insecticide having remarkably low persistency.

Acknowledgment: We thank Dr. K. Hirota and Mr. S. Takahashi for his encouragement and we are indebted to Messrs Y. Tsujino, T. Ohtsuka, S. Yuge and H. Tamari for their technical assistance.

References

- Sanpei, N., K. Tomita, H. Tsuji, T. Yanai, H. Oka and T. Yamamoto: Ann. Sankyo Res. Lab., 22, 221 (1970).
- For biological activity: see Shinnoyaku (Sankyo Co.), 27, No.1 (1973) and 28, No.1 (1974).
- 3) Tsuji, H. and T. Mizuno: Jap. J. Sanitary

Zoology, 22, 1 (1971).

- 4) Omino, T., S. Yokoi, K. Fujita and H. Tsuji: Ann. Sankyo Res. Lab., 26, 134 (1974).
- Yokoi, S., T. Omino and H. Tsuji: Jap. J. Appl. Ent. Zool., 19, 11 (1975).
- 6) Shimada, Y. and H. Tamaki: unpublished data.
- 7) Ando, M., M. Nakagawa and T. Nakamura: Agr. Biol. Chem., 39, 803 (1975).
- Ando, M., Y. Iwasaki and M. Nakagawa: *Ibid.*,
 39, 2137 (1975).
- Nakagawa, M., M. Ando and Y. Obata: *Ibid.*, 39, 1763 (1975).
- Miyamoto, J. and Y. Sato: Botyu-Kagaku, 30, 45 (1965).

Analysis of Optically Active Allethrin in Mosquito Coils. Takenosuke Takano (Technical Division, Japan Insecticide Industrial Association) Received Sept. 7, 1976. Botyu-Kagaku, 42, 40, 1977. (with English Summary 45)

4. 蚊取線香中の光学活性アレスリンの分析 高野武之助(日本殺虫剤工業会技術部会,京都府 宇治市五ヶ庄) 51. 9. 7 受理

ガスクロマトグラフ法により蚊取線香中の光学活性アレスリン(3-allyl-2-methylcyclopent-2-en-4-on-1-yl d-cis, trans-chrysanthemate)を定量し、あわせてその幾何ならびに光学異性体を分析した。アレスリンに対する方法を準用し、光学異性体は線香から抽出して薄層クロマトグラフ法でクリーンアップしたのち、加水分解して生ずる菊酸を d-2-オクタノールのジアステレオマーエステル誘導体にしてガスクロマトグラフ法で、d-トランス、d-シスおよび l-シス型の4種の異性体を分離しピーク面積の比から異性体組成を分析した。これらの方法により線香中のアレスリン異性体の1年後の経時変化を検討し、異性体はいづれも変化がなく、定量値も平均2~3%の減少で、実用的にはほとんど変化していないことを確認した。

アレスリン(3-allyl-2-methylcyclopent-2-en-4-on-1-yl dl-cis, trans-chrysanthemate)は菊酸部位の立体配座の違いによって幾何および光学異性体があり d-シス, l-シス, d-トランスおよび l-トランスの4 種の異性体が存在し、それぞれ昆虫に対する殺虫効力が異なり、d-型が l-型よりもはるかに強い効力を有する。 最近アレスロロンと d-シス, トランス菊酸のエステルである光学活性アレスリンの工業的製造が可能となりピナミンフォルテ®なる商品名で市販され、ラセミ型のアレスリン(ピナミン®)に代って電気かとりマットや蚊取線香に使用されつつある。

日本殺虫剤工業会技術部会は、さきに蚊取線香中のアレスリンの定量法について研究し、ソックスレー抽 出器を用いてメタノールで抽出後、ガスクロマトグラフ (GC) で正確に分析できることを報告した"が、 前報に引き続きピナミンフォルテについても、その分析法を検討し、アレスリン同様に定量でき、また光学 異性体も薄層クロマトグラフ (TLC) でクリーンアップしてのち、GC により分析が可能であることを確認した。さらにピナミンフォルテ線香の1年後の経時変化についても検討したので、その結果についてもあわせて報告する。

試薬器具および装置

ピナミンフォルテ基準品 ピナミンフォルテ原体を 前報¹¹のアレスリン原体の GC 内標準法で分析し、純 度を求めたものを 線香定量用基準品に使用した。(純 度93.3%, cis/trans 比 17.4/82.6)

