ -BHCは完全に溶解する。残渣は $\beta$ -BHCで、メタノールより再結し結晶40mgを得た。一方、 $\alpha$ -BHCを溶解した展開溶剤を加えた円筒に、更に30mlの展開溶剤を加え加圧流出させ流出液を50mlのビーカーに集めてとった。

#### (5) $\gamma$ -BHCの精製

クロマト I, クロマト II によって分離された $\gamma$ -BHC分劃をアセトンに溶かし1箇のビーカーに集め通風下でアセトンを蒸発させた後、展開溶剤6mlに溶かし、前同様のシリカ・ゲル円筒に注入し、3mlと5mlで2回ビーカーを洗い注入して、同様操作で流出液を集めた。これ以外異性体、過塩素化物の分離はできなかった。各異性体の分離もフード内で通風下で行った。

各異性体の収量は母液からの結晶も集計すると、 $\alpha$ -BHC-1-C<sup>14</sup> 470mg,  $\beta$ -BHC-1-C<sup>14</sup> 50mg,  $\gamma$ -BHC-1-C<sup>14</sup> 80mg,  $\delta$ -BHC-1-C<sup>14</sup> 50mgであった。

#### 異性体の確認

異性体の確認は Mitchell<sup>2)</sup> の逆相クロマトグラフ法によりペーパークロマトグラムをつくり、オートラジオグラフ法によって行つた。

東洋汙紙 No. 51 20cm×20cm を 8% 2-phenoxyethanol (phenylcellosolve) エーテル液に漬け固定相とし、エーテル揮発後、アセトンに溶解した BHC 各異性体をスポットし、*n*-ヘキサンを展開剤として上昇法により展開した。展開後発色剤(硝酸銀 0.9g, 2-phenoxyethanol 5ml, エタノール 25ml に水を加えて 100ml とする)を噴霧、紫外線を照射すると

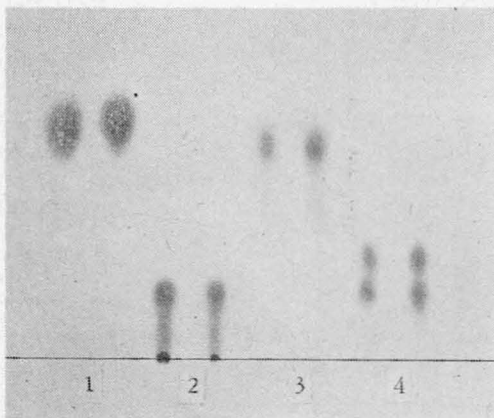


Fig. 2 Autoradiogram of BHC isomers.  
1.  $\alpha$ -BHC, 2.  $\beta$ -BHC, 3.  $\gamma$ -BHC.  
4.  $\delta$ -BHC (impure)

全面赤褐色に呈色、BHC の存在部位は暗色に発色する。R<sub>f</sub> は固定相中の 2-phenoxyethanol の濃度によりかなり動くが、1例を挙げると次の通りである。

$$\alpha \cdot 0.66, \beta \cdot 0.16, \gamma \cdot 0.55, \delta \cdot 0.21$$

全く同様な方法により放射性 BHC 各異性体を展開し、クロマトグラムを富士レントゲンフィルムに33日間感光させてオートラジオグラムとした。

オートラジオグラムの結果より  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -異性体は純粋であることを確認し得たが  $\delta$  部分は 2 成分に分離し不純であるため以後の実験から除くこととした。

#### 比放射能の測定

合成した放射性 BHC の比放射能を正確に決定することは、以後の生物試験に重要であると考え、Van Slyke-Folch 混液による湿式酸化法を改良した田中、浅見<sup>3)</sup>の方法を試みた。 $\alpha$ -BHC を 10~20mg 正確に秤量し Van Slyke-Folch 新混液(固形試薬: KIO<sub>3</sub>, K<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> 2:1, 液体試薬: 発煙硫酸, 磷酸 67:33 vol + KIO<sub>3</sub> 1wt.)を加え徐々に加温すると、BHC の一部は昇華し容器内壁に結晶を生じるため、完全な分解が行われず、実測値が理論値よりかなり低くなった。したがって本分析による放射線強度の測定はできない。

比放射能は原料の Benzene-1-C<sup>14</sup> が 0.4mc であるから収量より計算して約 0.398 $\mu$ c/mg となり、1 $\mu$ c  $\gamma$ -BHC-1-C<sup>14</sup> は 1.5mg/cm<sup>2</sup> マイカ窓の GM 管で 1cm の距離で測定した場合約 43cpm となる。実測値はこの計算値と近似した値を示した。

#### 摘 要

Benzene-1-C<sup>14</sup> 0.4mc (5.28mg) を benzene にて 270mg に稀釈し、計算量の塩素を吹込んだ四塩化炭素と反応させて BHC-1-C<sup>14</sup> を合成し、分配クロマトグラフ法により異性体の分離を行った。 $\alpha$ -BHC-1-C<sup>14</sup> 470mg,  $\beta$ -BHC-1-C<sup>14</sup> 50mg,  $\gamma$ -BHC-1-C<sup>14</sup> 80mg,  $\delta$ -BHC-1-C<sup>14</sup> 50mg を得た。オートラジオグラフ法により  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -異性体は純粋であるが、 $\delta$  は不純物を混入していることがわかった。

BHC-1-C<sup>14</sup> の比放射能は昇華性のため湿式分解により測定出来なかったが計算により約 0.4/c/mg となり、この値は GM 管による実測値とかなり一致していた。

#### 文 献

- 1) 福永一夫・見里朝正・石井至: 農技研報告 C 4, 75 (1954).
- 2) Mitchell, L. C.: J. A. O. A. C. 40, 294 (1957).
- 3) 田中稔・浅見義幸: 科研報告 33, 310 (1957).