内標準液 (i) β -ナフトキノリン (試薬特級) 約750mg を精密にはかりアセトンを加えて溶かし、正確に 50ml として原体定量用の内標準液とする。

(ii) ステアリン酸エチル (ES) またはメチル (MS)

(いづれも試薬特級) 1g 程度を精密にはかりメタノール:アセトン (1:1) 混液 (MA 液) を加えて溶かし、正確に 50ml として線否定量用の内標準液とする。

カラム担体:60~80メッシュの酸洗い,シラン処理 したガスクロマトグラフ用 Chromosorb W (Johns Manville Inc. Co. 製)

カラム充てん剤: 線香定量用に Silicone gum SE-30をカラム担体に1.5~5.0%含浸し、幾何異性体の分析用に Silicone DC QF-1 をカラム担体に2~5% 含浸し、光学異性体の分析用には5~10%含浸する.

カラム: 内径 3~4 mm の ガラス 製またはステンレス製長さは定量用は0.8~1.5m, 幾何異性体分析用は2~3m, 光学異性体分析用は4~5m.

薄層板: 薄層クロマトグラフ用シリカゲル (けい光 剤入り) 52g に水130ml を加えて、よくかき混ぜ、縦20cm、横20cm のガラス 板にアプリケーターを用いて、0.5mm の均一な厚さに塗布する。一夜放置したのち、120°C で60分間加熱して活性化する。

1N 水酸化カリウムの50 %メタノール溶液:水酸化カリウム 70g に水 500ml を加えて溶かし、メタノールを加えて1,000ml とする.

ピリジン:水酸化ナトリウムで脱水して使用する。 トルエン:金属ナトリウムで脱水して使用する。 塩化チオニル: JIS 試薬特級

d-2-オクタノール:市販試薬を次の操作に従って 純度を求め純度95%以上のものを使用する。ピレトリン I 15mg を含む除虫菊エキスを量り、メタノール 5ml を加えてよく振り混ぜ、1N 水酸化カリウムの50 %メタノール溶液 20ml を加えて、30分間加熱還流し て加水分解する。以下次に述べる光学異性体の分析操作と同様に操作し、d-2-octyl d-trans-chrysanthemate および d-2-octyl l-trans-chrysanthemate に相当するピーク面積 Ad および Al を接線三角法によって求め、次式により d-2-オクタノールの純度(%)を算出する。 $d-2-オクタノールの純皮(%) = \frac{Ad}{Ad+Al} \times 100$

供試蚊取線番:実験に使用した共通サンプル線香の 組成は Table 1 の通りである。

Table 1. Composition of Sample Mosquito Coil.

	_ ·
Pyrethrum marc	49.00
Tabu powder	30.00
Wood flour	20.07
Pynamin forte (technical)	0.33*
Malachite green	0.30
Dehydroacetic acid	0.30
Total	100.00

* Sample coil contains 0.30% 3-allyl-2-methyl-cyclopent-2-en-4-on-1-yl d-cis, trans-chrysanthemate. (d-cis, trans-allethrin)

装置: ガスクロマトグラフ: 島津製 3B, 4B, 4BM, 5A型; 日立製 6D, K-53型; 検出器はいづれも水素炎イオン化検出器 (FID).

分析法

線香からの抽出 試料の線香1巻 (約13g) をその80 %以上が 100 メッシュを通過する微粉末とする。それらの 3~5g を精密にはかり、円筒が紙に入れソックスレー抽出器を用いて湯浴の温度 85~90° にてメタノール 100~120ml で 4 時間抽出する。メクノールをロータリーエバポレーターを用いて減圧下で留去したのち、残留物に MA 液 5~15ml を加えて浴かし試料液とする。

定量法

1. GC 操作条件

線香中の d-cis, trans-allethrin の定所の GC 操作条件の一例を示すと Table 2 の通りである.

2. 検量線の作成

ピナミンフォルテ基準品約 250mg を精密にはかり MA 液を加えて溶かし、正確に 25ml とする。この液

Γable 2. Conditions of Gas-Liquid Chromatography for d-cis, trans-Allethrin Assay in Mosquito Coils.

Apparatus : Shimadzu GC-3BF, FID Detector.

Column : Spiral glass tube $(1.2m \times 3mm\phi)$

Liquid phase: 5% SE-30, Supportor: Chromosorb W (AW, DMCS, 60-80 mesh)

Column temperature: 190° Injection temperature: 230°

Carrier gas : N₂; 40ml/min.

FID Gas flow rate: H₂; 40ml/min. Air; 0.8 l/min.

Range sensitivity : 16×10^2 Chart speed : 10 mm/min. 1, 2, および 3ml を正確にとり、それぞれにステアリ ン酸エチル (ES) またはメチル (MS) 内標準液 1ml を正確に加え、さらに MA 液を加えて 5ml とする。

これらの液の 1µl をそれぞれ 10µl のシリンジ中に 採収し、これらのものにつき上記の条件でガスクロマ トグラフ法によって試験を行ないピナミンフォルテ基 準品およびES または MS のピーク高さを測定し、ピ ナミンフォルテ基準品の ES または MS に対する重量 比を横軸にピーク高さの比を縦軸にとって検量線を作 成する.

3. 定量操作

線香から抽出した試料液に ES または MS 内標準液 $1 \, \mathrm{m} l$ を正確に加えてよく振り混ぜ、この液 $1 \mu l$ につき 上記の条件でガスクロマトグラムを測定し、ピナミン フォルテの ES または MS に対するピーク高さの比を 計算して検量線からそれに対応する重量比Aを求め次 式により d-cis, trans-allethrin の含量を算出する.

線香中の d-cis, trans-allethrin 含量(%)

試料線香の重量 (mg)

ただし、Pはピナミンフォルテ基準品の純度(%)と する.

幾何異性体の分析

1. GC 操作条件

幾何異性体分析の GC 操作条件の一例を示すと Table 3 の通りである.

2. 分析操作

線香から抽出した 試料液 1.0μl を 10μl のシリンジ 中に採取し、このものについて上記の条件(Table 3) でガスクロマトグラムを測定し、allethrolone d,lcis-chrysanthemate および allethrolone d, l-transchrysanthemate の順に溶出するピークの面積をそれ ぞれ接線三角法によって求め、面積比 cis/trans を求

光学異性体の分析

1. GC 操作条件

光学異性体 (d, l-体) 分析の GC 操作条件の一例を 示すと Table 4 の通りである.

2. 分析操作

線香からの抽出(試料)液の溶媒を減圧で留去し, 残留物にメタノール 2ml を加えてよく 振り混ぜ、 こ の液全量を薄層板に両端約 2cm を残して線状にスポ ットする. 別にピナミンフォルテ原体約 15mg にメタ ノール 5ml を加えて浴かした液 0.005ml づつを薄層

Table 3. Conditions of Gas-Liquid Chromatography for Analysis of Geometrical Isomers. (cis/trans ratio)

Apparatus

: Shimadzu GC-4BPF, FID Detector.

Column

: Spiral glass tube $(2.0m \times 4mm\phi)$

Liquid phase: 2% DC QF-1, Supportor: Chromosorb W (AW, DMCS, 60-80 mesh)

Column temperature: 150°

Injection temperature: 230° Detector temperature: 210°

Carrier gas

: N₂; 40ml/min.

FID Gas flow rate

: H₂; 40ml/min., Air; 0.8 l/min.

Range sensitivity

: 8×10²

Chart speed

: 10 mm/min.

Table 4. Conditions of Gas-Liquid Chromatography for Analysis of Optical Isomers.

Apparatus

: Shimadzu GC-5APF, FID Detector.

Column

: Spiral glass tube $(5.0m \times 3mm\phi)$

Liquid phase: 10% DC QF-1, Supportor: Chromosorb W (AW, DMCS, 60-80 mesh)

Column temperature: 145° Injection temperature: 200°

Detector temperature: 200°

Carrier gas

FID Gas flow rate

: N_2 ; 40ml/min.

: H₂; 40ml/min., Air; 0.8 l/min.

Range sensitivity

: 8×10²

Chart speed

: 5 mm/min.