## Résumé

Radioactive BHC was synthesized from radioactive benzene labelled with  $C^{14}$ . 0.4 mc of benzene-1- $C^{14}$  (0.1 mc/1.32 mg) was diluted to 270 mg with non-labelled-benzene as carrier, and made to react with  $Cl_2$  absorbed in carbon-tetrachloride, using an apparatus shown in Fig. 1 for 29 hours under fluorescent light. Crude BHC-1- $C^{14}$  (950 mg) was obtained.

Partition chromatography using silica gel and *n*-hexane saturated with nitromethane was employed to separate each isomer. After recrystallization,  $\alpha$ -BHC-1- $C^{14}$  470 mg,  $\beta$ -BHC-1- $C^{14}$  50 mg,  $\gamma$ -BHC-1- $C^{14}$  80 mg and  $\delta$ -BHC-1- $C^{14}$

50 mg were obtained.

Radioactive  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -BHC isomers were confirmed to be chemically pure from autoradiograms of Mitchell's paper-chromatography method.

The wet combustion method using Van Slyke-Folch mixture was unable to apply for determination of the radioactivity of  $\gamma$ -BHC-1- $C^{14}$ , due to its sublimate nature.

Specific activity of  $\gamma$ -BHC-1- $C^{14}$  obtained was calculated as 0.389  $\mu$ c/mg from that of benzene-1- $C^{14}$ . Radioactivity of  $\gamma$ -BHC-1- $C^{14}$  measured by GM counter was relatively close to the calculated value.

**Systemic Nature of  $\gamma$ -BHC in Plants. Mode of Action of BHC. II.** Shoziro ISHII (National Institute of Agricultural Sciences, Nishigahara, Tokyo), Sadao ENJOJI and Katsui SEKIGUCHI (Chiba Prefectural Agricultural Experiment Station, Chiba). Received Oct. 4, 1959. *Botyu-Kagaku*, 24, 184, 1959 (with English résumé, 188).

36.  $\gamma$ -BHC の植物体内への浸透移行について BHC の作用に関する研究 II\* 石井象二郎 (農林省農業技術研究所) 円城寺定男・関口計主 (千葉県立農業試験場) 34. 10. 4 受理

放射性  $\gamma$ -BHC 乳剤をつくり、稲およびダイズに噴霧、滴下、浸漬を行い、 $\gamma$ -BHC がこれら植物体に浸透し組織を移行するか否かを調べた。オートラジオグラフの結果から、 $\gamma$ -BHC は植物体に浸透移行し難い化合物であると推定された。

## 結 言

$\gamma$ -BHC が植物体内に浸透移行して殺虫作用を現わすか否かについて論議があり、実際の害虫防除に本剤を使用する上にも重要な問題である。Kerr Jr.<sup>1)</sup>, Ehrenhardt<sup>2)</sup>, Haines<sup>3)</sup>, Lilly, and Fahey<sup>4)</sup>, Koehler and Gyrisco<sup>5)</sup> などはいずれも  $\gamma$ -BHC あるいは lindane が植物体内に浸透移行することを生物試験で証明している。一方 Starnes<sup>6)</sup> は  $\gamma$ -BHC を土壤に施用した場合、植物体内には移行しないという。

わが国では主としてニカメイチュウ防除に際し、 $\gamma$ -BHC が稲に浸透移行して作用するか否かで論議があったが<sup>7)</sup>、最近腰原・岡本<sup>8)</sup>、岡本・腰原<sup>9)</sup> は水稻移植直前に BHC 粉剤あるいはリンデン粉剤を水田土壤に施用すると、1化期ニカメイチュウを防除することができ、 $\gamma$ -BHC は水稻に吸収移行されてニカメイチュウに作用することを示した。

われわれは  $C^{14}$  標識  $\gamma$ -BHC を用いて  $\gamma$ -BHC が稲その他の作物に浸透移行するか否かを調べた。供試放射性  $\gamma$ -BHC の比放射能が、本実験の目的には充分

ではなかったが、得られた結果をとりまとめ報告する。

本研究に種々御配慮下さった千葉大学園芸学部野村健一教授、オートラジオグラフの反転、焼付の労をとられた農技研杉本渥技官に感謝の意を表する。

## 実 験

## 1. 散布試験

次の組成の放射性  $\gamma$ -BHC 乳剤を調製した。

$\gamma$ -BHC-1- $C^{14}$	15mg (6 $\mu$ c)
$\gamma$ -BHC (carrier)	35mg
xylene	1ml
Triton $\times$ 100	約 0.1ml

この原液を水で稀釈して5mlとした。散布液0.01mlは約0.012 $\mu$ c  $\gamma$ -BHC-1- $C^{14}$  を含んでいる。

千葉県立農業試験場圃場内にビニールハウスを設け、ポットに植付けた稲(分けつ4~5本)に1958年6月16日に噴霧した。稲は噴霧される茎葉以外はポリエチレンの袋で覆い、稀釈噴霧液はガラス製噴霧器に入れ、二連球を用いて、ビニールハウスの一端より噴霧した。

散布4時間後の稲を常法により富士レントゲンフィ

\* 本研究は文部省科学研究費による。結果の一部は1959年4月日本応用動物昆虫学会で発表した。