板の両端にスポットする。つぎに、ヘキサン:アセトン混液(4:1)を展開溶媒として約 12cm 展開したのち海層板を風乾する。これに紫外線(波長 254mμ)を照射し、ピナミンフォルテ原体の溶液から得たスポットと同一 Rr 値を示す試料液から得たスポット(借状)のシリカゲルをかきおとし、ガラス 沪 過 器(11 G-4)に入れクロロホルム 15ml づつで3回よくかき混ぜながら吸引沪過する。全沪液を合わせ、クロロホルムを減圧で留去する。

残留物にメタノール 5ml を加えて溶かし、1N 水酸 化カリウムの50% メタノール溶液20mlを加え,30 分間加熱還流して加水分解する。 冷後, 水 20ml を加 え, クロロホルム 10ml づつで3回洗い, 洗液はすて る. うすめた塩酸 (1→2) 10ml を加えて酸性とし, クロロホルム 10 ml づつで3回よく振り混ぜて抽出す る. 全クロロホルム抽出液を合せ無水硫酸ナトリウム 5g を加えて脱水し、沪過したのち、 残渣をクロロホ ルム 10ml で洗い、沪液および洗液を合せ、 減圧でク ロロホルムを留去する. 残留物にピリジンのトルエン 溶液 (1→50) 0.25ml, 塩化チオニルのトルエン溶液 (2→25) 0.25ml および d-2-オクタノールのトルエン 溶液 (1→5) 0.25ml を順次加え、水浴上で20分間加 熱する. 冷後, この液 0.5 μl を 10 μl のシリンジ中に 採取し、Table 4 の条件で GC 分析し、ピークの保持 時間の比が約 1.00および 1.16の位置に溶出する d-2octyl d-cis および d-2-octyl d-trans-chrysanthemate に相当するピークと、ピークの保持時間の比が 約1.08および1.25の位置に溶出するそれぞれ I-cis-型 および I-trans-型に相当するピークを求め、各ピーク の面積を接線三角法によって算出し次式により d-cis. trans-allethrin の比 (R) を計算する.

$$R = \frac{Adc + Adt + \frac{100 - P}{2P - 100}(Adc + Adt - Alc - Alt)}{Adc + Alc + Adt + Alt}$$
×100

ただし、Pは d-2-octanol の純皮 Adc, Alc, Adt, Alt はそれぞれ d-cis 型, l-cis 型, d-trans 型, l-trans 型の面積

実験結果および考察

ピナミンフォルテ原体の分析

1. 定量: ピナミンフォルテ原体の定量は前報^Dのアレスリン原体の定量と同様にして定量できる。この方法によりピナミンフォルテ原体を定量した結果はTable 5 の通りである。

2. 幾何異性体の分析: アレスリン中にはd, l-trans型とd, l-cis型の2つの幾何異性体が存在し、これら異性体は DC QF-1 で完全に分離することが村野らなによって発表されている。ピナミンフォルテ原体の幾何異性体比を測定するため、原体の10mg/ml アセト

Table 5. Analysis of (d-cis, trans-) Allethrin in Technical Pynamin Forte.

Laboratory	Purities	of Pynar	nin Forte	Mean
A	92.9%	93.2%	93.3%	93.1%
В	94.4	91.9	93.7	91.3
С	91.5	91.5	93.0	92.0
D	94.5	94.7	94.0	94.4
K	93.4	92.0	92.6	92.6
N	92.8	92.5	93.3	92.9
S	93.1	92.5	93.0	92.9
T	94.2	94.9	94.1	94.4
Mean x				93.3

ン溶液をつくり、Table 3の GC 操作条件でガスクロマトグラムを測定して、各ピークの面積を接線三角法によって求め、面積比から cis/trans 比を求めた結果は17.4/82.6であった。

3. 光学異性体の分析:ピナミンフォルテの光学異性体は、これを加水分解して得られる菊酸の光学異性に由来するので、この菊酸を光学活性の d-または l-2-octanol とエステル化してジアステレオマー誘導体とし、DC QF-1で d-トランス、l-トランス、d-シスおよび l-シスがそれぞれ分離できることを村野"が報告している。ピナミンフォルテ原体の d:l 比を分析するため原体の 15mg を 5ml のメタノールに溶かし、以下上記光学異性体の分析操作における特所分離以後の操作を行ない、Table 4 の GC 操作条件でガスクロマトグラムを測定して、各ピークの面積を接線三角法によって求め、d-型比Rを算出した結果は97.5%であった。

線香中のピナミンフォルテの分析

実験に使用した共通サンプル線香は1974年7月に作成して、これを8月に配布し、8~9月の間に各実験室で分析した。また同じ線香を室内保管したものを1975年の8~9月の間に同様分析して1年後の経時変化を検討した。

1. 定量:共通サンプル線香を各実験室で定量した 結果は Table 6 の通りである。

1975年の分析は実験のくり返し数(n)が少ないため1974年に比べやはり偏差がやや大きい(σ 0.0135)が、各実験室の定量値の平均値は1974年(製造直後)が0.304%、1975年(1年経過)が0.297%となり、1年で約2%強の減少が見られた。しかしこの結果は今まで線香は1年で約1割の有効成分の減少が起こるとされていた通念をくつがえすもので、供試した共通サンプル線香においては1年の経時変化は実用的には無視し得るものと考えられる。

Table 6. Optically Active Allethrin Assay in the Mosquito Coil.

Laboratory	1974(n=5)	1975 (n=3)
Α	0.287 %	- %
В		0.297
С	0.299	0.274
D	0.311	0.293
E	0.298	0.275
F	0.297	0.288
G	0.319	0.318
Н	_	0.301
I	0.293	0.295
J	_	0.283
K	0.318	0.289
L	_	0.313
N	0.315	0.298
P	_	0.302
S	0.304	0.314
T	0.298	0.295
Ū	_	0.313
W	0.299	0.278
Z	0.310	0.313
Mean X	0.304	0. 297
Standard Deviation o	0.0096	0.0135

Table 7. The Ratio of Geometrical Isomers (cis/trans) of Pynamin Forte in the Mosquito Coil.

Laboratory	1974 (n=5)	1975 (n=3)	
A	0.218	0.204	
В	0.210	0.214	
С	0.219	0.247	
D	0.193	0.197	
E	0.215	0.207	
F	0.205	0.200	
G	0.216	0.218	
I	· —	0.208	
J	_	0.209	
K	0.212	0.205	
N	0.208	0.188	
S	0.200	0.200	
T	0.215	0.229	
W	0.217	0.235	
Z	0.204	0.202	
Mean x	0. 210 (17. 4/82. 6)	0. 211 (17. 45/82. 55)	
Standard Deviation σ	0.0077	0.0151	

2. 幾何異性体の分析

上記分析法の幾何異性体の分析操作により分析した 結果は Table 7 の通りである。

この表から分かるように、 線香抽出液でも原体の場

合と同様、GC で何ら妨害なく幾何異性体のピーク面 積から、その比が求められる。1975年の数値は実験の くり返し数(n)が少ないため、偏差が若干大きいが、 平均値(x)は0.211と1974年の結果並に原体の幾何異 性体比0.210と極めて近似し、幾何異性体は線香の製 造途中は勿論、1年経過しても変化していないことが 分かる。

光学異性体の分析

上記分析法の光学異性体の分析操作により分析した 結果は Table 8 の通りである。

Table 8. Assay of Optical isomers (d-isomers) of Pynamin Forte in the Mosquito Coil.

Laboratory	d-isomers % (1974)	d-isomers % (1975)
A	_	97.6
F	97.4	_
G	98.6	98.2
K	97.5	_
S	97.8	97.5
T	_	97.3
Mean v	97.8	97.7

Purity of d-2-octanol: 98.2%

これらの結果は分析操作に述べた如く線香抽出液をシリカゲル海回板にて海回分離し、ピナミンフォルテに相当する部分のシリカゲルをかきとり、クロロフォルムで抽出したのち、菊酸部分を d-2-オクタノールでエステル化して得られたジアステレオマー誘導体を Table 4 の GC 操作条件で分析したもので、TLC によるクリーンアップを行なうことにより分析操作の前処理(加水分解、エステル化等)を妨害する抽出物中の夾雑物を除去でき、原体の場合と同様支障なく GC 分析ができた。Table 8 より光学異性体も線香製造途中は勿論 1 年後の経時変化も起こっていないことが分かる。

結 論

(1)蚊取線香中の光学活性アレスリンの定量は前報のアレスリン(ラセミ体)の定量法と全く同一の操作法, GC 条件で定量でき, 各実験室の共通サンプルの定量結果はほぼ満足すべき結果を得た.

(2)蚊取線香中の光学活性アレスリンの分析を幾何異性体、光学異性体について、それぞれ GC 法で行ない、幾何異性体については抽出液をそのまま、また光学異性体については抽出液を TLC で分離することにより、いづれもアレスリン異性体原体の分析法を適用できることを確かめ、それによって各実験室で共通サンプル

線香の分析を行なった結果。 それらの値はよく一致した。

(3)共通サンプル線香を1年間室内保存した場合の経時変化は幾何異性体比,光学異性体比には何ら変化は認められなかったが、残存率で97.7%と約2%強の減少が見られた。しかしての程度の減少は実用的にはほとんど経時変化しないものと考えられ、線香中ではかなり安定であることが分かった。

本研究に関してで協力をいただいた日本殺虫剤工業 会技術部会の方々に厚くお礼を申し上げます。

引用文献

- 1) 高野武之助: 防虫科学, 39, 96 (1974).
- 2) 村野 敦, 堀場正雄:分析化学, 20, 789 (1971).
- 3) Murano, A.: Agr. Biol. Chem., 36, 2203 (1972).

Summary

A method for analysis of optically active allethrin (3-allyl-2-methylcyclopent-2-en-4-on-1-yl *d-cis, trans*-chrysanthemate) in mosquito coils was carried out by gas chromatography.

The content of optically active allethrin in mosquito coils was determined by the method described in our previous paper.10 Geometrical isomers were separated from each other under the GC conditions of Table 3 and their proportions were estimated from their peak area ratios. Optical isomers were determined as follows: the extract from mosquito coil was cleaned up by TLC and the separated allethrin was hydrolysed to chrysanthemic acids. The chrysanthemic acids were esterified with d-2-octanol and the diastereoisomer ester derivatives were resolved under the GC conditions of Table 4. The peak areas of the isomers were calculated by a triangulation method and the isomer composition was determined from the peak area ratios.

After one year storage at room temperature, the loss of allethrin content in mosquito coils was only 2-3% and such reductions are out of the problem in practice. The optical and geometrical isomerizations of allethrin did not occur even after one year storage.

Effects of Methoprene with Juvenile Hormone Activity on the Oviposition of the Oriental Horned Wax Scale, Ceroplastes pseudoceriferus Green. Shoji Asano and Masaharu Kamer (Laboratories of Agricultural Chemicals Research, Tokushima Factory, Otsuka Pharmaceutical Co., Ltd. Kawauchi, Tokushima, Japan) Received Sept. 24, 1976. Botyu-Kagaku, 42, 45, 1977. (with English Summary 49)

幼若ホルモン (JH) 様活性を有する methoprene は、10月~4月に野外から採集したツノロウムシの産卵を、採集時期に関係なく促進した。 $0.04~\mu g/$ 早以上の処理薬量においては、産下された卵のふ化が著しく抑制された。

ツノロウムシは、種々の果樹、特用作物や庭木類に寄生し、年1回発生、6月下旬から8月下旬の幼虫期を除くと、すべて成虫態で生活する。さきに、筆者らはの、2月から4月に採集した越冬成虫に、幼若ホルモン (JH) 様活性物質の methoprene を処理すると、産卵の開始する時期が早められ、0.04μg/早以上の処理薬量では、産下卵のふ化が著しく抑制されることを報告した。JH 活性を有する物質が昆虫の産卵を促すことは、他の種でも認められ^{1,2,4,5}、その卵のふ化が阻害されることも報告されている^{4,7}。一般に、発育段階のある限られた時期が、JH 活性に高い感受性を示すといわれている^{1,0}。2~4月に野外の寄主植物か

ら離したツノロウムシ成虫は、加温によっても産卵を開始し、その度合は、採集時期の遅い個体ほど早い、しかし、methoprene を処理した個体の産卵は、採集時期とは関係なく早められ、一定期間後に産卵がみられた。。今回、こうした、methoprene の産卵におよぼす作用を、10~1月に採集したツノロウムシ成虫について調べ、先報。の結果と合せて考察した。

本文に先立ち、報告をまとめるに際し、助言と論議 を願った大塚製薬株式会社第2研究所の島田秀弥、根 岸務、釜田壹および石渡武敏の各位、供試昆虫の採集 に協力を戴いた郡隆雄氏、並びに本稿の校閲を賜わっ た島根大学農学部長沢純夫博士に心から感謝する。